

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**“ESTUDO DO POTENCIAL ENZIMÁTICO DE MICRO-
ORGANISMOS ENDOFÍTICOS PARA A
BIOTRANSFORMAÇÃO DE PRODUTOS NATURAIS E
ANÁLOGOS SINTÉTICOS”**

Bianca Ferreira da Silva*

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de DOUTOR EM CIÊNCIAS, área de concentração: QUÍMICA ORGÂNICA.

Orientador: Prof. Dr. Edson Rodrigues Filho

*** bolsista FAPESP**

**São Carlos - SP
2009**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**“ESTUDO DO POTENCIAL ENZIMÁTICO DE MICRO-
ORGANISMOS ENDOFÍTICOS PARA A
BIOTRANSFORMAÇÃO DE PRODUTOS NATURAIS E
ANÁLOGOS SINTÉTICOS”**

Bianca Ferreira da Silva*

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de DOUTOR EM CIÊNCIAS, área de concentração: QUÍMICA ORGÂNICA.

Orientador: Prof. Dr. Edson Rodrigues Filho

*** bolsista FAPESP**

**São Carlos - SP
2009**

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da
Biblioteca Comunitária/UFSCar**

S586ep

Silva, Bianca Ferreira da.

Estudo do potencial enzimático de micro-organismos endofíticos para a biotransformação de produtos naturais e análogos sintéticos / Bianca Ferreira da Silva. -- São Carlos : UFSCar, 2009.

187 f.

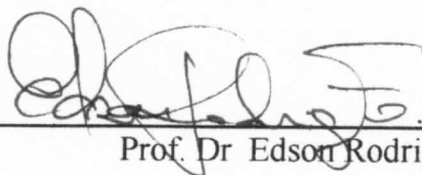
Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2009.

1. Química orgânica. 2. Biotransformação. 3. Microorganismos endofíticos. 4. Flavonoides. 5. Oxigenases. I. Título.

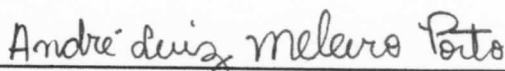
CDD: 547 (20^a)

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia
Departamento de Química
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA
Curso de Doutorado

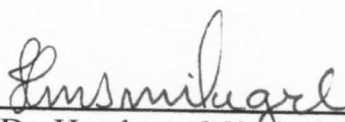
Assinaturas dos membros da banca examinadora que avaliaram e aprovaram a defesa de tese de doutorado da candidata Bianca Ferreira da Silva, realizada em 27 de novembro de 2009.



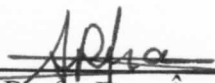
Prof. Dr. Edson Rodrigues Filho



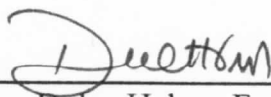
Prof. Dr. Andre Luiz Meleiro Porto



Prof. Dr. Humberto Márcio Santos Milagre



Profa. Dra. Ângela Regina Araújo



Profa. Dra. Dulce Helena Ferreira de Souza

“Bom mesmo é ir a luta com determinação, abraçar a vida com paixão, perder com classe e vencer com ousadia, pois o triunfo pertence a quem se atreve... A vida é muita para ser insignificante.”

Charles Chaplin

“I am among those who think science has great beauty. A scientist in his laboratory is not only a technician: he is also a child placed before natural phenomena which impress him like a fairy tale.”

Marie Curie

DEDICATÓRIA

À **Deus**, por me dar forças para vencer todos os meus objetivos.

Ao meu marido **Marco Antonio Navarro Vasconcellos**, a quem muito amo e admiro, pelo constante e incondicional apoio, paciência, compreensão e principalmente companheirismo.

Aos meus pais, **Maria Helena Bianqueti da Silva e Adilson Ferreira da Silva**, que me mostraram a importância de buscar a realização e felicidade além do eterno apoio em todos os momentos, minha eterna gratidão.

Ao meu irmão **Osmair** e minha cunhada **Suzana**.

As minhas sobrinhas queridas, **Beatriz e Gabriela**, que mesmo longe estão sempre presentes em meus pensamentos.

A toda a minha família pelo carinho e apoio.

E, em especial, aos meus amigos **Enzo, Zeh, Florim, Mari, Nat, Diego, Elaine, Cintia e Renato** pelo apoio em todos os momentos.

AGRADECIMENTOS

Ao **Prof. Dr. Edson Rodrigues-Filho**, do DQ-UFSCar, pela oportunidade, orientação, ensinamentos e amizade. Muito obrigado!!

To **Dr. Kurt Faber** and **Dr. Wolfgang Kroutil**, from University of Graz, for being a wonderful host during 12 months in Graz - Austria, for all support, friendship, and for having introduced me *all spirit of biocatalysis*.

To **Miguel, Francesco, Dorina, Dominik, Clemens, Babsi, Petra, Birgit, Iván** and **Michael** for all attention, friendship and technical support.

Aos **Profa. Dra. Quézia Bezerra Cass, Prof. Dr. Antônio Gilberto Ferreira, Profa. Dra. Dulce Helena Ferreira de Souza, Profa. Dra. Regina Oliveira, Prof. Dr. Tiago, Prof. Dr. Moacir**, do DQ-UFSCar e ao **Prof. Dr. Alcindo dos Santos**, do IQ-USP, pela amizade e discussões científicas.

Aos professores **Prof. Dr. João Batista Fernandes, Profa. Dra. Maria Fátima das Graças Fernandes da Silva** e **Prof. Dr. Paulo César Vieira**, do Laboratório de Produtos Naturais – UFSCar, pela amizade e ensinamentos na graduação e pós-graduação.

Aos demais professores do DQ-UFSCar.

Ao corpo técnico do DQ-UFSCar: **Ademir, Doraí, Paula, Luciana, Paulo e Valdir**.

Aos demais técnicos do DQ-UFSCar.

Ao Programa de Pós-Graduação em Química – UFSCar e suas secretárias, **Ariane, Luciana e Cristina**.

Aos amigos de ontem, hoje e sempre, do Laboratório de Bioquímica Micromolecular de Micro-organismos – UFSCar: **Murgu, Grace, Francinete**,

Regina, Cebolinha, Ana Paula, Ângela, Afonso, Antônia, Andrey, Paschoalino, Fabiana, Renata, LF, LH, Elaine, Luciana, Taícia, Thaís, Livia, Marília, Diego, Amanda, Cíntia, Malu, Zé, Ângelo, Enzo, Victor, Florim, Heloisa, Mariana, Heloísa, Adriana, Carol, Monize, Thaísa. Muito obrigado pela amizade ao longo de todo esse tempo!

Aos demais amigos do Laboratório de Produtos Naturais, Laboratório de Síntese Inorgânica, Laboratório de Síntese Orgânica, Laboratório de Cromatografia Líquida.

Aos demais amigos do DQ-UFSCar e à toda a turma 2001 do curso de Bacharelado em Química – UFSCar.

Em especial aos meus grandes amigos **Rodrigo, Joel e Gezimar** pelo apoio, amizade e diversas discussões futurísticas. Vocês moram no meu coração!

A FAPESP, pela bolsa de doutorado direto concedida e também por todo o apoio concedido aos nossos laboratórios.

A CAPES, pela bolsa de doutorado *sandwich* concedida e por todo o apoio fornecido aos nossos laboratórios.

Ao CNPq e a FINEP, pelo apoio financeiro.

Deixo aqui registrado o meu agradecimento a todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

| | |
|---------------------|--|
| CG | - Cromatografia a Gás |
| CG-EM | - Cromatografia a Gás acoplada a espectrometria de massas |
| CCDA | - Cromatografia em camada delgada analítica |
| CCDP | - Cromatografia em camada delgada preparativa |
| CC | - Cromatografia em coluna |
| CLAE | - Cromatografia líquida de alta eficiência |
| CLAE-EM | - Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massas |
| EM | - Espectrometria de massas |
| CIT | - Cromatograma de íons totais |
| eV | - Eletrons volt |
| EI | - Energia de ionização |
| h | - Altura |
| L | - Litro |
| μL | - Microlitro |
| min | - Minuto |
| s | - Singleto |
| t | - Tripleto |
| d | - Dubleto |
| dd | - Duplo dubleto |
| EFS | - Extração em fase sólida |
| tr | - Tempo de retenção |
| ODS | - Octadecilsilano |
| <i>m/z</i> | - Relação massa/carga |
| RMN ¹ H | - Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio |
| RMN ¹³ C | - Ressonância Magnética Nuclear de Carbono |
| 1 D | - Experimentos de RMN em uma dimensão |
| 2 D | - Experimentos de RMN em duas dimensões |
| <i>J</i> | - Constante de acoplamento em Hertz |
| Hz | - Hertz |
| nOe | - Nuclear Overhouser Effect |
| HMBC | - Heteronuclear Multiple Bond Correlation |

| | |
|-----------|---|
| UV | - Ultravioleta |
| δ | - Deslocamento químico em partes por milhão (ppm) |
| ϕ | - Diâmetro |
| λ | - Comprimento de onda |
| PAL | - <i>Phenylalanine-amoniliase</i> |
| Pág. | - página |

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|-----|
| TABELA 1.1 – Vantagens e desvantagens de biocatalisadores e enzimas ² | 2 |
| TABELA 3.1 – Condições do espectrômetro de massas para as amostras com naringina (ESI+)..... | 37 |
| TABELA 3.2 – Condições do espectrômetro de massas para hesperidina e rutina (ESI+)..... | 38 |
| TABELA 4.1 – Valores de RMN ¹³ C da literatura, amostra padrão e produto biotransformado, respectivamente..... | 59 |
| TABELA 4.2 – Correlações obtidas pelo HMBC – produto de biotransformação..... | 61 |
| TABELA 4.3 – Possíveis massas obtidas para os flavonóides após as reações de permetilação..... | 81 |
| TABELA 4.4 – Dados dos deslocamento químicos dos hidrogênios observados para a naringina metoxilada..... | 83 |
| TABELA 4.5 – Dados dos deslocamentos químicos observados para os hidrogênios da hesperidina metoxilada..... | 90 |
| TABELA 4.6 – Dados dos deslocamento químicos obtidos para a amostra da rutina metoxilada..... | 94 |
| TABELA 4.7 - Dados de RMN ¹ H obtidos para 1-indanona padrão e dihidrocoumarina..... | 120 |
| TABELA 5.1 – Resumo das biotransformações obtidas..... | 176 |

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| FIGURA 1.1 – Ilustração hipotética da interação bioquímica entre fungos e plantas. Em A o contacto do fungo com a planta induz a biossíntese de fitoalexinas; em B , o fungo detoxifica essas fitoalexinas..... | 7 |
| FIGURA 1.2 – Biotransformação da pisatina por <i>Fusarium solani</i> | 8 |
| FIGURA 1.3 – Biotransformação da MBOA e BOA..... | 9 |
| FIGURA 1.4 – Biotransformação esteroeletiva da tioridazina..... | 9 |
| FIGURA 1.5 – Estruturas moleculares dos meroterpenos isolados de <i>Penicillium brasilianum</i> (1-3) e dos limonóides (4-6) característicos de Meliáceas..... | 14 |
| FIGURA 1.6 – Estruturas químicas das chalconas, flavonóides e isoflavonóides..... | 16 |
| FIGURA 1.7: Metabólitos das transformações microbianas obtidas a partir da flavanona (15)..... | 18 |
| FIGURA 1.8 – Meroterpenos produzidos por <i>Penicillium brasilianum</i> | 23 |
| FIGURA 1.9 – Biotransformação da cânfora por <i>Penicillium brasilianum</i> | 24 |
| FIGURA 1.10 – Desmetilação da cafeína por <i>Penicillium griseoroseum</i> | 24 |
| FIGURA 4.1 – <i>Penicillium griseoroseum</i> isolado dos frutos do café..... | 54 |
| FIGURA 4.2 – Biotransformação da cafeína..... | 55 |
| FIGURA 4.3 – Mecanismo proposto para a conversão da cafeína em teofilina..... | 55 |
| FIGURA 4.4 – Estrutura química da 5,7,3',4',5'-pentametóxi-flavanona..... | 57 |
| FIGURA 4.5 – Espectros de hidrogênio da amostra padrão (A) e do produto de biotransformação (B) (CDCl ₃ – 400MHz)..... | 58 |
| FIGURA 4.6 – Estrutura semelhante entre amostra padrão, dados da literatura e produto biotransformado, indicados pelos ¹³ C..... | 60 |
| FIGURA 4.7 – Espectro de HMBC do produto de biotransformação..... | 60 |
| FIGURA 4.8 – Correlações similares a amostra padrão e produto biotransformado..... | 61 |
| FIGURA 4.9 – Irradiação sobre o hidrogênio em δ 2,52 e δ 6,18, respectivamente..... | 62 |
| FIGURA 4.10 – Irradiação sobre o hidrogênio das metilas..... | 63 |
| FIGURA 4.11 – Irradiação sobre o hidrogênio em 2,10ppm..... | 63 |

| | |
|--|----|
| Figura 4.12 – Estrutura proposta para o produto biotransformado..... | 64 |
| FIGURA 4.13 - I) Correlações existentes no espectro de HMBC; II) Correlações dos espectros de NOE: a) FIGURA 4.9, b) FIGURA 4.11 e c) FIGURAS 4.9 e 4.10..... | 65 |
| FIGURA 4.14 – Espectros de massas: íons fragmentos de m/z 553 e espectro de varredura de íons, respectivamente..... | 65 |
| FIGURA 4.15 – Esquema de fragmentação sugerido para a estrutura proposta..... | 66 |
| FIGURA 4.16 – Flavonóides substituídos com grupos benzílicos..... | 67 |
| FIGURA 4.17 – Flavonóides glicosilados utilizados..... | 68 |
| FIGURA 4.18 – (A) Amostra controle (meio + naringina), (B) Amostra contendo fungo +meio + naringina em 279nm..... | 70 |
| FIGURA 4.19 – Cromatogramas em 284nm das amostras: (A) meio + hesperidina e (B) meio + fungo + hesperidina..... | 71 |
| FIGURA 4.20 - A) Cromatograma do extrato da biotransformação da hesperidina; B) Espectros de UV das bandas indicadas..... | 72 |
| FIGURA 4.21 – Espectro de massas obtido para a banda em 14,22 minutos, onde observa-se a presença da hesperidina (m/z 609)..... | 72 |
| FIGURA 4.22 – Espectro de massas obtido para a banda em 9,77 minutos, referente a banda assinalada em azul..... | 73 |
| FIGURA 4.23 – Espectro de fragmentos de m/z 689..... | 73 |
| FIGURA 4.24 – Proposta de fragmentação para a hesperidina biotransformada..... | 74 |
| FIGURA 4.25 – Cromatogramas sobrepostos, em preto representado pelo meio líquido e substrato; azul meio líquido e fungo; rosa meio líquido, fungo e substrato, sendo (A) naringina, (B) hesperidina e (C) Rutina..... | 75 |
| FIGURA 4.26 – <i>Aspergillus flavus</i> isolado de <i>Murraya paniculata</i> | 77 |
| FIGURA 4.27 – Estruturas das principais aflatoxinas produzidas por <i>Aspergillus flavus</i> | 77 |
| FIGURA 4.28 – Cromatogramas obtidos para as amostras: (A) meio + fungo, (B) meio + fungo + naringina e (C) meio + naringina (indicada pela seta) e seu respectivo espectro de UV..... | 78 |

| | |
|--|----|
| FIGURA 4.29 – CCDA após a realização de CCDP, onde as substâncias assinaladas foram analisadas por EM e RMN ¹ H, sendo: (A) naringina, (B) rutina e (C) hesperidina, com seus respectivos sistemas de eluição..... | 80 |
| FIGURA 4.30 – Espectro de hidrogênio da naringina polimetoxilada (400MHz – CDCl ₃)..... | 82 |
| FIGURA 4.31 – Proposta para a formação de <i>m/z</i> 707 com a adição de uma metoxila a mais..... | 84 |
| FIGURA 4.32 – Esquema proposto para a formação de <i>m/z</i> 707..... | 85 |
| FIGURA 4.33 – Espectro de massas obtido para amostra Prep2_naringina metoxilada..... | 85 |
| FIGURA 4.34 – Espectro de íons filhos de <i>m/z</i> 707, 17eV..... | 86 |
| FIGURA 4.35 – Proposta de fragmentação para a perda de açúcar fornecendo o pico base em <i>m/z</i> 315..... | 86 |
| FIGURA 4.36 – Espectro de varredura de íons da amostra B (CCDA C da FIGURA 4.26)..... | 87 |
| FIGURA 4.37 – Espectro de íons fragmentos de <i>m/z</i> 737..... | 88 |
| FIGURA 4.38 – Proposta de fragmentação para a obtenção de <i>m/z</i> 345..... | 88 |
| FIGURA 4.39 – Espectro de hidrogênio da hesperidina polimetoxilada (400MHz – CDCl ₃)..... | 89 |
| FIGURA 4.40 – Espectro de varredura de íons para a amostra da rutina metoxilada..... | 91 |
| FIGURA 4.41 – Espectro de íons fragmentos para <i>m/z</i> 751..... | 92 |
| FIGURA 4.42 – Esquema de fragmentação para <i>m/z</i> 751 para a obtenção de <i>m/z</i> 361, correspondente a perda do açúcar metoxilado..... | 92 |
| FIGURA 4.43 – Espectro de hidrogênio para a rutina polimetoxilada (400MHz – CDCl ₃)..... | 93 |
| FIGURA 4.44 – Estruturas químicas dos produtos de metilação da naringina: (1) anel C fechado e (2) anel C aberto..... | 95 |
| FIGURA 4.45 – Cromatogramas sobrepostos: (A) Somente fungo; (B) Fungo + naringina polimetoxilada; (C) Naringina polimetoxilada e seu espectro de UV.. | 95 |
| FIGURA 4.46 – Cromatogramas obtido das amostras: (A) meio + fungo, (B) meio + fungo + naringina polimetoxilada e (C) meio + naringina polimetoxilada (indicada pela seta) e seu respectivo espectro de UV..... | 96 |

| | |
|---|-----|
| FIGURA 4.47 – Esquema geral para a obtenção das agliconas..... | 98 |
| FIGURA 4.48 – Cromatogramas obtidos para os padrões naringenina e hesperetina e seus respectivos espectros de UV..... | 99 |
| FIGURA 4.49 – Análises realizadas para naringenina..... | 100 |
| FIGURA 4.50 – Análises realizadas para hesperetina..... | 101 |
| FIGURA 4.51 – Cromatogramas: (A) Somente meio, (B) Meio e fungo, (C) Meio e hesperetina e (D) Meio + fungo + hesperetina..... | 103 |
| FIGURA 4.52 – Cromatogramas: (A) Somente meio, (B) meio e fungo, (C) meio e naringenina e (D) meio + fungo + naringenina..... | 104 |
| FIGURA 4.53 – Análises por CLAE/UV-EM para a amostra contendo hesperetina como substrato..... | 105 |
| FIGURA 4.54 – Experimento de íons fragmentos para m/z 303..... | 106 |
| FIGURA 4.55 – Experimentos realizados com a amostra contendo meio + fungo + naringenina..... | 108 |
| FIGURA 4.56 – Biotransformação das agliconas naringenina e hesperetina.. | 109 |
| FIGURA 4.57 – Reação de metilação da 2',4',6'-trihidroxiacetofenona..... | 110 |
| FIGURA 4.58 – Espectro de hidrogênio da 2',4',6'-trimetóxiacetofenona (200MHz – CDCl ₃)..... | 110 |
| FIGURA 4.59 – Estrutura química do produto 2',4',6'-trimetóxiacetofenona metilado..... | 111 |
| FIGURA 4.60 – CCDA das amostras do extrato orgânico do experimento contendo 2',4',6'-trimetoxiacetofenona e produto de biotransformação purificado através de CCDP..... | 112 |
| FIGURA 4.61 – Cromatograma referente ao produto de biotransformação isolado via CCPD e seus respectivos espectros de UV..... | 113 |
| FIGURA 4.62 – Espectros de massas da banda em 12,08 minutos e espectro de íons fragmentos de m/z 197..... | 113 |
| FIGURA 4.63 – Espectros de massas da banda em 14,55 minutos e espectro de íons produtos de m/z 231..... | 114 |
| FIGURA 4.64 – (A) Espectro de massas simulado e (B) espectro de massas real da amostra biotransformada..... | 115 |
| FIGURA 4.65 – Espectro de hidrogênio da amostra biotransformada (200MHz – CDCl ₃)..... | 115 |

| | |
|---|-----|
| FIGURA 4.66 – Produtos biotransformados: 4'-hidroxi-2',6'-dimetoxiacetofenona e 3'-cloro-4'-hidroxi-2',6'-dimetoxiacetofenona..... | 116 |
| FIGURA 4.67 – Espectro de hidrogênio da amostra isolada. (200MHz – CDCl ₃)..... | 117 |
| FIGURA 4.68 – Estrutura proposta com os dados do espectro de hidrogênio..... | 118 |
| Figura 4.69 – Cromatograma da amostra isolada e seu respectivo espectro de massas..... | 118 |
| FIGURA 4.70 – Estrutura proposta para o produto do metabolismo secundário do fungo..... | 119 |
| FIGURA 4.71 - Espectro de hidrogênio da dihidrocoumarina obtida via reação de oxidação da 1-indanona (200MHz – CDCl ₃)..... | 120 |
| FIGURA 4.72 - Estruturas químicas das substâncias: (1) 1-indanona padrão e (2) dihidrocoumarina..... | 121 |
| FIGURA 4.73 – <i>Penicillium brasilianum</i> isolado como endofítico de <i>Melia azedarach</i> | 121 |
| FIGURA 4.74 – Espectro de hidrogênio da amostra biotransformada (400MHz - CDCl ₃)..... | 123 |
| FIGURA 4.75 – Estrutura do possível produto biotransformado (148,0 Da) com os respectivos deslocamento químicos dos seus hidrogênios..... | 124 |
| FIGURA 4.76 – Espectro de massas da amostra biotransformada, <i>m/z</i> 149 comprova realmente que a 1-indanona foi biotransformada..... | 124 |
| FIGURA 4.77 – CCDA das amostras obtidas após extração com acetato de etila, sendo: M (meio), M+F (meio + fungo), P (padrão dos substratos) e 1, 2 e 3 (amostras contendo meio + fungo+ substratos)..... | 125 |
| FIGURA 4.78 – Cromatogramas de íons totais (CIT) para as amostras: 1-indanona e cânfora, meio +fungo+indanona 10 dias, meio+fungo+indanona 3 dias, meio+fungo, Meio+indanona e somente meio..... | 126 |
| FIGURA 4.79 – Espectro de massas obtido para a banda em 14.6 minutos.. | 127 |
| FIGURA 4.80 – Espectro de massas obtido para banda em 19.2 minutos..... | 127 |
| FIGURA 4.81 – Espectros de massas para as bandas em 20.1 e 21.3 minutos..... | 128 |
| FIGURA 4.82 – Produtos de oxidação obtidos com 1-indanona e <i>Penicillium brasilianum</i> | 128 |

| | |
|---|-----|
| FIGURA 4.83 – CCDA das frações purificadas após CCDP..... | 129 |
| FIGURA 4.84 – Espectro de hidrogênio da banda C (FIGURA 4.79) (CDCl ₃ – 400MHz)..... | 130 |
| FIGURA 4.85 – Cromatogramas de íons totais das frações B e C (FIGURA 4.83)..... | 131 |
| FIGURA 4.86 – Espectro de massas para o pico em 9,74 min do cromatograma da FIGURA 4.85..... | 131 |
| FIGURA 4.87 – Espectro de massas para o pico em 9,52 minutos do cromatograma da FIGURA 4.85..... | 132 |
| FIGURA 4.88 - Estrutura química proposta do produto biotransformado a partir da 1-indanona..... | 132 |
| FIGURA 4.89 – Cromatograma do substrato 1-indanona com seu respectivo espectro de UV..... | 133 |
| FIGURA 4.90 - Cromatogramas: (A) Cont_Pen_3dias_1%, (B) Pen_Inda_3dias_1%, (C) Sobreposição de A e B e 1-indanona padrão em rosa, (D) Cont_Pen_12dias_1%, (E) Pen_Inda_12dias_1% e (F) Sobreposição de D e E e 1-indanona padrão em rosa..... | 134 |
| FIGURA 4.91 – Cromatogramas obtidos das amostras: (A) somente tampão, (B) tampão + fungo, (C) tampão + indanona e (D) tampão + fungo + indanona..... | 136 |
| FIGURA 4.92 – Espectro de massas da banda em 12,8 minutos, referente ao metabólito secundário do <i>Penicillium brasilianum</i> | 137 |
| FIGURA 4.93 – Estrutura do ácido penicílico, substância produzida por <i>Penicillium brasilianum</i> | 137 |
| FIGURA 4.94 – Espectros de massas das bandas nos tempos de retenção: 6,7, 9,8 e 21 minutos..... | 138 |
| FIGURA 4.95 – Estruturas referentes aos espectros de massas (FIGURA 4.90)..... | 138 |
| FIGURA 4.96 – CCDA das amostras contendo 1-indanona e <i>Aspergillus flavus</i> | 139 |
| FIGURA 4.97 – Espectro de hidrogênio da fração biotransformada de 1-indanona por <i>Aspergillus flavus</i> (CDCl ₃ – 400MHz)..... | 140 |

| | |
|--|-----|
| FIGURA 4.98 – (A) Cromatograma de íons totais e (B) cromatograma de íon selecionado (m/z 148)..... | 141 |
| FIGURA 4.99 – Espectro de massas da banda em 9,59 minutos (FIGURA 4.98)..... | 141 |
| FIGURA 4.100 – Biotransformação de 1-indanona por <i>Aspergillus flavus</i> | 142 |
| FIGURA 4.101 – CCDA da amostra extraída da reação de oxidação da α,β -amirina..... | 142 |
| FIGURA 4.102 – Espectro de hidrogênio do produto oxidado ($CDCl_3$ – 200MHz)..... | 143 |
| FIGURA 4.103 – Espectro de carbono 13 do produto oxidado ($CDCl_3$ – 200MHz)..... | 143 |
| FIGURA 4.104 - Estruturas químicas de (1) α -amirinona e (2) β -amirinona... | 144 |
| FIGURA 4.105 – Estruturas das cetonas utilizadas no experimento de biotransformação com <i>Penicillium brasilianum</i> | 145 |
| FIGURA 4.106 – CCDAs das amostras obtidas do experimento com as diversas cetonas..... | 146 |
| FIGURA 4.107 – Cromatogramas das amostras: (A) tampão + benzopinacolona, (B) tampão + fungo e (C) tampão + fungo + benzopinacolona..... | 147 |
| FIGURA 4.108 – Cromatogramas das amostras: (A) tampão + dibenzalacetona, (B) tampão + fungo e (C) tampão + fungo + dibenzalacetona..... | 148 |
| FIGURA 4.109 – Cromatograma da mistura dos produtos de oxidação de Baeyer-Villiger e hidroxilação, pelo experimento de íons fragmentos de m/z 149..... | 149 |
| FIGURA 4.110 – Espectros de massas das bandas em 8,08 minutos (produto hidroxilado) e em 11,43 minutos (oxidação de Baeyer-Villiger)..... | 149 |
| FIGURA 4.111 – Proposta de fragmentação para o produto hidroxilado..... | 150 |
| FIGURA 4.112 – Proposta de fragmentação para o produto da reação de Baeyer-Villiger..... | 150 |
| FIGURA 4.113 – Cromatogramas de íons fragmentos de m/z 149 para as espécies de <i>Penicillium</i> | 151 |
| FIGURA 4.114 – Espectros de íons fragmentos de m/z 149 para as bandas com tempo de retenção em 8,00 minutos..... | 152 |

| | |
|--|-----|
| FIGURA 4.115 – Espectros de íons fragmentos para as bandas detectadas em 11,47 minutos (FIGURA 4.113)..... | 153 |
| FIGURA 4.116 – Espectros de íons fragmentos para as bandas em 12,30 minutos (FIGURA 4.113)..... | 153 |
| FIGURA 4.117 – Oxidação de Baeyer-Villiger catalisada pelos micro-organismos..... | 154 |
| FIGURA 4.118 – Cromatogramas de íons fragmentos de <i>m/z</i> 149 para as espécies de <i>Aspergillus</i> | 155 |
| FIGURA 4.119 – Espectros de massas para as bandas em 8,00 minutos (FIGURA 4.118)..... | 155 |
| FIGURA 4.120 – Espectros de massas para as bandas em 11,42 minutos e 12,30 minutos (FIGURA 4.118)..... | 156 |
| FIGURA 4.121 – Mecanismo de reação de oxidação de Baeyer-Villiger..... | 157 |
| FIGURA 4.122 – Cromatograma de íons fragmentos de <i>m/z</i> 149 para a amostra do fungo <i>Aspergillus flavus</i> em solução tampão..... | 157 |
| FIGURA 4.123 – Espectros de massas para as bandas em (A) 8,09 minutos e (B) 12,33 minutos (FIGURA 4.122)..... | 158 |
| FIGURA 4.124 – Espectro de massas para a banda em 14,52 minutos (FIGURA 4.122)..... | 158 |
| FIGURA 4.125 – Estrutura proposta para a segunda hidroxilação observada..... | 159 |
| FIGURA 4.126 – <i>Aspergillus aculeatus</i> | 160 |
| FIGURA 4.127 – Estrutura química dos dímeros isolados de <i>Aspergillus aculeatus</i> : (1) orlandina, (2) kotanina, (3) fonseciona A e (4) fonseciona B.... | 160 |
| FIGURA 4.128 – Estrutura química das substâncias (5) α -naftol, (6) β -naftol, (7) α -naftilamina e (8) crisofanol..... | 161 |
| FIGURA 4.129 – Cromatogramas das amostras contendo meio + β -naftol e meio + β -naftol + fungo..... | 162 |
| FIGURA 4.130 – Espectros de massas para as bandas obtidas no cromatograma do fungo + β -naftol (FIGURA 4.103)..... | 162 |
| FIGURA 4.131 – Reação de acetilação por <i>Aspergillus aculeatus</i> | 163 |
| FIGURA 4.132 – Rearranjo de Fries para o composto naftil acetato..... | 163 |

| | |
|---|-----|
| FIGURA 4.133 – Cromatogramas obtidos para as amostras: (A) naftil acetato, (B) produto do rearranjo de Fries e (C) fração biotransformada..... | 164 |
| FIGURA 4.134 – Espectros de massas das amostras: (A) naftil acetato, (B) produto do rearranjo de Fries e (C) fração biotransformada..... | 165 |
| FIGURA 4.135 – Espectros de íons fragmentos de m/z 185 para as amostras: (A) produto do rearranjo de Fries e (B) fração biotransformada..... | 166 |
| FIGURA 4.136 – Mecanismo de fragmentação proposto..... | 166 |
| FIGURA 4.137 – Espectro de hidrogênio da fração biotransformada. (200MHz – $CDCl_3$)..... | 167 |
| FIGURA 4.138 – Espectro simulado para a estrutura proposta indicada..... | 168 |
| FIGURA 4.139 – Estrutura do produto biotransformado..... | 168 |
| FIGURA 4.140 – Cromatograma de íon selecionado m/z 185, para a amostra contendo α -naftol..... | 169 |
| FIGURA 4.141 – Espectro de íons fragmentos de m/z 185 para a amostra contendo α -naftol..... | 169 |
| FIGURA 4.142 – Biotransformação do substrato α -naftol..... | 170 |
| FIGURA 4.143 – Cromatograma de íon selecionado m/z 184 para a amostra contendo α -naftilamina..... | 170 |
| FIGURA 4.144 – Espectro de íons fragmentos de m/z 184 da amostra contendo α -naftilamina..... | 171 |
| FIGURA 4.145 – Biotransformação do substrato α -naftilamina..... | 171 |

LISTA DE FLUXOGRAMAS

| | |
|---|----|
| FLUXOGRAMA 3.1 – Procedimento experimental para o experimento de biotransformação da 5,7,3',4',5'-pentametoxiflavanona..... | 32 |
| FLUXOGRAMA 3.2 – Procedimento utilizado para o experimento de biotransformação dos flavonóides glicosilados e <i>Penicillium griseoroseum</i> | 34 |
| FLUXOGRAMA 3.3 – Procedimentos experimentais para extração dos produtos de reação dos flavonóides glicosilados..... | 37 |
| FLUXOGRAMA 3.4 – Procedimento para a biotransformação dos flavonóides polimetoxilados..... | 39 |
| FLUXOGRAMA 3.5 – Procedimento utilizado na biotransformação da 1-indanona..... | 44 |
| FLUXOGRAMA 3.6 – Procedimento utilizado para os substratos α -naftol, β -naftol, α -naftilamina e alizarina..... | 49 |

RESUMO

ESTUDO DO POTENCIAL DE MICRO-ORGANISMOS ENDOFÍTICOS NA BIOTRANSFORMAÇÃO DE PRODUTOS NATURAIS. Os micro-organismos endofíticos *Penicillium griseoroseum*, *Penicillium brasilianum*, *Aspergillus flavus* e *Aspergillus aculeatus* se mostraram bastante eficientes para a realização das mais diferenciadas reações de biotransformação. O fungo *Penicillium griseoroseum* apresentou elevada seletividade de desmetilação do substrato cafeína além da desmetilação da 2',4',6'-trimetoxiacetofenona. Modificações químicas mais complexas como formação de ligação C-C (no flavanóide 5,7,3',4',5'-pentametoxiflavanona) e cloração também foram observadas com este micro-organismo. Ainda quando explorado com flavonóides como naringenina e hesperetina, obteve-se suas respectivas chalconas e, com o flavonóide glicosilado o fungo também se mostrou ativo. Por outro lado explorou-se a capacidade oxidativa dos fungos *Penicillium brasilianum* e *Aspergillus flavus* com o substrato 1-indanona. Ambos os fungos realizaram tanto a reação de oxidação de Baeyer-Villiger quanto hidroxilação. No entanto ao se testar flavonóides glicosilados com o fungo *Aspergillus flavus* obteve-se a degradação completa dos mesmos, porém com os respectivos substratos metoxilados nenhuma transformação foi obtida. O fungo *Aspergillus aculeatus* por sua vez foi explorado quanto a sua capacidade de dimerizar substâncias. Dessa forma os substratos utilizados foram os compostos fenólicos 2-naftol, 1-naftol e 1-naftilamina. Como produto de biotransformação foi obtida uma nova reação, um rearranjo de Fries que originou a adição do grupo cetil em todos os substratos testados.

ABSTRACT

STUDY OF ENDOPHYTIC MICROORGANISMS POTENTIAL ON THE BIOTRANSFORMATION OF NATURAL PRODUCTS. The endophytic microorganisms *Penicillium griseoroseum*, *Penicillium brasilianum*, *Aspergillus flavus* e *Aspergillus aculeatus* have shown to be very efficient in order to perform the most differentiated biotransformation reactions. The fungi *Penicillium griseoroseum* has presented an elevated desmethylation selectivity of the caffeine substrate besides the desmethylation of the 2',4',6'-trimethoxyacetophenone. More complex chemical modifications as the formation of the C-C bond (in the flavanoid 5,7,3',4',5'-pentamethoxyflavanone) and chloration were also observed with this microorganisms. Yet when explored with flavonoids such as the naringenin and hesperetin, their respective chalcone and, with the glycosylated flavonoid the fungi has also shown itself active. Besides that, the oxidative capability of the *Penicillium brasilianum* e *Aspergillus flavus* fungi has been explored with the 1 indanone substrate. Both fungi have performed the Baeyer-Villiger oxidation reaction and the hidroxylation as well. Therefore, when testing glycosylated flavonoids with the fungi *Aspergillus flavus* their complete degradation was obtained, but with the respective methoxylated substrates no transformation has been obtained. The *Aspergillus aculeatus* fungi was explored concerning its capability of dimerizing substances. This way, the used substrates were the phenolics 2-naphthol, 1-naphthol e 1-naphthilamine compounds. As a biotransformation product a new reaction was obtained, a Fries rearrangement that has originated the addition of the ketil group to all tested substrates.

SUMÁRIO

| | |
|--|--------------|
| LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS..... | viii |
| LISTA DE TABELAS..... | X |
| LISTA DE FIGURAS..... | xi |
| LISTA DE FLUXOGRAMAS..... | xx |
| RESUMO..... | xxi |
| ABSTRACT..... | xxii |
| SUMÁRIO..... | xxiii |
| | |
| 1- INTRODUÇÃO..... | 2 |
| | |
| 1.1 – Biotransformações – aspectos gerais..... | 2 |
| 1.2 – Micro-organismos endofíticos como biocatalisadores..... | 6 |
| 1.3 – Biotransformação de flavonóides..... | 15 |
| 1.4 – Biotransformações oxidativas..... | 19 |
| 1.5 – Alguns resultados ilustrativos obtidos no LaBioMMi/DQ/UFSCar.21 | |
| 1.5.1 – Biotransformação de cetonas..... | 21 |
| 1.5.2 – Reação de Desmetilação..... | 24 |
| | |
| 2 – OBJETIVOS..... | 26 |
| | |
| 3 – EXPERIMENTAL..... | 28 |
| | |
| 3.1 – Materiais..... | 28 |
| 3.2 – Equipamentos utilizados..... | 29 |
| 3.3 – Métodos..... | 30 |
| 3.3.1 – Cultivo dos micro-organismos..... | 30 |
| 3.3.2 – Experimentos de biotransformação utilizando <i>Penicillium</i> <i>griseoroseum</i> | 31 |
| 3.3.2.1 – Biotransformação da cafeína..... | 31 |
| 3.3.2.2 – Biotransformação da 5,7,3',4',6'-pentametoxiflavanona..... | 31 |
| 3.3.2.3 – Biotransformação dos flavonóides glicosilados..... | 33 |
| 3.3.2.3.1 – Experimento com a adição da mistura de flavonóides..... | 33 |
| 3.3.2.3.2 – Cultivo dos flavonóides individualmente sob agitação..... | 34 |
| 3.3.2.3.3 – Cultivo em meio rico, adição dos flavonóides glicosilados, cultivo em meio pobre..... | 34 |
| 3.3.2.3.4 – Análise dos experimentos com flavonóides..... | 35 |
| 3.3.2.4 – Reação de permetilação dos flavonóides glicosilados..... | 36 |
| 3.3.2.4.1 – Análises dos produtos reacionais por EM..... | 37 |
| 3.3.2.5 – Experimento de biotransformação dos flavonóide polimetoxilados..... | 38 |

| | |
|---|-----------|
| 3.3.2.5.1 – Análise do experimento com os flavonóides polimetoxilados..... | 39 |
| 3.3.2.6 – Reação de hidrólise dos flavonóides glicosilados..... | 39 |
| 3.3.2.7 – Biotransformação da naringenina e hesperetina..... | 40 |
| 3.3.2.7.1 – Análises do experimentos contendo naringenina e hesperetina..... | 40 |
| 3.3.2.8 – Reação de metilação da 2',4',6'-trihidróxiacetofenona..... | 41 |
| 3.3.2.9 – Biotransformação da 2',4',6'-trimetoxiacetofenona..... | 41 |
| 3.3.2.9.1 – Análise da amostra biotransformada de 2',4',6'-trimetoxiacetofenona..... | 41 |
| 3.3.2.10 – Isolamento de metabólitos secundários..... | 42 |
| 3.3.3 – Experimentos de biotransformação utilizando <i>Penicillium brasilianum</i> | 42 |
| 3.3.3.1 – Reação de oxidação da 1-indanona (reação de Baeyer-Villiger <i>in vitro</i>)..... | 42 |
| 3.3.3.2 – Biotransformação da 1-indanona por <i>Penicillium brasilianum</i> | 43 |
| 3.3.3.2.1 – Modo estático (20 dias de cultivo)..... | 43 |
| 3.3.3.2.2 – Adição da 1-indanona após 3 dias de cultivo..... | 44 |
| 3.3.3.2.3 – Biotransformação monitorada da 1-indanona..... | 45 |
| 3.3.3.2.4 – Análises do experimento com 1-indanona..... | 45 |
| 3.3.3.3 – Biotransformação da 1-indanona utilizando células em suspensão..... | 46 |
| 3.3.3.4 – Reação de oxidação da α,β -amirina..... | 46 |
| 3.3.3.5 – Biotransformação de diversas cetonas por <i>Penicillium brasilianum</i> | 47 |
| 3.3.4 – Experimentos de biotransformação utilizando <i>Aspergillus aculeatus</i> | 48 |
| 3.3.4.1 – Análises por CLAE/UV-EM..... | 49 |
| 3.3.5 – Experimentos de biotransformação utilizando <i>Aspergillus flavus</i> | 50 |
| 3.3.5.1 – Biotransformação de flavonóides por <i>Aspergillus flavus</i> | 50 |
| 3.3.5.2 – Biotransformação da 1-indanona por <i>Aspergillus flavus</i> | 50 |
| 3.3.6 – Triagem para a detecção de Baeyer-Villiger monooxigenases..... | 51 |
| 3.3.6.1 – Análises por CLAE/UV-EM..... | 51 |
| 4 – RESULTADOS..... | 54 |
| 4.1 – Experimentos de biotransformação utilizando <i>Penicillium griseoroseum</i>..... | 54 |
| 4.1.1 – Biotransformação da cafeína..... | 54 |
| 4.1.2 – Biotransformação da 5,7,3',4',5'-pentametóxi-flavanona..... | 56 |
| 4.1.3 – Experimentos de biotransformação dos flavonóides glicosilados: naringina, rutina e hesperidina..... | 68 |

| | |
|---|------------|
| 4.1.3.1 – Biotransformação de flavonóides glicosilados utilizando <i>Aspergillus flavus</i> | 76 |
| 4.1.4 – Reações de Permetilação dos flavonóides glicosilados..... | 79 |
| 4.1.4.1 – Análise da naringina polimetoxilada..... | 81 |
| 4.1.4.2 – Análise da hesperidina polimetoxilada..... | 87 |
| 4.1.4.3 – Análise da rutina polimetoxilada..... | 91 |
| 4.1.5 – Experimento de biotransformação dos flavonóides polimetoxilados..... | 95 |
| 4.1.5.1 – Biotransformação da naringina polimetoxilada utilizando <i>Aspergillus flavus</i> | 96 |
| 4.1.6 – Reação de Hidrólise dos flavonóides glicosilados..... | 97 |
| 4.1.7 – Biotransformação da naringenina e hesperetina..... | 101 |
| 4.1.8 – Reação de Metilação da 2',4',6'-trihidróxiacetofenona..... | 109 |
| 4.1.9 – Biotransformação da 2',4',6'-trimetoxiacetofenona..... | 111 |
| 4.1.10 – Substância isolada do metabolismo do fungo <i>Penicillium griseoroseum</i> | 117 |
| 4.2 – Experimentos de biotransformação utilizando <i>Penicillium brasilianum</i>..... | 119 |
| 4.2.1 - Reação de Oxidação da 1-indanona..... | 119 |
| 4.2.2 – Biotransformação da 1-indanona..... | 121 |
| 4.2.2.1 – Biotransformação da 1-indanona utilizando células em suspensão..... | 135 |
| 4.2.2.2 – Biotransformação da 1-indanona utilizando <i>Aspergillus flavus</i> | 139 |
| 4.2.3 – Reação de Oxidação da α,β -amirina..... | 142 |
| 4.2.4 – Biotransformação de diversas cetonas por <i>Penicillium brasilianum</i> | 144 |
| 4.3 – Triagem para a detecção da enzima Baeyer-Villigerase..... | 148 |
| 4.4 – Experimentos de biotransformação utilizando <i>Aspergillus aculeatus</i>..... | 159 |
| 5 – CONSIDERAÇÕES FINAIS..... | 173 |
| 6 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 178 |

INTRODUÇÃO

1 – INTRODUÇÃO

1.1 – Biotransformações – aspectos gerais

Biotransformações são processos em que um agente biológico é utilizado para a conversão de um substrato (composto orgânico) por um número limitado de etapas, sendo uma(s) enzima(s), o principal agente dessas reações¹.

De fato, transformações biotecnológicas incluem uma variedade de processos, ordenados de acordo com o número de etapas biologicamente realizadas e a complexidade dos substratos. O termo biotransformação pode ser aplicado para modificações específicas ou interconversões químicas realizadas por enzimas presentes nas células ou na forma isolada².

Já “processos biocatalíticos” são descritos como transformações de um substrato definido para um produto alvo definido com uma ou diversas etapas enzimáticas envolvidas. No entanto, quando se comparam as biocatálises com as demais catálises obtêm-se boas vantagens em termos de seletividade e especificidade, contudo a estabilidade do catalisador biológico torna-se em alguns casos uma desvantagem considerável. As vantagens e desvantagens do uso de biocatálises encontram-se listadas na Tabela 1.1².

TABELA 1.1 – Vantagens e desvantagens de biocatalisadores e enzimas².

| <i>Biocatalisador</i> | <i>Vantagens</i> | <i>Desvantagens</i> |
|------------------------------|---------------------------------------|---|
| Enzimas | Alta especificidade | Custo elevado |
| | Maior produtividade | Necessidade de cofatores |
| | Facilidade de isolamento dos produtos | Disponibilidade em alguns casos |
| Células | Baixo custo | Baixa tolerância a substratos e solventes orgânicos |
| | Regeneração de cofatores | Reações paralelas devido ao metabolismo celular |

O uso de biocatalisadores naturais não é nada novo. Eles vêm sendo utilizados por mais de 100 anos, sendo o primeiro uso de biotransformação descrito

por Pasteur em 1858, quando ele obteve *L*-tartarato de amônio de *DL*-tartarato de amônio utilizando o fungo *Penicillium glaucum*³. Inicialmente as biotransformações foram consideradas um movimento “fashion”, sendo empregadas em algumas etapas da química orgânica sintética. Contudo, com o desenvolvimento de novas técnicas, o uso de biotransformação foi crescendo até ser empregado, atualmente, como uma poderosa ferramenta de produção de compostos com alto valor agregado. Acredita-se que o futuro da indústria de síntese química, essencialmente devido às crescentes exigências de qualidade e preservação do meio ambiente, passará em muitos casos pela utilização de processos biocatalíticos.

Os biocatalisadores têm se tornado mais acessíveis e de fácil obtenção e manuseio. Sua eficiência em realizar diversas reações químicas, até as mais difíceis de serem obtidas pelos métodos tradicionais, como a modificação de grupos pouco ativados e a introdução de funções orgânicas, principalmente hidroxilações, em carbonos sp^3 remotos a funções pré-existentes, têm sido o grande atrativo para sua aplicação em sínteses químicas multi-etapas. A seletividade apresentada pelos biocatalisadores naturais (quimioseletividade, enantioseletividade e regioseletividade), o amplo espectro de substâncias químicas que são aceitas para as reações como substratos, o custo, as condições amenas e ecologicamente corretas, conferem aos mesmos algumas características fundamentais para sua utilização⁴. Nos últimos anos as biotransformações têm explorado conhecimentos de áreas como a biologia molecular, com o intuito de desenvolver biocatalisadores mais ativos, estáveis e seletivos, passíveis de serem utilizados pela indústria a um custo mais acessível.

As reações de biotransformação são realizadas empregando-se enzimas isoladas ou células íntegras de organismos vivos (como plantas) ou micro-organismos (leveduras, bactérias e fungos). Os micro-organismos compreendem uma enorme diversidade em espécies, mas apesar das inúmeras aplicações biológicas apresentadas na literatura⁵⁻⁸, os fungos e as bactérias constituem os grupos menos estudados do ponto de vista do metabolismo secundário⁹.

Os fungos têm sido uma fonte excepcionalmente rica de fármacos ou pró-fármacos importantes, incluindo antibióticos antibacterianos (β -lactâmicos, aminoglicosídeos, tetraciclina, macrolídeos, glicopeptídeos e estreptograminas), antibióticos-antitumorais (antraciclinas, bleomicinas, actinomicinas, mitomicinas e ácidos aureólicos), agentes redutores do colesterol sanguíneo (estatinas), agentes

imunossupressores (ciclosporina A), entre outros^{10,11}. De fato, o metabolismo secundário dos fungos é rico em diferentes classes de substâncias, desde terpenoides, alcaloides, e policetídeos, como zearalenonas, antraquinonas, alquiorescinóis, e meroterpenos, dentre outras. Aproximadamente um quarto de todos os produtos naturais biologicamente ativos foram obtidos de fungos¹².

Há diferentes estimativas sobre a quantidade de espécies de fungos que habitam o nosso planeta¹³. Estima-se que haja cerca de 1,5 milhões de fungos, dos quais apenas 5% das espécies estão descritas¹⁴. Entre as espécies descritas (69.000), somente 16% (11.500) têm sido cultivadas¹¹. Estes dados ilustram o grande potencial químico e biológico a ser explorado com estudos de metabólitos secundários produzidos por fungos, bem como seu sistema enzimático.

De fato os micro-organismos são seres importantes para a humanidade por inúmeras razões, incluindo sua participação em reflorestamentos (micorrizas), fermentação para a produção de alimentos, sendo uma das principais a produção de substâncias valiosas, como ácido cítrico, ciclosporina, penicilina dentre outras substâncias biologicamente ativas. As principais características dos micro-organismos que os tornam úteis para a produção de tais compostos, os quais poderiam ser obtidos de plantas ou ainda serem sintetizados *in vitro* por vias químicas são a alta razão superfície/volume, que facilita o rápido consumo de nutrientes para seu metabolismo e biossíntese; a ampla variedade de reações que os micro-organismos são capazes de realizar; a grande facilidade de adaptação nos mais diferentes ambientes, permitindo o seu transporte da natureza para meios artificiais, no qual eles são capazes de crescer utilizando fontes de carbono e nitrogênio de baixo custo e produzir compostos de interesse; a simplicidade de procedimentos de *screening*, permitindo examinar milhares de culturas em um tempo razoavelmente curto; e a ampla diversidade de espécies, produzindo diferentes enzimas, que podem catalisar as mesmas reações, permitindo assim, um monitoramento diferenciado nas condições de cultivo¹⁵.

O desenvolvimento de enzimas para uso industrial depende primeiramente do uso de fontes microbianas. As enzimas de fontes microbianas são preferidas sobre as de plantas e animais devido à viabilidade econômica para sua produção, fácil processo de modificação e otimização¹⁶.

A abordagem tradicional para inclusão de biotransformações em um processo sintético, normalmente inicia-se com a escolha do micro-organismo a ser

utilizado. Essa pode ser a etapa mais crítica do procedimento global. Inicialmente, analisam-se os resultados semelhantes já disponíveis na literatura em relação à reação de interesse, na tentativa de se obter dados no que diz respeito às possíveis enzimas envolvidas no processo. Obtém-se as cepas com outros grupos de pesquisa ou em coleções de culturas de instituições de pesquisa. Na ausência de dados na literatura que indique o sistema enzimático desejado à reação em estudo, pode-se isolar o micro-organismo da natureza (solo, plantas, ambientes marinhos) e testá-los através de um processo empírico de seleção (*screening*). Nessa seleção realizam-se experimentos em pequena escala com os organismos disponíveis e analisam-se os extratos brutos obtidos do caldo de fermentação, comparando-se a um controle, o qual não foi adicionado substrato. Se houver a formação de novos metabólitos isso significa que aquele organismo realizou alguma transformação química no substrato¹⁷.

Atualmente, visando o aprimoramento de estratégias de produção na área da química fina, os procedimentos utilizados para a inclusão de etapas biocatalíticas encontram-se cada vez mais focados. Busca-se a atividade específica de uma determinada enzima com o objetivo de se obter o composto de interesse em alto rendimento e de fácil purificação e, principalmente, à baixos custos⁴. Essa otimização é plenamente justificada e responde bem aos requerimentos atuais de desenvolvimento sustentável, preservação do meio ambiente, etc. No entanto, o uso da estratégia de triagem (*screening*) aleatória de grandes coleções de micro-organismos durante a etapa de descoberta das enzimas ideais pode ser contraditório e inconsistente com os objetivos finais de introduzir processos pouco poluidores, ecologicamente corretos. Além disso, a abordagem focada e específica para a transformação de um único substrato certamente dificulta novas descobertas. Assim, usando essa estratégia, fontes promissoras de outras enzimas podem ser descartadas.

Como em todas as atividades visando o desenvolvimento científico e tecnológico, o campo das biotransformações deve também ser bem seguído em etapas de descoberta, desenvolvimento e aplicação. Os trabalhos feitos no Laboratório de Bioquímica Micromolecular de Micro-organismos (LaBioMMi) da Universidade Federal de São Carlos visam contribuir com novas estratégias para a descoberta de diferentes processos enzimáticos. Essa abordagem envolve estudos cuidadosos das relações ecológicas dos micro-organismos e o estudo de rotas

biossintéticas procurando verificar transformação enzimática em substratos endógenos. Os micro-organismos estudados são aqueles vivendo em ambientes especiais, principalmente associados à plantas – os micro-organismos endofíticos.

1.2 – Micro-organismos endofíticos como biocatalisadores

A definição de micro-organismos endofíticos é ainda bastante polêmica. Essa definição é frequentemente usada de acordo com as particularidades das áreas de estudos. Às vezes as consequências bioquímicas desse tipo de associação simplesmente não importam e as definições usadas são generalistas. Muitas áreas usam os termos *endofítico* e *patogênico* para designar dois tipos de associações diferentes conforme a interação é positiva (não há desenvolvimentos de sintomas de doenças no hospedeiro), ou negativa, (com prejuízo para o hospedeiro) respectivamente^{18,19}. O grupo LaBioMMi usa o termo endofítico para designar o *habitat* de onde o micro-organismo foi obtido. Usando metodologias que garantam a assepsia da superfície do vegetal, ao inocular esse material em meios de cultura artificiais os micro-organismos vivendo no interior (*endo*) da planta (*fito*) são obtidos. O termo fitopatógeno deve ser associado a uma consequência negativa (para o hospedeiro) da interação entre a planta e o micro-organismo, porém isso não é verificado somente pela metodologia de isolamento.

Um endofítico mutualista pode evoluir para uma condição de fitopatógeno em situações em que a planta hospedeira não dispõe dos nutrientes para o desenvolvimento controlado do micro-organismo. Alguns pesquisadores têm demonstrado que, da mesma maneira que fitopatógenos, fungos endofíticos, quando re-inoculados na planta hospedeira podem estimular a enzima fenilalanina-amonioliase (PAL)^{20,21}, que é responsável em muitos casos pela biossíntese de fitoalexinas²² derivadas de fenilpropanóides. Enfim, para muitas áreas de estudos essas definições são meramente topológicas. Em resumo, na fase patogênica o micro-organismo degrada elementos essenciais para a sobrevivência da planta, enquanto que durante o mutualismo, a planta consegue controlar o desenvolvimento do micro-organismo¹⁹. Portanto, as consequências bioquímicas das fases mutualista e patogênica podem ser muito distintas.

As plantas são capazes de responder de diversas maneiras ao ataque por micro-organismos. As maneiras mais conhecidas são o estabelecimento de

barreiras físicas²³ (enrijecimento da parede celular com acúmulo de ligninas) e químicas^{23,24} (produção de fitoalexinas). A indução da biossíntese de fitoalexinas é uma das possíveis maneiras para promover o aumento da produção de metabólitos secundários em plantas^{25,26}. Por sua vez, o micro-organismo invasor pode degradar enzimaticamente essas barreiras, estabelecendo uma verdadeira “batalha” química, dificultando a identificação das fitoalexinas como metabólitos finais produzidos pelo hospedeiro^{27,28} (FIGURA 1.1).

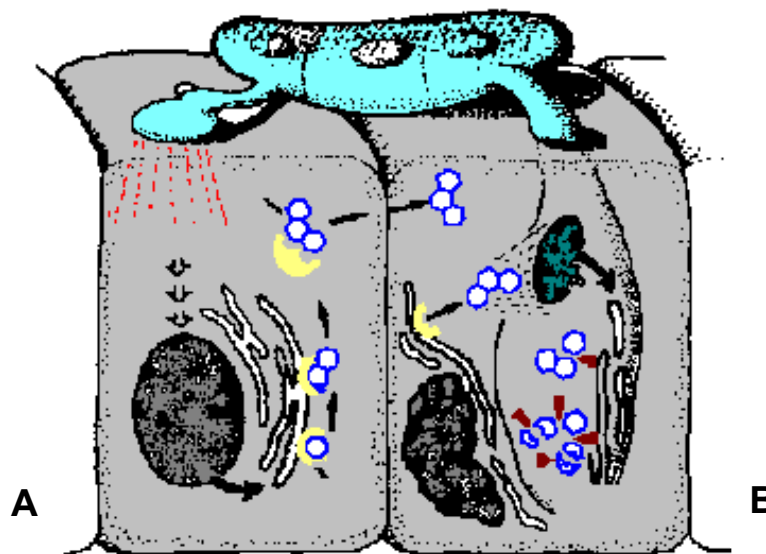


FIGURA 1.1 – Ilustração hipotética da interação bioquímica entre fungos e plantas. Em **A** o contacto do fungo com a planta induz a biossíntese de fitoalexinas; em **B**, o fungo detoxifica essas fitoalexinas.

Um exemplo clássico de contra-defesa, ou seja, degradação de fitoalexinas por micro-organismos, é constatado em um sistema envolvendo o fungo *Fusarium solani*. O fungo foi isolado da espécie de planta *Pisum sativum*, fortemente conhecida pela elevada produção de fitoalexinas, como a pisatina. Aparentemente como uma estratégia de defesa, o micro-organismo apresentou a capacidade de biotransformar a substância fungicida produzida pela mesma, para conviver em harmonia nos tecidos internos da planta. O que se descobriu foi que o fungo desmetilou a pisatina tornando-a não tóxica ao seu próprio organismo. Posteriormente, designou-se a enzima responsável por tal desmetilação por pisatina demetilase (FIGURA 1.2)²⁹.

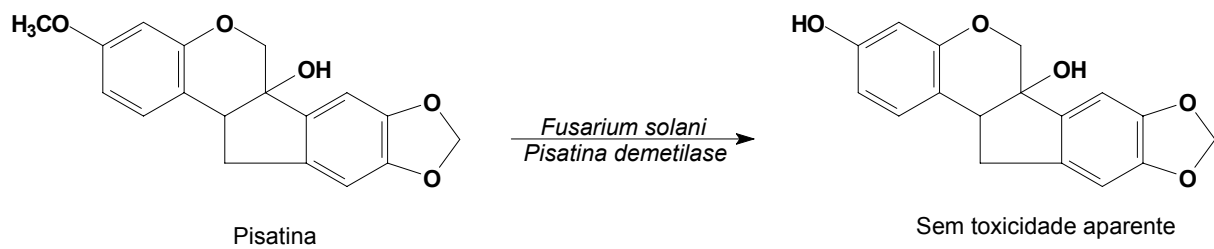


FIGURA 1.2 – Biotransformação da pisatina por *Fusarium solani*.

Além disso, metabólitos isolados da planta podem ter sido produzidos por micro-organismos invasores. A habilidade de patógenos para produzir substâncias fitotóxicas *in situ* durante a infecção foi demonstrada para fungos do gênero *Fusarium* infectando espigas de trigo no campo³⁰. Essas micotoxinas são tricotecenos do grupo deoxinivalenol e são bastante agressivas inibindo o desenvolvimento de várias plantas³⁰. Muitas vezes, essas substâncias podem ter atividades biológicas que levam a concluir que elas apresentam função de manter a associação mutualista. Essas substâncias produzidas por micro-organismos e que têm apresentado possíveis papéis na proteção do hospedeiro, têm recebido a denominação de “metabólitos terciários”³¹. Plantas infectadas por endofíticos podem ser protegidas da predação por insetos através de toxinas. Assim, algumas plantas infectadas com fungos da família Clavicipitaceae exibem uma melhor tolerância e tem resistência aumentada aos micro-organismos fitopatogênicos³².

A despeito da vasta possibilidade de ação enzimática em vários substratos, os fungos endofíticos ainda são uma fonte pouco explorada para os estudos de biotransformação. Alguns trabalhos se destacam na literatura como: i) a biotransformação de 6-metoxibenzoxazolinona (MBOA) e 2-benzoxazolinona (BOA) em *N*-(2-hidroxi-4-metoxifenil) e *N*-(2-hidroxifenil), respectivamente, por *Fusarium moliniforme*³³ além dos diversos outros produtos obtidos com diferentes endofíticos (FIGURA 1.3); ii) biotransformação estereoseletiva da tioridazina estudada por Borges *et al*^{34,35} (FIGURA 1.4). Algumas biotransformações envolvendo fármacos também foram obtidas^{36,37}.

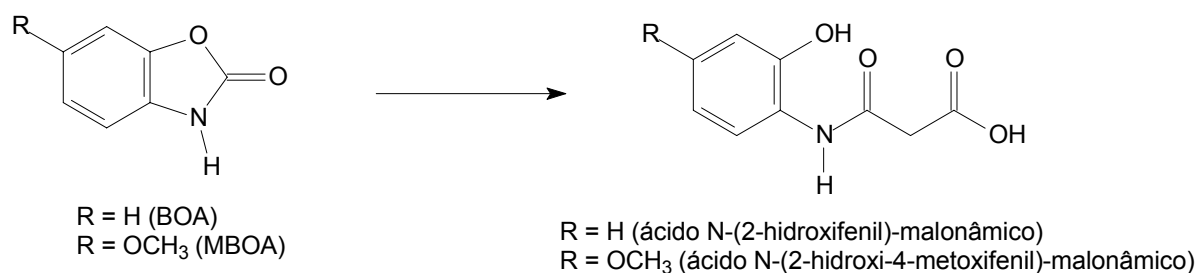


FIGURA 1.3 – Biotransformação da MBOA e BOA.

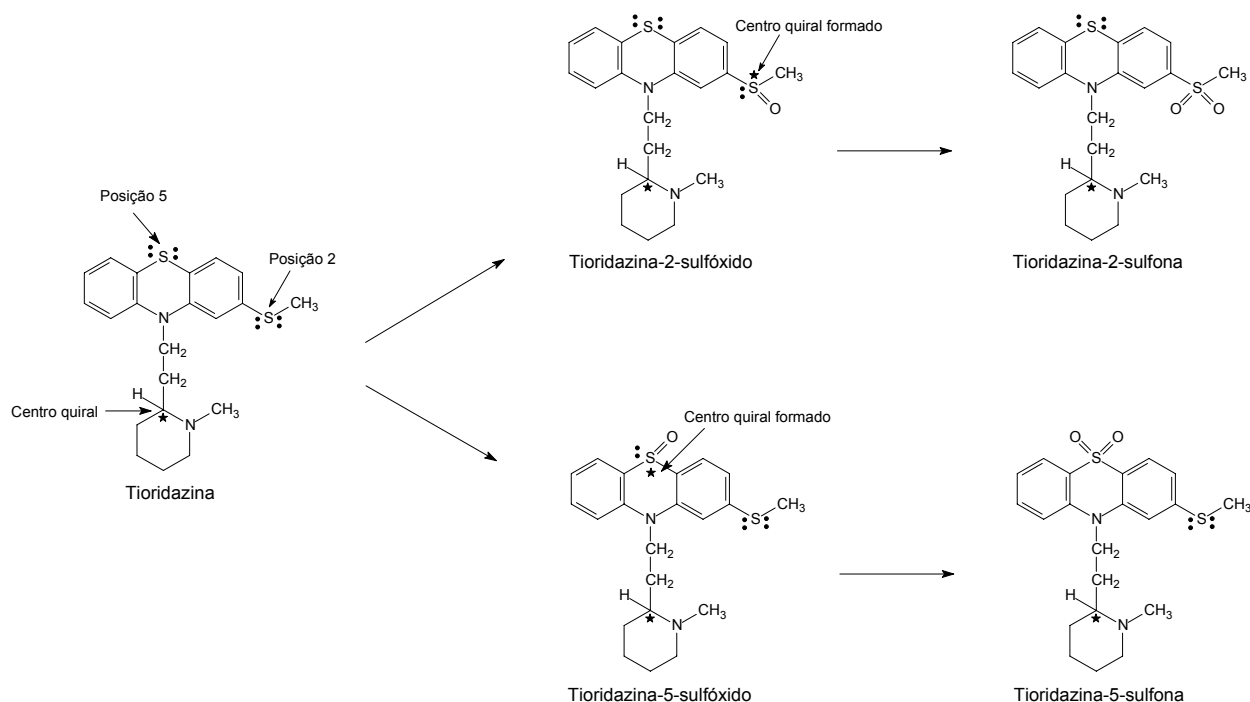


FIGURA 1.4 – Biotransformação estereoseletiva da tioridazina.

Enfim, os fenômenos ilustrados na FIGURA 1.1 (pág. 7) refletem o início do desenvolvimento da relação ecológica entre fungos e plantas, e podem ser vistos como um conjunto enorme de oportunidades para sua exploração na produção de substâncias de interesse. Do ponto de vista bioquímico, os mecanismos de estabelecimento da associação micro-organismo / planta envolvem uma série de transformações enzimáticas. A reprodução desses fenômenos de forma controlada em laboratório pode servir como uma boa ferramenta para a produção de moléculas quirais ou funcionalizadas conforme o interesse do pesquisador.

Por sua vez, as associações simbióticas entre fungos endofíticos e plantas, que quase sempre são específicas, têm revelado uma intrigante intimidade no nível bioquímico micromolecular. A habilidade demonstrada *in vitro* pelos

organismos associados em produzir metabólitos secundários, algumas vezes idênticos aos produzidos pela planta hospedeira e vice-versa, tem chamado a atenção de diversos pesquisadores. Um dos primeiros exemplos documentados dessa situação foi dado pelo fungo *Gibberela fugikuroi* [forma sexuada de *Fusarium moniliforme* (Sheldon)] associado à planta *Cucurbita maxima* produzindo derivados do ácido giberélico³⁸, um diterpeno com atividade hormonal de crescimento até então conhecido como metabólito de plantas. Hoje é conhecido que fungos produzem uma variedade de giberelinas^{39,40}. Por sua vez, tricotecenos macrocíclicos foram surpreendentemente isolados da planta *Baccharis megapotamica* (exclusivamente da planta fêmea)⁴¹. Essas substâncias são conhecidas como micotoxinas produzidas pelas espécies de fungos dos gêneros *Fusarium* e *Myrothecium*⁴², que podem ser isolados do solo em torno da planta. Ainda não há opinião unânime quanto à origem desses metabólitos. Há sugestões de que os fungos do solo produzem os tricotecenos e a planta os absorve³¹. Em favor dessa hipótese, está o fato de que plantas geneticamente relacionadas, *B. megapotamica* macho e *B. dracunculifolia*, não acumulam tricotecenos mesmo quando coletadas na mesma região e em convivência com os fungos produtores^{31,43,44}. Por outro lado, a grande quantidade de tricotecenos nos diferentes órgãos da planta tem indicado a planta como a produtora das micotoxinas⁴⁴. Tricotecenos macrocíclicos foram também isolados de outra espécie de *Baccharis* (*B. coridifolia* DC)^{45,46}.

No início da década de 90 foi descoberto que um fungo (*Taxomyces andreanae*) isolado como endofítico em *Taxus brevifolia* produz paclitaxel (TaxolTM) em meio de cultura artificial na ausência de células da planta^{47,48}. Essa descoberta causou grande impacto no meio acadêmico devido às propriedades anticancerígenas diferenciadas apresentadas por esse diterpeno⁴⁹. O rendimento de taxol na planta *T. brevifolia* é muito baixo, uma quantidade menor do que 0.02 % da planta seca⁵⁰. Devido à grande demanda dessa substância, certamente, e principalmente por razões ecológicas, a planta não se tornou uma fonte sustentável de taxol. Muitas outras espécies de fungos produtores de taxol em rendimentos bastante razoáveis foram isolados dos tecidos de *T. brevifolia*⁴⁵ e também de outras espécies de *Taxus*⁵¹⁻⁵³.

Há ainda alguns dados intrigantes sobre a biossíntese de taxóides por fungos endofíticos. Por exemplo, o fungo *Periconia* sp, endofítico em *Torreya grandifolia*, planta da mesma família do gênero *Taxus*, mas que não produz taxanos,

produz taxol quando recém isolado e cultivado em meio artificial⁵⁴. A biossíntese de taxol decai com sucessivas transferências do fungo de meios de cultura, porém, é reativada com a adição de ácidos carboxílicos e fenóis, sendo o ácido benzóico o melhor estimulante⁵⁴. O fungo *Pestalotiopsis guepinii*, endofítico em *Wollemia nobilis*, uma espécie da família Araucariaceae, não relacionada com *Taxus*, é também produtor de taxol. Os autores desse trabalho sugerem que o fungo tenha adquirido a “habilidade” de produzir taxol hospedando alguma espécie de *Taxus* e então transferido para *Wollemia nobilis* através de insetos ou pássaros⁵⁵. No mesmo sentido, o fungo *Seimatoantlerium tepuiense* gen. nov. foi relatado recentemente como o primeiro caso de um fungo epifítico produtor de taxol⁵⁶, isolado de *Maguireothamnus speciosus*, uma Rubiaceae.

Os três casos discutidos acima, a produção de giberelinas por fungos, o acúmulo de micotoxinas tricotecenos em plantas do gênero *Baccharis* e a produção de taxol por fungos endofíticos em *Taxus* e plantas afins, definitivamente têm motivado pesquisadores a investigar os mecanismos desse fenômeno bioquímico-ecológico. Embora ainda não unanimemente aceito, este fenômeno tem sido interpretado do ponto de vista bioquímico, como sendo uma “transferência genética horizontal” (TGH) entre plantas e fungos⁵⁷. O metabolismo secundário é uma consequência fenotípica do organismo e é, portanto, uma expressão do seu conteúdo genético⁵⁸. Embora ainda aceita por poucos, a transferência genética entre fungos e plantas parece ser a melhor explicação para o “aprendizado” que os organismos associados adquirem na produção de metabólitos secundários. Alguns trabalhos envolvendo biologia molecular têm demonstrado a ocorrência desse fenômeno ecológico, onde foi constatado que as sequências de bases no DNA de espécies de Bambusoideae (Bambu) estavam contaminadas com DNA de fungos endofíticos^{59,60}.

As consequências previstas para essa troca de informação são observadas na biossíntese de moléculas idênticas às produzidas pelo hospedeiro (ou vetor), ou a codificação de enzimas que têm papel chave na biossíntese de classes de substâncias que atuam em parte da rota biossintética. Numa versão “artificial” dessas possíveis interações genômicas entre micro-organismos e plantas, o gene que codifica a enzima taxadieno sintase, uma molécula chave na ciclização do difosfato de geranylgeranila para produzir taxadieno, foi recentemente introduzido na bactéria *Escherichia coli*. Essa transferência genética levou a uma superprodução

de taxadieno sintase pela bactéria⁶¹ e poderá vir a ser uma poderosa ferramenta na síntese de taxol. Em outro exemplo, a transferência do gene que codifica a enzima tricodieno sintetase em fungos do gênero *Fusarium*, que são produtores de micotoxinas do grupo dos tricotecenos, para a planta *Nicotiana tabacum*, levou a planta a produzir tricodieno (precursor dos tricotecenos)⁶². Essa estratégia (engenharia genética) vem sendo utilizada com sucesso para a obtenção de metabólitos secundários⁶³.

A principal crítica que se faz nos trabalhos mencionados anteriormente, aqueles que reportam que fungos endofíticos podem produzir substâncias idênticas às produzidas pela planta hospedeira, é que esses trabalhos reportam a ocorrência de um único representante da classe da substância em questão. Por exemplo, *Taxomyces andrenae* produz taxol, mas não há relatos da ocorrência de outros diterpenos taxanos no fungo; podofilotoxina ocorre isoladamente em *Phialocephala fortinii* isolado como endofítico de *P. peltatum*, mas não há relatos da produção de outras lignanas pelo fungo. Todos os demais trabalhos podem ser analisados no mesmo sentido. Em geral, estudos químicos envolvendo metabolismo micromolecular de organismos vivos mostram que as substâncias ocorrem em classes compostas de vários membros e quase nunca apenas um único membro é detectado.

Assim, como apenas poucos micro-organismos endofíticos são de fato simbióticos com a planta hospedeira, a interação genômica que levaria a esse tipo de consequência metabólica mencionada acima, se de fato existir, deve ser um fenômeno bastante raro. Caso contrário seria muito maior o número de estudos relacionados na literatura. Além disso, moléculas como taxol e podofilotoxina são estruturalmente muito complexas. Suas biossínteses devem envolver numerosos passos, cada um envolvendo enzimas específicas. Ao declarar TGH como o fenômeno responsável pela co-produção de metabólitos secundários de estruturas químicas complexas em organismos associados, assumimos que toda a “maquinaria” genética necessária para a produção de tal substância é completamente codificada no organismo receptor. Enfim, um número grande de enzimas deve ser codificado por uma região muito extensa do genoma, o que significa que, se a “transferência genética” ocorreu, ela deve ter envolvido uma sequência muito grande de bases.

De qualquer forma, interações genômicas (inserção de plasmídios, ativação de genes silenciados, etc), se ocorrem nessas associações micro-

organismos/plantas, devem produzir conseqüências primeiramente no sistema enzimático usado para a biossíntese dos metabólitos finais pelo fungo. Portanto, a expressão dessas enzimas em outras classes de substâncias pode ser também uma documentação da interação genômica entre os organismos associados. Nos trabalhos feitos no DQ-UFSCar, visando contribuir para essas investigações, tenta-se encontrar a reprodução desse modelo de associação fungo-planta. Foram escolhidas algumas plantas, sobre as quais sua fitoquímica já foi estudada em considerável extensão. De uma dessas plantas, *Melia azedarach*, uma Meliaceae, foi obtida uma larga coleção de fungos endofíticos de seus frutos, folhas, galhos e raízes⁶⁴. Os fungos dos gêneros *Penicillium* e *Aspergillus* foram os que se destacaram como principais hospedeiros dessa planta. O principal resultado obtido, que possa eventualmente refletir uma possível interação genômica entre a planta e o fungo, foi o isolamento e a identificação de meroterpenóides (substâncias de biossíntese mista terpenoídica e policetídic) de extratos de um fungo (*Penicillium brasilianum*) endofítico em *Melia azedarach*. Uma série inédita dessas substâncias foi produzida em culturas desse fungo em arroz⁶⁵⁻⁶⁸. A semelhança estrutural entre os meroterpenos e os limonóides (FIGURA 1.5), os quais são substâncias típicas de Meliaceas, é algo destacável. Os limonóides são triterpenóides bastante modificados por oxidações do tipo Baeyer-Villiger, sendo essa a principal semelhança estrutural com os meroterpenóides, o que leva a supor que o sistema enzimático usado pelos dois organismos tem a mesma origem genética.

O estudo dessas rotas biossintética pode inspirar e direcionar a pesquisa de enzimas úteis para uso em biotransformação de substratos naturais e sintéticos. A incorporação da unidade policetídic nos terpenóides para formar os meroterpenos é uma substituição nucleofílica aromática, envolvendo a formação de uma ligação C-C (Esquema 1.1). Isso é verificado em uma série de outros compostos de biossíntese mista entre terpenóides e policetídeos^{69,70}. Essa reação é de grande utilidade em síntese orgânica. A sua reprodução controlada *in vitro*, usando células vivas ou enzimas isoladas pode ser então uma boa ferramenta para produzir substâncias aromáticas alquiladas. Os passos seguintes na biossíntese dos meroterpenos envolvem as oxidações do anel A à ciclohexanona e lactonização (Baeyer-Villiger) tanto na porção terpenoila como na parte derivada do ácido orselínico, levando a compostos polifuncionalizados como **1**, **2** e **3**⁷⁰.

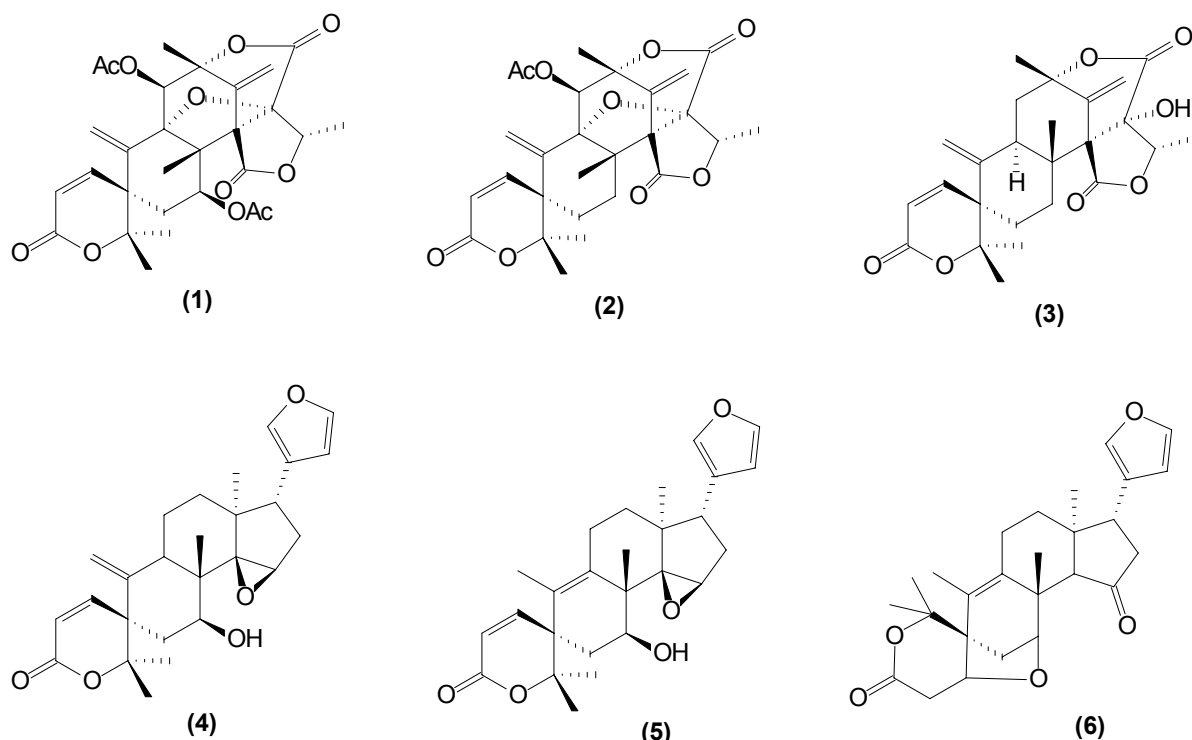
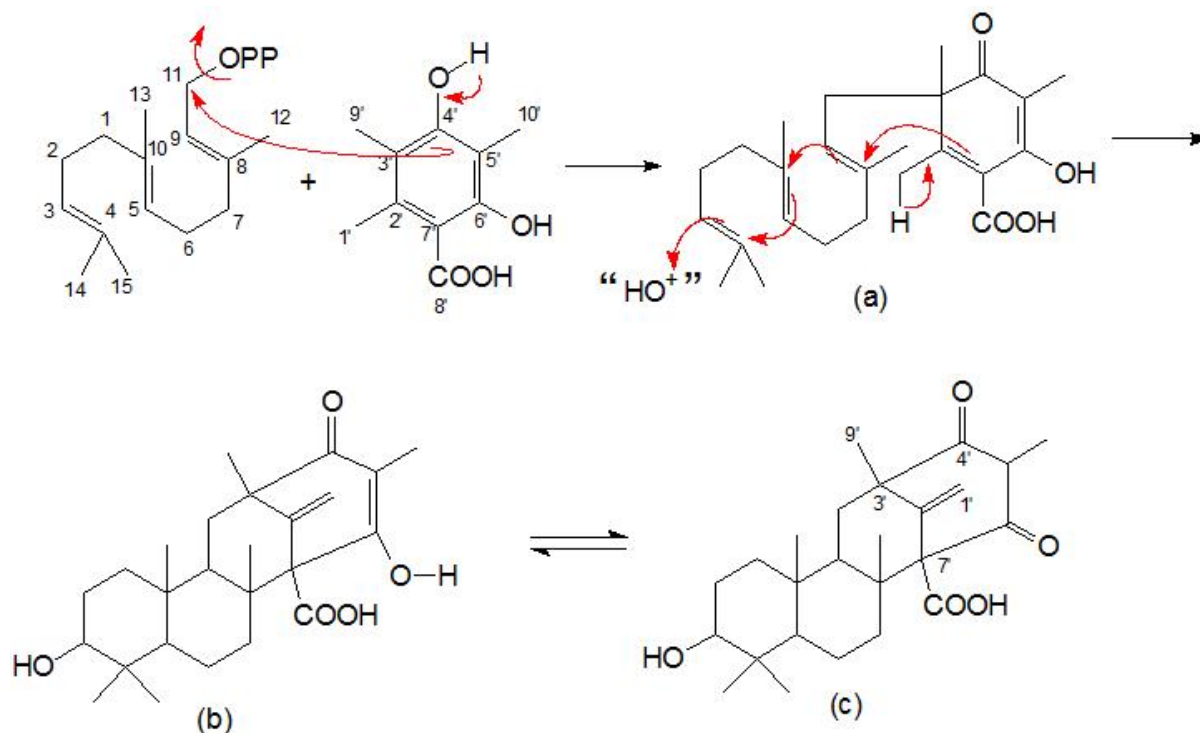


FIGURA 1.5 – Estruturas moleculares dos meroterpenos isolados de *Penicillium brasilianum* (1-3) e dos limonóides (4-6) característicos de Meliáceas.



Esquema 1.1 – Formação do esqueleto meroterpenoídico pelo acoplamento entre o ácido dimetilorselinico e farnesilpirofosfato. A formação do esqueleto tricíclico na porção terpenoídica poder ser invertida, com etapas nucleofílicas culminando na adição tipo Michael no orselinado.

A inspiração em rotas biossintéticas para a busca de enzimas úteis em processos de biotransformação, pode ser uma abordagem mais interessante em

relação ao *screening* aleatório de coleções microbianas, uma vez que, em muitas situações, ao avaliar a rota de produção de metabólitos secundários, pode-se supor quais enzimas são de fato produzidas pelo micro-organismo e que estão ativas na biossíntese. Se substratos adequados são adicionados, eles podem ser “incorporados” e metabolizados pelas enzimas em rotas biosintéticas ativas. Ilustramos isso com mais algumas substâncias isoladas no LaBioMMi/DQ/UFSCar. Alcalóides tremorgênicos também foram produzidos por *P. brasilianum*, o mesmo fungo produtor dos meroterpenos discutidos acima. Esses alcalóides são dipeptídeos (Try-Pro) alquilados com grupos prenilas. “Lendo” as estruturas químicas dessas substâncias, pode-se supor que na sua biossíntese há envolvimento de enzimas preniltransferases. Essa idéia já foi seguida por outros pesquisadores, usando o fungo *Aspergillus fumigatus*, levando à possibilidade de produção e isolamento da enzima em larga escala⁷¹. Preniltransferases podem ser úteis para aplicação em diversas etapas sintéticas para produção de substâncias importantes para o ser humano⁷².

O estudo do genoma de micro-organismos, tentando encontrar genes responsáveis pela produção de certas enzimas, vem sendo apontado como uma estratégia também interessante para triagem de ferramentas úteis para biotransformações⁷³. No entanto, esses genes podem estar silenciados e um grande esforço buscando ativadores tem obrigatoriamente que ser feito. As rotas biosintéticas são um testemunho de que esses genes já estão ativados.

1.3 – Biotransformação de flavonóides

Como constituintes integrais da dieta, os flavonóides exercem amplos efeitos benéficos sobre a saúde humana, incluindo proteção contra doenças cardiovasculares e até mesmo algumas formas de câncer⁷⁴. Recentes estudos têm mostrado algumas das atividades fisiológicas e farmacológicas destes compostos naturais, tais como: estrogênico⁷⁵, antilipoperoxidante⁷⁶, antitumor⁷⁴, antiviral⁷⁷, antifúngico⁷⁸, antibacteriano⁷⁹, antialérgico e antiinflamatório^{80,81}. Estes compostos naturais também apresentam a capacidade de inibir a ação de diversas enzimas, como lipooxigenases⁸², ciclooxigenases⁸³, monooxigenases⁸⁴, xantina oxidase⁸⁵, DNA polimerase⁸⁶, dentre outras. Os efeitos biológicos apresentados pelos

flavonóides se devem, principalmente, pelas suas atividades antioxidantes^{85,87} e habilidades quelantes com muitos metais⁸⁸.

A estrutura básica dos flavonóides contém um núcleo flavano, o qual consiste de 15 átomos de carbonos derivados do esqueleto C₆ – C₃ – C₆ (FIGURA 1.4, (7))⁸⁹. As diferentes classes de flavonóides se distinguem pela adição de anéis oxigenados (heterocíclicos), pela posição diferenciada do anel B e pela adição de grupos substituintes como hidroxilas, metoxilas, isoprenilas, metilas em diferentes posições nos anéis⁹⁰⁻⁹². Esqueletos de alguns flavonóides comuns tais como chalcona (8), flavona (9), flavonol (10), flavanona (11), catequina (12), isoflavona (13) e isoflavanona (14) são apresentadas na FIGURA 1.6.

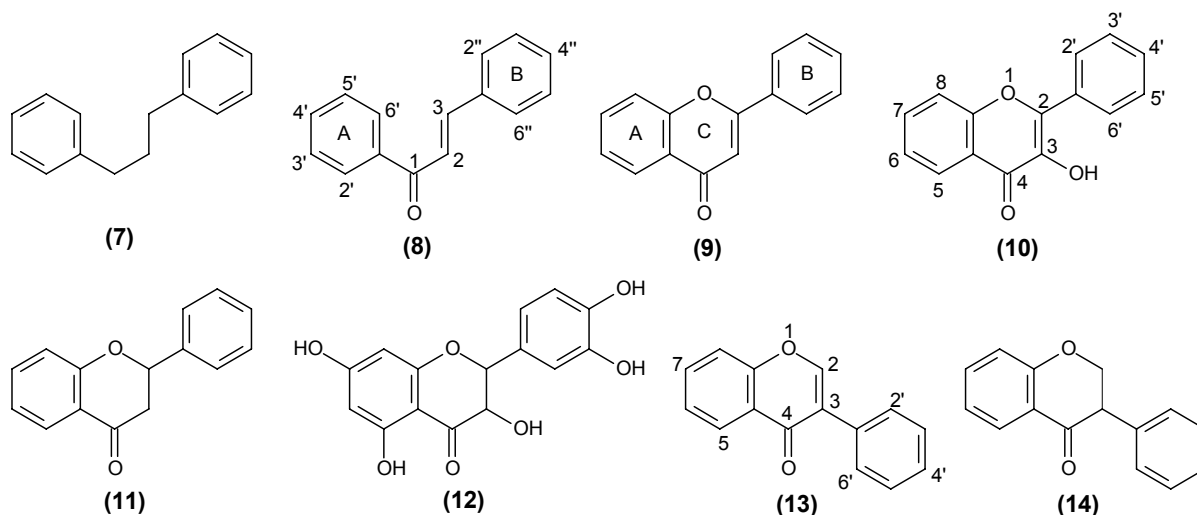


FIGURA 1.6 - Estruturas químicas das chalconas, flavonóides e isoflavonóides.

Os flavonóides pertencem a uma das classes de substâncias mais abundantes e mais amplamente estudadas na natureza. Milhares de flavonóides já foram isolados e identificados, sendo geralmente encontrados na sua forma glicosilada em vacúolos de flores, folhas, sementes e raízes^{91,93}. Os açúcares podem ocorrer nos grupos hidroxilas presentes no esqueleto, no caso O-glicosilação, ou diretamente nos átomos de carbono do anel A e no anel C (mais raramente encontrada). O número de açúcares varia de um a quatro grupos glicosídicos⁹³⁻⁹⁵. As agliconas dos flavonóides, ou até mesmo os flavonóides simples e polimetoxilados não são comumente encontrados, no entanto algumas espécies de *Citrus* são grandes fontes produtoras de tais flavonóides^{96,97}.

Muitos dos flavonóides conhecidos são metabolizados no organismo humano, principalmente pela presença do citocromo P450^{98,99}. Citocromo P450 é o

nome dado para um conjunto de enzimas, formando uma super família de hemeoproteínas presentes em uma série de espécies desde bactérias até mamíferos^{100,101}. Elas são agrupadas em famílias e subfamílias, baseado nas similaridades do sequenciamento dos seus aminoácidos constituintes, sendo as principais responsáveis pelo metabolismo oxidativo dos xenobióticos^{101,102}. Muitos citocromos P450 encontrados em fungos filamentosos estão envolvidos nas reações de desintoxicação ou na síntese de metabólitos secundários⁹⁰. Dentre as reações catalisadas pelo citocromo P450 encontram-se reações de redução, hidrólise e principalmente oxidação^{90,101,102}. Embora os citocromos P450, geralmente convertam xenobióticos para produtos menos tóxicos, as reações freqüentemente envolvem a formação de intermediários reativos ou permitem o vazamento de radicais livres capazes de causar toxicidade.

Essas proteínas estão envolvidas nas interações com flavonóides pelo menos de três formas: (i) flavonóides induzem a biossíntese de muitos citocromos P450; (ii) atividades enzimáticas de citocromos P450 são inibidas ou estimuladas por estes compostos e (iii) flavonóides são metabolizados por muitos citocromos P450¹⁰³. Alguns estudos experimentais vêm sugerindo que muitos flavonóides podem ser metabolizados por citocromo P450, aumentando a contribuição de substâncias que apresentam atividades biológicas marcantes¹⁰⁴.

A busca de meios alternativos para a obtenção de flavonóides naturais tem aumentado com o desenvolvimento da química dos micro-organismos associada à biologia micromolecular¹⁰⁵.

Assim, devido à elevada aplicabilidade e disponibilidade destes compostos na natureza, eles se tornaram alvos de fácil obtenção para a realização de biotransformações, uma vez que qualquer alteração, mesmo que mínima, na estrutura dos flavonóides poderá acarretar no aumento, diminuição ou até mesmo na anulação dos efeitos já apresentados pelos mesmos. Isso faz com que as biotransformações tornem-se uma alternativa para a busca de novas substâncias potencialmente ativas, derivadas de substâncias conhecidas e ativas biologicamente.

Os estudos envolvendo biotransformações de flavonóides têm aumentado consideravelmente nos últimos anos¹⁰⁶. Dentre as reações mais estudadas destacam-se as reações de oxidação, redução, clivagens de anel, conjugação e desglicosilações. Estas reações incluem o uso de biocatalisadores

para converter protótipos abundantes de flavonóides em produtos mais raros; micro-organismos como modelos de transformação metabólica de flavonóides para mamíferos, plantas e solos e seu uso como fontes de vários mecanismos envolvendo hidroxilações enzimáticas, metilações e formação de ligações carbono-carbono¹⁰⁷⁻¹⁰⁹. No entanto o uso de micro-organismos endofíticos para tais reações ainda é muito pouco explorado.

Existe uma série de estudos que envolvem transformações microbianas de flavonas¹¹⁰, flavonóis¹¹¹ e flavononas¹¹², que constituem o grupo mais abundante dos flavonóides. Muitos micro-organismos já foram avaliados de acordo com suas habilidades em produzir transformações em flavonóides. Como ilustrado na FIGURA 1.7, um único substrato pode gerar uma variedade de outras substâncias quando diferentes micro-organismos são empregados^{110,112}.

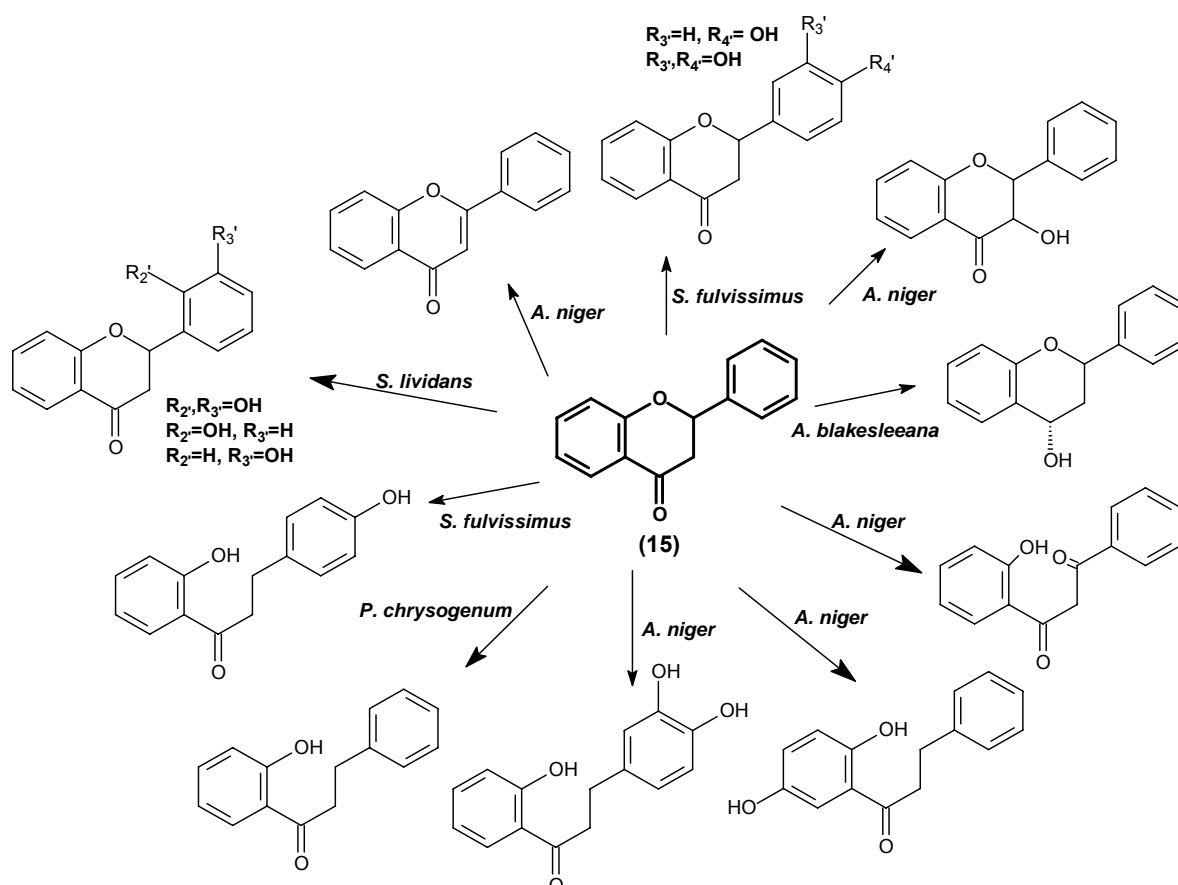


FIGURA 1.7 – Metabólitos das transformações microbianas obtidas a partir da flavanona (15).

Apesar dos flavonóides serem bastante explorados para as reações de biotransformação, principalmente na tentativa de obtenção de novos compostos,

existem alguns tipos de flavonóides que foram pobremente estudados, tratam-se dos flavonóides polimetoxilados e os flavonóides glicosilados.

Dessa forma, busca-se verificar a capacidade dos micro-organismos endofíticos em biotransformar os flavonóides glicosilados, polimetoxilados como uma contribuição para o desenvolvimento da ciência micromolecular dos fungos, uma vez que são estudos ausentes na literatura.

1.4 – Biotransformações oxidativas

Reações de oxidação constituem uma das etapas chaves na introdução de grupos funcionais em compostos da síntese orgânica, os quais na maioria das vezes são alcanos, alcenos ou uma molécula aromática. Tradicionalmente esta metodologia encontra-se associada a diversos problemas, como: muitos oxidantes são baseados em íons de metais tóxicos como cromo (incompatível ao meio ambiente); subprodutos indesejados devido à perda da quimioseletividade; o mais acessível oxidante – oxigênio molecular – não utilizado de maneira eficiente além de ser extremamente difícil utilizar oxidações régio- e estereoespecíficas^{4,113}.

Como consequência, compostos organo-halogenados têm sido amplamente utilizados como intermediários para a síntese de compostos oxigenados (tais como álcoois, aldeídos/cetonas e ácidos carboxílicos), gerando problemas para o tratamento residual. Muitos destes problemas podem ser reconsiderados utilizando oxidações biológicas, em particular para aqueles casos onde a estereoseletividade é requerida⁴.

Enzimas que catalisam a incorporação direta de oxigênio molecular em moléculas orgânicas são denominadas *oxigenases*. A transferência de oxigênio de uma molécula de oxigênio para um receptor orgânico pode proceder de três diferentes mecanismos:

- 1) As monooxigenases são enzimas oxidativas que utilizam oxigênio molecular para inserir um átomo de oxigênio no substrato, enquanto o segundo oxigênio é reduzido por elétrons provenientes do NADH ou NADPH resultando em água¹¹³;
- 2) As dioxigenases incorporam simultaneamente ambos átomos de oxigênio no substrato formando espécies de peróxidos¹¹⁴;

- 3) Oxidases, por outro lado, catalisam a transferência de elétrons na molécula de oxigênio⁴.

As oxidações régio e estereoseletivas obtidas com as oxigenases têm tornado as mesmas uma ferramenta muito útil para a síntese orgânica, já que essas reações são muito úteis para a obtenção dos mais variados compostos. Dentre uma das oxidações mais exploradas, encontra-se a reação de oxidação de Baeyer-Villiger (BV).

A oxidação de Baeyer-Villiger de cetonas cíclicas ou acíclicas é uma das mais exploradas das reações orgânicas. Esta reação, descrita há aproximadamente 100 anos, permite transformar cetonas nas correspondentes lactonas e estéres por oxidantes tais como o ácido meta-cloro-perbenzóico, ácido trifluorperacético, ácido peróxibenzóico e peróxido de hidrogênio¹¹⁵. Estes oxidantes são instáveis, tóxicos e levam à perda da enantioseletividade. Ultimamente o uso de procedimentos envolvendo metais tem sido amplamente aplicado¹¹⁶⁻¹¹⁸. Entretanto estes procedimentos mostram uma baixa versatilidade fornecendo somente uma pequena porcentagem de produto enantiomericamente puro. Por outro lado, o envolvimento de etapas de oxidação de Baeyer-Villiger no metabolismo de muitos micro-organismos já é conhecido por mais de 10 anos, mediados por enzimas então denominadas Baeyer-Villigerases^{119,120}.

Em muitos casos, a aplicação destas enzimas permite aumentar muito a enantioseletividade, sendo aplicadas até mesmo em escalas preparativas através do cultivo de micro-organismos, partindo-se de produtos racêmicos ou proquirais¹²¹. Assim, a aplicação desta “química verde” tornou-se uma alternativa para os métodos químicos, diminuindo assim os impactos causados ao meio ambiente.

Dessa forma, as biotransformações de cetonas envolvendo reações de Baeyer-Villiger têm aumentando nos últimos anos devido à possibilidade de produção de lactonas opticamente ativas com alta estereoseletividade. Tais reações envolvem enzimas Baeyer-Villiger monooxigenases (BVMOs), as quais utilizam oxigênio molecular como oxidante (como já descrito acima).

As BVMOs são produzidas por numerosos micro-organismos. Dentre eles encontram-se os fungos e bactérias^{119,120,122}, o que os tornam promissores biocatalisadores para tais reações.

Assim, são inúmeras as biotransformações oxidativas estudadas, seja para oxidações de BV, hidroxilações, dihidroxilações entre outras. Ou seja, o potencial oxidativo dos micro-organismos é bastante elevado, podendo este ser explorado de diversas maneiras para a obtenção de novos compostos, principalmente, os compostos obtidos de reações altamente estereoseletivas.

Visando a obtenção de tais reações, foram realizados experimentos testes para a comprovação da presença de enzimas BVMOs, nos micro-organismos endofíticos *Penicillium brasilianum* e *Aspergillus flavus*.

1.5 – Alguns resultados ilustrativos obtidos no LaBioMMi/DQ/UFSCar

A fundamentação dada acima indica que micro-organismos fitopatogênicos, aqueles que se associam às plantas e logo provocam sérios prejuízos ao seu desenvolvimento, causando-lhes doenças, são sempre muito agressivos ao hospedeiro. Seu sistema enzimático é extremamente ativo, diminuindo as chances do hospedeiro em suprimir ou controlar esse ataque. Do ponto de vista químico essa relação ecológica pode ser correlacionada com a habilidade do fungo para fazer reações de maior velocidade, porém pouco seletivas. Em geral esses patógenos são hábeis para metabolizar rapidamente substâncias típicas da planta. Por outro lado, micro-organismos de relação aparentemente simbiótica com a planta, são mais seletivos e específicos ao metabolizar substâncias endógenas no hospedeiro. Essa correlação entre o tipo de associação micro-organismo/planta e a expressão do sistema enzimático dos organismos consorciados ainda é uma hipótese de difícil verificação, pois o momento em que o endofítico inicia a fase patogênica da colonização dos tecidos vegetais é um evento muito particular para cada sistema. Nossos estudos envolvendo biotransformações de produtos naturais visam dar contribuições na verificação dessas hipóteses, além de tentar gerar substâncias e processos biossintéticos úteis para os seres humanos.

1.5.1 – Biotransformação de cetonas

Conforme discutido acima, em trabalhos anteriores conduzidos na UFSCar, um dos fungos isolados da planta *Melia azedarach*, identificado como

Penicillium brasilianum, produziu uma série de substâncias da classe dos meroterpenos, contendo uma porção da estrutura oriunda de um sesquiterpeno (C₁₅) e outra de um tetracetídeo (C₁₀)⁶⁶⁻⁶⁸. Essas substâncias apresentam em suas estruturas moleculares vários grupos funcionais lactônicos semelhantes ao encontrado nos limonóides, substâncias endógenas na planta hospedeira (FIGURA 1.8)^{123,124}. As modificações estruturais verificadas no anel A da porção terpenoídica envolvem uma lactonização a partir de uma ciclohexonona, rearranjo para uma função *spiro* e insaturação nos carbonos C-1 e C-2. Essas modificações estruturais são idênticas àquelas seguidas na biosíntese de limonóides produzidos por espécies de plantas correlacionadas taxionômicamente com a planta de onde este fungo foi isolado¹²⁵. Há também a presença de lactonização na porção policetídica dos meroterpenos.

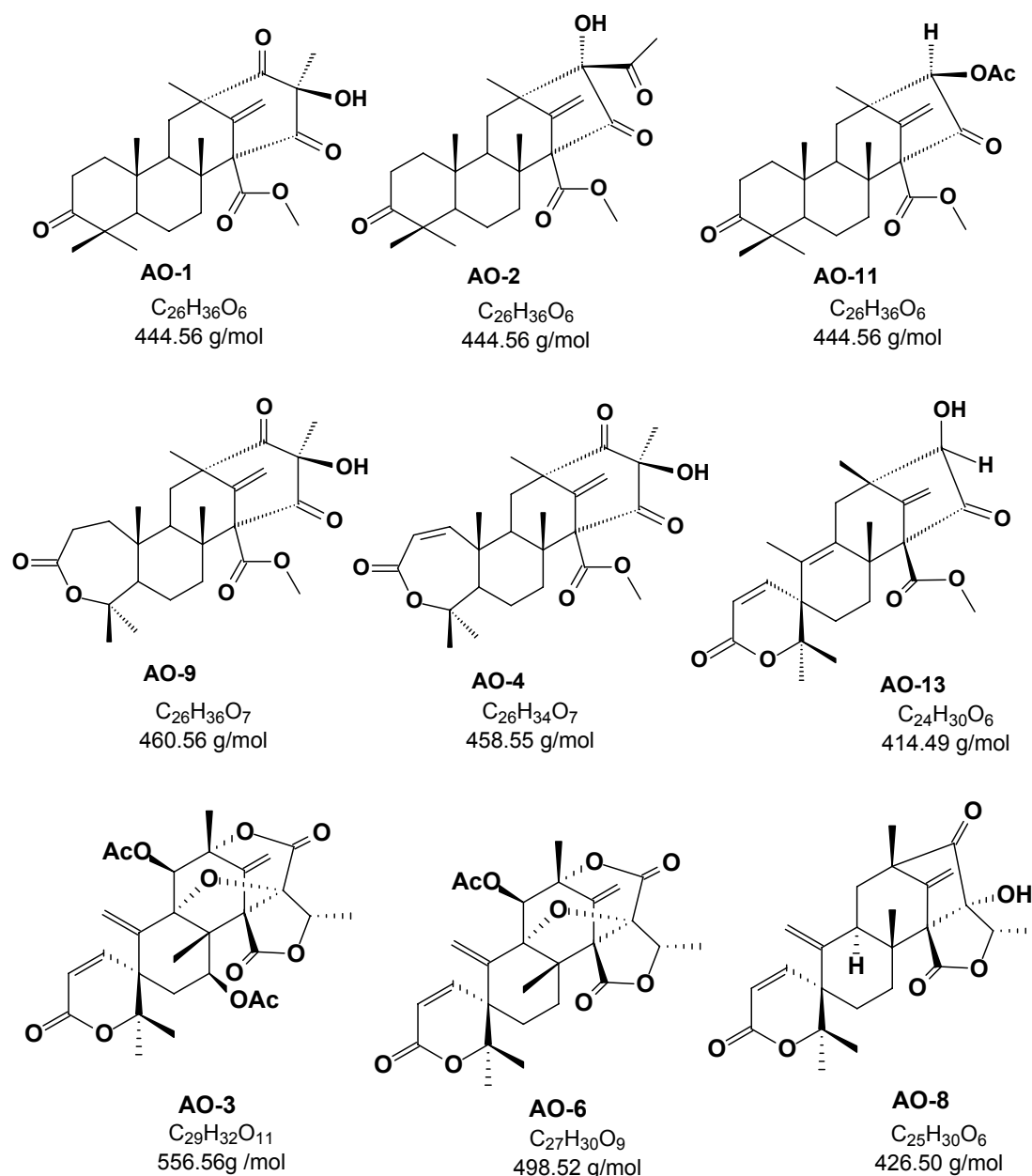


FIGURA 1.8 – Meroterpenos produzidos por *Penicillium brasilianum*.

Durante as tentativas de exploração do sistema enzimático deste fungo, cuja expressão e atividade são constatadas pela produção dos meroterpenos, foram avaliados inicialmente experimentos de lactonização de substratos naturais, como a cânfora¹²⁶. A cânfora foi totalmente consumida e o produto majoritário identificado foi a lactona com a regioquímica prevista pela reação de Baeyer-Villiger. Este resultado confirma a presença de enzimas do tipo Baeyer-Villiger monooxigenases no micro-organismo (FIGURA 1.9).

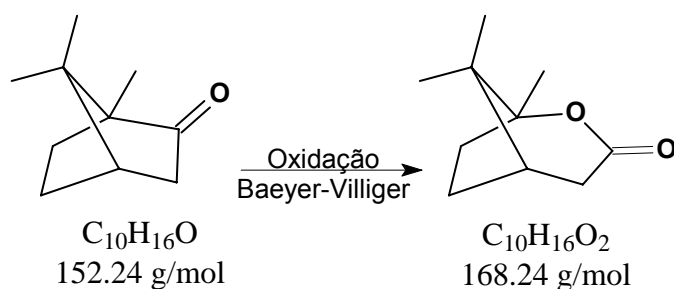


FIGURA 1.9 – Biotransformação da cânfora por *Penicillium brasilianum*.

Aparentemente, essa inserção segue a regioquímica da reação de Baeyer-Villiger clássica, porém, quando a catálise é enzimática, há forte possibilidade de discriminação entre possíveis estereoisômeros^{126,127}.

1.5.2 – Reação de Desmetilação

A facilidade com que os micro-organismos possam reconhecer e transformar substâncias pertencentes ao seu ambiente natural foi mostrada com um experimento inicial realizado com o fungo *Penicillium griseoroseum*, um endofítico isolado dos frutos verdes de *Coffea arabica*. Essa é a primeira vez que este fungo foi isolado dos frutos da planta do café e, além disso, há poucas citações deste fungo em casos de fitopatogenia. Dessa maneira, não há indicativos claros sobre sua forma de associação com a planta nem sobre sua maneira de lidar com constituintes químicos do hospedeiro. Como sabemos, cafeína é um constituinte símbolo da bebida “café”, preparada com sementes de plantas do gênero *Coffea*. De fato, este fungo é bastante adaptado a essa planta, crescendo abundantemente quando é cultivado apenas em sementes de café trituradas e esterilizadas como única fonte de carbono¹²⁸. Quando cafeína pura foi adicionada a um meio de cultivo artificial, o fungo *P. griseoroseum* efetuou uma desmetilação na posição N-7, produzindo a teofilina (FIGURA 1.10)¹²⁹.

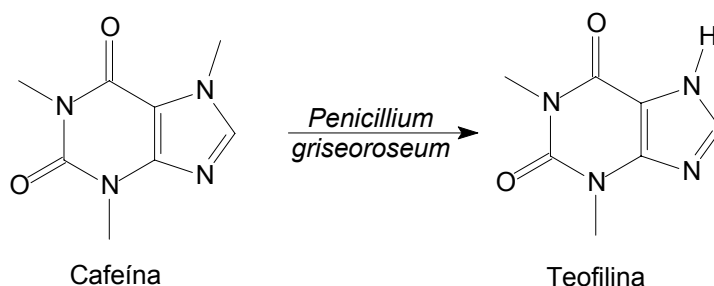


FIGURA 1.10 – Desmetilação da cafeína por *Penicillium griseoroseum*.

OBJETIVOS

2 – OBJETIVOS

O principal objetivo deste trabalho foi investigar a capacidade enzimática dos micro-organismos endofíticos *Penicillium griseoroseum*, *Penicillium brasilianum*, *Aspergillus aculeatus* e *Aspergillus flavus* em biotransformar diferentes substratos.

As metas desenvolvidas foram:

- 1 - Avaliar a seletividade das metilações e desmetilações feitas pelo fungo *Penicillium griseoroseum*, em diferentes substratos tais como flavonóides polimetoxilados.
- 2 - Estabelecer protocolos para extração e análise de culturas fúngicas em diferentes meios e em pequena escala por técnicas de separação (CG-EM e CLAE/UV-EM).
- 3 - Propor esquemas de fragmentação e estratégias de identificação para os substratos e possíveis produtos de biotransformação usando compostos modelos.
- 4 - Aplicar as metodologias analíticas e os protocolos desenvolvidos em experimentos de biotransformação.
- 5 – Isolar e identificar os produtos por RMN e outros métodos espectroscópicos.
- 6 - Avaliar novas condições de biotransformação, tais como meio de cultivo, agitação, temperatura e luminosidade, na tentativa de obtenção de novos produtos biotransformados.
- 7 - Comparação da seletividade e capacidade de biotransformação do gênero *Penicillium* com outros micro-organismos.
- 8 - Realizar a síntese de derivados de flavonóides específicos para a avaliação da seletividade apresentada pelo fungo;
- 9 - Investigar via extrações e fracionamentos, as possíveis enzimas produzidas pelos fungos para a realização de reações de biotransformação.
- 10 - Realizar ensaios para avaliação das atividades biológicas dos metabólitos secundários e de biotransformação.

EXPERIMENTAL

3 – EXPERIMENTAL

3.1 – Materiais

a) Suportes para cromatografia:

As separações cromatográficas em colunas foram realizadas utilizando como fase estacionárias:

- Sílica gel 60 (70-230 mesh) Merck;

-Sílica gel 60 (230-400 mesh) Merck;

Para fracionamentos em camada delgada preparativa (CCDP) e analítica (CCDA) foram utilizadas sílica gel 60 PF₂₅₄ e sílica gel 60 G.

Para separação por cromatografia em CLAE/UV analítica utilizou-se a coluna ODS Synergi 250 x 4.6mm - 4 μ (Phenomenex).

b) Eluentes para cromatografia:

Nas eluições de colunas cromatográficas a baixa pressão e de camada delgada analítica e preparativa foram utilizados solventes P.A. (Merck e Synth) e solventes comerciais destilados no DQ-UFSCar.

Nas eluições de colunas cromatográficas de alta eficiência (CLAE/UV) foram utilizados solventes de grau CLAE/UV (Mallinckrodt, Tedia e JT Baker).

c) Solventes utilizados para obtenção de espectros de RMN:

Os espectros de RMN foram obtidos utilizando solventes deuterados da Merck e Aldrich (98,0-99,9%).

d) Meios de cultura utilizados para o cultivo dos fungos *Penicillium brasilianum*, *Penicillium griseoroseum*, *Aspergillus flavus* e *Aspergillus aculeatus*

Foram utilizados para o cultivo dos fungos o meio de cultura sólido ágar batata e dextrose (BDA); e os meios líquidos Czapek's e Czapek's enriquecido com extrato de levedura (0,8-2%).

Os seguintes reagentes foram utilizados para a preparação dos meios:

- dextrose

- K_2HPO_4
- $MgSO_4 \cdot 7H_2O$
- $FeSO_4 \cdot 7H_2O$
- KCl
- $NaNO_3$
- extrato de levedura
- ágar-ágar

3.2 – Equipamentos utilizados

a) Cromatógrafo a gás

As análises por CG-EM foram realizadas em um espectrômetro CARLO ERBA, modelo GC 8000 series, equipado com uma coluna DB-1 (30 m x 0,25 mm ID) (J&W Scientific).

b) Espectrômetros de massas

Os espectros de massas foram adquiridos em dois equipamentos: o espectrômetro MICROMASS Platform II, equipado com a interface por impacto eletrônico 70eV, utilizado quando acoplado ao cromatógrafo a gás; e o espectrômetro MICROMASS Quattro LC (triplo quadrupolo) equipado com uma fonte ESI/APCI “Z-spray” e gás de arraste argônio, utilizado em inserção direta e acoplado ao cromatógrafo líquido WATERS Alliance 2695.

c) Espectrômetros de RMN

Os espectros de RMN foram obtidos nos espectrômetros Bruker ARX 200 e AVANCE DRX 400, operando a 4,7 e a 9,4 Tesla, respectivamente.

d) CLAE/UV

As análises em CLAE analítico foram realizadas em dois cromatógrafos: um cromatógrafo Shimadzu LC-10AD, equipado com um detector de UV Shimadzu SPD-M10Avp *diode array*, Auto injetor Shimadzu SIL-10Advp e Sistema de controle Shimadzu SCL-10A e um cromatógrafo WATERS Alliance 2695, equipado com um detector de UV WATERS 2996 *Photo Diode Array*.

e) Estufa de secagem e esterilização

Para secagem de vidrarias e esterilizações de placas de Petri foram utilizadas as estufas FANEM-315 SE.

f) Autoclaves verticais

Para a esterilização de materiais e meios de cultura foram utilizadas as autoclaves PHOENIX AV 75 e AV 30.

g) Câmara de fluxo laminar

A manipulação dos micro-organismos foram realizadas em um fluxo laminar da VECO VL FS – 12M.

h) Rotaevaporador

A eliminação das solventes nos extratos e frações foram realizadas em rotaevaporadores a pressão reduzida utilizando Buchi Waterbath B – 480.

i) Moínho

Para a moagem de meios de culturas contendo os micro-organismos para tornar a extração mais eficiente foi utilizado um moinho TECNAL – TE 631.

3.3 – Métodos

3.3.1 – Cultivo dos micro-organismos

A ativação de todas as cepas obtidas ocorreu através da inoculação de recortes (0,5 x 0,5cm) do fungo em placas contendo o meio BDA. Após o desenvolvimento dos mesmos nestas placas (aproximadamente três dias) eles já encontravam-se aptos para os posteriores experimentos de biotransformação.

Para os experimentos de biotransformação os micro-organismos foram cultivados em meio líquido:

Meio líquido Czapek's: Este meio líquido foi obtido da seguinte forma: em um Becker adicionou-se 3,0 g de NaNO₃, 1,0 g de K₂HPO₄, 0,5 g de MgSO₄.7H₂O, 0,5 g KCl e 0,01 g FeSO₄.7H₂O e 1 L de água destilada agitou-se até a completa dissolução dos

sais. Em seguida adicionou-se 30 g de glicose e manteve-se a agitação. Homogeneizada a solução, autoclavou-se a mesma por 15 minutos.

Meio líquido Czapek's enriquecido com extrato de levedura: em um Becker adicionou-se 3,0 g de NaNO₃, 1,0 g de K₂HPO₄, 0,5 g de MgSO₄.7H₂O, 0,5 g KCl e 0,01 g FeSO₄.7H₂O e 1 L de água destilada agitou-se até a completa dissolução dos sais. Em seguida adicionou-se 30 g de glicose e manteve-se a agitação. Adicionou-se por fim 20 g de extrato de levedura. Homogeneizada a solução, autoclavou-se a mesma por 15 minutos. Após autoclavados e resfriados à temperatura ambiente os micro-organismos foram inoculados. O tempo de cultivo dos mesmos variou conforme o experimento realizado.

3.3.2 – Experimentos de biotransformação utilizando *Penicillium griseoroseum*

3.3.2.1 – Biotransformação da cafeína

O preparo do meio de cultura utilizado seguiu a descrição contida no item 3.3.1. 200 mL do meio líquido Czapek's contendo 2% de extrato de levedura foram adicionados em frascos de Erlenmeyers de 500 mL. Após autoclavados inoculou-se o fungo *Penicillium griseoroseum* em alguns dos frascos, deixando-se um frasco como controle (sem o micro-organismo), em seguida adicionou-se uma solução contendo 20 mg de cafeína dissolvidos em 2 mL de acetona por frasco. O experimento foi mantido estático por 25 dias.

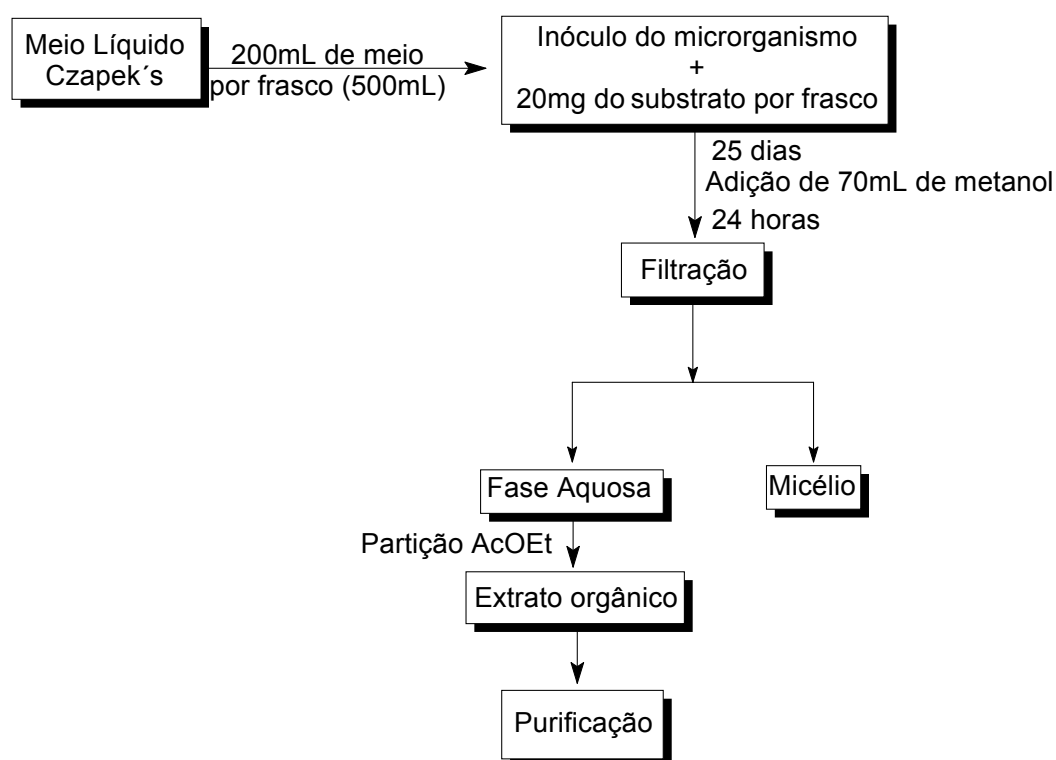
Adicionou-se em cada um dos frascos 70 mL de metanol e deixou-se extraído por 24 horas. Triturou-se o micélio, filtrou-se à vácuo e o filtrado restante foi particionado com acetato de etila (3 x 100 mL). O extrato orgânico obtido foi purificado através de colunas cromatográficas. As frações obtidas das colunas cromatográficas foram monitoradas por CCDA. A presença de um possível produto de biotransformação foi detectada e, portanto realizou-se CCDP para o isolamento do produto, que foi caracterizado via as análises de RMN¹H 1D e 2D.

3.3.2.2 – Biotransformação da 5,7,3',4',6'-pentametoxiflavanona

O preparo do meio de cultura utilizado seguiu a descrição anterior (item 3.3.2.1), na qual o meio líquido utilizado foi Czapek's contendo 2% de extrato de

levedura. Após autoclavado o meio inoculou-se o fungo *Penicillium griseoroseum* (sempre mantendo um frasco controle – contendo somente o micro-organismo) e adicionou-se uma solução contendo 20 mg do substrato 5,7,3',4',5'-pentametoxiacetofenona dissolvidos em 2 mL de acetona por frasco. O experimento foi mantido estático por 25 dias.

Adicionou-se em cada um dos frascos 70 mL de metanol e deixou-se extraíndo por 24 horas. Triturou-se o micélio, filtrou-se à vácuo e o filtrado restante foi particionado com acetato de etila (3 x 100 mL). O extrato orgânico obtido foi purificado através de colunas cromatográficas (Fluxograma 3.1).



FLUXOGRAMA 3.1 – Procedimento experimental para o experimento de biotransformação da 5,7,3',4',5'-pentametoxiflavanona.

O produto purificado (2 mg) foi caracterizado por RMN 1D e 2D e análises de EM. As condições para a análise por EM foram: ionização por *electrospray* modo positivo; temperatura da fonte 130°C; temperatura do probe 450°C; potencial do capilar 3,08 kV; potencial do cone 32 V; potencial do extrator 3 V e lentes RF 0,61 V. Para os experimentos de íons fragmentos utilizou-se 20 eV de energia de colisão.

3.3.2.3 – Biotransformação dos flavonóides glicosilados

Todos os experimentos utilizando os flavonóides glicosilados foram realizados em meio líquido, no entanto se distinguiram em relação a composição do meio líquido, à maneira de adicionar os substratos, assim como o tempo e ambiente de cultivo. Os meios de cultura foram obtidos de acordo com o item 3.3.1.

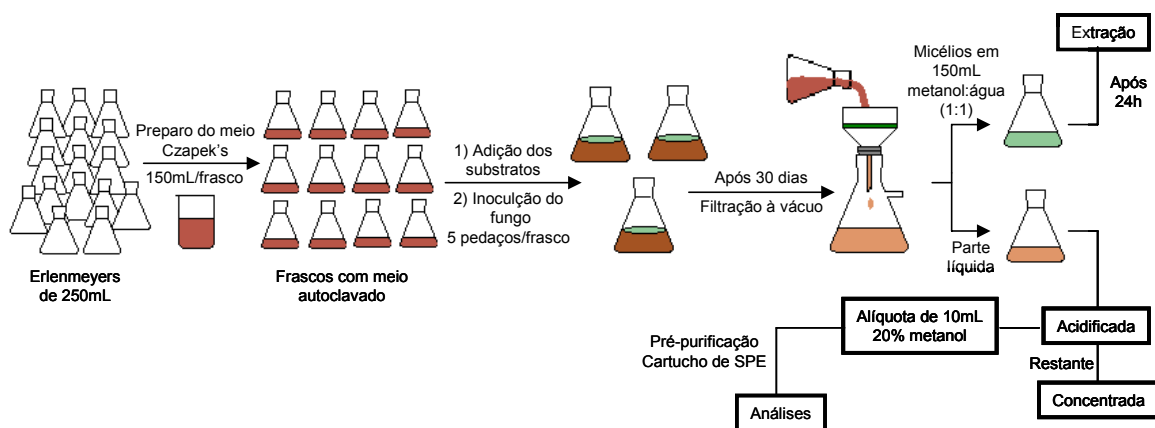
3.3.2.3.1 – Experimento com a adição da mistura de flavonóides

Inicialmente, dois experimentos foram realizados: (I) – o fungo foi cultivado em meio líquido Czapek's e estático; (II) – o fungo foi cultivado no mesmo meio líquido, porém sob agitação constante (120 rpm).

Em cada um dos doze frascos de Erlenmeyers utilizados nos experimentos foram distribuídos 150 mL de meio líquido. Autoclavou-se os frascos e quando resfriados à temperatura ambiente, o micro-organismo foi inoculado e a mistura dos flavonóides (rutina, naringina e hesperidina – 10 mg de cada dissolvidos em 4 mL de uma solução água:metanol 4:1) foi adicionada ao meio, sendo um dos frascos mantido como controle – sem micro-organismo e sem substratos.

O experimento foi mantido sob temperatura ambiente e estático por 30 dias (experimento (I)), os outros 12 frascos, preparados sob as mesmas condições, foram mantidos sob agitação constante (120 rpm), por 30 dias (experimento (II)).

Após o término de cultivo do micro-organismo, os conteúdos dos frascos foram filtrados sob vácuo, por um funil de Buchner, onde a fase aquosa foi recolhida e os micélios armazenados numa solução água:metanol (4:1). A fase aquosa foi acidificada com ácido clorídrico diluído (0,1mol/L) para pH, aproximadamente, 5,0. Em seguida, retirou-se uma alíquota de 8 mL e a esta adicionou-se 2 mL de metanol (4:1). Esta amostra de 10 mL foi submetida as demais análises. Inicialmente a amostra foi pré-purificada por EFS e, então analisada por CLAE/UV e CLAE/UV-EM (Fluxograma 3.2).



FLUXOGRAMA 3.2 – Procedimento utilizado para o experimento de biotransformação dos flavonóides glicosilados e *Penicillium griseoroseum*.

3.3.2.3.2 – Cultivo dos flavonóides individualmente sob agitação

O experimento sob agitação constante de 120 rpm foi realizado novamente, porém com os flavonóides padrões adicionados individualmente para facilitar as posteriores análises. Outra modificação foi realizada no meio de cultura, do qual diminuiu-se pela metade a quantidade de glicose normalmente utilizada.

As demais condições de cultivos foram as mesmas descritas anteriormente no item 3.3.2.2. O experimento foi mantido sob agitação constante por 25 dias e, ao término do cultivo interrompeu-se a agitação, filtrou-se o conteúdo dos frascos, acidificou-se os mesmos com ácido clorídrico até pH = 5,0. Retirou-se uma alíquota de 10 mL com 20% de metanol. Submeteu-se essas alíquotas à pré-purificação no cartucho de EFS e, em seguida estas foram analisadas por CLAE/UV, exatamente como descrito para os experimentos (I) e (II), inclusive nas mesmas condições (item 3.3.2.3.1).

3.3.2.3.3 – Cultivo em meio rico, adição dos flavonóides glicosilados, cultivo em meio pobre

Inicialmente, o fungo foi inoculado no meio líquido Czapek's enriquecido com 0,8% de extrato de levedura (meio rico). Utilizou-se no experimento, frascos de 250 mL contendo 62,5 mL de meio em cada. Após 7 dias de cultivo estático, os micélios foram filtrados na capela de fluxo laminar, completamente esterilizada (papel de filtro, funil de Buchner e kitasato). Os micélios

foram transferidos para outro meio de cultura (meio líquido Czapek's), os quais estavam divididos em triplicata de acordo com os flavonóides utilizados:

- 3 frascos contendo 15 mg de naringina;
- 3 frascos contendo 15 mg de hesperidina;
- 3 frascos contendo 15 mg de rutina;
- 3 frascos contendo somente o micélio;
- 1 frasco contendo somente meio líquido;
- 3 frascos contendo os substratos individualmente.

Os substratos foram previamente solubilizados em DMSO e adicionados ao meio de cultura após a esterilização. Os frascos foram mantidos sob agitação constante (120 rpm) por 12 dias.

Ao término do cultivo filtrou-se o experimento, o filtrado foi extraído com acetato de etila, enquanto o micélio foi extraído com metanol:diclorometano (1:1). Os extratos obtidos do filtrado foram analisados por CCDA e por CLAE/UV.

3.3.2.3.4 – Análise dos experimentos com flavonóides

Os solventes utilizados na eluição gradiente foram: eluente A: água MilliQ, eluente B: Metanol, ambos contendo 0,1% de TFA. A concentração do eluente B variou de 20 – 60% (0 – 10 min), 60 – 100% (10 – 30 min), 100% (30 – 35 min), 100 – 20% (35 – 37 min) e condicionou-se a coluna em 20% por 13 min.

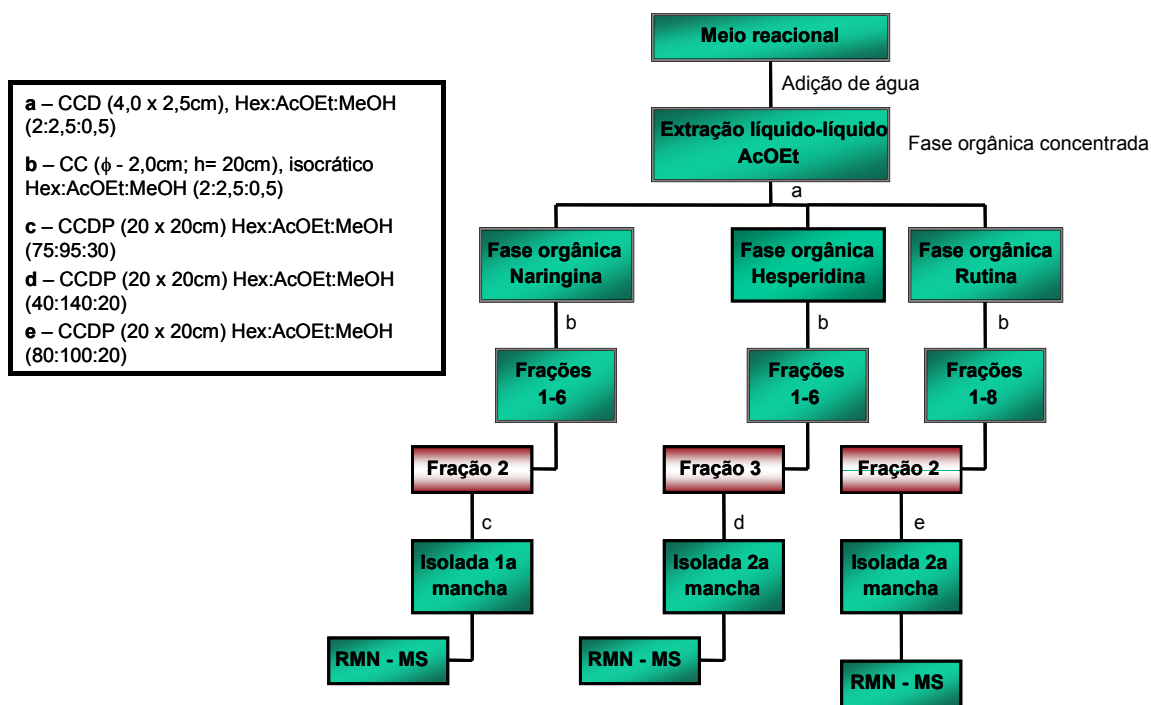
O volume de injeção foi de 20 µL e o fluxo utilizado foi de 0.7 mL/min. A coluna utilizada foi a coluna Phenomenex – Synergi Fusion RP 80A 4 µ, 250 x 4.6 mm. A detecção por UV variou entre 190 – 800 nm.

As análises por EM utilizou ionização por *electrospray* no modo negativo, onde os parâmetros foram: temperatura da fonte 130°C; temperatura do probe 350°C; potencial do capilar 3,08 kV, potencial do cone 36 V, extrator 4 V e lentes RF 0,70 V. Para os experimentos de íons fragmentos utilizou-se 15 eV de energia de colisão.

3.3.2.4 – Reação de permetilação dos flavonóides glicosilados

Pesou-se 10 mg de naringina, rutina e hesperidina, separadamente e colocou-se nos respectivos balões de 10 mL. Os balões foram colocados sob agitação magnética e os substratos foram dissolvidos em 0,300 mL de DMF e conectou-se o gás nitrogênio para desaerar. As quantidades de reagentes utilizadas foram calculadas baseando-se nas quantidades relativas de excesso, como discutido por ROGMANN *et al* (2000)¹³⁰. Pesou-se a quantidade de hidreto de sódio (5 equivalente molar/grupo –OH) necessário para a reação de cada flavonóide individualmente e colocou-se nos balões de adição. Após a dissolução completa dos flavonóides iniciou-se a adição do hidreto ao balão reacional, vagarosamente. Deixou-se reagindo por meia hora. Passado esse tempo, adicionou-se o iodo metano aos balões (5 equivalente molar/grupo –OH) para cada flavonóide e deixou-se sob agitação por 24 horas.

Ao término das 24 horas, interrompeu-se a reação com a adição de 3 mL de água destilada. Acidificou-se a solução reacional com algumas gotas de ácido acético e realizou-se uma partição líquido-líquido com acetato de etila. Separou-se a fase aquosa da fase orgânica. Secou-se a fase orgânica com sulfato de sódio anidro, filtrou-se e evaporou-se o solvente, como ilustra detalhadamente o Fluxograma 3.3.



FLUXOGRAMA 3.3 – Procedimentos experimentais para extração dos produtos de reação dos flavonóides glicosilados.

3.3.2.4.1 – Análises dos produtos reacionais por EM

Como os possíveis produtos da reação encontrariam-se metoxilados, as análises por EM não foram realizadas no modo de ionização negativo e sim no modo positivo, uma vez que a adição de prótons na molécula ocorreria de maneira mais facilitada. O solvente utilizado nas análises foi metanol e as condições para os flavonóides encontram-se descritas nas Tabelas 3.1 e 3.2:

TABELA 3.1 – Condições do espectrômetro de massas para as amostras com naringina (ESI+).

| | |
|---------------------------|------|
| Temperatura da fonte (°C) | 130 |
| Temperatura do probe (°C) | 350 |
| Capilar (kV) | 2.62 |
| Cone (V) | 35 |
| Extrator (V) | 6 |
| Lentes RF (V) | 0.60 |

TABELA 3.2 – Condições do espectrômetro de massas para hesperidina e rutina (ESI+).

| | |
|---------------------------|------|
| Temperatura da fonte (°C) | 130 |
| Temperatura do probe (°C) | 350 |
| Capilar (kV) | 4.13 |
| Cone (V) | 36 |
| Extrator (V) | 5 |
| Lentes RF (V) | 0.70 |

Para os experimentos de íons precursores, as condições utilizadas foram as mesmas citadas acima, porém as energias de colisão foram:

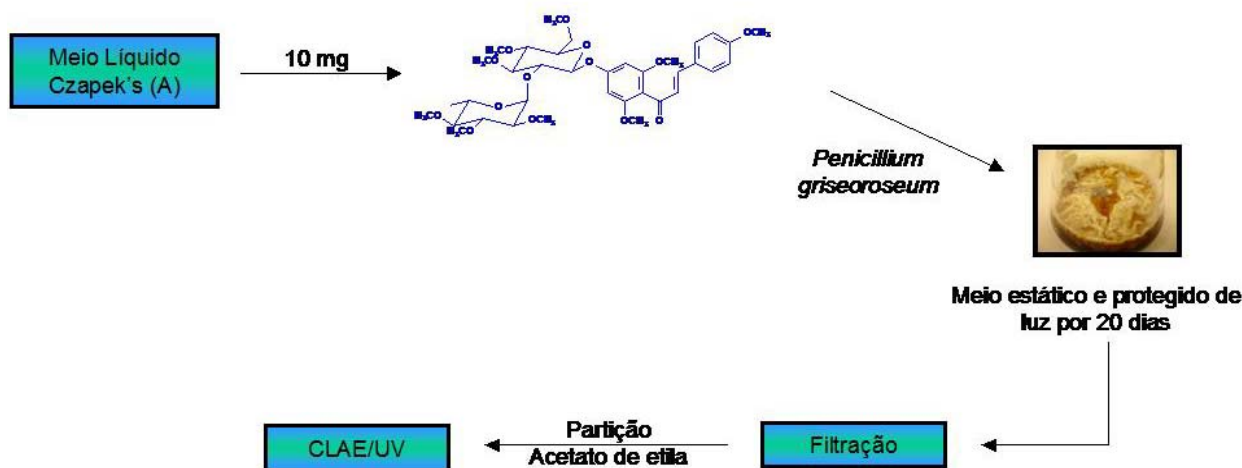
- naringina: 17eV
- hesperidina: 20eV
- rutina: 20eV

3.3.2.5 – Experimento de biotransformação dos flavonóide polimetoxilados

Os flavonóides polimetoxilados naringina, hesperidina, e rutina foram obtidos de acordo com o item 3.3.2.4. No entanto, reação em grande escala foi obtida primeiramente somente com o flavonóide naringina, para que um teste de biotransformação fosse realizado. De acordo com os resultados obtidos com a reação de permetilação, dois flavonóides polimetoxilados foram obtidos, um deles apresentou a abertura do anel C (naringina 1), enquanto o outro não (naringina 2). Para o experimento de biotransformação utilizou-se 16 frascos de Erlenmeyer de 250 mL contendo 100 mL de meio líquido Czapek's enriquecido com extrato de levedura, sendo divididos da seguinte maneira: 3 frascos contendo 10 mg da naringina 1, 2 frascos contendo 10 mg da naringina 2, 3 frascos contendo meio e fungo. O experimento permaneceu e protegido de luz por 20 dias.

Após 20 dias de cultivo, os frascos foram filtrados a vácuo, os micélios foram armazenados em 100 mL de metanol por 24 horas, sendo posteriormente triturados, filtrados e concentrados. O filtrado inicial foi submetido a partição líquido-líquido com acetato de etila, denominada **A**. Em seguida, a fase aquosa foi acidificada com uma solução de HCl (pH 2) e extraída com acetato de etila (**Aa**).

Adicionou-se ainda à fase aquosa remanescente uma solução básica (NaOH), invertendo-se o pH para 10 e extraiu-se novamente com acetato de etila (**Ab**). Adicionou-se sulfato de sódio anidro a todas as fases orgânicas obtidas, filtrou-se e evaporou-se no rotaevaporador (Fluxograma 3.4).



FLUXOGRAMA 3.4 – Procedimento para a biotransformação dos flavonóides polimetoxilados.

3.3.2.5.1 – Análise do experimento com os flavonóides polimetoxilados

Os solventes utilizados na eluição gradiente foram: eluente A: água MilliQ, eluente B: Metanol. A concentração do eluente B variou de 60 – 100% (0 – 45 min), 100% (45 – 50 min) e condicionou-se a coluna em 45% por 15 min.

O volume de injeção foi de 30 μ L e o fluxo utilizado foi de 0.7 mL/min. A coluna utilizada foi a coluna Phenomenex – Synergi Fusion RP 80A 4 μ , 250 x 4.6 mm. A detecção por UV variou entre 190 – 800 nm.

3.3.2.6 – Reação de hidrólise dos flavonóides glicosilados

Os flavonóides foram solubilizados em uma solução metanólica (1:1), sob agitação constante. Para 500 mg de cada flavonóide individualmente, adicionou-se 20 mL de HCl concentrado e deixou-se sob refluxo à 80°C por 24h. A reação foi monitorada por CCDA, cujo eluente foi acetato de etila:água:ácido fórmico (6:1:1). Ao término da reação adicionou-se à mistura reacional 200 mL de água destilada.

Extraiu-se com acetato de etila (3 x 200 mL) e secou-se com sulfato de sódio anidro. As fases orgânicas foram concentradas. O extrato obtido foi purificado através de coluna cromatográfica de sílica do tipo *flash*, sendo o eluente hexano:acetato de etila (1:1). As frações purificadas foram analisadas por CLAE/UV-EM.

3.3.2.7 – Biotransformação da naringenina e hesperetina

O micro-organismo foi inicialmente cultivado em meio líquido Czapek's sem extrato de levedura (item 3.3.1) durante três dias sob agitação constante (120 rpm). Após os três dias de cultivo, as agliconas dos flavonóides glicosilados, naringenina e hesperitina, solubilizadas em DMSO e adicionadas aos frascos contendo o meio e o micro-organismo, em seguida o experimento foi mantido por mais sete dias sob agitação constante.

Ao término do cultivo, filtrou-se todos os frascos dos experimentos. Retirou-se uma alíquota de 5 mL de cada filtrado e adicionou-se 5 mL de metanol para as posteriores análises por CLAE/UV-EM. O restante do filtrado foi extraído com acetato de etila, sendo as fases orgânicas depois de secas, analisadas por CLAE/UV-EM.

3.3.2.7.1 – Análises do experimentos contendo naringenina e hesperetina

Os solventes utilizados na eluição gradiente foram: eluente A: água MilliQ, eluente B: Metanol. A concentração do eluente B variou de 20 – 65% (0 – 10 min), 65 – 100% (10 – 30 min) e condicionou-se a coluna em 20% por 15 min. O volume de injeção foi de 15µL e o fluxo utilizado foi de 0.7 mL/min. A coluna utilizada foi a coluna Phenomenex – Synergi Fusion RP 80A 4µ, 250 x 4.6 mm. A detecção por UV variou entre 210 – 500 nm.

As análises por EM utilizou ionização por APCI no modo positivo, sendo os potenciais utilizados: corona 3,10 kV, cone 25 V, extrator 6 V e lentes RF 0,70 V, as temperaturas foram: da fonte 170°C e do probe 400°C. Para os experimentos de íons fragmentos utilizou-se 15 eV de energia de colisão.

3.3.2.8 – Reação de metilação da 2',4',6'-trihidróxiacetofenona

Os reagentes 2',4',6'-trihidróxiacetofenona (100 mg), carbonato de potássio (446 mg) e dimetilsulfato (0,310 mL) foram adicionados e dissolvidos em um balão de 50 mL contendo 15 mL de acetona, a 45°C de aquecimento em um banho de óleo, sob refluxo, durante aproximadamente 14 horas. A reação foi interrompida com a adição de 10 mL de HCl 10%. Realizou-se uma partição líquido-líquido com acetato de etila, em seguida, lavou-se a fase orgânica com água para a retirada do excesso de ácido. Posteriormente, lavou-se ainda a fase orgânica com NaCl saturada para facilitar a sua secagem. Secou-se com sulfato de sódio anidro e concentrou-se o solvente. Para a purificação do produto metilado realizou-se uma coluna cromatográfica (h=20 cm e ϕ =2,5 cm) com sílica do tipo flash como fase estacionária, sob pressão, sendo a eluição realizada no modo isocrático com hexano:acetato de etila (8:2). As frações purificadas do produto foram reunidas e submetidas as análises por RMN¹H.

3.3.2.9 – Biotransformação da 2',4',6'-trimetoxiacetofenona

Cultivou-se o micro-organismo em meio rico por 7 dias. Transferiu-se o micélio para o meio pobre contendo 15 mg do substrato previamente dissolvido em DMSO, como já descrito no item 3.3.2.3.3. Após 12 dias de cultivo em meio pobre sob agitação constante, filtrou-se o experimento e retirou-se uma alíquota de 5 mL do filtrado. Adicionou-se à alíquota 5 mL de metanol para as análises por CLAE/UV-EM. O restante do filtrado foi extraído com acetato de etila. As fases orgânicas foram secas e concentradas. Os extratos obtidos foram monitorados por CCD. As substâncias foram isoladas por CCDP e submetida as análises por CLAE/UV-Em e RMN¹H.

3.3.2.9.1 – Análise da amostra biotransformada de 2',4',6'-trimetoxiacetofenona

Os solventes utilizados na eluição gradiente foram: eluente A: água MilliQ, eluente B: Metanol. A concentração do eluente B foi mantida em 20% durante 10 minutos, em seguida variou de 20 – 100% (10 – 11 min), manteve-se em 100% por 5 minutos e condicionou-se a coluna em 20% por mais 15 min.

O volume de injeção foi de 5 μ L e o fluxo utilizado foi de 1 mL/min. A coluna utilizada foi a coluna Phenomenex – Synergi Fusion RP 80A 4 μ , 250 x 4.6 mm. A detecção por UV variou entre 210 – 500 nm.

As análises por EM utilizou ionização por APCI no modo positivo, sendo os potenciais utilizados: corona 3,22 kV, cone 25 V, extrator 6 V e lentes RF 0,70 V, as temperaturas foram: da fonte 170°C e do probe 300°C. Para os experimentos de íons fragmentos utilizou-se 20 eV de energia de colisão.

3.3.2.10 – Isolamento de metabólitos secundários

Os frascos contendo o meio líquido Czapek's (200 mL em frascos de 500 mL) foram autoclavados e o fungo *Penicillium griseoroseum* foi inoculado. Os frascos foram mantidos em modo estático e protegido da luz durante 20 dias.

Ao término do cultivo, o conteúdo dos frascos foram filtrados, sendo a fase aquosa extraída com acetato de etila (3 x 100 mL). Todas as fases orgânicas foram reunidas em um único extrato. O extrato foi purificado em coluna cromatográfica de sílica do tipo *flash*, sendo uma substância isolada. Cerca de 5 mg da substância pura foi obtida, que foi caracterizada pelos métodos espectroscópicos.

3.3.3 – Experimentos de biotransformação utilizando *Penicillium brasilianum*

3.3.3.1 – Reação de oxidação da 1-indanona (reação de Baeyer-Villiger *in vitro*)

Em balão de fundo redondo de 125 mL contendo 60 mL de diclorometano tratado, adicionou-se 1,00 g de 1-indanona. O balão foi mantido sob agitação constante. A completa solubilização da 1-indanona tornou a solução amarela. Em seguida, adicionou-se, aos poucos, 3,83g de bicarbonato de sódio e conseqüentemente o ácido meta-cloroperbenzóico (4,37g). A reação permaneceu sob agitação por um período de 24 horas.

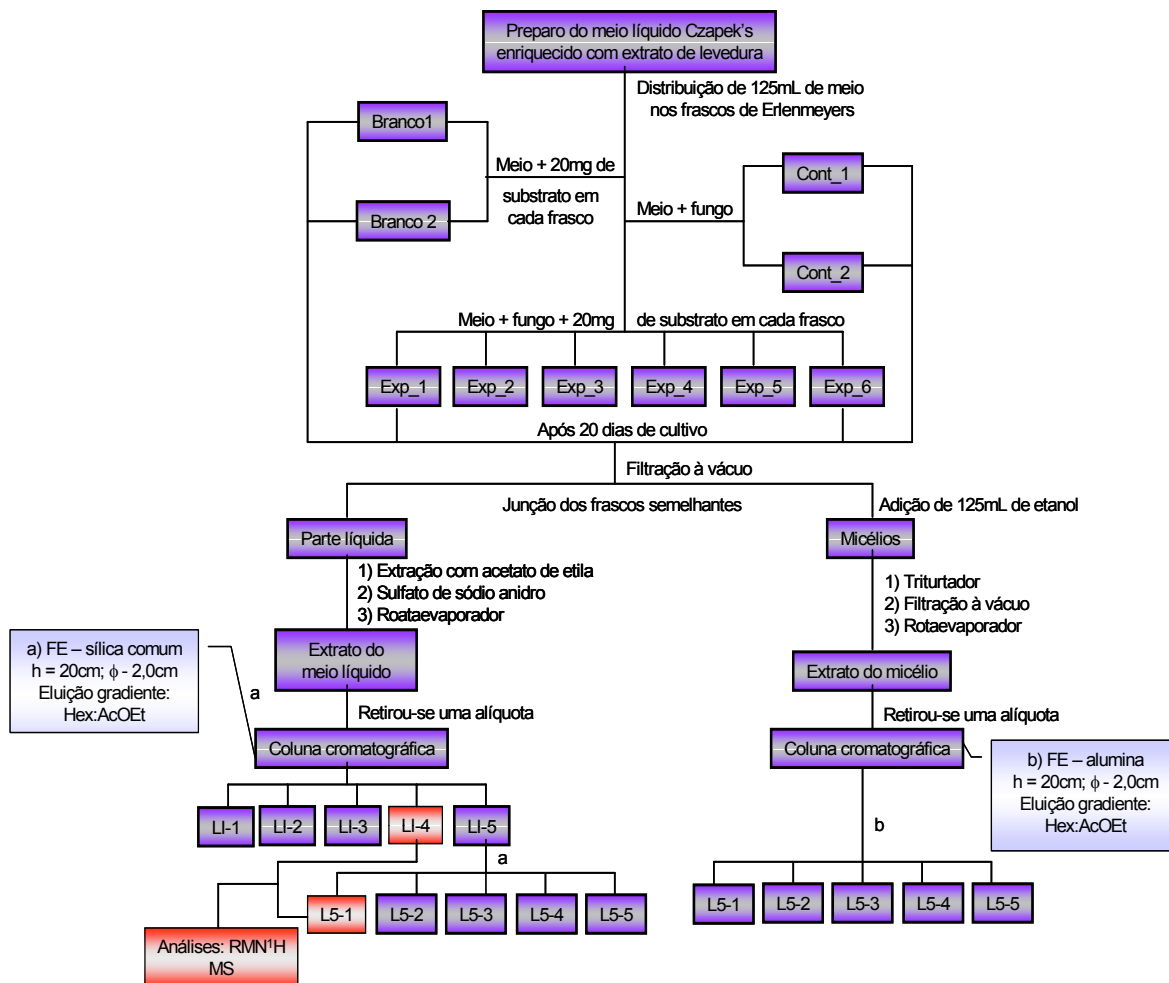
Ao término das 24 horas, adicionou-se 20 mL de uma solução 10% de iodeto de potássio e 20 mL de uma solução de NaHSO₃. Posteriormente, realizou-se uma partição líquido-líquido com 200 mL acetato de etila. Secou-se a fase orgânica e evaporou-se o solvente. O produto obtido foi analisado e caracterizado por CG-EM e RMN.

3.3.3.2 – Biotransformação da 1-indanona por *Penicillium brasilianum*

3.3.3.2.1 – Modo estático (20 dias de cultivo)

O meio líquido utilizado para a reação de biotransformação com o fungo *Penicillium brasilianum* foi o Czapek's enriquecido com extrato de levedura. O modo de preparo do meio também foi semelhante aos meios de cultura já mencionados anteriormente. Porém antes de serem autoclavados, realizou-se uma modificação: em 7 dos 9 frascos utilizados, foi adicionada uma solução de 20 mg de indanona dissolvida em acetona. Em seguida, todos os frascos foram autoclavados por 15 minutos à pressão de 1atm. Depois de resfriado o meio até a temperatura ambiente, inoculou-se 5 pedaços do fungo em cada frasco e reservou-se em meio estático protegido de luz, por 20 dias.

Ao término dos 20 dias de cultivo, o conteúdo dos frascos foram filtrados à vácuo, onde o filtrado foi separado do micélio. Ao micélio, adicionou-se 125 mL de etanol, triturou-se e, em seguida, foram novamente filtrados. Juntaram-se as partes líquidas semelhantes, inicialmente separadas, extraiu-se as mesmas com acetato de etila, secou-se a fase orgânica obtida com sulfato de sódio anidro e concentrou-se. A fase etanólica obtida dos micélios foi somente concentrada. Retirou-se uma alíquota do extrato do micélio e do extrato do meio líquido para a realização de colunas cromatográficas. O eluente utilizado nas colunas foi hexano e acetato de etila, uma eluição gradiente com a variação da porcentagem de acetato de etila, ou seja, inicialmente com 0% AcOEt e término com 100% do mesmo. Já as fases estacionárias utilizadas foram: para o extrato do micélio utilizou-se alumina, enquanto para o extrato do meio líquido foi sílica comum. O monitoramento foi realizado através de CCDA (Fluxograma 3.5).



FLUXOGRAMA 3.5 – Procedimento utilizado na biotransformação da 1-indanona.

3.3.3.2.2 – Adição da 1-indanona após 3 dias de cultivo

Utilizou-se o meio líquido Czapek's enriquecido com extrato de levedura. Adicionou-se, separadamente, 30 mL do meio de cultura em frascos erlenmeyers de 125 mL.

Adicionou-se o micro-organismo ao meio de cultura líquido em ambiente estéril (capela de fluxo laminar), retirando-se 100 μ L da suspensão de esporos, em seguida, transferiu-se os mesmos ao meio de cultura líquido, já a temperatura ambiente. Os frascos foram mantidos sob agitação (120 rpm). O fungo foi mantido sob tais condições por aproximadamente 3 dias, quando boa parte de seu micélio já encontra-se desenvolvido. Os frascos foram colocados em ambiente estéril (capela de fluxo laminar) e adicionou-se a solução do substrato 1-indanona. Para tal, pesou-se 30 mg do substrato e dissolveu-se em 1 mL de DMSO e transferiu-se para os frascos. Em seguida, o experimento foi mantido por 3 e 10 dias

após a adição dos substratos. Ao término dos dias de cultivo, no caso, 3 e 10 dias, os experimentos foram extraídos em triplicata, através de partição líquido-líquido (2 x 15 mL) com acetato de etila. A fase orgânica foi seca com sulfato de sódio anidro e concentrada. As amostras foram monitoradas com CCDA. De acordo com a variedade de substâncias adquiridas, colunas para pré-purificação foram realizadas, facilitando assim as posteriores análises por CG-EM e CLAE/UV-EM.

3.3.3.2.3 – Biotransformação monitorada da 1-indanona

Foram utilizados 25 frascos de Erlenmeyer de 250 mL, todos contendo 100mL de meio líquido Czapek's enriquecido com extrato de levedura. Em 20 frascos foram adicionados 20 mg do substrato (dissolvidos em 1 mL de acetona), sendo 18 frascos para o experimento de biotransformação e 2 frascos para controle do substrato (substrato e meio líquido). Os demais 5 frascos continham apenas o meio e o fungo. Após autoclavados e resfriados à temperatura ambiente foram inoculados 5 pedaços dos fungos nos respectivos frascos. O experimento foi mantido em ambiente estático e protegido de luz por um período de 20 dias.

Este experimento foi monitorado de 3 em 3 dias de cultivo, ou seja, realizou-se extrações nos dias: 3, 6, 9, 12, 15 e 20. Em cada dia da extração, retiraram-se 3 frascos contendo fungo, meio e substrato (triplicata) e um frasco contendo somente o meio e o fungo. Em seguida, estes frascos foram filtrados, sendo os micélios armazenados em 100 mL de metanol por 24 horas, posteriormente foram triturados, filtrados e concentrados. O filtrado inicial foi submetido a uma extração líquido-líquido (3 x 100 mL) com acetato de etila. Secou-se a fase orgânica com sulfato de sódio anidro, filtrou-se e evaporou-se o solvente no rotaevaporador.

3.3.3.2.4 – Análises do experimento com 1-indanona

Os solventes utilizados na eluição gradiente foram: eluente A: água MilliQ, eluente B: Acetonitrila. A concentração do eluente B variou de 20 – 65% (0 – 10 min), 65 – 100% (10 – 30 min), 100% (30 – 35 min) e condicionou-se a coluna em 20% por 15 min.

O volume de injeção foi de 20 μ L e o fluxo utilizado foi de 0.7 mL/min. A coluna utilizada foi a coluna Phenomenex – Synergi Fusion RP 80A 4 μ , 250 x 4.6 mm. A detecção por UV variou entre 190 – 600 nm.

As amostras também foram analisadas por CG-EM, onde utilizou-se a coluna J&W Scientific DB-5, 30 m x 0.25 mm, 0.25 μ , o gás de arraste – hélio White Martins e a rampa de aquecimento 55 – 120°C (2°/min); 120 – 300°C (4°/min).

3.3.3.3 – Biotransformação da 1-indanona utilizando células em suspensão

O micro-organismo foi inicialmente cultivado em meio líquido Czapek's enriquecido com extrato de levedura (item 3.3.1). Após o inóculo do fungo, manteve-se os frascos sob agitação durante 4 dias (para o bom desenvolvimento micelial).

Preparou-se uma solução tampão de fosfato de sódio (fosfato de sódio monobásico e fosfato de sódio bibásico) à pH 7,0, sendo 100 mL em cada frasco de Erlenmeyer de 250 mL. Autoclavou-se os frascos contendo tampão. Em seguida, adicionou-se aos frascos 20 mg de 1-indanona (dissolvidos em 1 mL de acetona) e manteve-se em ambiente estéril.

Os frascos contendo o fungo sob agitação foram filtrados à vácuo na capela de fluxo laminar devidamente esterilizada. O micélio filtrado com lavado com água destilada e adicionado aos frascos contendo a solução tampão. Sendo mantido três controles durante o experimento: controle do tampão (somente tampão), controle do fungo (meio + fungo) e controle do substrato (meio + substrato).

O experimento foi mantido durante 12 dias sob agitação constante (120 rpm). Ao término do cultivo, o conteúdo dos frascos foram filtrados e a fase aquosa foi extraída com acetato de etila (3 x 50 mL). As fases orgânicas foram secas com sulfato de sódio anidro e concentradas.

Os extratos obtidos foram monitorados por CCDA e analisados por CLAE/UV-EM (item 3.3.3.2.4).

3.3.3.4 – Reação de oxidação da α,β -amirina

Foram dissolvidos 500 mg do substrato α,β -amirina em 15 mL de diclorometano em um balão de 50 mL, que encontrava-se sob agitação constante. Após a dissolução completa da substância, adicionou-se 275 mg do oxidante PCC,

mantendo a mistura sob agitação constante e vigorosa por 10 horas. Ao término da reação, adicionou-se 10 mL de éter etílico. Em funil de placa sinterizada, colocou-se uma porção de sílica do tipo Florisil. Aplicou-se o conteúdo do balão para a realização de uma filtração e lavou-se constantemente com uma grande quantidade de éter etílico (cerca de 100 mL). Concentrou-se o éter. Realizou-se cromatografia em camada delgada analítica (CCDA) para a definição de um eluente cromatográfico, sendo o obtido: hexano com duas gotas de acetato de etila o eluente que melhor resolveu as bandas observadas. Para a purificação do produto utilizou-se uma coluna cromatográfica com 3 cm de diâmetro e 20 cm de altura, contendo sílica do tipo flash. A coluna foi condicionada inicialmente com hexano (100%) e após a aplicação da amostra eluiu-se as frações, no modo isocrático, com hexano contendo duas gotas de acetato de etila. As frações obtidas foram monitoradas por CCDA e posteriormente reunidas. Aquelas que apresentaram um elevado grau de pureza foram submetidas a análises por RMN¹H.

3.3.3.5 – Biotransformação de diversas cetonas por *Penicillium brasilianum*

O mesmo procedimento descrito no item 3.3.3.3 foi utilizado para o experimento com diversas cetonas, ou seja, o fungo foi cultivado em Czapek's e, em seguida o micélio foi suspenso em solução tampão contendo os diferentes substratos:

- 20 mg de benzopinacolona;
- 20 mg de dibenzalacetona;
- 20 mg de cânfora;
- 20 mg de α,β -amirinona;
- 20 μ L de (*R*)-carvona;
- 20 μ L de (*S*)-carvona;
- 20 μ L de ciclopentanona;
- 20 μ L de 2-(3-metoxifenil)-ciclohexanona;
- 20 μ L de 6-hidróxi-ciclohexanona.

O experimento também foi mantido durante 12 dias sob agitação constante. A extração foi obtida com a filtração dos micélios e, em seguida a fase aquosa extraída com acetato de etila (3 x 50 mL). A fase aquosa remanescente da

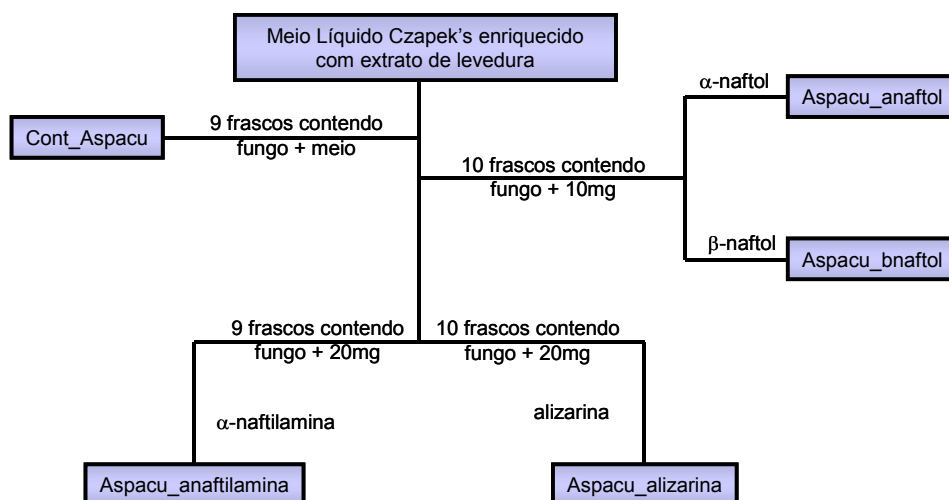
extração, foi acidificada com ácido clorídrico (pH 3) e extraída novamente com acetato de etila (3 x 50 mL). Todas as fases orgânicas foram secas com sulfato de sódio anidro e concentradas. O micélio filtrado foi extraído com metanol durante 24 horas, em seguida, filtrado e concentrado.

As amostras foram analisadas inicialmente por CCDA, sendo as amostras benzopinacolona e dibenzalacetona analisadas por CLAE/UV-EM, enquanto as demais amostras foram analisadas por CG-EM (item 3.3.3.2.4).

3.3.4 – Experimentos de biotransformação utilizando *Aspergillus aculeatus*

Para o experimento, utilizou-se 48 frascos contendo 100 mL de meio líquido Czapek's enriquecido com extrato de levedura. Os substratos α -naftol, β -naftol, α -naftilamina e alizarina foram inoculados com o fungo por 15 dias sob agitação constante (120 rpm).

Ao término dos 15 dias de cultivo o conteúdo dos frascos foram submetidos à filtração á vácuo, reunindo-se os frascos semelhantes. Alíquotas de 6mL do filtrado foram retiradas (alíquota aquosa). Os micélios foram mantidos durante 24 horas em 100 mL de etanol, sendo posteriormente triturados, filtrados e concentrados. Com a fase inicialmente filtrada realizou-se partição líquido-líquido com acetato de etila (3 x 200 mL). Todas as fases orgânicas foram secas com a adição de sulfato de sódio anidro, filtradas e evaporadas no rotaevaporador (Fluxograma 3.6).



FLUXOGRAMA 3.6 – Procedimento utilizado para os substratos α -naftol, β -naftol, α -naftilamina e alizarina.

Ao término dos 18 dias de cultivo os frascos foram submetidos à filtração à vácuo, reunindo-se os frascos semelhantes. Os micélios foram mantidos durante 24 horas em 100 mL de metanol, sendo posteriormente triturados, filtrados e concentrados. Com a fase inicialmente filtrada realizou-se, primeiramente, uma partição líquido-líquido com acetato de etila (neutra), denominados **A**; em seguida, na fase aquosa remanescente adicionou-se uma solução básica (NaOH) elevando-se o pH a 10 e extraiu-se com acetato de etila (**Ab**). Novamente com a fase aquosa remanescente inverteu-se o pH para 2 (com a adição de uma solução ácida de HCl) e realizou-se uma nova extração com acetato de etila, denominada **Aa**. Todas as fases orgânicas foram secas com a adição de sulfato de sódio anidro, filtradas e evaporadas no rotaevaporador.

3.3.4.1 – Análises por CLAE/UV-EM

As análises foram realizadas com uma coluna Synergi Fusion RP 4 μ da Phenomenex, sendo 250 x 4,6 mm suas dimensões. Os solventes utilizados na eluição gradiente foram: eluente A: água MilliQ, eluente B: Metanol. A concentração do eluente B variou de 40 – 100%B (0 – 40 min), 100%B (40 – 45 min) e condicionou-se a coluna em 40% por 15 min.

O volume de injeção foi de 20 μ L e o fluxo utilizado foi de 0.7 mL/min. A detecção por UV variou entre 190 – 800 nm.

As análises por EM ionização por APCI no modo negativo, sendo os potenciais utilizados: corona 3,50 kV, cone 30 V, extrator 6 V e lentes RF 0,71 V, as temperaturas foram: da fonte 170°C e do probe 350°C. Para os experimentos de íons fragmentos utilizou-se 20 eV de energia de colisão.

3.3.5 – Experimentos de biotransformação utilizando *Aspergillus flavus*

3.3.5.1 – Biotransformação de flavonóides por *Aspergillus flavus*

O fungo *Aspergillus flavus* foi cultivado em meio líquido Czapek's enriquecido com extrato de levedura (item 3.3.1). Em cada um dos frascos de Erlenmeyers (250 mL) utilizados no experimento foram distribuídos 100 mL de meio líquido. Autoclavou-se os frascos e quando resfriados à temperatura ambiente, o micro-organismo foi inoculado. Os substratos naringina, hesperidina e rutina foram adicionados aos frascos (dissolvidos em água:metanol (4:1)), enquanto os substratos polimetoxilados naringina e chalcona (após abertura do anel C) foram dissolvidos em acetona e também adicionados aos respectivos frascos, todos os substratos foram adicionados em triplicata. Os frascos foram mantidos estáticos e protegidos de luz por 20 dias.

Após o término de cultivo do micro-organismo, os conteúdos dos frascos foram filtrados sob vácuo, por um funil de Buchner, onde a fase aquosa foi recolhida e os micélios armazenados numa solução água:metanol (4:1). A fase aquosa foi acidificada com ácido clorídrico diluído (0,1mol/L) para pH, aproximadamente, 5,0. Extraiu-se com acetato de etila (3 x 100 mL), secou-se a fase orgânica e concentrou-se. As amostras foram analisadas por CLAE/UV-EM (como descrito nos itens 3.3.2.3.4 e 3.3.2.5.1).

3.3.5.2 – Biotransformação da 1-indanona por *Aspergillus flavus*

O meio líquido utilizado para a reação de biotransformação foi o mesmo descrito anteriormente (meio líquido Czapek's enriquecido com extrato de levedura). Após autoclavados, os frascos foram enriquecido com a adição do substrato 1-indanona (20 mg dissolvidos em 1 mL de acetona por frasco) e o fungo *Aspergillus flavus*. O experimento foi mantido em meio estático por 20 dias.

Ao término dos 20 dias de cultivo, o conteúdo dos frascos foram filtrados à vácuo, onde o filtrado foi separado do micélio. Ao micélio, adicionou-se 125 mL de etanol, triturou-se e, em seguida, foram novamente filtrados. As fases aquosas foram extraídas com acetato de etila, secou-se a fase orgânica obtida com sulfato de sódio anidro e concentrou-se. A fase etanólica obtida dos micélios foi somente concentrada. Os extratos obtidos foram monitorados por CCDA. A presença de produto de biotransformação foi detectada e, portanto a substância foi isolada por CCDP e caracterizada pelas técnicas espectroscópicas.

Um outro experimento também realizado com o substrato 1-indanona e o fungo *Aspergillus flavus* foi com as células ressuspensas em solução tampão já contendo 20 mg da 1-indanona. O procedimento utilizado foi o mesmo descrito no item 3.3.3.3.

3.3.6 – Triagem para a detecção de Baeyer-Villiger monooxigenases

Para o experimento de triagem de Baeyer-Villiger monooxigenase utilizou-se o substrato 1-indanona para as diferentes espécies de *Aspergillus* e *Penicillium*. O meio líquido utilizado foi Czapek's enriquecido com 2% de extrato de levedura (item 3.3.1). O meio foi distribuído em frascos de Erlenmeyer (125 mL) contendo 30 mL de meio. Após autoclavados, os frascos foram enriquecidos com o substrato 1-indanona, sendo realizado em triplicata para cada fungo, mantendo-se sempre os controles dos fungos (ou seja, sem adição do substrato). Os micro-organismos foram inoculados através de solução de esporos e mantidos estáticos por 15 dias.

Ao término do cultivo, os micélios foram filtrados à vácuo, sendo a fase aquosa extraída com acetato de etila (2 x 20 mL). As fases orgânicas foram secas e concentradas. As amostras obtidas foram analisadas por CLAE/UV-EM.

3.3.6.1 – Análises por CLAE/UV-EM

Os extratos orgânicos obtidos do experimento foram diretamente analisados por CLAE/UV-EM. As análises foram realizadas com uma coluna Synergi Fusion RP 4 μ da Phenomenex, sendo 250 x 4,6 mm suas dimensões. Os solventes utilizados na eluição gradiente foram: eluente A: água MilliQ, eluente B: Metanol,

ambos acrescidos de 0,1% de TFA. A concentração do eluente B foi mantida em 25% durante 15 minutos e, em seguida variou de 25 – 100%B (15 – 16 min), 100%B (16 – 26 min) e condicionou-se a coluna em 25% por 15 min.

O volume de injeção foi de 10 μ L e o fluxo utilizado foi de 0.9mL/min. A detecção por UV variou entre 210 – 500 nm.

As análises por EM utilizou ionização por APCI no modo positivo, sendo os potenciais utilizados: corona 3,34 kV, cone 32 V, extrator 5 V e lentes RF 0,62 V, as temperaturas foram: da fonte 170°C e do probe 450°C. Para os experimentos de íons fragmentos utilizou-se 18 eV de energia de colisão.

RESULTADOS

4 – RESULTADOS

4.1 – Experimentos de biotransformação utilizando *Penicillium griseoroseum*

4.1.1 – Biotransformação da cafeína

Recentemente muitas biotransformações estudadas envolvem, em geral, os fungos *Penicillium* e *Aspergillus*. Dentre elas, as que mais se destacam são biotransformações do citrionelol¹³¹, terpenos¹³² e corticosteróides¹³³. No entanto, a abordagem geralmente utilizada para a escolha das cepas nesses experimentos é aleatória. Conforme temos enfatizado, o uso de micro-organismos endofíticos seria, no nosso entendimento, uma abordagem com um pouco mais de racionalidade.

O principal fungo, que inicialmente foi utilizado no presente trabalho trata-se do *Penicillium griseoroseum* (FIGURA 4.1), o qual foi isolado como endofítico dos frutos de café verde e posteriormente depositado na micoteca de nosso laboratório (LaBioMMi). Como no ambiente natural do micro-organismo encontra-se presente uma elevada concentração de cafeína, podia-se esperar o reconhecimento bioquímico desta substância pelo fungo quando adicionada ao seu meio de cultura – o que chamamos de biotransformação biossinteticamente dirigida.

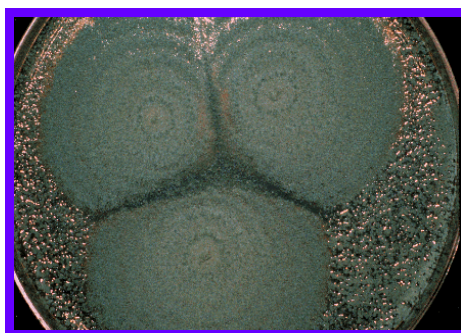


FIGURA 4.1 – *Penicillium griseoroseum* isolado dos frutos do café.

Realizou-se a biotransformação da cafeína, sendo o fungo cultivado em meio líquido Czapek's contendo cafeína como substrato¹²⁹. A reação observada foi a desmetilação na posição N-7 desta substância (FIGURA 4.2), produzindo a teofilina.

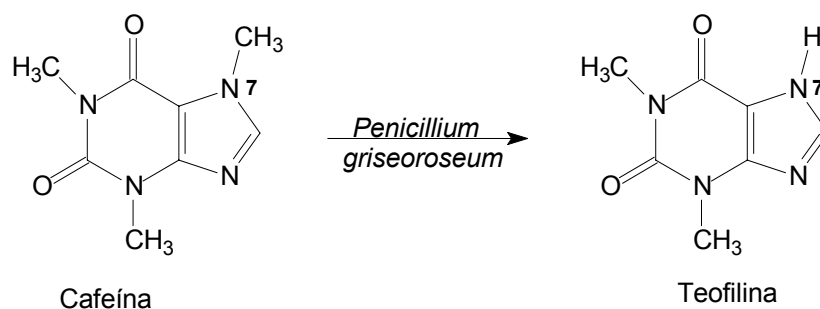


FIGURA 4.2 – Biotransformação da cafeína.

A biodegradação da cafeína vem sendo estudada durante anos por pesquisadores utilizando os mais diferenciados micro-organismos^{134,135} com o objetivo de desintoxicar ambientes poluídos com polpas das plantações de café. Os produtos de biotransformação da cafeína encontrados normalmente são a teofilina, teobromina e xantina, sendo a última uma substância não tóxica. A degradação da cafeína é seguida de sucessivas desmetilações e em poucas horas uma grande variedade de micro-organismos é capaz de convertê-la na sua forma mais simples, a xantina.

Dentre as diversas enzimas responsáveis pela desmetilação de substâncias, pode-se destacar o citocromo P450, conhecido pela detoxificação de diversas substâncias. No entanto, outras enzimas como amina monooxigenase realizam reações de desmetilação. Assim, a FIGURA 4.3 ilustra o mecanismo geral de desmetilação tanto via citocromo P450 quanto via amina monooxigenase¹³⁶⁻¹³⁸.

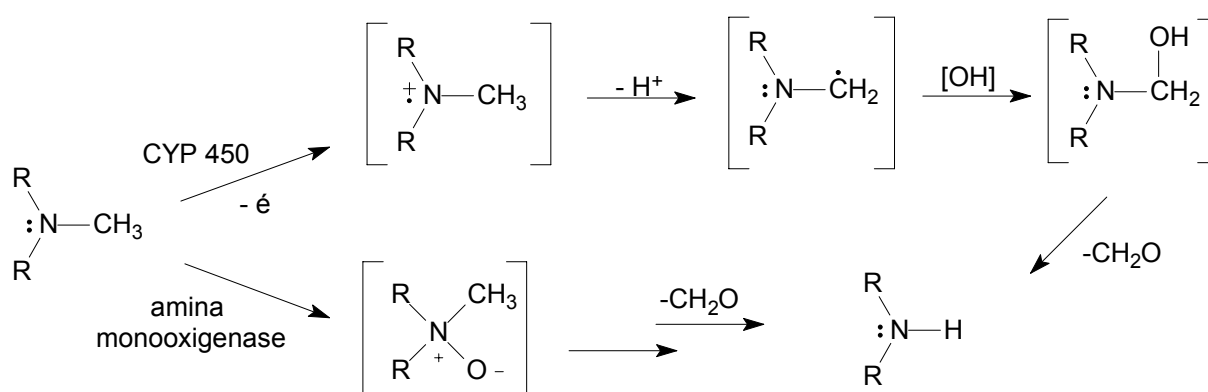


FIGURA 4.3 – Mecanismo proposto para a conversão da cafeína em teofilina.

No entanto, a seletividade apresentada pelo fungo em desmetilar apenas uma posição na molécula de cafeína, proporcionou um grande interesse para o estudo dos processos de biotransformação envolvendo este micro-organismo. Como os demais micro-organismos, o fungo *Penicillium griseoroseum* iniciou a degradação da cafeína com a desmetilação da posição N-7, contudo, independente do tempo de cultivo, as demais desmetilações não foram observadas.

Além da seletividade obtida durante o experimento, a biotransformação da cafeína indicou também a possível presença de citocromo P450 como uma das enzimas ativas no metabolismo do micro-organismo, o que proporciona um aumento do potencial das reações que o micro-organismo pode realizar, uma vez que como descrito anteriormente o citocromo P450 é responsável por diversas reações nos organismos vivos.

4.1.2 – Biotransformação da 5,7,3',4',5'-pentametóxilflavanona

Os flavonóides, como já discutido, tratam-se de uma classe de substâncias alvo para as reações de biotransformação. As diferentes atividades biológicas, assim como a disponibilidade das substâncias são os principais atrativos para os seus estudos. No entanto, muitos flavonóides ainda não foram explorados em biotransformações; como pode-se destacar os flavonóides altamente funcionalizados, flavonóides glicosilados e polimetoxilados, principalmente quando os micro-organismos empregados são endofíticos.

Portanto, como o fungo ainda pouco explorado *Penicillium griseoroseum* apresentou uma seletividade de desmetilação, assim como, uma possível presença de citocromo P450 (que normalmente sofre alteração na presença de flavonóides), foi obtida uma nova classe de substâncias para os estudos envolvendo este micro-organismo.

Assim, o substrato natural inicialmente selecionado apresentava diversas metoxilas, as quais proporcionariam o possível reconhecimento enzimático, para a reação de desmetilação.

O flavonóide utilizado foi a 5,7,3',4',5'-pentametóxilflavanona, a qual foi adicionada ao meio de cultivo do fungo, como descrito no item 3.3.2.2 (FIGURA 4.4).

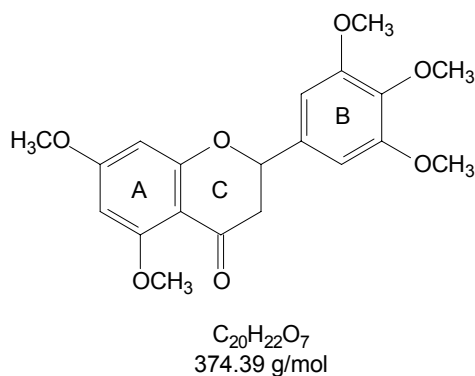


FIGURA 4.4 – Estrutura química da 5,7,3',4',5'-pentametóxilflavanona.

O experimento proporcionou a obtenção de pelo menos um produto biotransformado, que foi detectado inicialmente por análises de CCDA. A substância foi purificada através de coluna cromatográfica e submetida à análises de RMN 1D e 2D.

Os espectros de RMN¹H entre as amostras padrão e o possível produto de biotransformação foram comparados e diferenças significativas foram observadas, como ilustrado na FIGURA 4.5, onde os espectros encontram-se alinhados pelo sinal do CDCl₃ para facilitar a visualização.

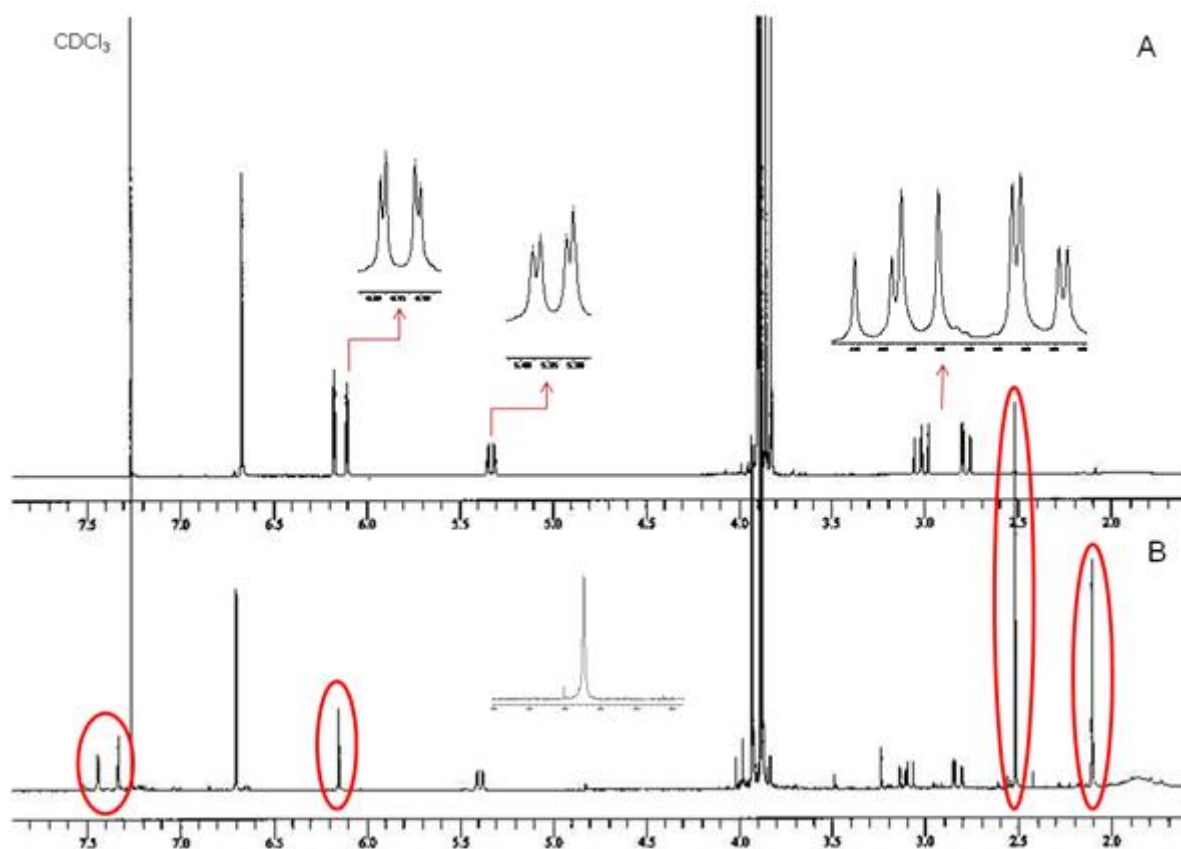


FIGURA 4.5 – Espectros de hidrogênio da amostra padrão (A) e do produto de biotransformação (B) (CDCl_3 – 400MHz).

As principais diferenças entre os espectros de hidrogênio estão assinaladas em vermelho e foram obtidas no anel A, onde somente um singleto foi observado em δ 6,18, indicando que houve a introdução de algum outro grupo na molécula, pois na substância padrão tem-se os dois dubletos em posição *meta* no anel A (δ 6,20). Quatro sinais na região das metoxilas podem ser observados como na amostra referente ao padrão; já os singletos em δ 2,10, 2,52, 7.32 e 7.48 são inexistentes no espectro padrão; além de um sinal em δ 13,10 indicando a possível presença de uma hidroxila. A hidroxila encontra-se bastante deslocada (δ 13,10), isto se deve ao fato de estar quelada com uma carbonila próxima, a qual atrai para si os elétrons, deixando a hidroxila desblindada quanto a uma nuvem eletrônica.

Os valores da amostra padrão e do produto biotransformado foram comparados com dados obtidos na literatura¹³⁹ e estão apresentados na Tabela 4.1. Através desta comparação é confirmada que a reação observada ocorreu, possivelmente, no anel A da flavanona, pois o sinal referente ao anel B apresentou a mesma integração (dois hidrogênios) e no mesmo deslocamento químico que a

amostra padrão (δ 6,60), enquanto os dubletos esperados para o anel A não foram observados e sim a presença de um singlete com integração para somente um hidrogênio (δ 6,18), região dos dubletos observados no padrão.

TABELA 4.1 – Valores de RMN ^{13}C da literatura, amostra padrão e produto biotransformado, respectivamente.

| ^{13}C | ^{13}C – Literatura (ppm) | ^{13}C – padrão (ppm) | ^{13}C – Produto (ppm) |
|-------------------------|------------------------------------|--------------------------------|---------------------------------|
| 2 | 79,33 | 79,00 | 79,00 |
| 3 | 45,65 | 46,00 | 45,87 |
| 4 | 189,00 | 189,00 | 189,00 |
| 5 | 164,75 | 165,00 | 160,00 |
| 6 | 93,52 | 93,50 | 112,00 |
| 7 | 165,90 | 167,00 | 162,00 |
| 8 | 93,14 | 93,00 | 104,00 |
| 9 | 162,21 | 162,00 | 162,00 |
| 10 | 105,85 | 106,00 | 107,00 |
| 1' | 134,23 | 134,00 | 132,00 |
| 2' | 103,16 | 103,00 | 103,00 |
| 3' | 153,42 | 153,00 | 153,00 |
| 4' | 138,10 | 137,00 | 137,00 |
| 5' | 153,42 | 153,00 | 153,00 |
| 6' | 103,16 | 103,00 | 103,00 |
| -OCH₃ | 60,74 | 57,00 | 60,50 |
| -OCH₃ | 56,11 | 56,00 | 56,00 |
| -OCH₃ | 55,53 | 55,00 | 55,78 |
| | | | 16,00 |
| | | | 26,00 |
| | | | 116,00 |
| | | | 130,00 |
| | | | 202,00 |

Portanto, por comparação destes valores, observou-se que os deslocamentos químicos do ^{13}C padrão utilizado condizem com os deslocamentos

químicos obtidos pela literatura, enquanto que o produto biotransformado obtido apresenta significativas diferenças. A FIGURA 4.6 ilustra o esqueleto semelhante das flavanonas com os respectivos deslocamentos químicos dos ^{13}C semelhantes nas três colunas da Tabela 4.1.

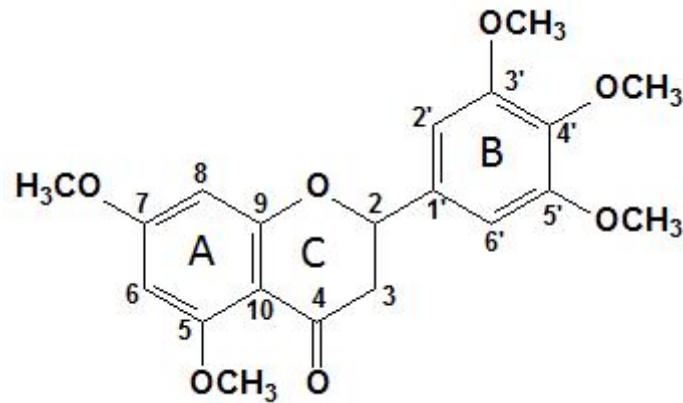


FIGURA 4.6 – Esqueleto semelhante entre amostra padrão, dados da literatura e produto biotransformado, indicados pelos ^{13}C .

Ao analisar o espectro de HMBC da amostra biotransformada (FIGURA 4.7), observou-se as principais diferenças em relação ao anel A, indicando, portanto, que a reação de biotransformação tenha ocorrido.

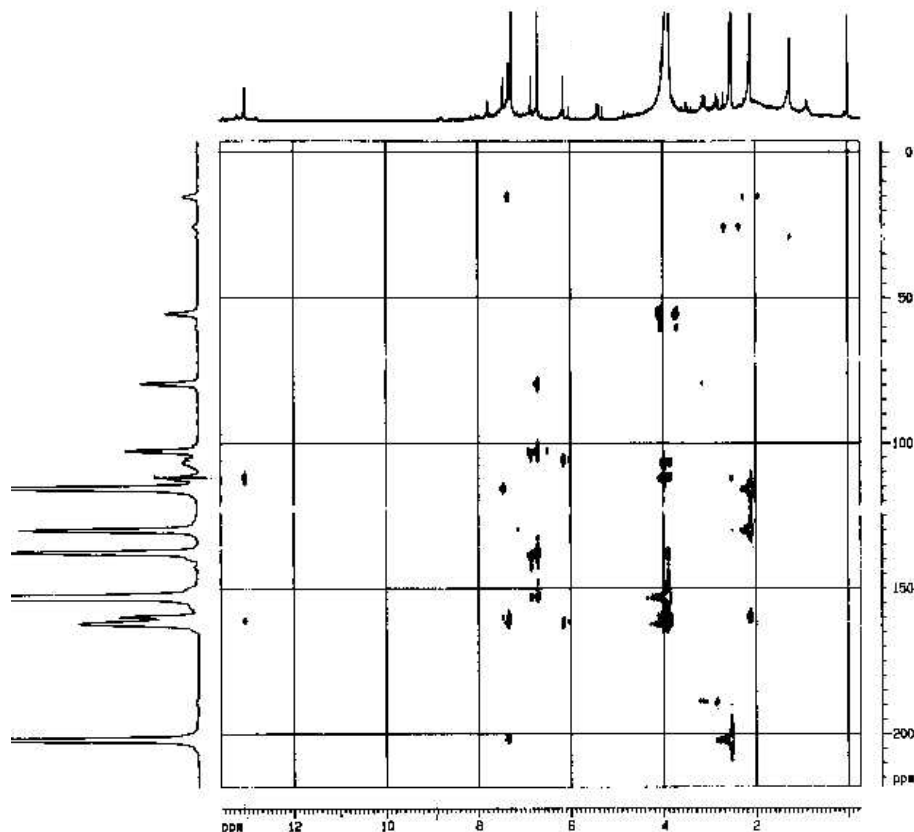


FIGURA 4.7 – Espectro de HMBC do produto de biotransformação.

As diferenças e os valores obtidos pelo espectro de HMBC da amostra biotransformada encontram-se resumidos na Tabela 4.2.

TABELA 4.2 – Correlações obtidas pelo HMBC – produto de biotransformação

| Proposta estrutural | $\delta^1\text{H}$ (ppm) | $\delta^{13}\text{C}$ (ppm) |
|-------------------------------|------------------------------|--|
| Anel B | 6,72 | 79,00; 103,00; 132,00; 137,00; 153,00 |
| Anel C | 2,83 3,10 | 189,00 79,00; 189,00 |
| Anel A | 6,18 13,10 | 105,00; 106,50; 162,00 112,00; 162,00 |
| Sinais inexistentes no padrão | 2,10 2,52 7,32 7,48 | 116,00; 130,00 112,00; 202,00 162,00; 202,00 116,00 |

As semelhanças existentes entre a amostra padrão e a amostra biotransformada encontra-se ilustrada na FIGURA 4.8.

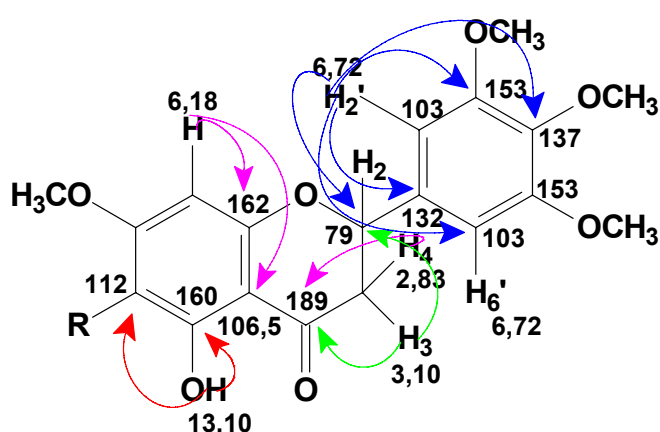


FIGURA 4.8 – Correlações similares a amostra padrão e produto biotransformado.

Além destes espectros de RMN¹H e HMBC, foram realizados espectros de NOE e análises por Espectrometria de Massas, como citado anteriormente.

Pelos espectros de NOE observou-se que:

- Quando irradiou-se sobre o hidrogênio posicionado em δ 2,52 obteve-se uma alteração no hidrogênio em δ 7,32 (FIGURA 4.9).
- Quando a irradiação ocorreu no hidrogênio em δ 6,18 (anel A), observou-se a alteração na região referente às metilas (FIGURA 4.9).
- Quando, contudo, a irradiação ocorreu no hidrogênio na região das metoxilas (por volta de δ 4,00), observou-se uma alteração com aumento da intensidade do hidrogênio em δ 6,18 (o inverso do que ocorreu com a irradiação anterior), FIGURA 4.10.
- Irradiando-se o hidrogênio em δ 2,10, observou-se uma alteração com aumento de intensidade do hidrogênio em δ 7,32, FIGURA 4.11.

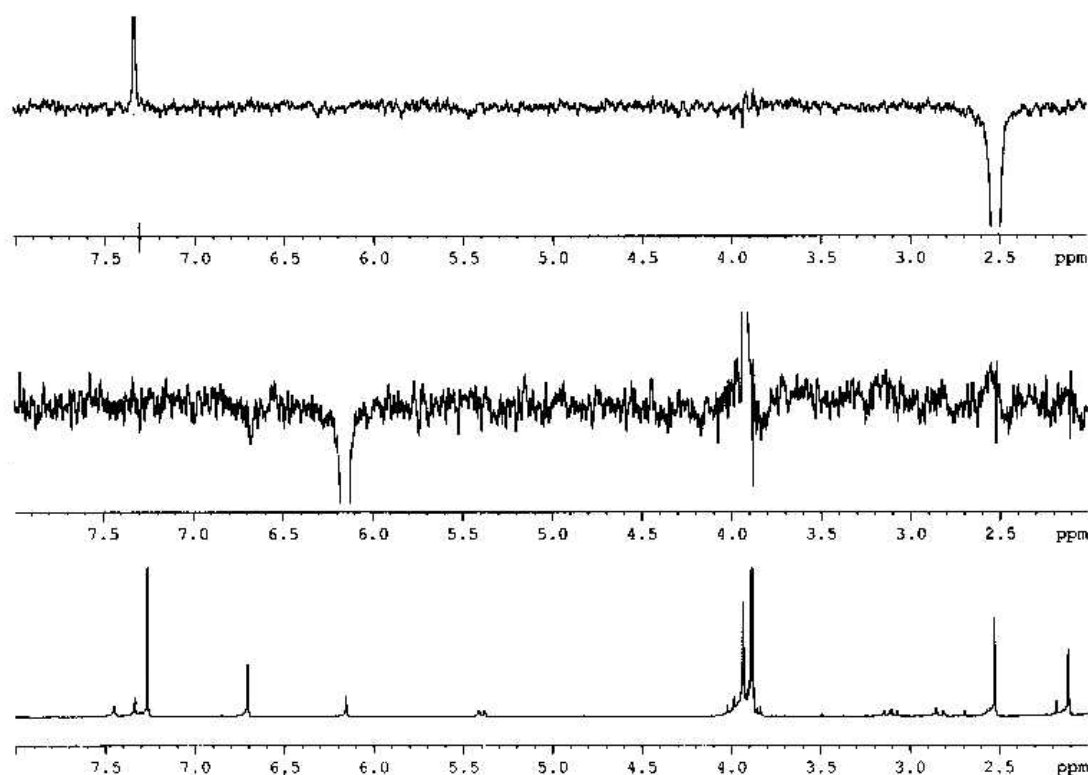


FIGURA 4.9 – Irradiação sobre o hidrogênio em δ 2,52 e δ 6,18, respectivamente.

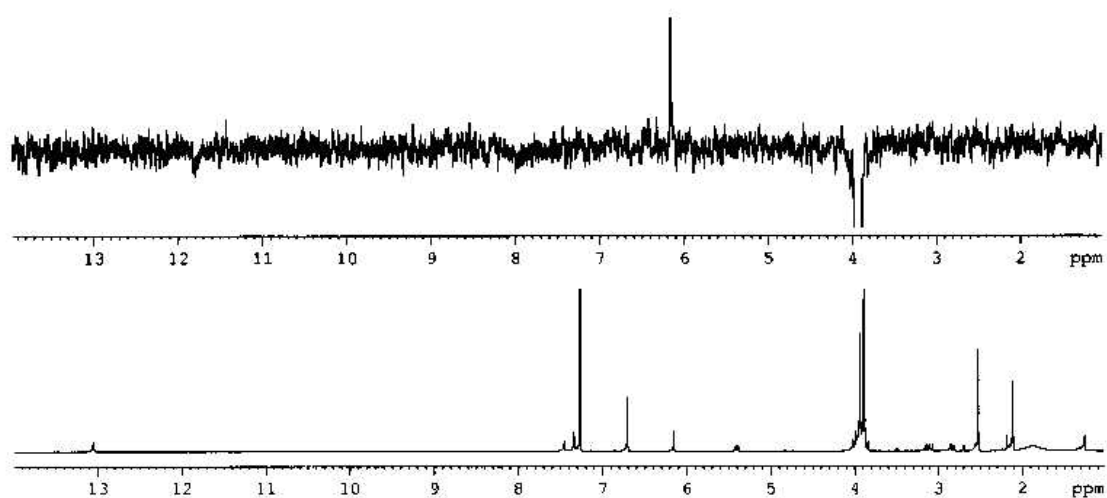


FIGURA 4.10 – Irradiação sobre o hidrogênio das metilas.

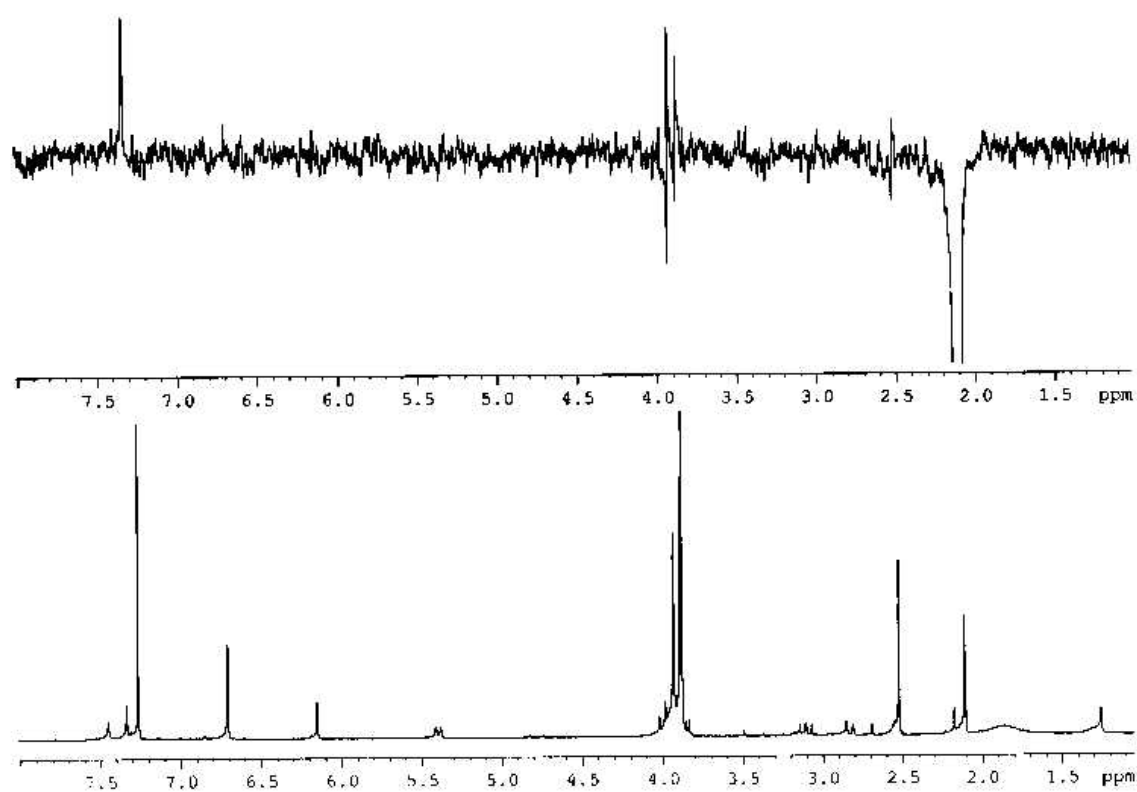


FIGURA 4.11 – Irradiação sobre o hidrogênio em 2,10ppm.

Pelos sinais observados no espectro de hidrogênio e suas correlações com os respectivos carbonos, juntamente com os dados do NOE, uma proposta estrutural foi realizada (FIGURA 4.12).

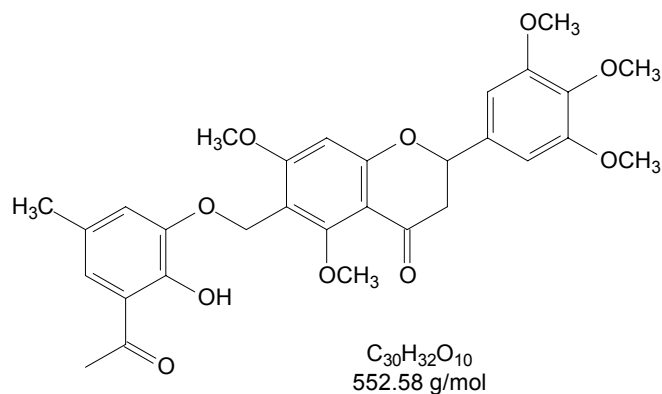


FIGURA 4.12 – Estrutura proposta para o produto biotransformado.

Como pode se observar, na FIGURA 4.12, a proposta da estrutura confirma os sinais obtidos pelos espectros de hidrogênio, ou seja, os sinais em δ 2,10 e δ 2,52, são correspondentes as possíveis duas metilas ilustradas. A hidroxila proposta também está quelada com uma carbonila, apresentando assim o sinal em δ 13,10. Os outros dois sinais obtidos como singletos são observados numa região característica de anéis aromáticos e como são singletos e largos, estes podem desdobrar-se em dois dubletos, os quais corresponderiam aos hidrogênios do anel aromático proposto, ou seja, na posição *meta* (FIGURA 4.12). No entanto, o sinal referente ao carbono α à carbonila (-CH₂), o qual seria observado em torno de δ 4,0, pode estar encoberto pelos sinais das metoxilas que são quatro como no espectro padrão, confirmando também que realmente não ocorreu desmetilação da posição 5 do anel A. Tanto o espectro de NOE quanto os espectros de HMBC confirmam a estrutura proposta, como está demonstrada as correlações existentes na FIGURA 4.13.

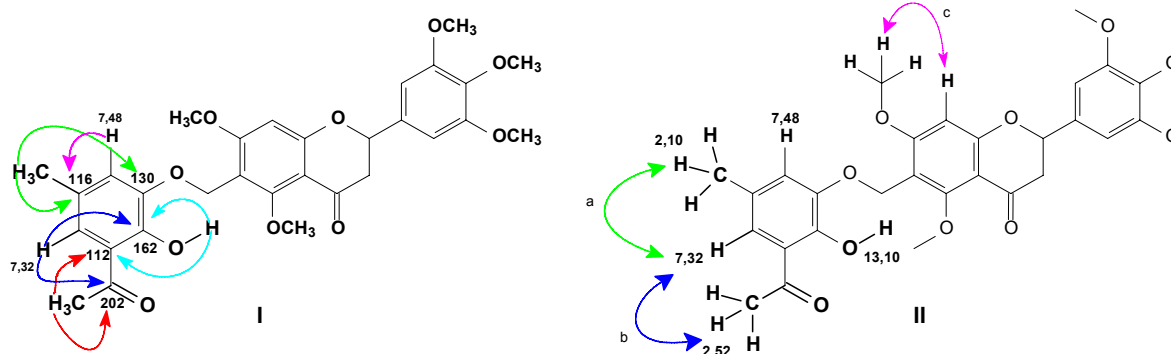


FIGURA 4.13 - I) Correlações existentes no espectro de HMBC; II) Correlações dos espectros de NOE: a) FIGURA 4.8, b) FIGURA 4.10 e c) FIGURAS 4.8 e 4.9.

Dessa forma, a estrutura confere todos os dados de HMBC (FIGURA 4.7) e os espectros de NOE (FIGURAS 4.9, 4.10 e 4.11).

Além destes experimentos obtiveram-se os espectros de massas da amostra biotransformada apresentada na FIGURA 4.14. Pelo espectro de massas obtido através de inserção direta utilizando a ionização por *electrospray* no modo positivo (item 3.3.2.2), observou-se um pico bastante intenso em m/z 553, o que indicou que a possível massa do flavonóide biotransformado seja 552.

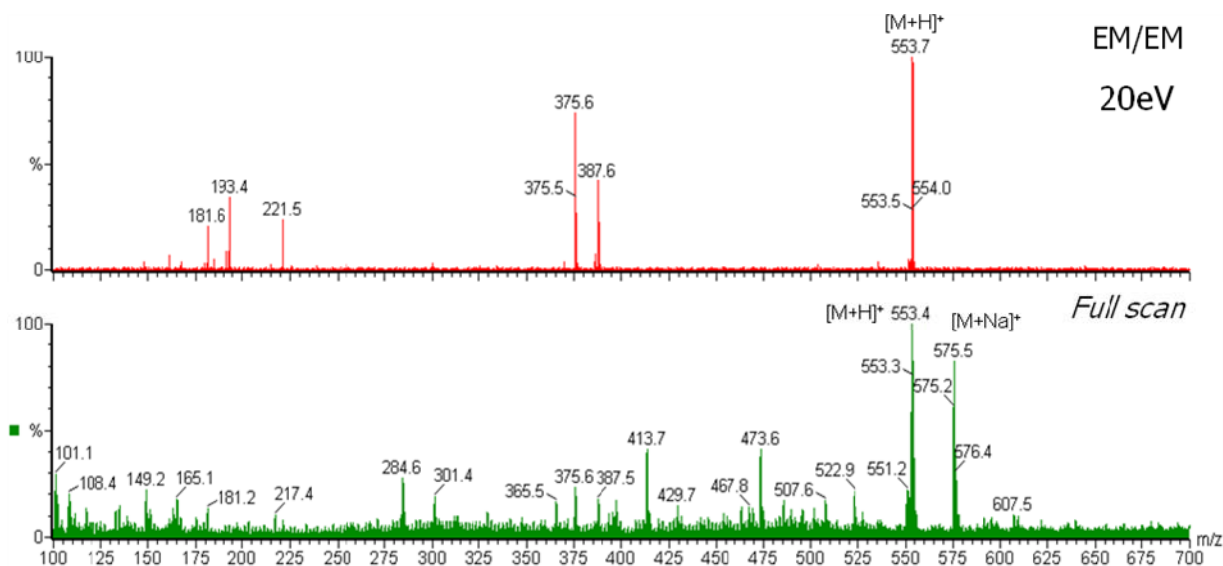


FIGURA 4.14 – Espectros de massas: íons fragmentos de m/z 553 e espectro de varredura de íons, respectivamente.

Analisando o espectro de massas observou-se que ocorre uma perda de 178 Da fornecendo um pico em m/z 375, o qual por sua vez corresponde a mesma massa do flavonóide padrão ionizado (374 Da). Isso mostra que a adição que ocorreu na molécula não afetou o esqueleto básico da mesma, apenas foi

adicionado um grupo no carbono 6 de massa 178. Para uma maior confiabilidade da estrutura proposta, estudaram-se as possíveis fragmentações obtidas através do espectro de massas dos íons produtos de m/z 553. A proposta de fragmentação está esquematizada na FIGURA 4.15.

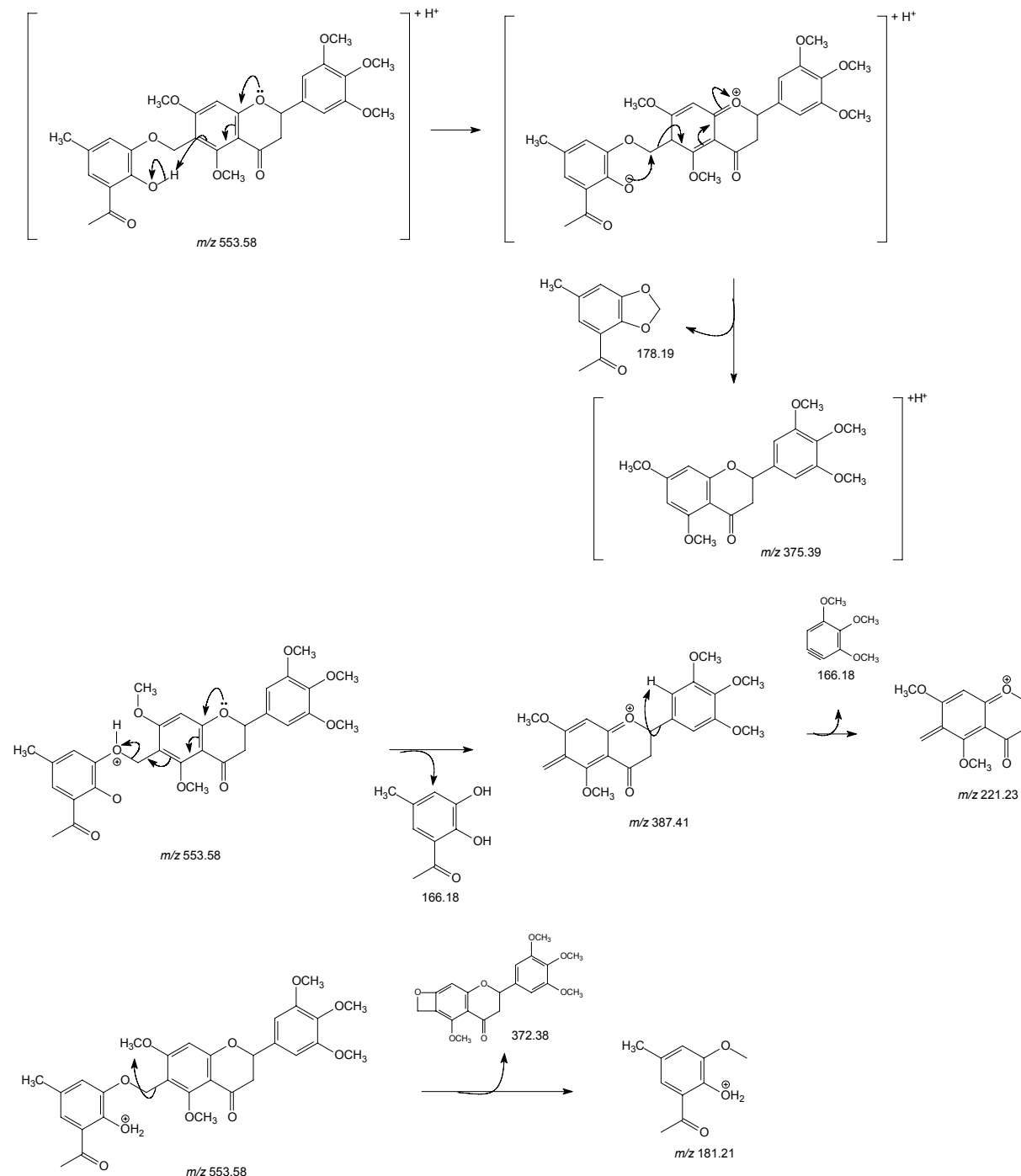


FIGURA 4.15 – Esquema de fragmentação sugerido para a estrutura proposta.

Dessa forma tem-se como produto de biotransformação um flavonóide substituído no anel A com um grupo aromático. Esta estrutura, apesar de não usual,

encaixa-se na química de produtos naturais, uma vez que outros flavonóides com grupos benzílicos já vem sendo isolados de plantas, como ilustra a FIGURA 4.16¹⁴⁰⁻

142

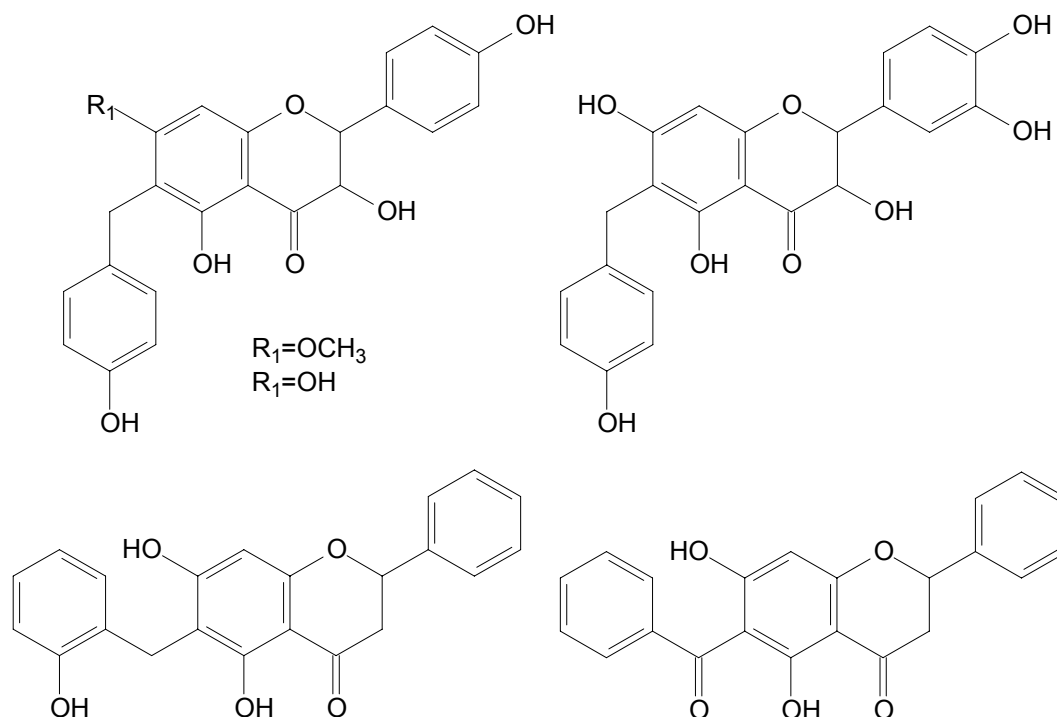


FIGURA 4.16 – Flavonóides substituídos com grupos benzílicos.

A formação de ligação C-C é alvo constante das reações de biotransformação, pois não são todos os micro-organismos que possuem enzimas ativas para tal transformação.

O experimento realizado para a busca de reações de desmetilação proporcionou a descoberta de outra reação realizada pelas das enzimas do fungo *Penicillium griseoroseum*. A presença do flavonóide não ativou as possíveis enzimas responsáveis pela desmetilação e, em contra partida, uma enzima ligase foi acionada promovendo a nova formação da ligação C-C entre o substrato adicionado e um possível metabólito do fungo, já que nenhum outro composto orgânico foi adicionado no meio.

A reação de biotransformação proporcionou ainda mais uma informação sobre o metabolismo secundário do fungo, o qual deve estar associado à produção de substâncias aromáticas. Com relação ao flavonóide biotransformado, o substituinte em especial detectado ainda não foi relatado na literatura, sendo o flavonóide proposto inédito. Por se tratar também de uma reação de

biotransformação, tanto a reação (formação de ligação C-C) quanto o produto são considerados inéditos para estudos de biotransformação envolvendo flavonóides e micro-organismos endofíticos.

4.1.3 – Experimentos de biotransformação dos flavonóides glicosilados: naringina, rutina e hesperidina

O fungo *Penicillium griseoroseum* apresentou habilidade em biotransformar a 5,7,3',4',5'-pentametoxiflavanona, o que tornou ainda maior a possibilidade do seu sistema enzimático em reconhecer e biotransformar diferentes flavonóides. Por isso, para ampliar a capacidade de transformação de flavonóides, explorou-se uma outra classe das substâncias funcionalizadas, os flavonóides glicosilados. Contando-se ainda com a disponibilidade dos flavonóides naringina, hesperidina e rutina (flavonóides glicosilados) (FIGURA 4.17), normalmente encontrados em diversas espécies de plantas, tais como, *citrus*, investigou-se o potencial do micro-organismo frente a adição destes substratos ao meio de cultura.

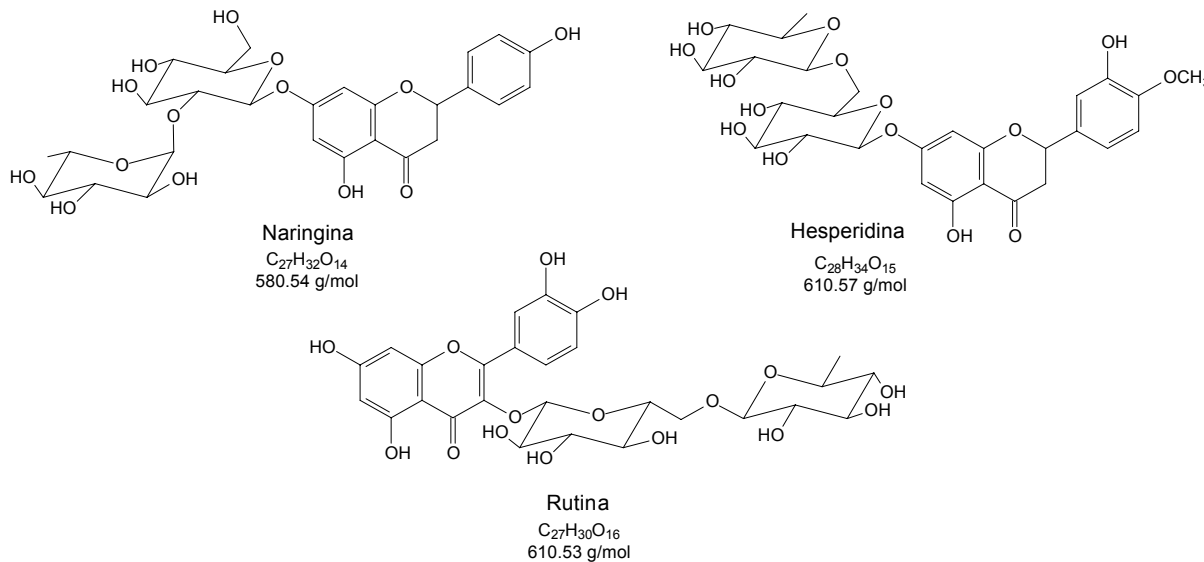


FIGURA 4.17 – Flavonóides glicosilados utilizados.

Inicialmente, partiu-se para a administração dos flavonóides glicosilados misturados nos frascos, ou seja, os três substratos foram adicionados juntamente ao meio de cultura do fungo, imitando assim, o ambiente natural que o micro-organismo encontraria se habitasse uma planta produtora de tais substâncias.

Contudo, a utilização da mistura de flavonóides, como descrito no item 3.3.2.3.1, dificultou a identificação de possíveis produtos biotransformados.

Os flavonóides glicosilados possuem comportamento cromatográficos muito similares (dados não apresentados) deixando ainda mais obscura a descoberta por produtos biotransformados. A mistura dos flavonóides juntamente com os metabólitos do fungo tornou os dados muito complexos para informações mais concretas.

Assim, como com os resultados anteriores a identificação de algum produto de biotransformação se tornou um tanto quanto complexa devido a numerosa quantidade de substâncias presentes no meio, resolveu-se realizar experimentos com o fungo *Penicillium griseoroseum* com uma diferença atenuante: que os flavonóides padrões (naringina, hesperidina e rutina), utilizados como substratos, fossem adicionados individualmente por frasco no experimento (item 3.3.2.3.2. Talvez com a administração individual dos substratos, o sistema enzimático do micro-organismo poderia reconhecê-lo mais facilmente do que em uma mistura de substâncias parecidas para então realizar sob as mesmas, algum tipo de transformação.

A agitação também foi escolhida, pois sob agitação o micro-organismo é cultivado com um certo grau de estresse, o que de fato pode também influenciar no seu sistema enzimático, além de proporcionar a maior oxigenação do meio e o contato do fungo com o substrato, uma vez que o meio está em constante movimento (não havendo o perigo de decantação do substrato). Além de tal modificação, diminuiu-se a concentração de açúcar adicionado ao meio de cultura pela metade. Com a redução de açúcar disponível para o desenvolvimento do fungo, seria de extrema importância para o fungo fazer uso dos substratos como fonte de energia. O experimento foi mantido sob agitação constante durante o período de 25 dias.

Todas as amostras obtidas foram analisadas igualmente por CLAE/UV. Assim, para facilitar a descrição dos dados, os resultados estão separados por flavonóides administrados.

Iniciou-se as análises da amostra controle contendo naringina, ou seja, aquela que apresenta apenas o meio e a naringina sem presença do micro-organismo. Em seguida, a amostra contendo meio, fungo e naringina (FIGURA 4.18).

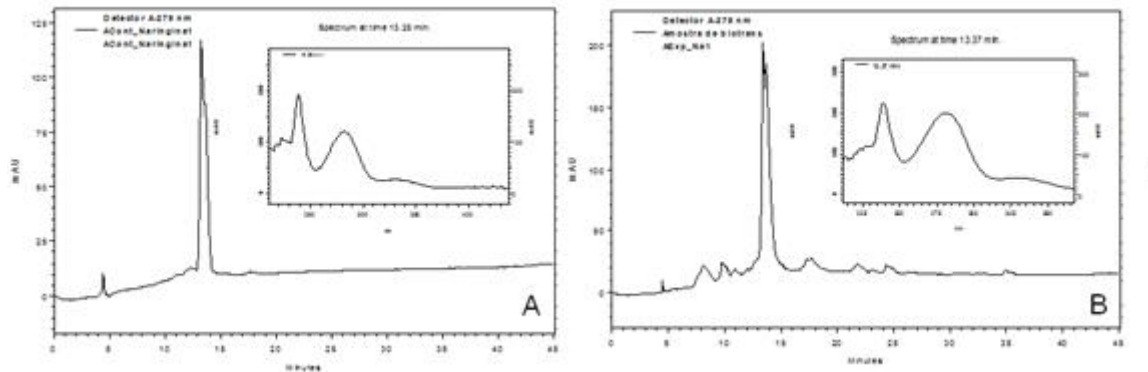


FIGURA 4.18 – **(A)** Amostra controle (meio + naringina), **(B)** Amostra contendo fungo +meio + naringina em 279nm.

A análise dos dados indicaram claramente a presença tanto da naringina padrão (13,37 min) quanto de algumas outras substâncias inexistentes na amostra controle com tempos de retenção em 9,97; 17,29 e 21,90 min (FIGURA 4.18). A presença de tais bandas indicam suspeitas sob a ocorrência de produtos de biotransformação da naringina, porém são dados ainda muito preliminares.

As amostras da rotina não apresentaram nenhuma banda diferenciada entre a amostra controle e a amostra do experimento. O flavonóide rutina não foi aparentemente consumido e/ou transformado pelo fungo.

Já as amostras analisadas da hesperidina apresentaram diferenças significativas. A amostra controle detectou perfeitamente a hesperidina padrão (14,14 min), assim como seu espectro de UV apresentou sua identificação clara e fácil (FIGURA 4.19). De acordo com o cromatograma para a amostra contendo o fungo e a hesperidina (FIGURA 4.19 **B**), pode se observar a presença de diferentes bandas (em 10,72; 13,44; 18,02; 21,41 e 25,43 min) quando este é comparado com a amostra controle.

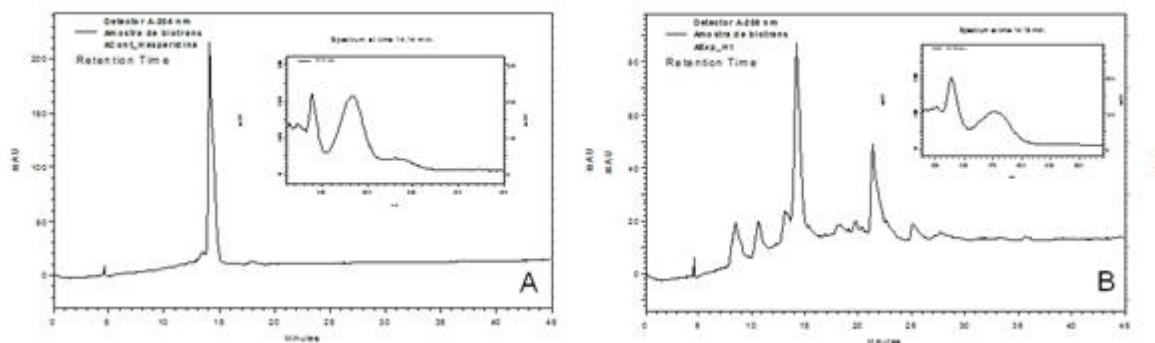


FIGURA 4.19 – Cromatogramas em 284nm das amostras: **(A)** meio + hesperidina e **(B)** meio + fungo + hesperidina.

Os dados obtidos dos experimentos com *Penicillium griseoroseum* e os flavonóides padrões, principalmente naringina e hesperidina, indicaram a presença de possíveis produtos de biotransformação. As diferentes bandas observadas já são um indicativo de que alguma transformação tenha ocorrido. Contudo somente com os dados cromatográficos é pouco confiável a afirmação de que realmente o micro-organismo realizou uma biotransformação sob os substratos utilizados. O experimento de mais fácil acessibilidade para a detecção de tais bandas seria a realização de análises no espectrômetro de massas, o qual realmente foi utilizado para uma das amostras em questão. Como tratou-se de uma análise de extrato, quanto maior a resolução do cromatograma melhor seria a análise obtida pelo acoplamento do CLAE/UV-EM, pois com bandas definidas a probabilidade de co-eluição é menor, sendo a relação massa/carga (m/z) um dado referente a somente uma determinada banda, facilitando sua possível identificação. Para isto diferentes métodos foram testados na CLAE/UV com o objetivo de melhorar a resolução das bandas obtidas no cromatograma. O método utilizado para as análises de CLAE/UV-EM encontra-se descrito no item 3.3.2.3.4.

O cromatograma da amostra apresentado na FIGURA 4.20 apresentado a seguir, indicou a presença de bandas muito interessantes e seus respectivos espectros de UV, assinalados pela sua coloração.

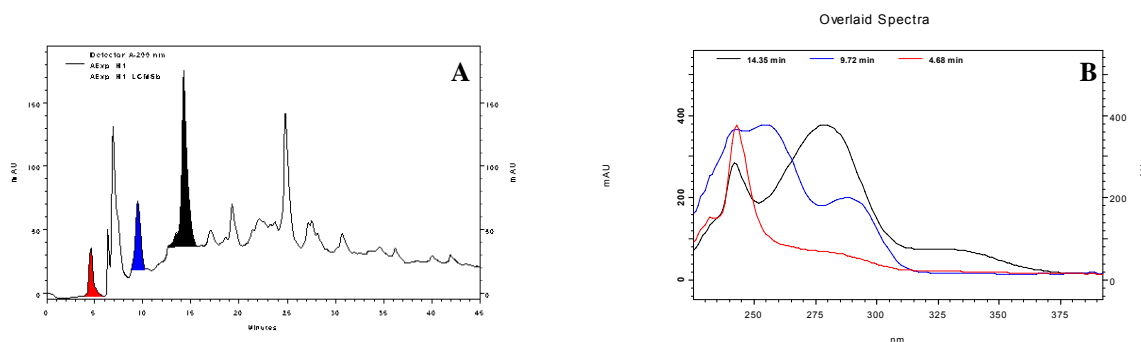


FIGURA 4.20 – **A)** Cromatograma do extrato da biotransformação da hesperidina; **B)** Espectros de UV das bandas indicadas.

Mesmo sendo possível a detecção de produtos de biotransformação, observou-se a presença marcante do flavonóide padrão (hesperidina), representado pela coloração preta (FIGURA 4.20). O seu respectivo espectro de massas (FIGURA 4.21) confirmou a presença da hesperidina através da detecção do íon m/z 609 ($[M-H]^-$).

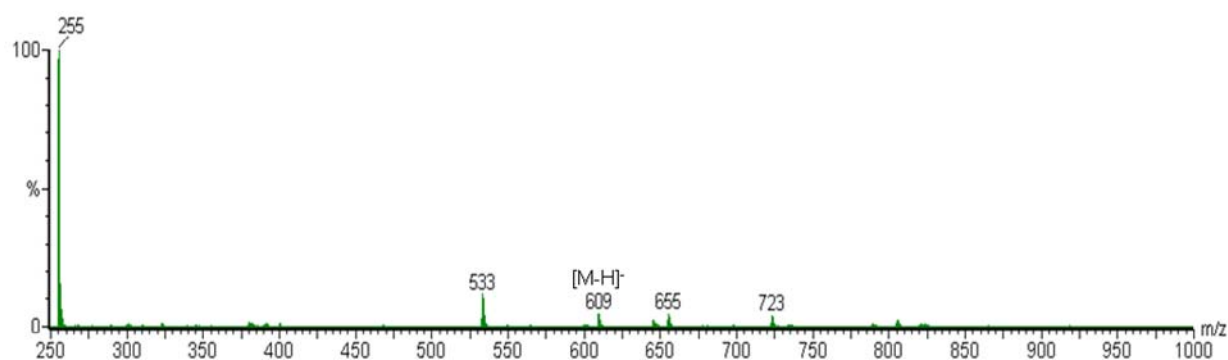


FIGURA 4.21 – Espectro de massas obtido para a banda em 14,22 minutos, onde observa-se a presença da hesperidina (m/z 609).

O espectro de massas gerado a partir da banda em 9,77 min (assinalado em azul na FIGURA 4.20) apresentou como possível íon *quasi* molecular m/z 689 (FIGURA 4.22).

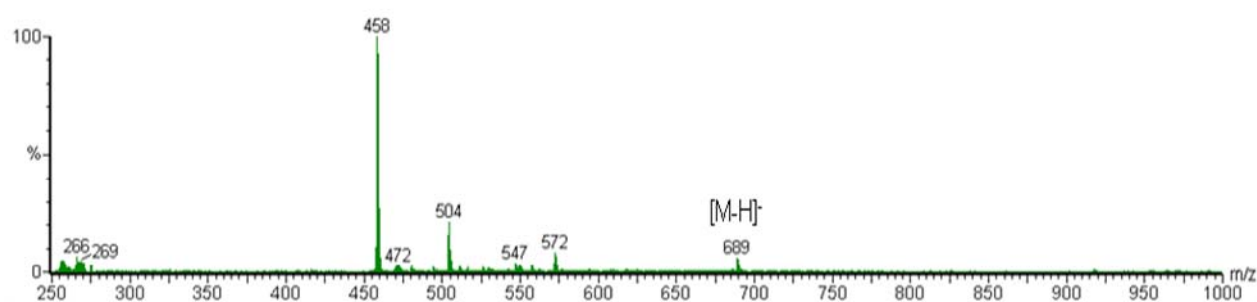


FIGURA 4.22 – Espectro de massas obtido para a banda em 9,77 minutos, referente a banda assinalada em azul.

A princípio tem-se uma adição de 80 Da no padrão hesperidina (610 Da). Contudo, esta afirmação somente seria verdadeira se após a realização de experimentos de íons produtos de m/z 689, fosse observado o íon produto m/z 609, correspondente à hesperidina padrão. Para tanto realizou-se o experimento de íons fragmentos de m/z 689 (FIGURA 4.23) e observou-se o íon fragmento m/z 609.

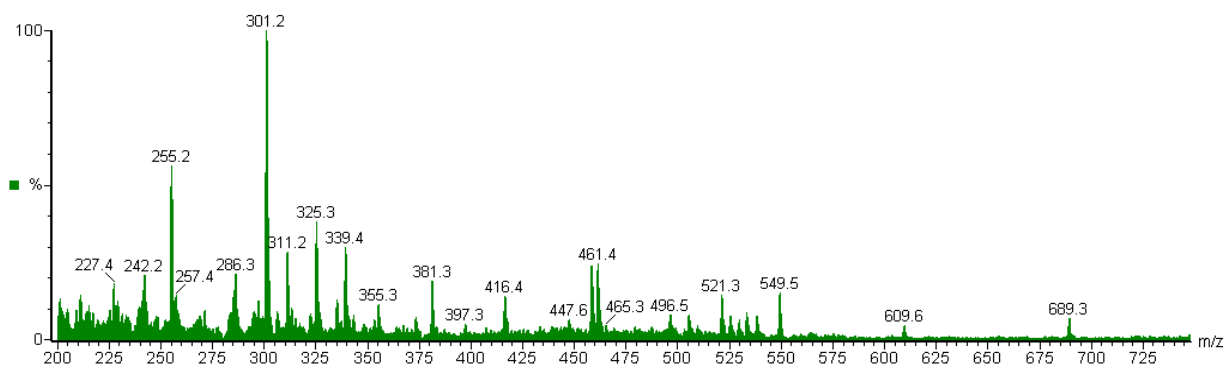


FIGURA 4.23 – Espectro de fragmentos de m/z 689.

Comumente, os flavonóides glicosilados apresentam um padrão de fragmentação, onde inicialmente perdem os açúcares produzindo a aglicona, como pode ser observado no experimento de íons produtos de m/z 689, que após a perda de 80 Da produziu m/z 609 (correspondente a hesperidina – flavonóide glicosilado), o qual posteriormente perdeu o açúcar levando ao pico base m/z 301 (correspondente a aglicona), FIGURA 4.24.

Pode-se ainda afirmar que o acréscimo de 80 unidades de massa ocorreu na aglicona do flavonóide, uma vez que a perda direta dos açúcares produz o íon produto m/z 381, que trata-se da aglicona da hesperidina acrescida das 80 unidades de massa, como observado na FIGURA 4.24.

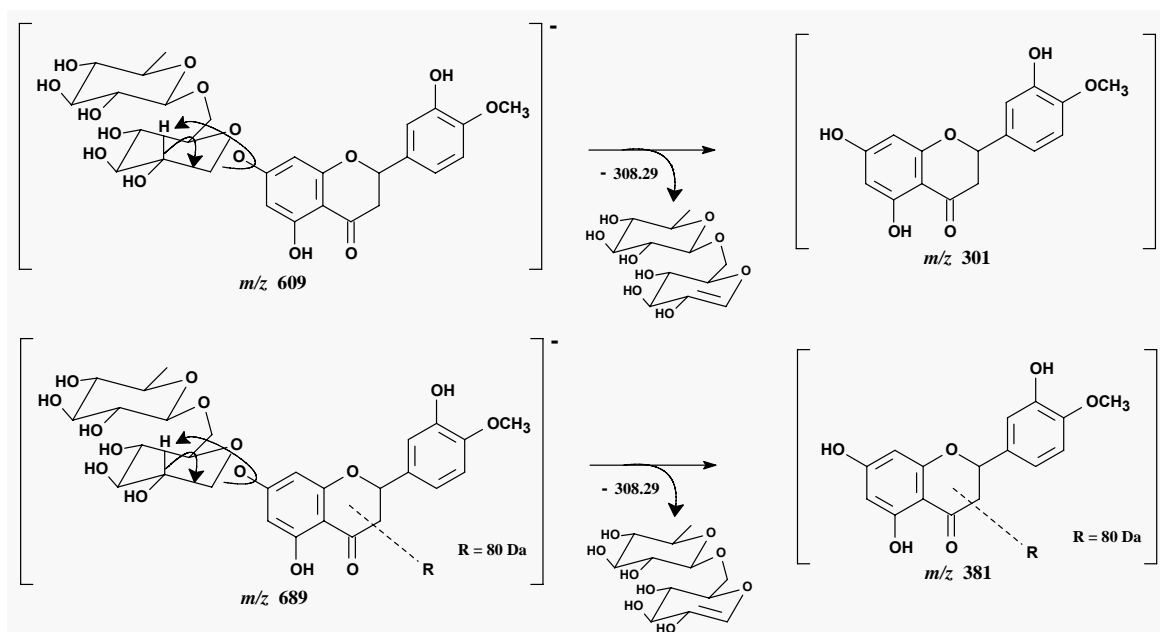


FIGURA 4.24 – Proposta de fragmentação para a hesperidina biotransformada.

Portanto, pelo experimento de CLAE/UV-EM, pode-se concluir que o micro-organismo biotransformou o flavonóide glicosilado hesperidina.

Pode-se ainda afirmar que o sistema enzimático do micro-organismo reconheceu e atuou sob um dos substratos adicionados ao meio de cultura, porém a quantidade de substância biotransformada foi muito pequena.

Durante o desenvolvimento do experimento observou-se o precário crescimento do fungo, provavelmente ocasionado pela redução do açúcar utilizado. Para certificar se o crescimento do fungo provocou alguma alteração no metabolismo do mesmo, realizou-se um novo experimento nas mesmas condições descritas para o experimento anterior, porém com a quantidade de açúcar mais elevada.

O experimento foi realizado em pequena escala com os flavonóides glicosilados e serviria de base para estudos mais minuciosos de reações de biotransformação. Por ter sido realizado em pequena escala, as amostras obtidas foram analisadas diretamente por CLAE/UV-EM, contudo dentre as diversas análises realizadas, não foi detectado nenhum produto de biotransformação de nenhum dos flavonóides testados. Vale ressaltar que a busca de produtos de biotransformação foi, inicialmente, direcionada pela presença do íon m/z 689 para as amostras contendo hesperidina. Contudo, a ausência da substância provocou o

estudo detalhado de cada amostra e de cada flavonóide e mesmo assim, nenhum produto de biotransformação pode ser detectado.

Outra maneira para enriquecer o meio líquido seria a utilização do meio líquido Czapek's enriquecido com extrato de levedura, como descreve o item 3.3.2.3.3. Neste experimento o fungo foi inicialmente cultivado em meio líquido rico (Czapek's contendo extrato de levedura) por sete dias. Este período foi suficiente para o total desenvolvimento do fungo, inclusive de sua esporulação. O fungo foi devidamente filtrado, sendo o micélio transferido para um meio mais pobre (Czapek's sem extrato de levedura), o qual já havia sido aditivado com os substratos (flavonóides glicosilados dissolvidos em DMSO, adicionados individualmente e em triplicata). Após a transferência do micélio para o meio pobre contendo os substratos, armazenaram-se os frascos sob agitação constante, permitindo assim, a maior interação entre o micélio e os substratos. Ao término dos doze dias de cultivo, o conteúdo dos frascos foi filtrado. Tanto as alíquotas quanto os extratos orgânicos foram analisados por CLAE/UV.

Os cromatogramas preliminares indicaram a possível metabolização dos flavonóides padrões ou parte deles, porém nenhuma outra banda cromatográfica significativa foi observada (FIGURA 4.25).

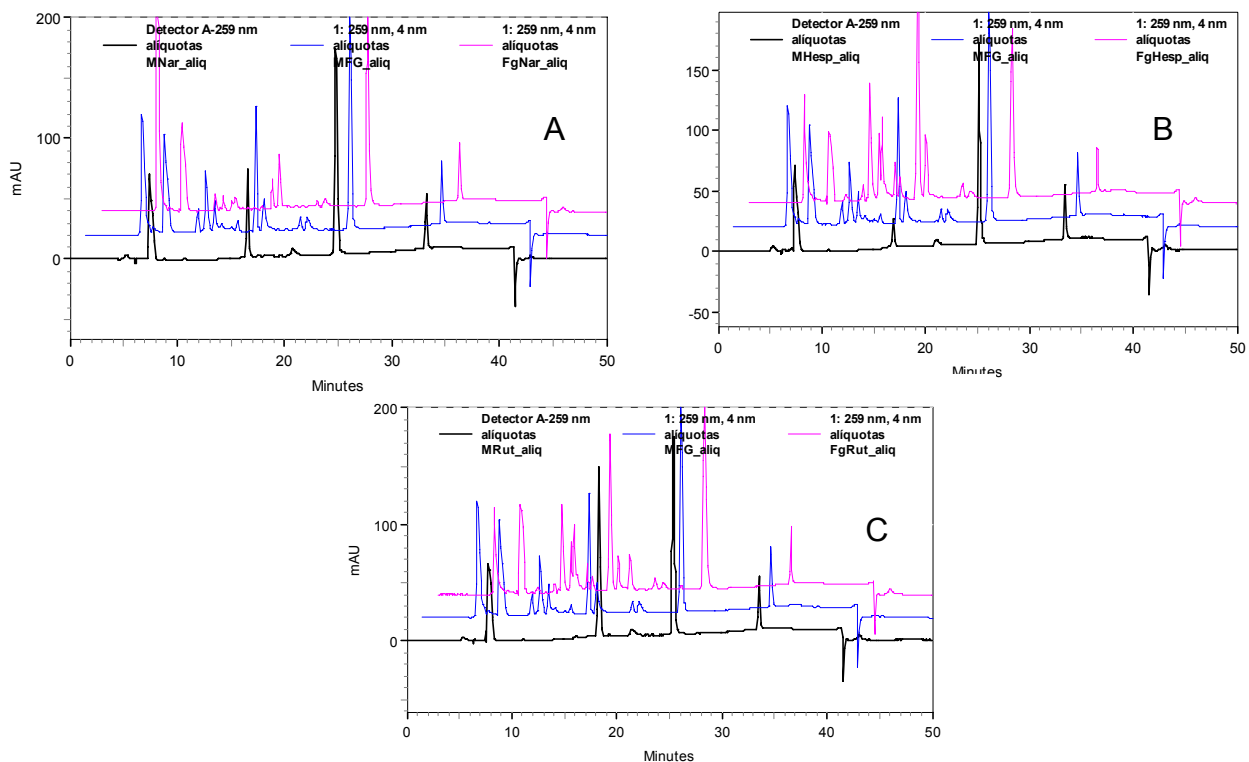


FIGURA 4.25 – Cromatogramas sobrepostos, em preto representado pelo meio líquido e substrato; azul meio líquido e fungo; rosa meio líquido, fungo e substrato, sendo (A) naringina, (B) hesperidina e (C) Rutina.

As amostras das alíquotas apresentam uma concentração muito baixa, visto que somente 5 mL de cada frasco foram retirados para as análises. As pequenas modificações observadas se destacam na região mais polar do cromatograma (ou seja, no início da eluição, indicando possivelmente que se ocorreu uma biotransformação, essa transformou o substrato em algo com uma polaridade mais elevada).

Já as amostras da fase orgânica confirmaram tal observação descrita acima, pois se o possível produto encontra-se mais polar, este não foi extraído para a fase orgânica utilizada (Acetato de etila). Os cromatogramas obtidos para a fase orgânica não demonstraram nenhuma modificação, assim nenhum produto de biotransformação pode ser detectado nas amostras orgânicas.

Como não se esperava que a transformação levasse ao aumento da polaridade dos substratos, nenhuma atenção especial foi dada à fase aquosa do experimento.

Dessa forma, a adição dos flavonóides glicosilados como substratos nos diferentes experimentos citados, pode ter sido indiferente para o desenvolvimento do fungo. O fungo não foi capaz de atuar explicitamente sobre os flavonóides, com exceção da hesperidina no experimento com pouca quantidade de açúcar no meio (15 g/L). O estresse causado pela pequena quantidade de fonte de carbono pode ter favorecido a reação, contudo a taxa de conversão obtida foi tão pequena que o produto não pode nem ser isolado.

A possível presença do citocromo P450 pode ser uma das causas da atividade praticamente nula, pois se este conjunto de enzimas normalmente transforma os flavonóides, a inibição deste complexo provocou a inalteração nos substratos.

4.1.3.1 – Reação de biotransformação dos flavonóides glicosilados utilizando *Aspergillus flavus*

Os resultados obtidos no item anterior (4.1.3) possibilitaram a investigação dos mesmos substratos (rutina, hesperidina e naringenina) quando adicionados ao meio de cultura de outro micro-organismo. Já que o micro-organismo citado no resultado anterior trata-se de fungo isolado como endofítico de plantas de carácter mutualista, sem qualquer vestígio de patogenicidade, utilizou-se para fins

de comparação um micro-organismo distinto, dessa vez isolado como patógeno de *Murraya paniculata*¹⁴³. O fungo estudado foi *Aspergillus flavus* (FIGURA 4.26).

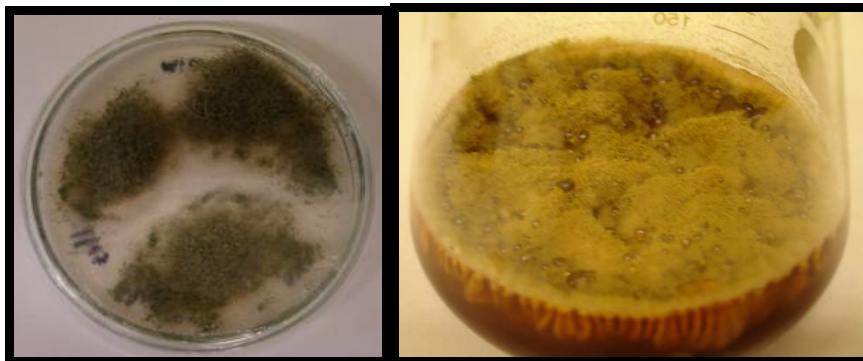


FIGURA 4.26 – *Aspergillus flavus* isolado de *Murraya paniculata*.

O metabolismo do fungo *Aspergillus flavus* já está bem estabelecido na literatura, sendo as principais substâncias produzidas pelo fungo as aflatoxinas (FIGURA 4.27).

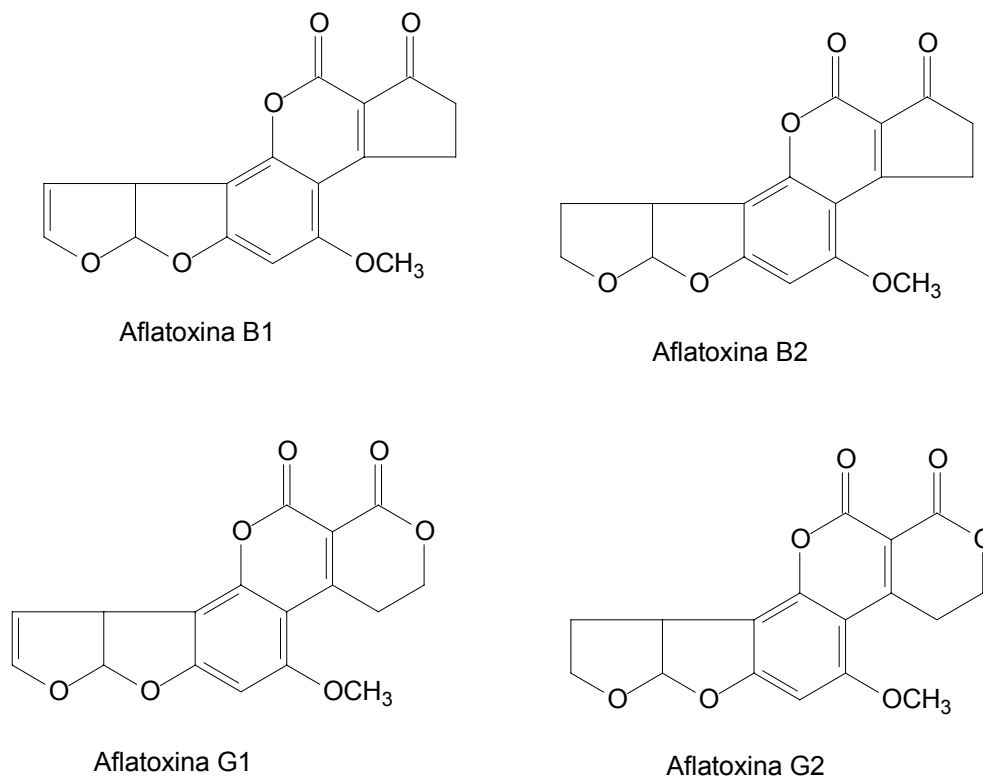


FIGURA 4.27 – Estruturas das principais aflatoxinas produzidas por *Aspergillus flavus*.

Por ser classificado como um fungo patógeno, muitas vezes seu sistema enzimático apresenta uma certa facilidade em degradar as mais diversas substâncias. Dentre as substâncias degradadas por este tipo de fungo destacam-se aquelas que possuem atividade antifúngica ou com certa toxicidade, sendo as reações de biotransformação uma maneira de sobrevivência neste habitat.

Muitos dos flavonóides encontrados na natureza apresentam as mais diferenciadas atividades biológicas, dentre elas as de caráter protetor das plantas. Como os flavonóides mais encontrados na natureza apresentam-se na sua forma glicosilada, teria-se a possibilidade de investigar a capacidade de transformação do micro-organismo patógeno frente aos substratos naringina, hesperidina e rutina.

No entanto, os dados obtidos com o fungo *Aspergillus flavus* mostraram uma certa divergência em relação aos dados observados para o fungo *Penicillium griseoroseum*. Os experimentos de biotransformação envolvendo o fungo *Aspergillus flavus* e os flavonóides glicosilados forma descritos no item 3.3.5.1.

As amostras foram analisadas diretamente por CLAE/UV-EM (item 3.3.5.2). Para facilitar a interpretação dos dados, iniciaram-se as análises das amostras contendo a naringina como substrato (FIGURA 4.28).

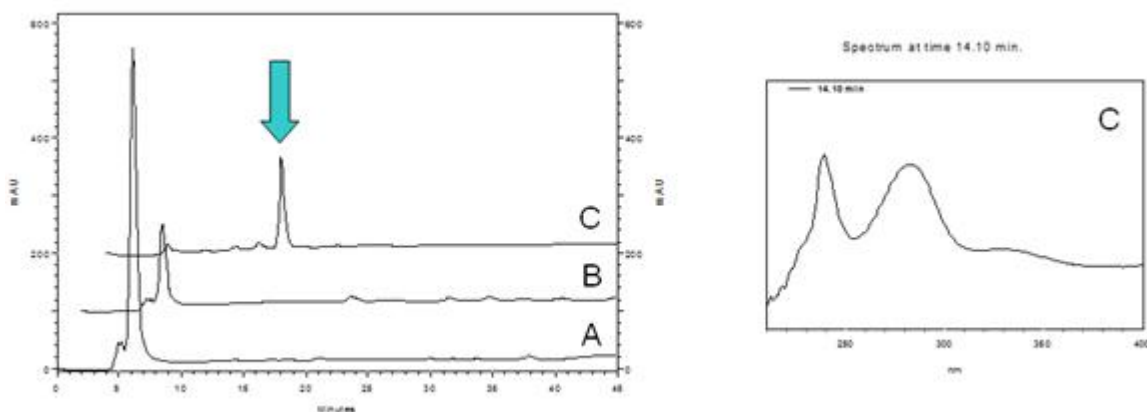


FIGURA 4.28 – Cromatogramas obtidos para as amostras: **(A)** meio + fungo, **(B)** meio + fungo + naringina e **(C)** meio + naringina (indicada pela seta) e seu respectivo espectro de UV.

Como observado nos cromatogramas (FIGURA 4.28), nenhuma banda referente a naringina padrão foi obtida na amostra contendo meio + fungo + naringina (FIGURA 4.28 B). Tal observação se justifica pelo consumo ou degradação completa do substrato adicionado ao meio de cultura. Contudo, nenhuma outra banda pode ser detectada quando comparado os cromatogramas

das amostras A e B (FIGURA 4.28), referentes as amostras do fungo com e sem substratos. Ou seja, as análises indicaram a degradação completa do substrato pelo micro-organismo sem que nenhum outro produto pudesse ser detectado.

O fato do fungo *Aspergillus flavus* degradar os flavonóides completamente, ou seja, em CO₂ e H₂O, como provavelmente foi observado, não é inédito na literatura. Herrman *et al* (2001)¹⁴⁴, discutiu a facilidade do micro-organismo em degradar compostos polifenólicos como os flavonóides glicosilados (naringina, hesperidina e rutina) como fontes de carbono para o seu próprio desenvolvimento.

Este fato, pode ser atribuído também ao caráter patogênico do fungo *Aspergillus flavus*, o qual utiliza de mecanismos enzimáticos para a sobrevivência nos mais diferenciados meios.

Assim, como a degradação total dos flavonóides e a falta de produtos de degradação e/ou biotransformação foram observadas para os três flavonóides testados, tornou-se desnecessária a apresentação dos demais resultados.

Independente das metodologias empregadas para os experimentos de biotransformação envolvendo os flavonóides glicosilados, o micro-organismo foi capaz de degradar os substratos, inclusive quando variado os tempos de cultivo.

4.1.4 – Reações de Permetilação dos flavonóides glicosilados

Como os primeiros resultados obtidos com o fungo *Penicillium griseoroseum* sobre a cafeína foi a reação de desmetilação, resolveu-se ainda explorar os flavonóides glicosilados, porém modificados quimicamente. Para tanto realizaram-se com os flavonóides glicosilados (rutina, naringina e hesperidina), reações de metilação com o objetivo de metilar todas as hidroxilas presentes nas substâncias. Assim, seriam avaliadas duas possibilidades: 1) a capacidade de desmetilação do fungo e/ou 2) a capacidade de biotransformar flavonóides.

Toda a descrição da metodologia empregada para a realização das reações, encontra-se no item 3.3.2.4. As condições adotadas nas reações dos três flavonóides utilizados foram semelhantes para cada um deles e foi baseada sobre a reação descrita por Rogmann *et al* (2000)¹²⁹. Utilizou-se um excesso tanto de base (hidreto de sódio) quanto de reagente (iodo metano) para garantir que as metilações ocorressem em todas as hidroxilas, inclusive nas hidroxilas dos açúcares.

As fases orgânicas obtidas passaram por colunas cromatográficas e os produtos foram isolados por placas cromatográficas preparativas. As substâncias obtidas das preparativas foram analisadas por CCDA, como ilustra a FIGURA 4.29.

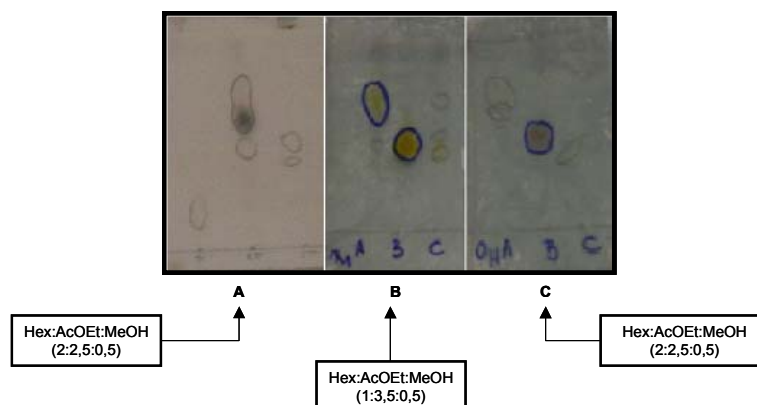


FIGURA 4.29 – Plaquinhas (CCDA) após a realização de CCDP, onde as substâncias assinaladas foram analisadas por EM e RMN¹H, sendo: **(A)** naringina, **(B)** rutina e **(C)** hesperidina, com seus respectivos sistemas de eluição.

Estas substâncias foram analisadas por EM (condições descritas no item 3.3.2.4.1). As massas esperadas para cada flavonóide dependiam da quantidade de hidroxilas metiladas (ou seja, da quantidade de metoxilas existentes), assim as possíveis massas obtidas para cada flavonóide encontram-se resumidas na Tabela 4.3.

TABELA 4.3 – Possíveis massas obtidas para os flavonóides após as reações de permetilação.

| Nº de metilações | Naringina | Hesperidina | Rutina |
|------------------|-----------|-------------|--------|
| 0 | 580 | 610 | 610 |
| 1 | 594 | 624 | 624 |
| 2 | 608 | 638 | 638 |
| 3 | 622 | 652 | 652 |
| 4 | 636 | 666 | 666 |
| 5 | 650 | 680 | 680 |
| 6 | 664 | 694 | 694 |
| 7 | 678 | 708 | 708 |
| 8 | 692 | 722 | 722 |
| 9 | ----- | 736 | 736 |
| 10 | ----- | ----- | 750 |

4.1.4.1 – Análise da naringina polimetoxilada

A primeira amostra analisada foi a fração da naringina (segunda substância com coloração marrom ilustrada na FIGURA 4.29 A). Como a substância encontrava-se praticamente pura, realizou-se um experimento de RMN¹H para a confirmação da estrutura obtida.

Através do espectro de hidrogênio (FIGURA 4.30), pode-se observar a presença dos sinais característicos da flavanona, referentes ao anel A, B e ao se analisar o anel C, notou-se a presença de dois dubletos com constantes de acoplamento $J = 16\text{Hz}$, além dos nove sinais de metoxilas presentes no espectro, confirmando assim que ocorreu todas as metilações inclusive uma metilação extra.

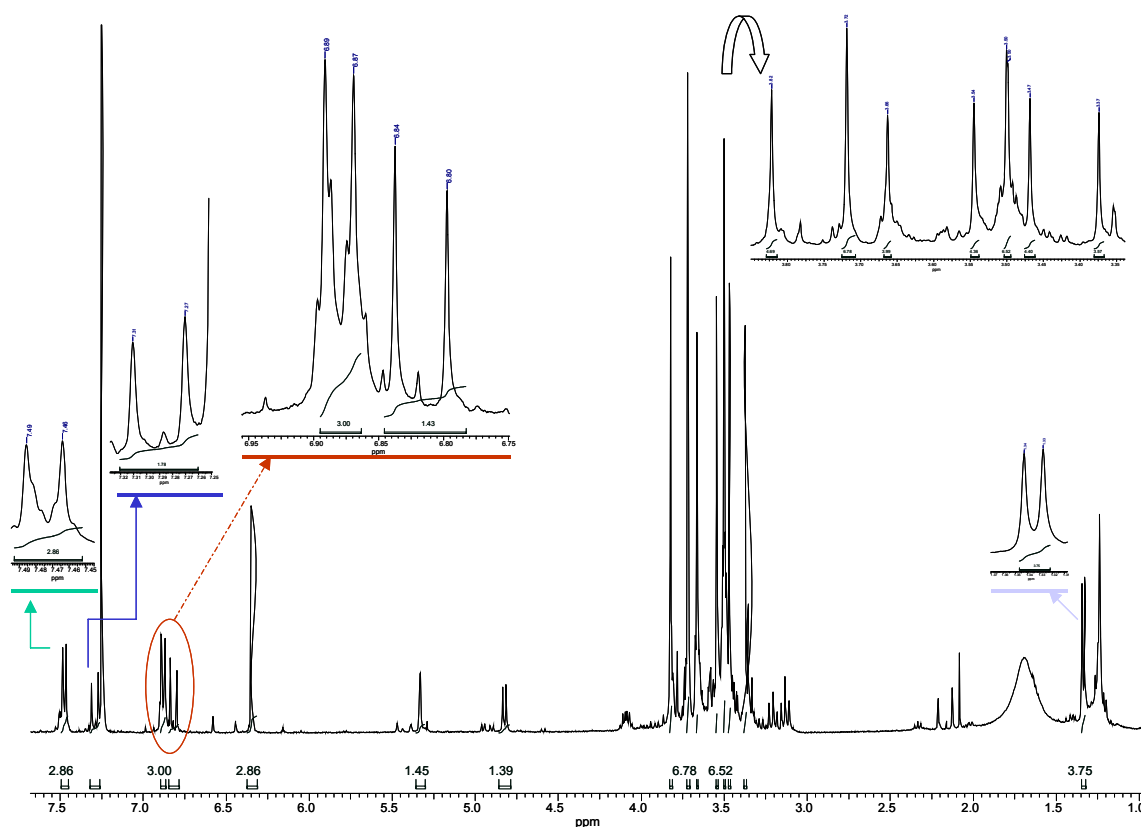
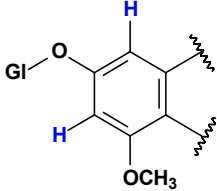
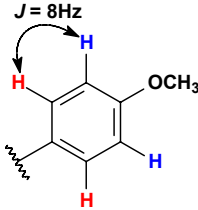
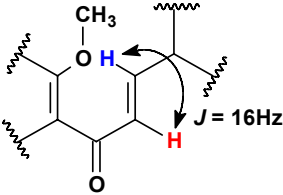
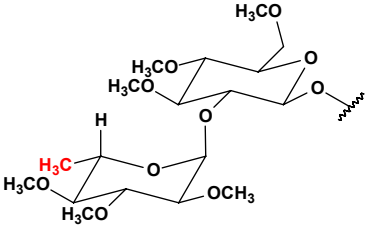
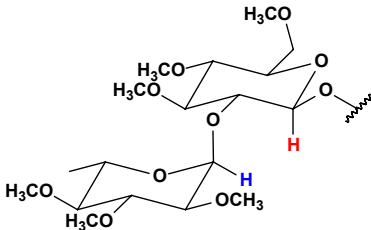


FIGURA 4.30 – Espectro de hidrogênio da naringina polimetoxilada (400MHz – CDCl_3).

Dessa forma, no anel A, observou-se um singlete referente aos dois hidrogênios presentes, em posição *meta* um ao outro. O anel B contendo quatro hidrogênios também foi identificado por dois dubletos com $J = 8,7\text{Hz}$, a qual corresponde como o esperado a posição *orto* entre ambos. A presença de somente dois sinais trata-se da equivalência química entre ambos, ou seja, os hidrogênios representados em azul são equivalentes, do mesmo modo que os hidrogênios representados em vermelho (como ilustra a Tabela 4.4 no anel B). A surpresa foi realmente quando observou-se a presença de dois dubletos com constante de acoplamento em 16Hz , a qual equivale a constante entre hidrogênios olefínicos em *trans*. Os demais sinais observados correspondem aos sinais das metoxilas, as quais podem ser contadas fornecendo o número total das mesmas (nove metoxilas), o sinal em $\delta 1,33$ referente a metila do açúcar, representada por um dubleto como o esperado e ainda outros sinais presentes no espectro são atribuídos aos hidrogênios do açúcar, como os hidrogênios anoméricos, em $\delta 4,84$ e $5,35$ (FIGURA 4.30).

TABELA 4.4 – Dados dos deslocamentos químicos dos hidrogênios observados para a naringina metoxilada.

| | δ_H (ppm) | Representação estrutural |
|---------------------------|---|--|
| Anel A | 6,35 (s) |  |
| Anel B | 7,47 (d, $J = 8,65\text{Hz}$) 6,87 (d, $J = 8,7\text{Hz}$) |  |
| Anel C | 7,30 (d, $J = 16\text{Hz}$) 6,81 (d, $J = 16\text{Hz}$) |  |
| -CH ₃ (açúcar) | 1,33 (d) |  |
| Anoméricos | 5,35 4,84 |  |

Como houve uma metoxilação a mais na molécula da naringina, imaginou-se a possibilidade da formação do ânion enolato, uma vez que a existência de um hidrogênio ácido vizinho ao carbono carbonílico permitiria a abstração deste pela base. Isto resultaria na formação de uma dupla ligação, a qual deslocaria os

elétrons π da carbonila para o oxigênio que suporta bem uma carga negativa. Este por sua vez abstrairia uma metila, proveniente do iodo metano, sendo explicado assim a detecção de uma metoxila a mais na molécula, como ilustrado na FIGURA 4.31.

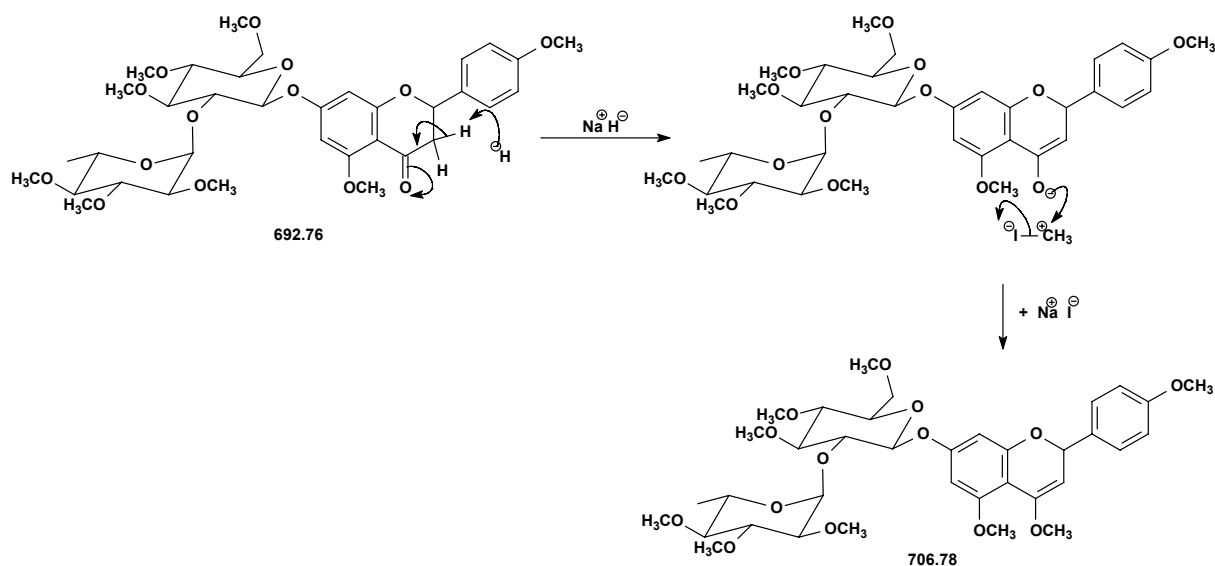


FIGURA 4.31 – Proposta para a formação de m/z 707 com a adição de uma metoxila a mais.

Contudo, esta proposta não estaria de acordo com os sinais obtidos para o anel C da molécula, onde existe apenas um hidrogênio olefínico. A única alternativa seria ter ocorrido a abertura do anel C, favorecendo a formação de uma dupla ligação *trans* (FIGURA 4.32) o que de fato confirma a reação ocorrida.

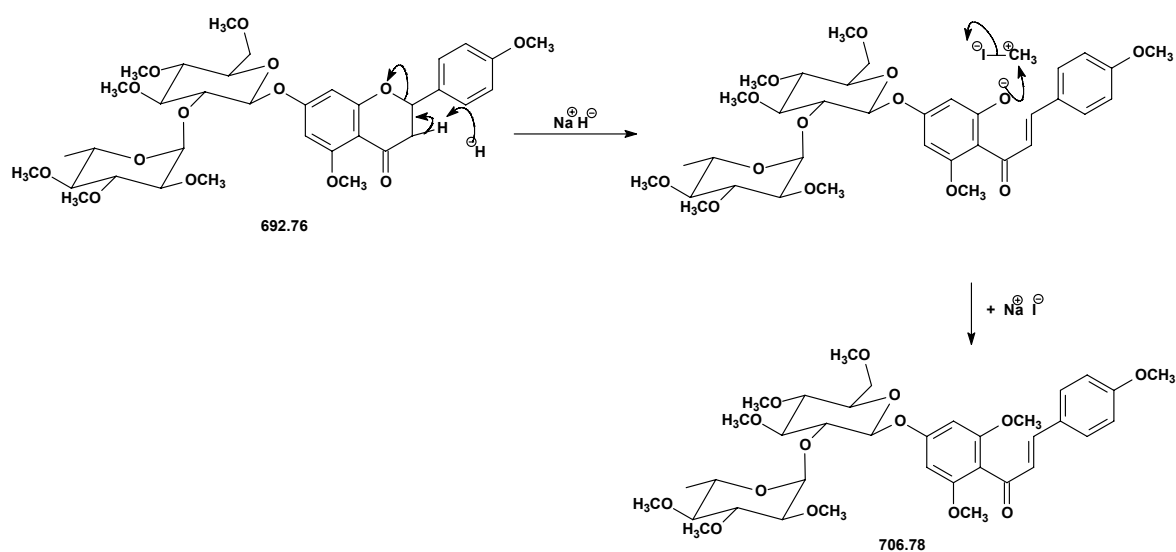


FIGURA 4.32 – Esquema proposto para a formação de m/z 707.

Foram realizadas análises por espectrometria de massas (inserção direta). O espectro de massas encontra-se ilustrado na FIGURA 4.33.

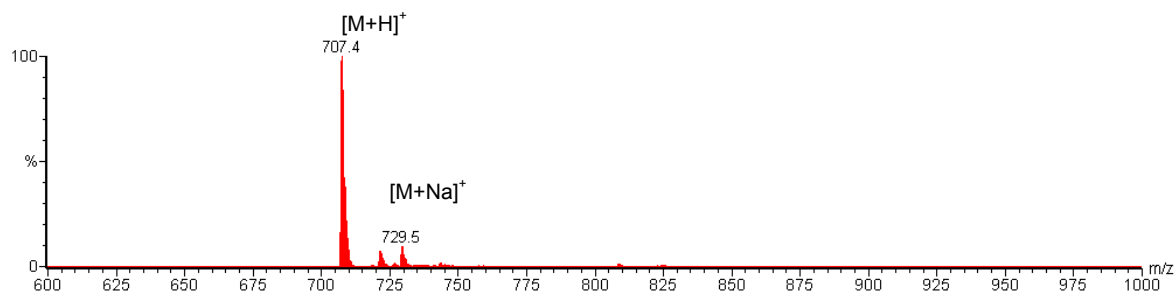


FIGURA 4.33 – Espectro de massas obtido para amostra Prep2_naringina metoxilada.

O pico de maior intensidade observado em m/z 707 não correspondia a nenhuma massa esperada para a naringina (Tabela 4.3), pois esperava-se que o número total de metoxilas fosse igual a oito. Contudo somando-se 692 Da (oito metilações) + 14 Da (referente a adição de mais uma metila), obtém-se 706 Da correspondente este ao íon m/z 707 ($[M+H]^+$) observado, uma vez que o experimento foi realizado no modo positivo de ionização. Dessa forma, confirmou-se que houve uma metilação a mais na molécula da naringina.

Realizaram-se ainda experimentos de íons produtos para confirmar a estrutura proposta. O espectro obtido comprovou realmente que o íon em m/z 707 correspondia ao flavonóide metoxilado, inclusive com as hidroxilas do açúcar metiladas, uma vez que o pico base observado no espectro (FIGURA 4.34) corresponde exatamente a aglicona do flavonóide metoxilado, ou seja, obtida a partir da perda de açúcar completamente metoxilado (FIGURA 4.35).

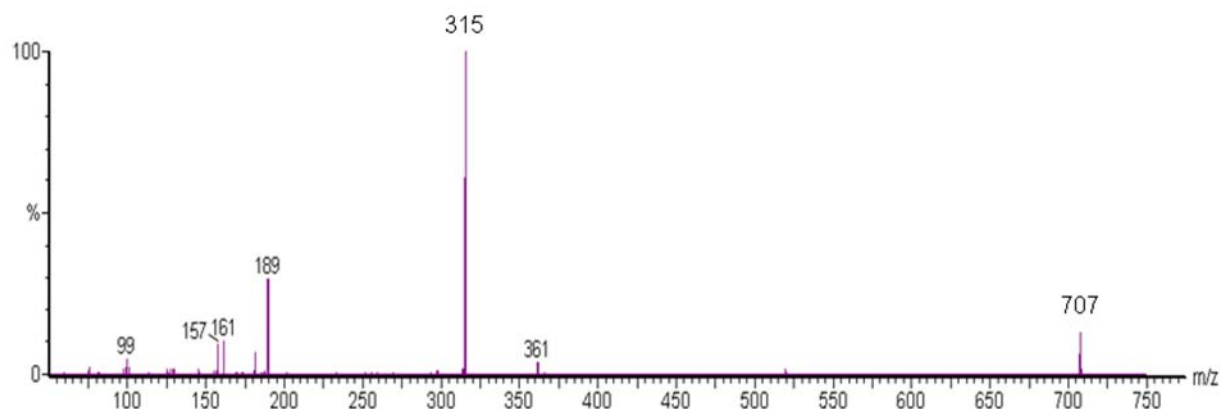


FIGURA 4.34 – Espectro de íons filhos de m/z 707, 17eV.

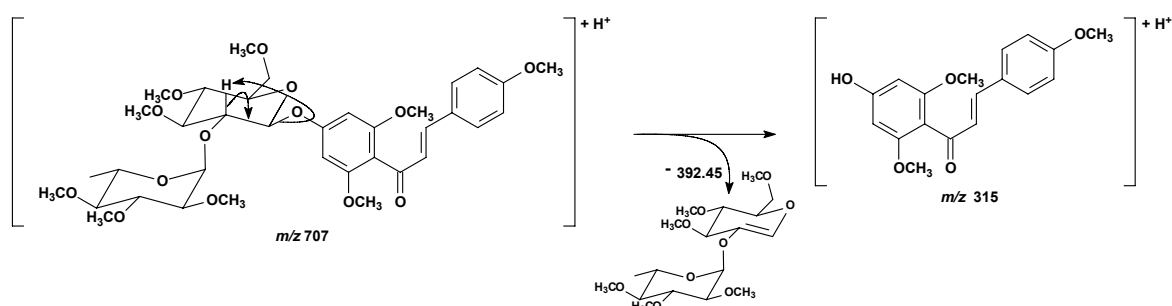


FIGURA 4.35 – Proposta de fragmentação para a perda de açúcar fornecendo o pico base em m/z 315.

Mesmo o produto obtido apresentando uma metoxila a mais do que a esperada, tratava-se de um produto muito interessante, pois o objetivo era justamente a obtenção de uma substância completamente metoxilada para analisar a capacidade de desmetilação do *Penicillium griseoroseum*. O fato de ter ocorrido a abertura do anel C durante o desenvolvimento da reação pode ter sido ocasionado pelas condições extremas de basicidade e excesso de reagentes utilizados, onde desejava-se garantir a total metilação, inclusive das hidroxilas do açúcar, as quais são mais difíceis de serem realizadas. A duração da reação também foi favorável para que este processo ocorresse (abertura do anel C). Porém, como já mencionado, para a finalidade do produto obtido não havia problema algum ter ocorrido tal abertura.

4.1.4.2 – Análise da hesperidina polimetoxilada

A mesma reação de permetilação foi repetida com o flavonóide hesperidina, lembrando que tratava-se de uma reação teste e portanto pouco material de partida estava sendo utilizado. Já que a hesperidina é uma flavanona como a naringina (ou seja, não possui a dupla ligação no anel C), esperava-se que a mesma abertura ocorresse, uma vez que as condições empregadas foram as mesmas. E isto foi realmente comprovado.

Quando analisou-se a amostra B ilustrada na CCDA em **C** da FIGURA 4.29, observou-se a presença de uma coloração alaranjada como a da própria hesperidina padrão, porém muito mais intensa e, portanto esta despertou rapidamente o interesse para ser analisada.

Primeiramente realizou-se um experimento *full scan* (varredura de íons), FIGURA 4.36, para identificar se a massa da substância se esta estava ou não de acordo com as massas previstas (Tabela 4.3).

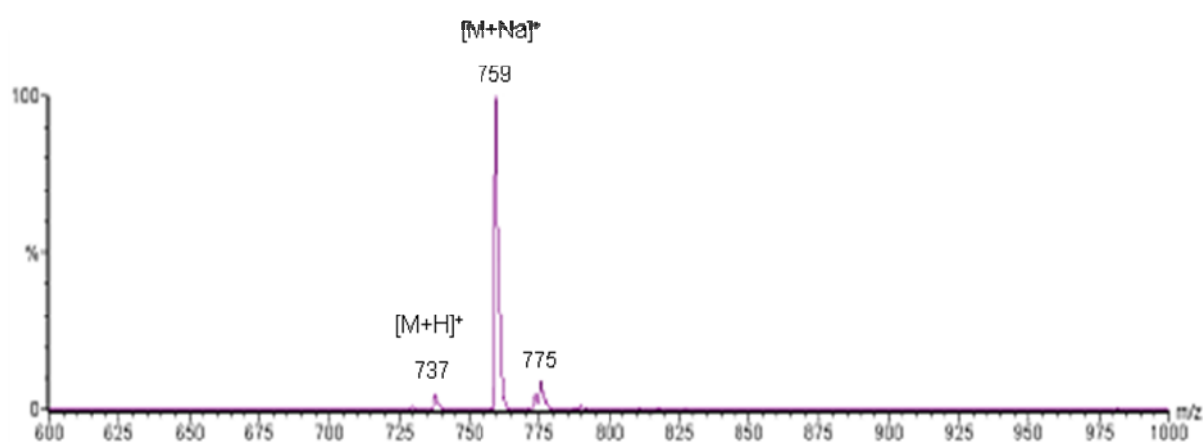


FIGURA 4.36 – Espectro de varredura de íons da amostra B (CCDA **C** da FIGURA 4.24).

De acordo com a Tabela 4.3 o pico de m/z 737 corresponde a massa 736, correspondente a nove metoxilas na molécula. A intensidade pequena referente ao pico de m/z 737 foi observada devido ao intenso pico de m/z 759, o qual corresponde ao aduto de sódio formado (já que utilizou-se o modo positivo de ionização facilitando a formação do mesmo). A massa 736 Da corresponde a nove metoxilas na molécula, que corresponde a abertura do anel C, pois a hesperidina possui oito hidroxilas e uma metoxila, sendo possíveis oito metilações, o que

equivale a massa de 722 Da. A metilação a mais deve ter procedido igualmente ao ocorrido com a naringina, já que o pico majoritário em m/z 759 (FIGURA 4.36), confirma o íon molecular de m/z 737.

O experimento de íons fragmentos de m/z 737 foi obtido para a confirmação estrutural da substância (FIGURA 4.37).

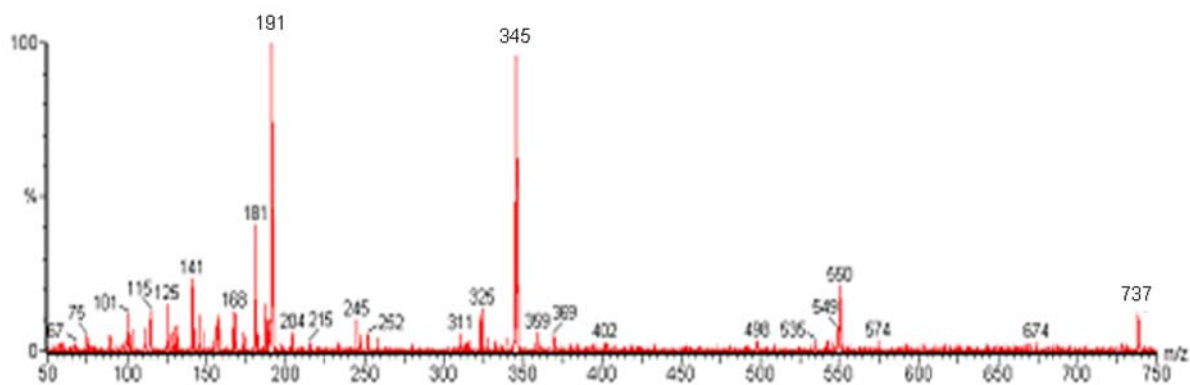


FIGURA 4.37 – Espectro de íons fragmentos de m/z 737.

De acordo com a FIGURA 4.37, referente ao espectro de massas de íons fragmentos pode-se observar a presença do pico de m/z 345 o que corresponde a perda de 392 unidades de massa, equivalente esta ao açúcar completamente metoxilado, como ilustra a FIGURA 4.38.

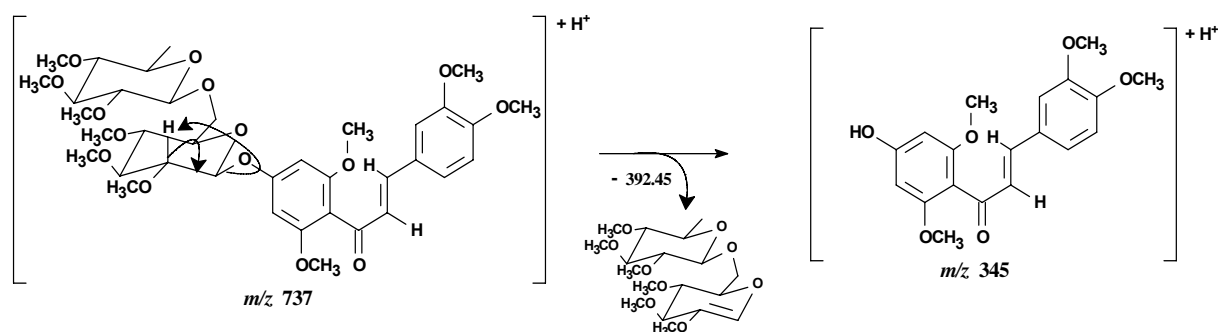


FIGURA 4.38 – Proposta de fragmentação para a obtenção de m/z 345.

Porém, para comprovar que realmente a abertura do anel havia ocorrido como para a naringina foi necessário realizar RMN¹H da amostra (FIGURA 4.39) analisada por EM.

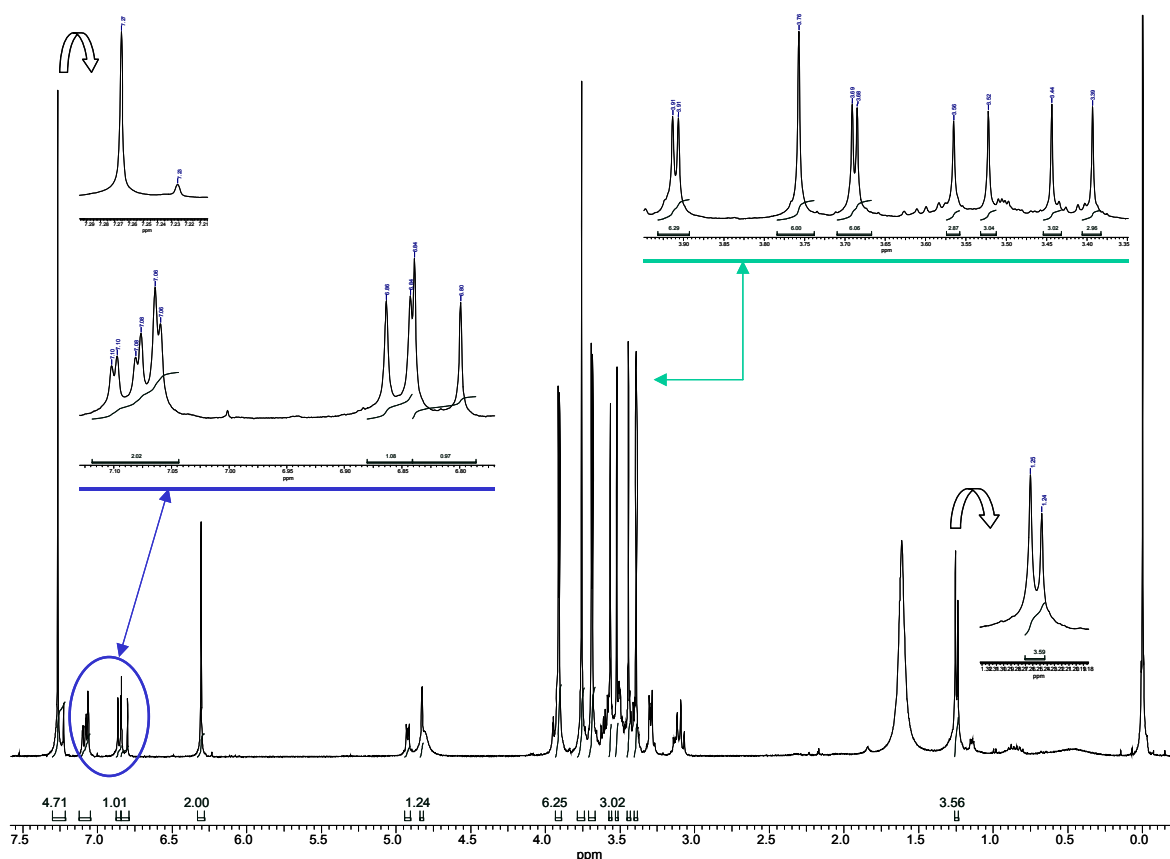
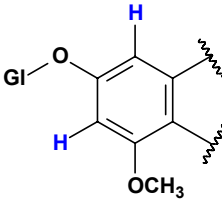
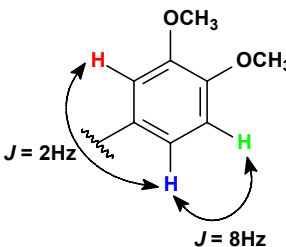
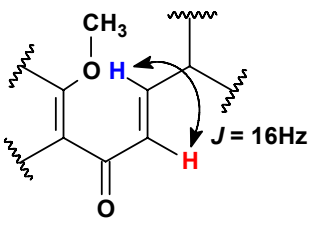
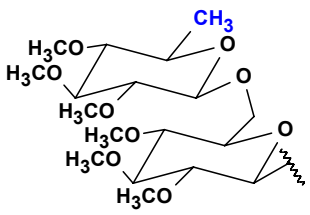
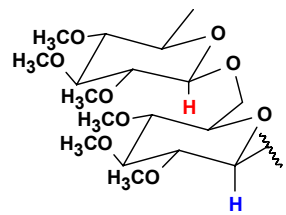


FIGURA 4.39 – Espectro de hidrogênio da hesperidina polimetoxilada (400MHz – CDCl_3).

Através do espectro obtido (FIGURA 4.39) pode-se observar os sinais característicos para a flavanona (identificando os anéis A, B e C), como resume a Tabela 4.5. Os dois hidrogênios presentes no anel A da molécula são observados como um singleto em δ 6,30 e quando integrado fornece um valor igual a dois, indicando a presença de dois hidrogênios no mesmo. Já para o anel B são observados três sinais referentes aos três hidrogênios deste anel, em δ 7,1 observou-se um dubleto com constante de acoplamento 2Hz (acoplamento em *meta*), em δ 7,07 observou-se um duplodubleto, pois este acopla tanto em *orto* como em *meta*, justificando os dois valores de $J = 2\text{Hz}$ e 8Hz (*meta* e *orto*) e um outro sinal em δ 6,85 correspondente também ao anel B, um dubleto com $J = 8\text{Hz}$, indicando o acoplamento em *orto*, como ilustrado na Tabela 4.5. A caracterização do produto deu-se com os sinais observados em δ 7,25 e δ 6,8, ambos dubletos com $J = 16\text{Hz}$, característico de hidrogênios olefínicos na posição *trans*. Na região das metoxilas (entre δ 3,2 – 4,0) pode-se observar a presença das nove metoxilas, indicando a presença da metilação a mais obtida. Os sinais em δ 4,92 e δ 4,82 correspondem

aos hidrogênios anoméricos, enquanto o dubleto observado em δ 1,2 corresponde a metila, estando estes presentes no açúcar da molécula.

TABELA 4.5 – Dados dos deslocamentos químicos observados para os hidrogênios da hesperidina metoxilada.

| | δ_H (ppm) | Representação estrutural |
|---------------------------|--|--|
| Anel A | 6,30 (s) |  |
| Anel B | 7,1 (d, $J = 2\text{Hz}$) 7,07 (dd, $J = 2$ e $8,65\text{Hz}$) 6,85 (d, $J = 8,7\text{Hz}$) |  |
| Anel C | 7,25 (d, $J = 16\text{Hz}$) 6,8 (d, $J = 16\text{Hz}$) |  |
| -CH ₃ (açúcar) | 1,2 (d) |  |
| Anoméricos | 4,92 4,82 |  |

Assim com os dados obtidos para a hesperidina metoxilada pode-se comprovar que ocorreu a abertura do anel como esperado, além das demais hidroxilas terem sofrido as metilações desejadas.

4.1.4.3 – Análise da rutina polimetoxilada

Com a rutina a reação também foi repetida nas mesmas condições, porém por se tratar de uma flavona, não era esperado a abertura do anel C, já que este possui a dupla ligação no anel, não havendo a possibilidade de abstração de próton.

O número de metoxilas esperadas seria, então, somente dez, o que forneceria uma massa de 750 Da. A análise iniciou-se com os experimentos de EM para a amostra que mais despertou interesse, no caso a amostra B da CCDA **B** (FIGURA 4.29), devido a sua intensa coloração, além de sua pureza.

No espectro de varredura de íons obtido para a amostra, observa-se a presença do íon m/z 751 (FIGURA 4.40), que corresponde a rutina contendo dez metoxilas, enquanto o íon m/z 773 trata-se do aduto de sódio para 750 Da.

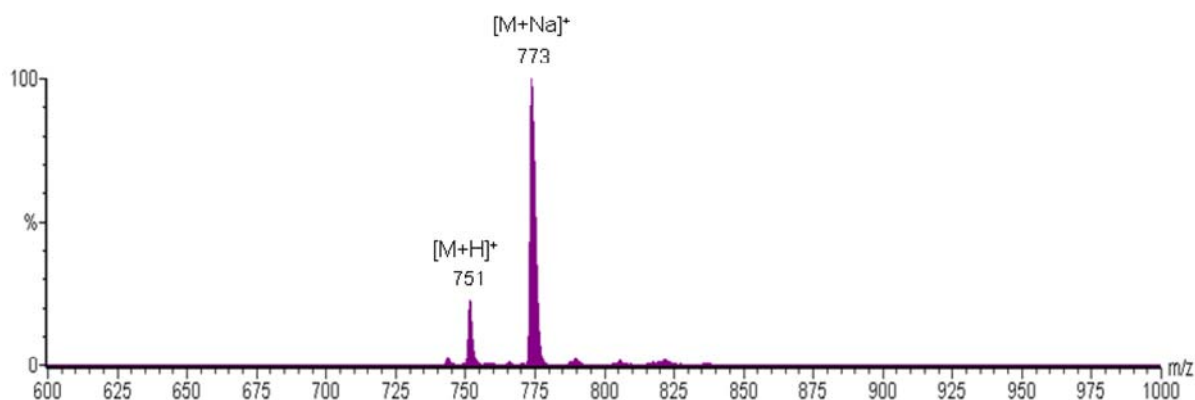


FIGURA 4.40 – Espectro de varredura de íons para a amostra da rutina metoxilada.

Em seguida, realizou-se o experimento de íons fragmentos para m/z 751 (FIGURA 4.41).

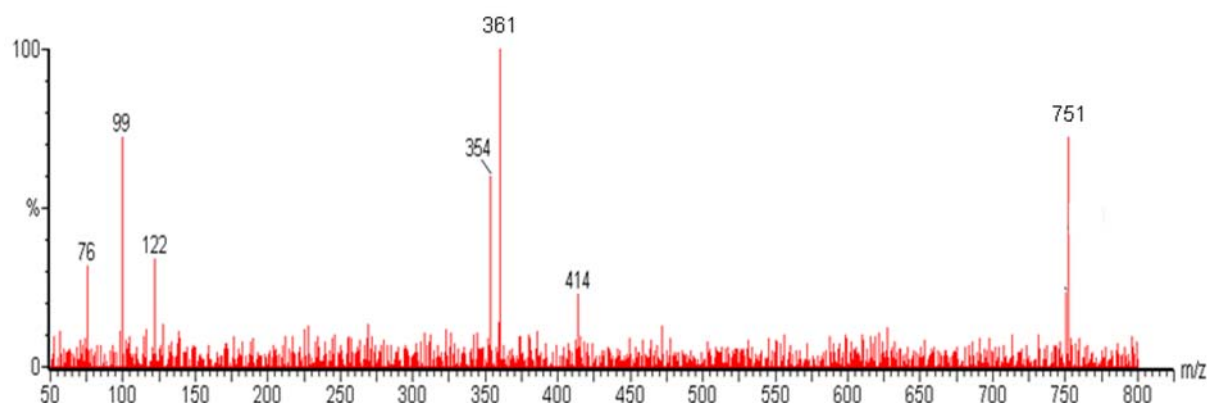


FIGURA 4.41 – Espectro de íons fragmentos para m/z 752.

De acordo com o espectro obtido (FIGURA 4.41), pode-se observar que o pico base para este corresponde exatamente a perda do açúcar metoxilado (FIGURA 4.42), como se esperava, uma vez que para os demais flavonóides analisados o mesmo tinha sido observado.

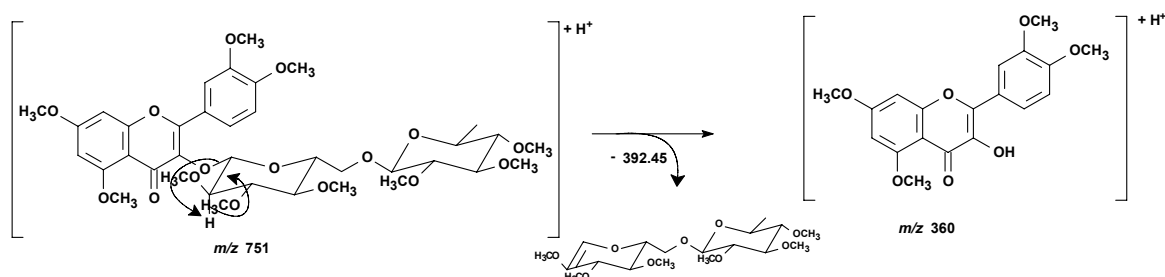


FIGURA 4.42 – Esquema de fragmentação para m/z 751 para a obtenção de m/z 361, correspondente a perda do açúcar metoxilado.

Assim, através das análises realizadas por EM já poderia-se afirmar que o produto havia sido totalmente metilado como o desejado, contudo para a melhor confirmação dos dados estruturais, realizou-se com a amostra análises de RMN¹H (FIGURA 4.43). Onde através dos sinais, o produto pode ser completamente caracterizado.

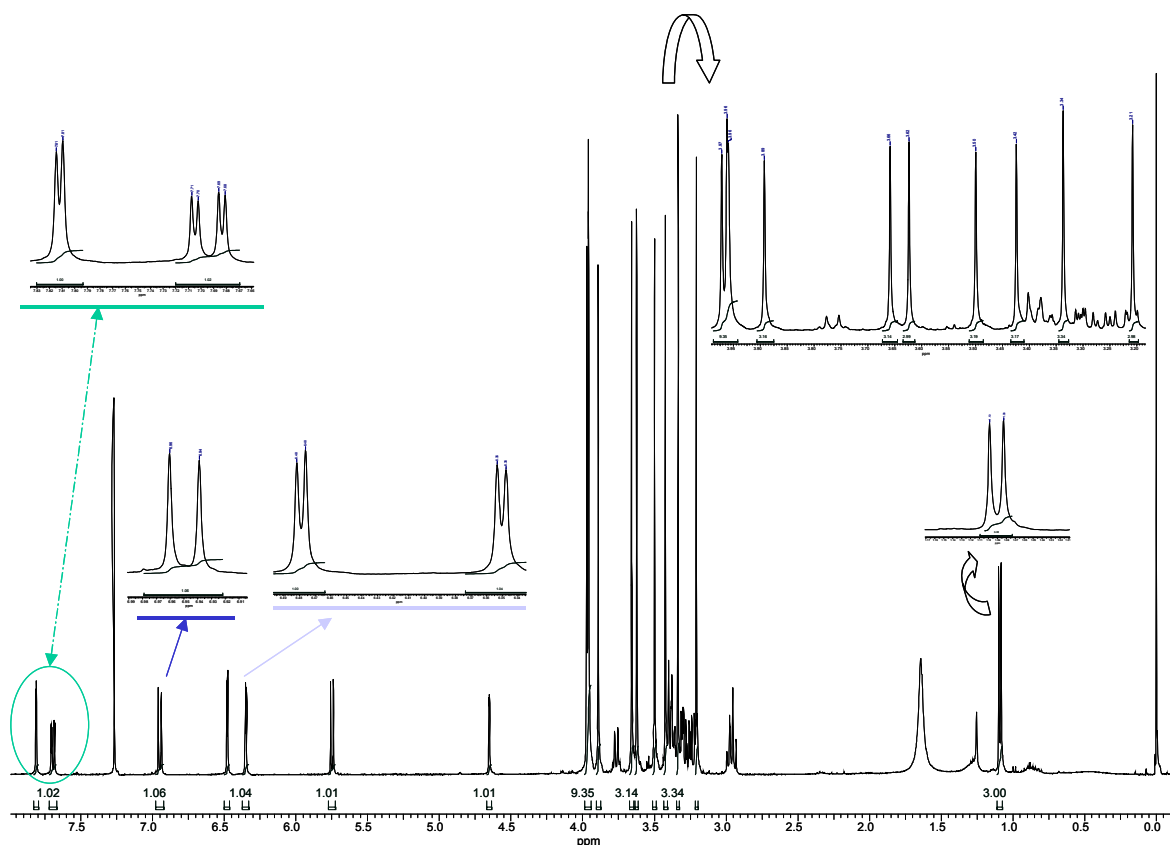


FIGURA 4.43 – Espectro de hidrogênio para a rutina polimetoxilada (400MHz – CDCl_3).

Os sinais observados em δ 6,48 e δ 6,35, ambos dubletos, apresentaram $J = 2\text{Hz}$, indicando o acoplamento em *meta* dos hidrogênios presentes no anel A. Já os sinais em: δ 7,81 um dubleto com $J = 2\text{Hz}$, δ 7,70 um duplodubleto com $J = 2$ e 8Hz e em δ 6,95 outro dubleto com $J = 8\text{Hz}$, caracterizou os sinais equivalentes aos hidrogênios presentes no anel B. As metoxilas puderam ser facilmente contadas (num total de dez metoxilas) na região entre δ 3,2 e 4,0 (ampliadas no espectro). Os demais sinais observados referem-se aos hidrogênios do açúcar da molécula: anoméricos em δ 4,65 e δ 5,75 e a metila em δ 1,1.

A Tabela 4.6 apresenta o resumo dos dados obtidos pelo espectro de hidrogênio, assim como, suas representações estruturais.

TABELA 4.6 – Dados dos deslocamentos químicos obtidos para a amostra da rutina metoxilada.

| | δ_H (ppm) | Representação estrutural |
|---------------------------|--|--------------------------|
| Anel A | 6,48 (d, $J = 2\text{Hz}$) 6,35 (d, $J = 2\text{Hz}$) | |
| Anel B | 7,81 (d, $J = 2\text{Hz}$) 7,70 (dd, $J = 2$ e 8Hz) 6,95 (d, $J = 8\text{Hz}$) | |
| -CH ₃ (açúcar) | 1,1 (d) | |
| Anoméricos | 5,75 4,65 | |

Portanto, a reação de metilação para todas as hidroxilas presentes nos substratos de partida foram satisfatórias para os três substratos utilizados (rutina, naringina e hesperidina). Porém o rendimento da reação foi baixo (em torno de 25%), sendo atribuído talvez a alguns parâmetros da reação, como tempo e quantidade de reagentes utilizados.

4.1.5 – Experimento de biotransformação dos flavonóides polimetoxilados

O produto da reação de permetilação obtido em maior quantidade foi a polimetoxilação da naringina, a qual foi obtida em duas formas: com o anel C aberto e com o anel C fechado (FIGURA 4.44).

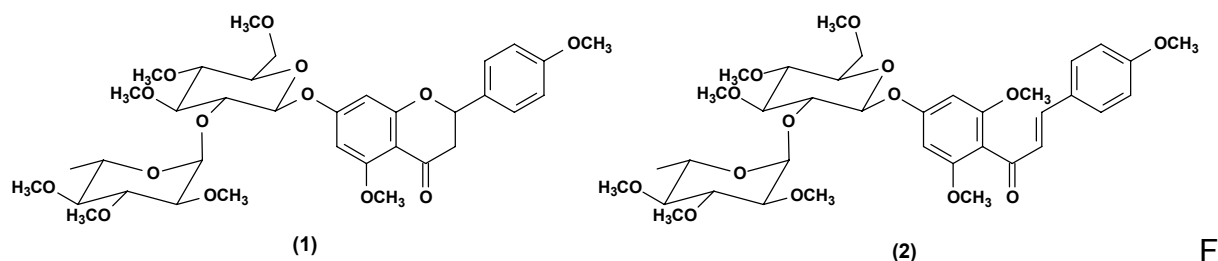


FIGURA 4.44 – Estruturas químicas dos produtos de metilação da naringina: **(1)** anel C fechado e **(2)** anel C aberto.

No entanto, para o experimento foi utilizada somente a naringina polimetoxilada com o anel C aberto, já que foi obtida com maior grau de pureza e em maior quantidade. O experimento seguiu o procedimento descrito no item 3.3.2.5. O fungo *Penicillium griseoroseum* foi inoculado com o substrato por 20 dias. Foram obtidos de cada extrato três amostras referentes às partições ácida, neutra e básica.

As amostras foram analisadas por CLAE/UV. A análise dos cromatogramas (FIGURA 4.45), ilustrou a inexistência de produtos de biotransformação, uma vez que em todas as amostras contendo fungo e substrato, observou-se uma banda referente ao substrato padrão e nenhuma outra banda diferenciada, ou seja, bandas inexistentes nos controles (somente meio e fungo).

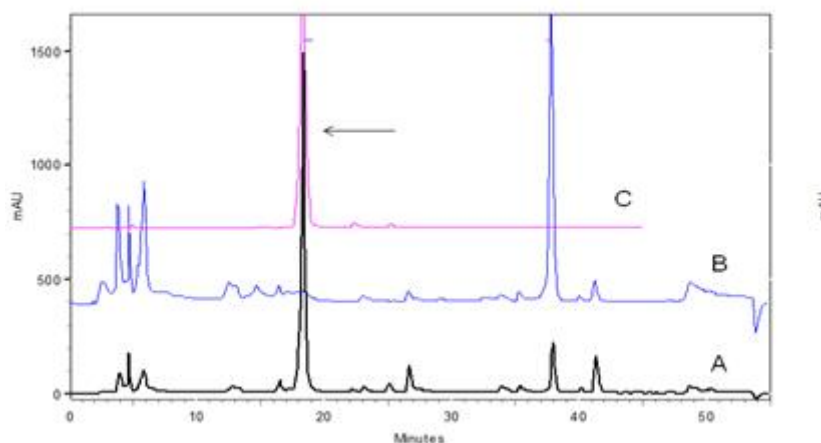


FIGURA 4.45 – Cromatogramas sobrepostos: **A)** Fungo + naringina polimetoxilada; **B)** Somente fungo; **C)** Naringina polimetoxilada.

Os cromatogramas apresentados acima resumem os demais cromatogramas obtidos, pois todos foram muito similares, sendo desnecessária a apresentação dos mesmos.

Dessa forma, o flavonóide polimetoxilado não foi transformado pelo fungo. Inúmeras podem ter sido as justificativas pela ausência de biotransformação, como por exemplo, a baixa solubilidade do substrato, falta de agitação dos frascos, baixa permeabilidade da substância nas membranas celulares, o volume dos substratos, entre outros. Enfim, o micro-organismo não foi capaz de metabolizar o substrato polimetoxilado.

4.1.5.1 – Reação de biotransformação da naringina polimetoxilada utilizando *Aspergillus flavus*

Da mesma forma como realizado para os flavonóides glicosilados, utilizou-se o fungo *Aspergillus flavus* para a biotransformação dos flavonóides modificados quimicamente, ou seja, a naringina polimetoxilada (item 3.3.2.4).

Novamente, iniciaram-se as análises com as amostras contendo naringina polimetoxilada (FIGURA 4.46).

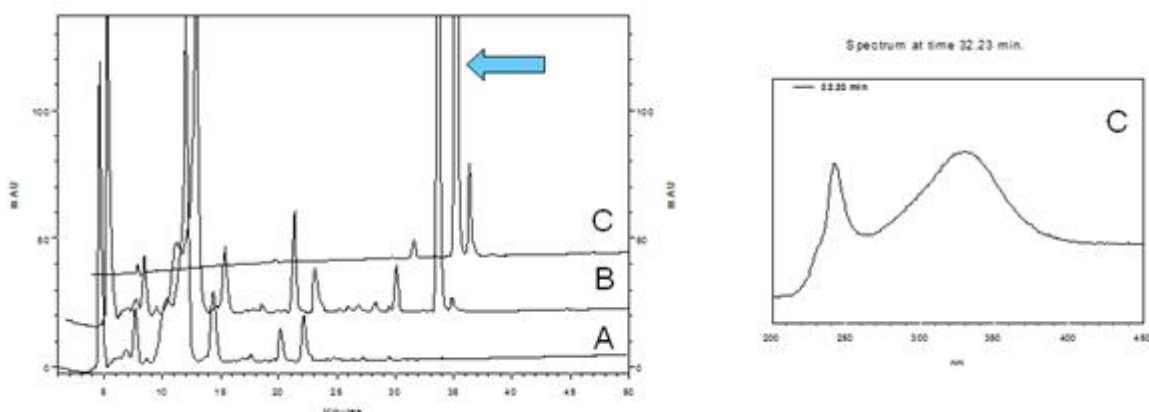


FIGURA 4.46 – Cromatogramas obtido das amostras: **(A)** meio + fungo, **(B)** meio + fungo + naringina polimetoxilada e **(C)** meio + naringina polimetoxilada (indicada pela seta) e seu respectivo espectro de UV.

Como ilustrado nos cromatogramas da FIGURA 4.46, o substrato polimetoxilado não sofreu nenhuma alteração química causada pelo micro-organismo.

Ao contrário do que se obteve para o substrato naringina (flavonóide glicosilado), o sistema enzimático do fungo não utilizou o substrato como fonte de carbono, permanecendo este inalterado na amostra contendo meio + fungo + naringina polimetoxilada (FIGURA 4.46 B).

Dessa forma, tem-se que com as amostras naturais, ou seja, glicosiladas, o fungo é capaz de degradar completamente as substâncias, no entanto, a partir das metilações obtidas, o sistema fúngico passa a não reconhecer mais o substrato.

Os motivos que provocam tal discrepância podem ser inúmeros, desde a falta de agitação durante os experimentos, a pouca solubilidade do substrato, a possível toxicidade do mesmo, enfim, as variáveis devem ser todas analisadas antes de uma afirmação mais concreta sobre as possíveis causas de nenhuma reação ter sido observada.

O fungo *Aspergillus flavus*, então como um legítimo patógeno se diferenciou do fungo *Penicillium griseoroseum* (sem patogenicidade aparente ou relatada), principalmente com relação a degradação dos flavonóides glicosilados. O *Penicillium griseoroseum* não foi capaz de degradar os flavonóides como o fungo *Aspergillus flavus*. Por sua vez o fungo *Penicillium griseoroseum* mostrou uma certa seletividade quando observado uma possível adição de 80 unidades de massas na hesperidina (item 4.1.3). Enquanto que o *Aspergillus flavus* não selecionou nenhum dos flavonóides, promovendo a degradação completa de todos os testados.

Já com relação aos substratos polimetoxilados, ambos os fungos apresentaram o mesmo comportamento, ou seja, nenhuma transformação foi obtida.

4.1.6 – Reação de Hidrólise dos flavonóides glicosilados

Anteriormente já se discutiram as características e a importância de se estudar os flavonóides. No entanto, estávamos mais direcionados ao estudo dos flavonóides glicosilados tais como, naringina, hesperidina e rutina e flavonóides polimetoxilados, já que se encontram poucos relatos de biotransformação destes na literatura.

Decidiu-se assim, ampliar a faixa dos flavonóides, ou seja, partiu-se para o uso de flavonóides mais simples, dentre eles as próprias agliconas dos flavonóides glicosilados já estudados.

Os flavonóides glicosilados (hesperidina e naringina) foram tratados com uma solução metanólica acidificada, por 24h sob refluxo à 80°C (item 3.3.2.6), para a remoção dos glicosídeos presentes na molécula (FIGURA 4.47).

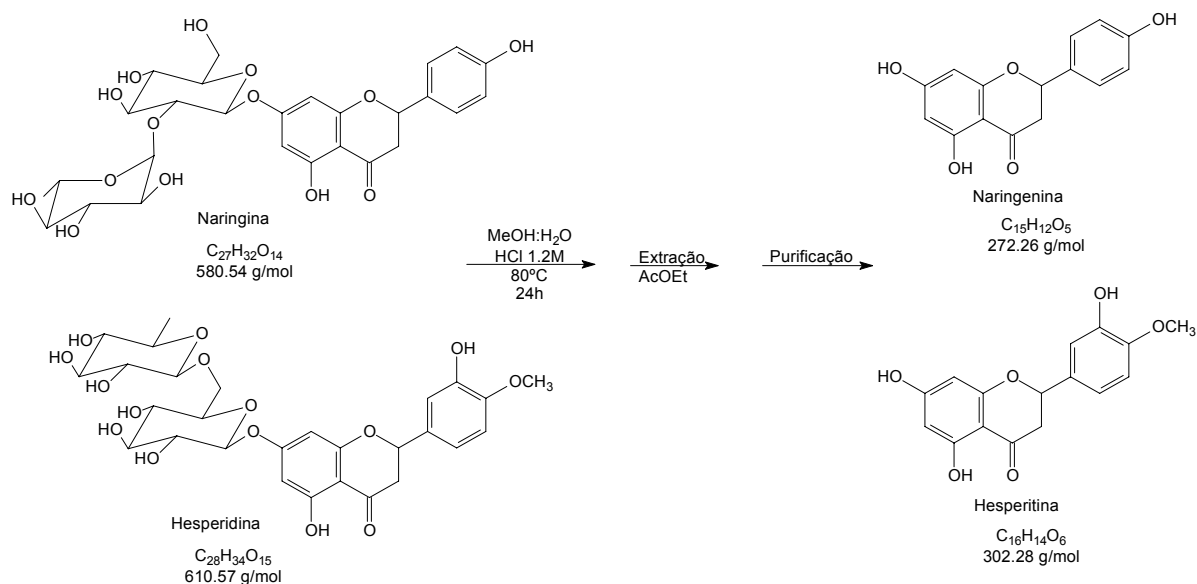


FIGURA 4.47 – Esquema geral para a obtenção das agliconas.

O extrato orgânico obtido para ambas as amostras foram purificados. O rendimento das reações foi de 83% para hesperetina e 30% para naringenina, a qual foi retirada com somente 20h de reação. As substâncias purificadas foram analisadas por CLAE/UV.

A reação forneceria as agliconas dos flavonóides, as quais são substâncias mais apolares do que os respectivos materiais de partida. Além dos diferenciados tempos de retenção, os flavonóides apresentam absorções no UV bem características.

Dessa forma, os flavonóides foram analisados e detectados por CLAE/UV (FIGURA 4.48), sendo o tempo de retenção para hesperetina 16.9 minutos e para a naringenina 16.5 minutos. As diferenças tanto no tempo de retenção quanto nos espectros de UV são mínimas, pois somente uma metoxila os diferem. A banda detectada em torno de 20.0 minutos trata-se do padrão interno adicionado as amostras, flavona, caso uma possível quantificação fosse realizada.

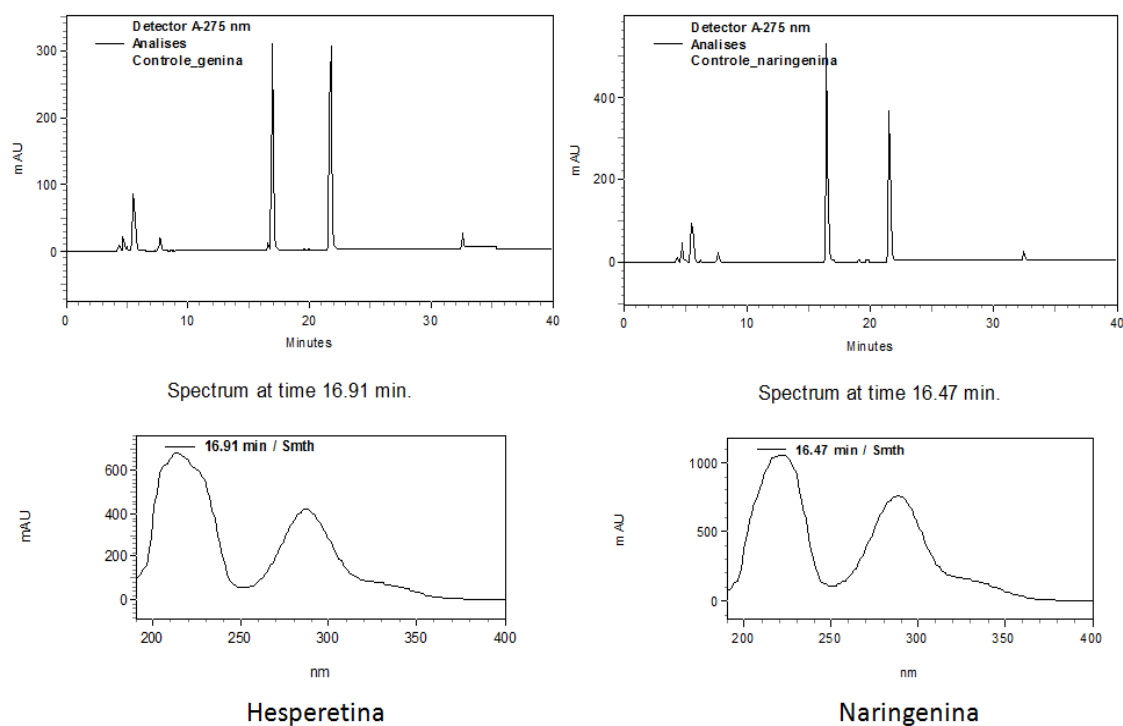


FIGURA 4.48 – Cromatogramas obtidos para os padrões naringenina e hesperetina e seus respectivos espectros de UV.

As agliconas obtidas foram confirmadas através de análises por CLAE/UV-EM. Os espectros de massas para cada uma das agliconas, analisadas no modo positivo comprovaram o sucesso da reação, já que se observou m/z 273 (referente a naringenina – 272Da) e m/z 303 (referente a hesperetina – 302Da) (FIGURAs 4.49 e 4.50).

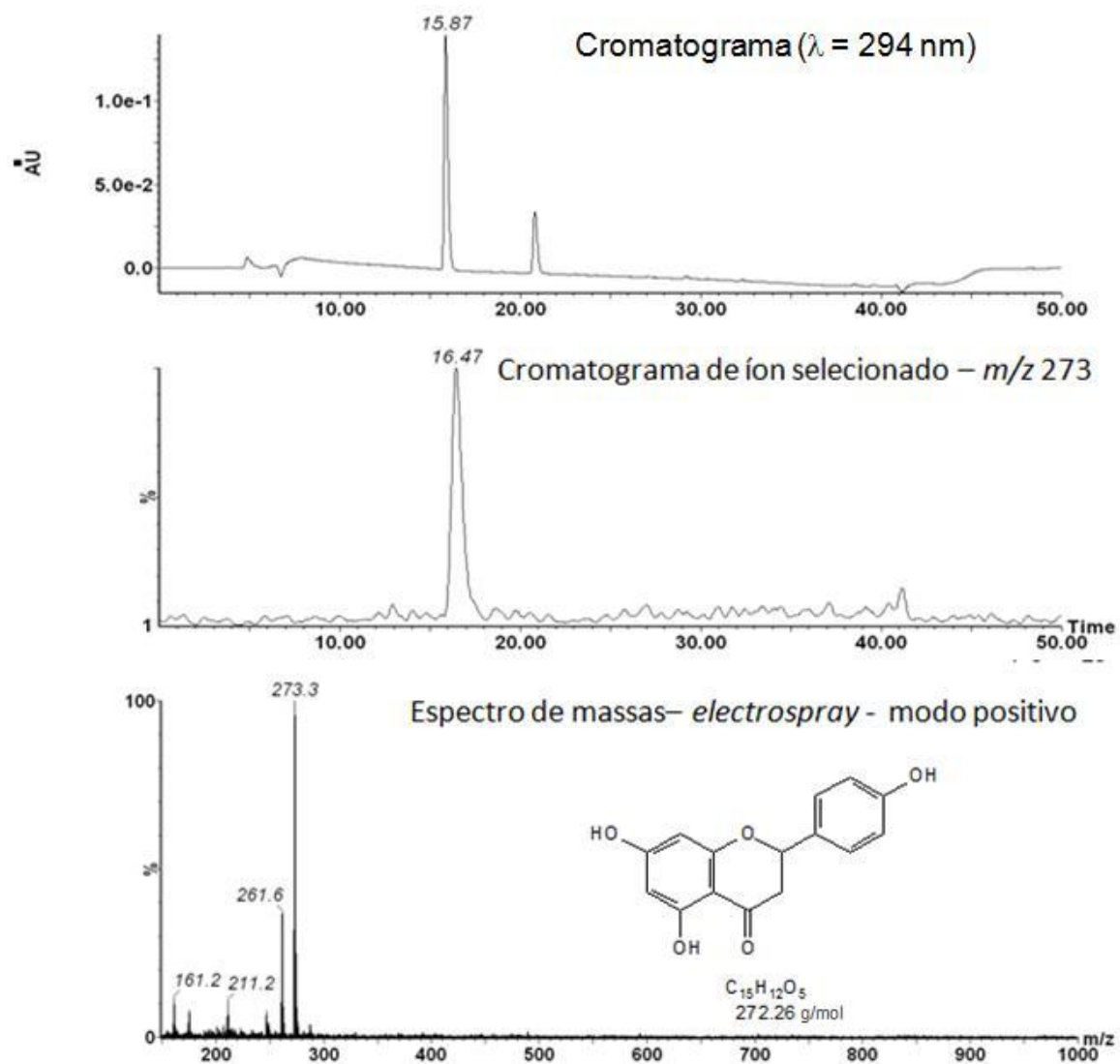


FIGURA 4.49 – Análises realizadas para naringenina.

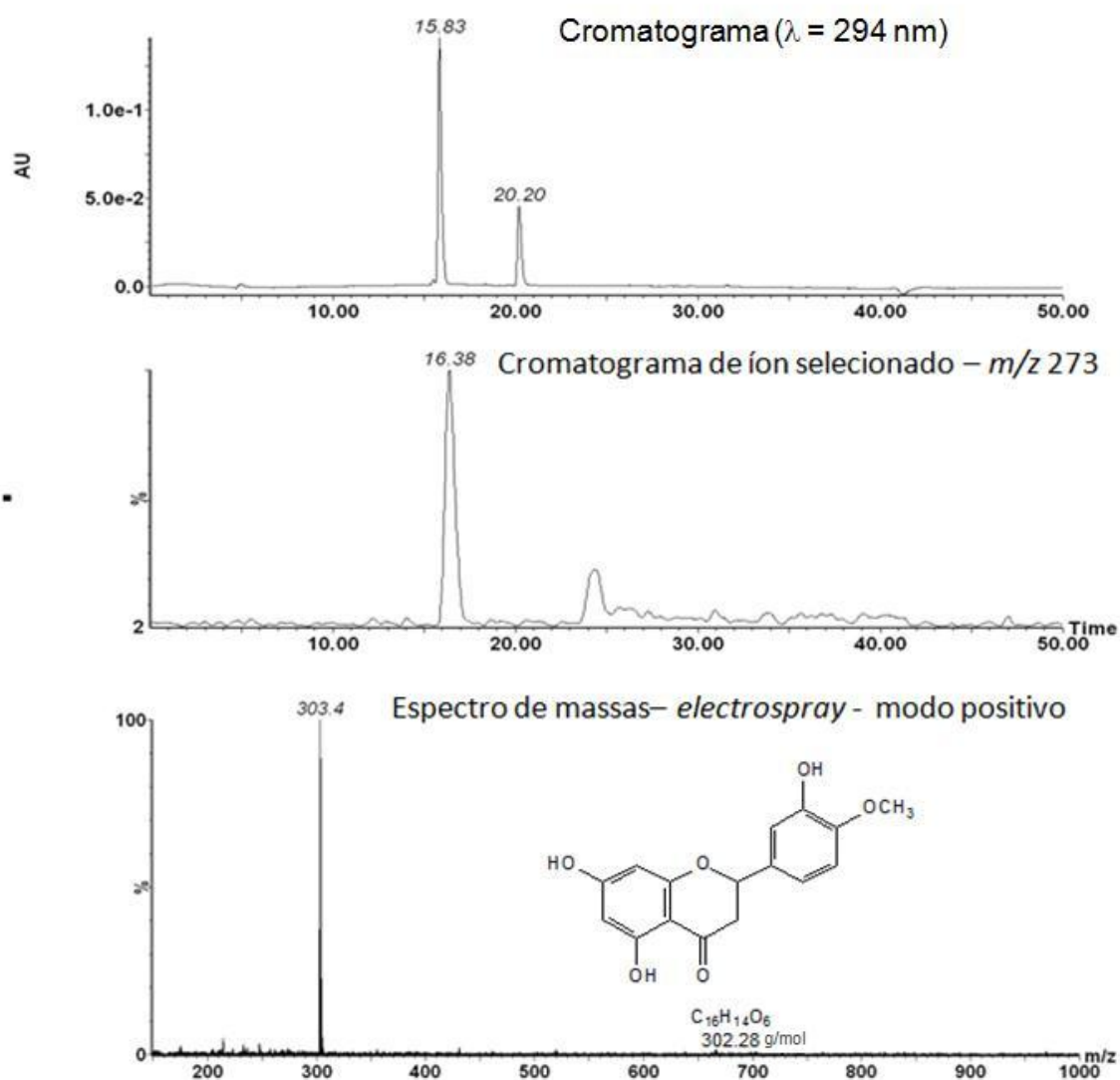


FIGURA 4.50 – Análises realizadas para hesperetina.

Dessa forma, os produtos obtidos foram utilizados para os experimentos de biotransformação, sendo os mesmos administrados ao micro-organismo *Penicillium griseoroseum*.

4.1.7 – Biotransformação da naringenina e hesperetina

De acordo com levantamentos bibliográficos realizados em bancos de dados como, *sciencefinder*, *scirus* e *elsevier*, encontram-se muitos trabalhos relacionados a biotransformação de flavonóides, porém com os flavonóides glicosilados como substratos são raros os trabalhos desenvolvidos. Já flavonóides mais simples, ou seja, sem unidades glicosídicas, muitos trabalhos já foram

descritos, destacando-se os esqueletos mais básicos com poucas oxigenações.

Assim, mantendo-se a originalidade do trabalho, passou-se a se investigar o potencial do fungo frente aos flavonóides, mas desta vez das agliconas dos flavonóides glicosilados (obtidos via reação de hidrólise – item 3.3.2.6). Os flavonóides naringenina e hesperitina se diferenciam daqueles já estudados, pela presença de diversas oxigenações em seus esqueletos. Outra característica destes flavonóides trata-se da pequena semelhança do flavonóide já biotransformado pelo fungo (5,7,3',4',5'-pentametoxiflavanona), podendo indicar assim uma certa vantagem para obtenção de produtos de biotransformação.

O experimento utilizou as condições normais de cultivo sob agitação constante, sendo os substratos adicionados após sete dias de cultivo (item 3.3.2.7).

Após 7 dias de cultivo os frascos contendo o experimento foram filtrados. Separou-se uma alíquota do filtrado e, em seguida, realizou-se a extração com acetato de etila. O micélio também foi extraído com metanol durante 24h. As alíquotas foram inicialmente analisadas por CLAE/UV.

As amostras contendo somente hesperetina e meio e naringenina e meio foram analisadas via CLAE/UV e CLAE/UV-EM (item 3.3.2.3.7.1) e apresentaram comportamento semelhante àqueles obtidos nas FIGURAS 4.47 e 4.48, indicando a estabilidade das substâncias no tempo de cultivo considerado.

As demais amostras foram analisadas por CLAE/UV-EM, as quais encontram-se ilustradas na FIGURA 4.51.

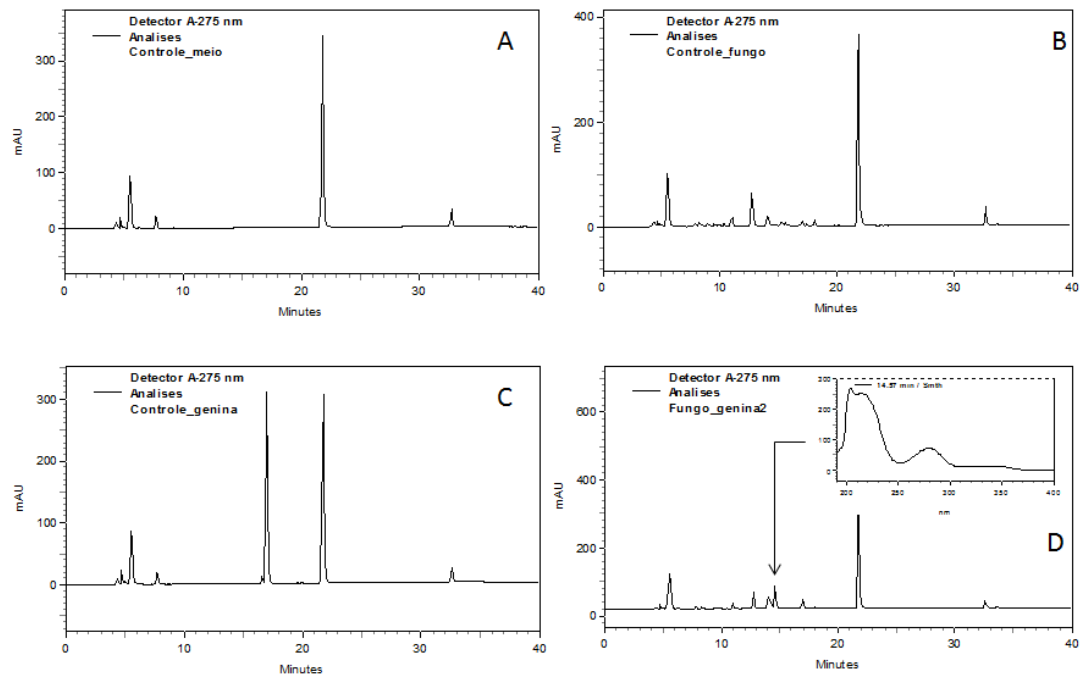


FIGURA 4.51 – Cromatogramas: **(A)** Somente meio, **(B)** Meio e fungo, **(C)** Meio e hesperetina e **(D)** Meio + fungo + hesperetina.

Diferentemente dos flavonóides glicosilados, observou-se o consumo da hesperetina (FIGURA 4.51 **D**), assim como o aparecimento de uma nova banda em 14.5 minutos, a qual possui o espectro de UV ilustrado na FIGURA 4.51.

Da mesma forma como obtido para a hesperetina, observou-se ainda a presença de naringenina na amostra contendo o fungo, como ilustra o cromatograma **D** (FIGURA 4.52), porém uma nova banda, também com tempo de retenção menor (14.0 minutos) foi detectada.

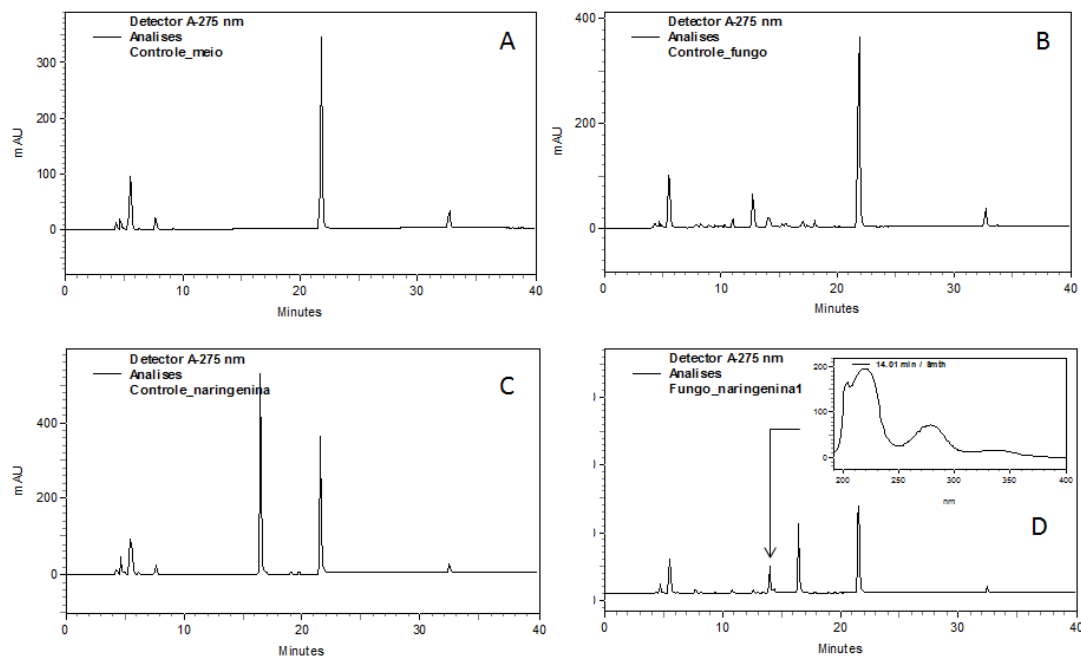


FIGURA 4.52 – Cromatogramas: **(A)** Somente meio, **(B)** meio e fungo, **(C)** meio e naringenina e **(D)** meio + fungo + naringenina.

O espectro de UV obtido para a banda em 14,0 minutos se mostrou bastante similar ao espectro de UV da própria naringenina (FIGURA 4.48).

Frente aos resultados obtidos, partiu-se para as análises por CLAE/UV-EM, na tentativa de identificação dos possíveis produtos biotransformados.

As amostras da hesperetina se mostraram bastante promissoras quanto a possíveis produtos de biotransformação, uma vez que quando selecionado tanto o comprimento de onda 294nm quanto o íon m/z 303 (correspondente a hesperetina), outras bandas foram detectadas (FIGURA 4.53).

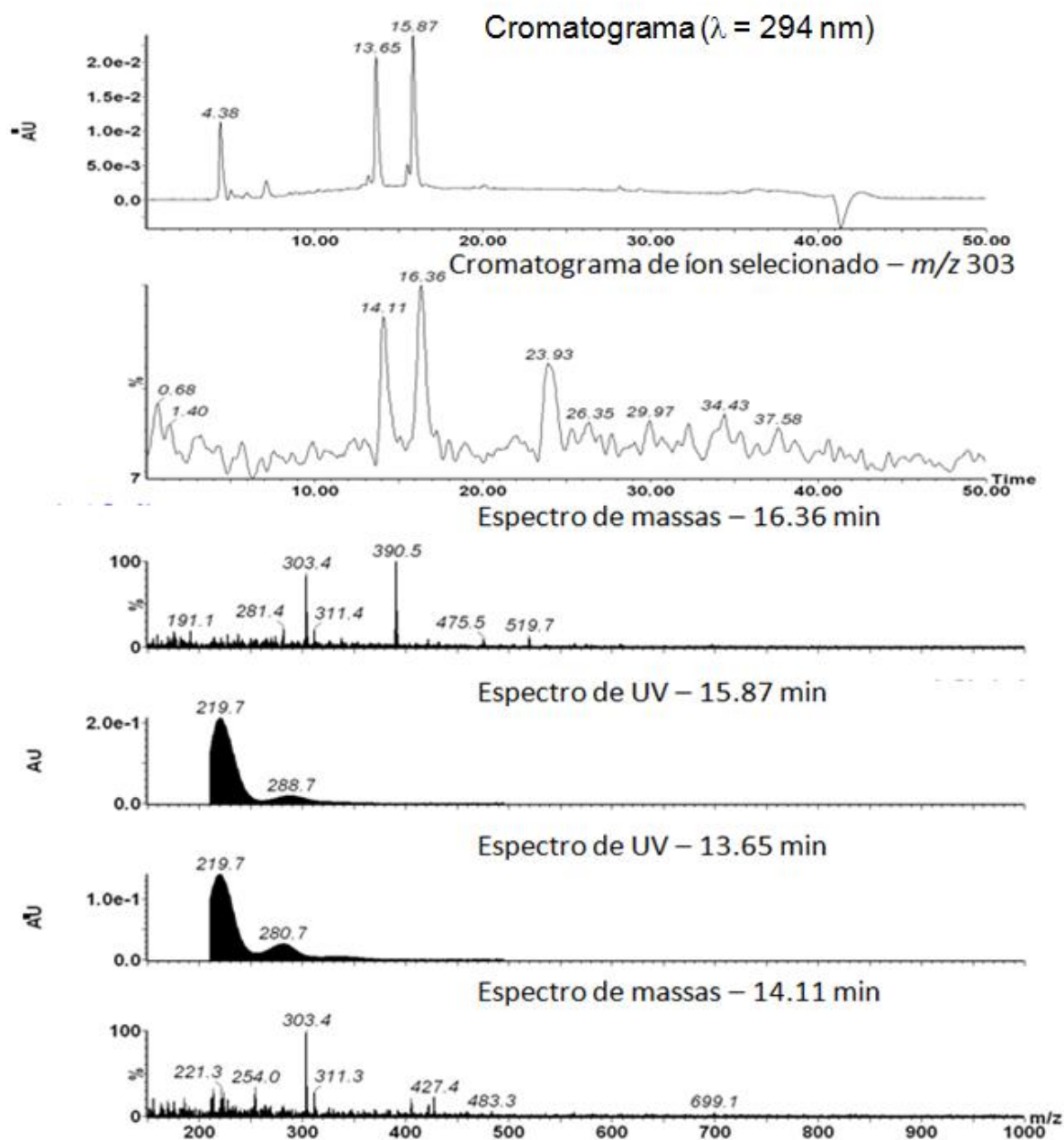


FIGURA 4.53 – Análises por CLAE/UV-EM para a amostra contendo hesperetina como substrato.

A presença intensa das bandas em 13.65 e 15.87 minutos no cromatograma quando selecionado 294 nm e das bandas em 14,11 e 16,36 minutos no cromatograma de íon selecionado (m/z 303), confirmou que o substrato hesperetina não havia sido completamente consumido (FIGURA 4.53). Contudo, duas bandas no cromatograma de íon selecionado despertaram o interesse, pois outra substância com a mesma massa molecular havia sido detectada, porém com tempo de retenção diferenciado. Analisando-se ainda os respectivos espectros de

UV (FIGURA 4.53), observou-se a grande semelhança existente entre a hesperetina e o possível produto de biotransformação.

Para confirmar se trata-se de alguma modificação estrutural no esqueleto básico da hesperetina, realizaram-se experimentos de íons fragmentos de m/z 303, pois se possuem o padrão de fragmentação, as chances da hesperetina ter sofrido alguma transformação eram grandes (FIGURA 4.54).

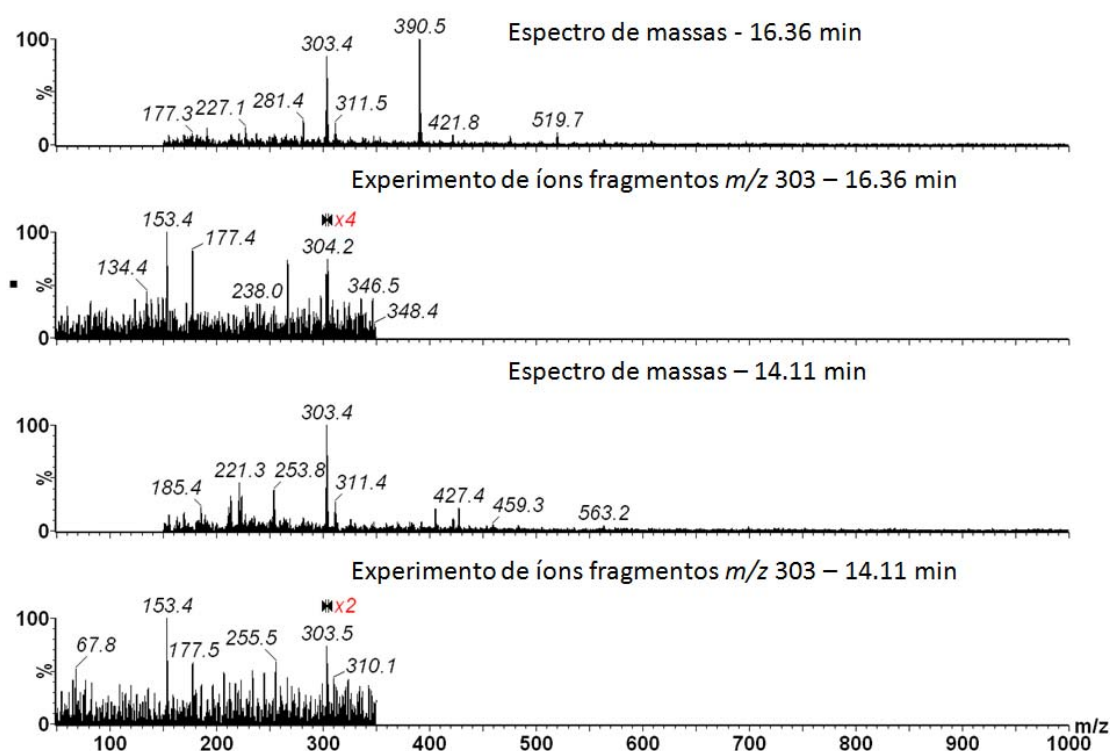


FIGURA 4.54 – Experimento de íons fragmentos para m/z 303.

Os espectros de massas (FIGURA 4.54) indicaram claramente que as substâncias presentes em 14.11 e 16.36 minutos possuem o mesmo esqueleto químico, ou seja, o esqueleto da hesperetina, uma vez que o padrão de fragmentação apresentado é altamente semelhante. Os picos com m/z 153 e 177 além de serem os mais intensos, se repetem em ambas as bandas.

Esse resultado sugeriu, a princípio, que algum grupo poderia ter sido adicionado à molécula da hesperetina. Para certificar-se de tal fato, realizaram-se experimentos de íons precursores de m/z 303, onde se detectariam íons que fossem capazes de gerar o fragmento m/z 303.

Contudo, os espectros de massas obtidos para tal experimento apresentaram-se com baixa resolução, sem nenhum pico realmente notável. Tal acontecimento pode ser facilmente explicado, pelo fato das condições de análises estarem voltadas para a detecção dos flavonóides, podendo assim o íon precursor ser pobremente ionizado. Ou então, nenhum grupo foi adicionado ao flavonóide hesperetina, sendo o íon detectado corresponde a massa da substância.

A simples abertura do anel C para a formação da chalcona já provocaria alteração no tempo de retenção da substância, além da alteração no espectro de UV. Porém, os dados ainda são somente suposições.

Dessa maneira, seguiu-se o mesmo raciocínio para o desenvolvimento das análises para as amostras contendo naringenina. Proseguiu-se as análises para a possível identificação da nova banda detectada (FIGURA 4.55). Os cromatogramas por detecção de UV e por íon m/z 273 selecionado, assim como, os espectros de massas e espectros de íons fragmentos para m/z 273 encontram-se ilustrados na FIGURA 4.55.

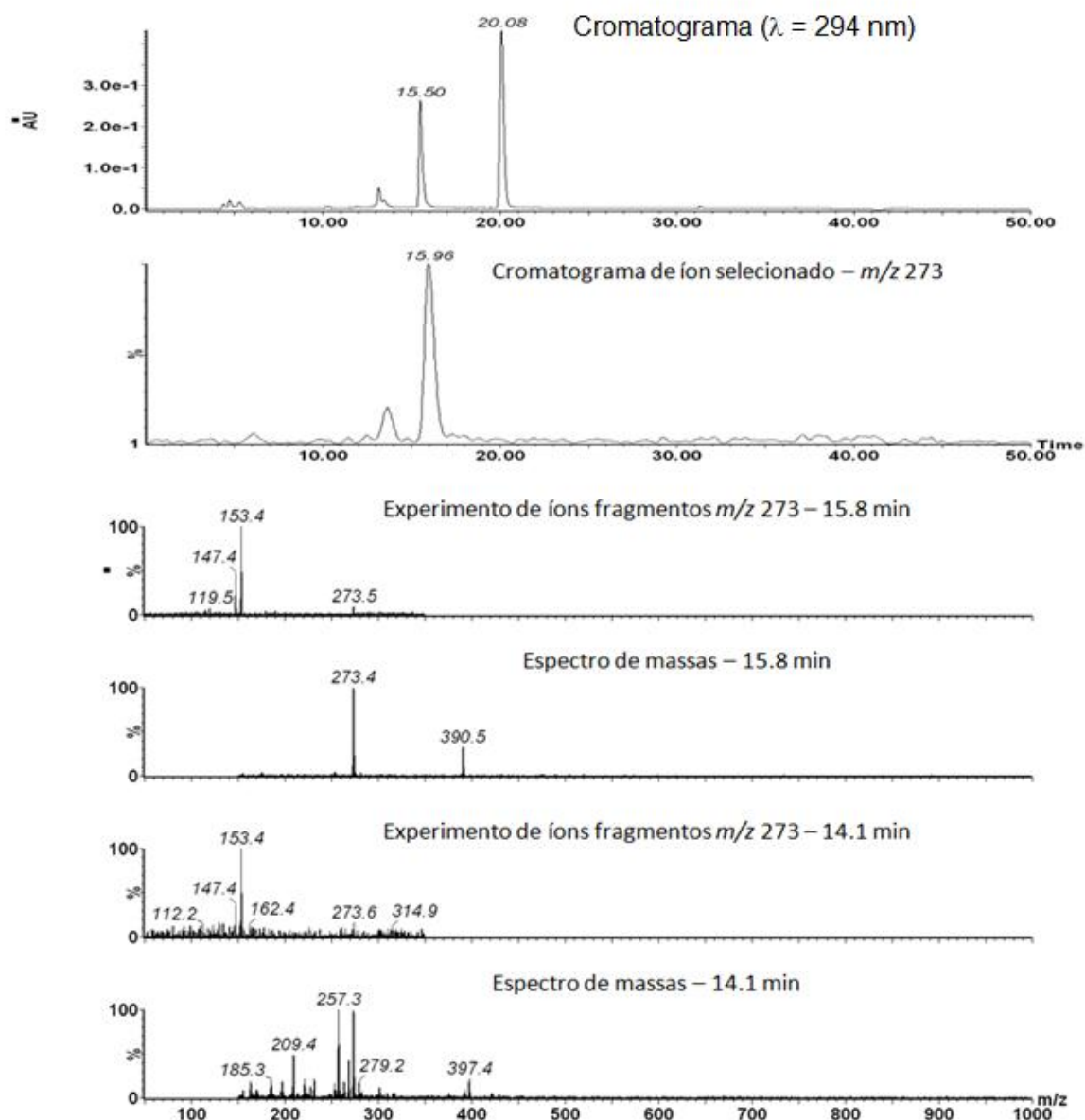


FIGURA 4.55 – Experimentos realizados com a amostra contendo meio + fungo + naringenina.

Assim, observou-se a presença de $m/z 273$ em dois tempos de retenção diferenciados, como já observado para a hesperetina. Realizaram-se os experimentos de íons fragmentos de $m/z 273$ para verificar as semelhanças existentes entre as substâncias, as quais foram identificadas, principalmente por $m/z 153$, pico base dos espectros de íons fragmentos para $m/z 273$ (FIGURA 4.55).

O forte indicativo da presença de uma alteração química sobre a molécula da naringenina, promoveu a realização dos experimentos de íons precursores, já que a nova banda com tempo de retenção em 14,1 minutos apresentou o mesmo padrão de fragmentação da naringenina. Porém, não se

obteve nenhum resultado a partir do espectro de íons precursores. Provavelmente devido as mesmas razões discutidas com o experimento da hesperetina.

Com os flavonóides naringenina e hesperetina ficou mais claro o reconhecimento enzimático por estas substâncias. Os dados por CLAE/UV-EM apresentados, indicou claramente a presença de pelo menos um produto de biotransformação. Aparentemente, ambos os flavonóides sofreram o mesmo tipo de reação, já que os produtos apresentaram as mesmas características (mais polares e com espectros de UV bastante similares aos dos respectivos substratos).

A inexistência de íons precursores e o deslocamento das bandas no espectro de ultravioleta (bandas em torno de 300 nm), indicaram a formação da chalcona para ambos os flavonóides utilizados. A abertura do anel C dos flavonóides permitem a maior deslocalização dos elétrons, o que favorece as maiores absorções obtidas (FIGURA 4.56).

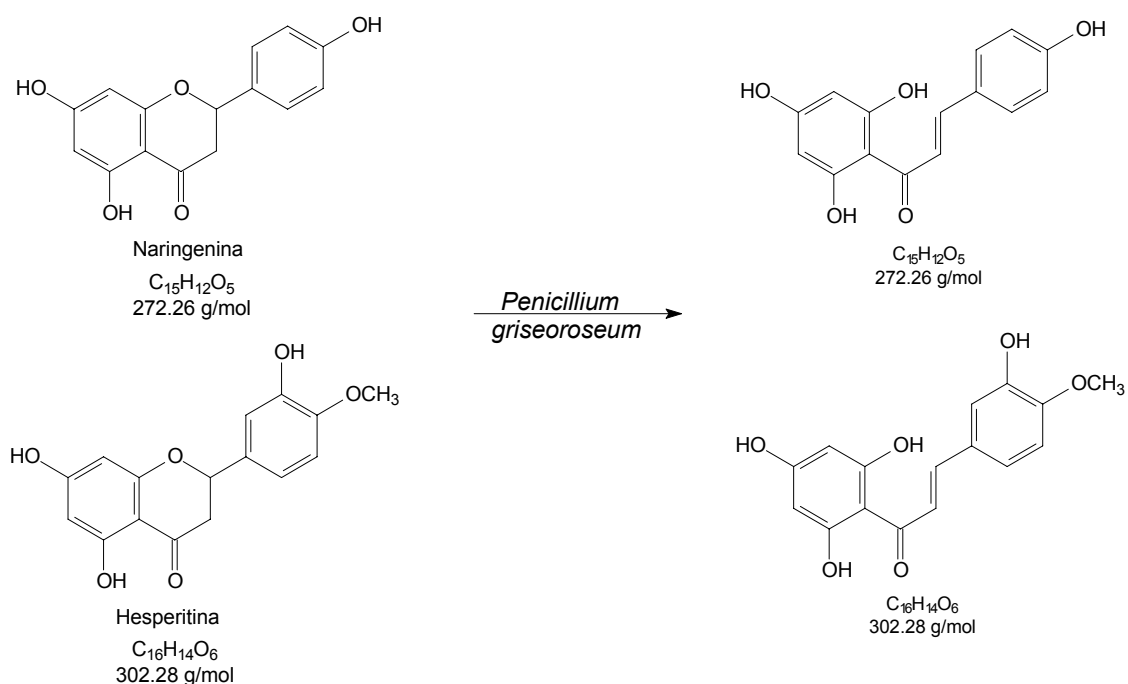


FIGURA 4.56 – Biotransformação das agliconas naringenina e hesperetina.

4.1.8 – Reação de Metilação da 2',4',6'-trihidróxiacetofenona

Na busca de novos substratos para as reações de biotransformação, partiu-se para a metilação de um dos precursores dos flavonóides, pois na maioria das transformações microbiais envolvendo estas substâncias raramente observa-se

a presença de grupos metoxilados, sendo mais comum a presença de hidroxilas livres¹⁰⁶. Para a obtenção de um precursor metoxilado utilizou-se a 2',4',6'-trihidróxiacetofenona (FIGURA 4.57), que foi mantida à 45°C com K₂CO₃ e (CH₃)₂SO₄ durante 14 horas (item 3.3.2.8). Interrompeu-se a reação através do monitoramento por CCDA e realizou-se sua extração. A purificação do produto ocorreu através de uma CC (h = 15cm e φ = 1,5cm) com eluição isocrática de hexano:acetato de etila (8:2). O produto obtido foi caracterizado através da análise por RMN¹H, como ilustra a FIGURA 4.58.

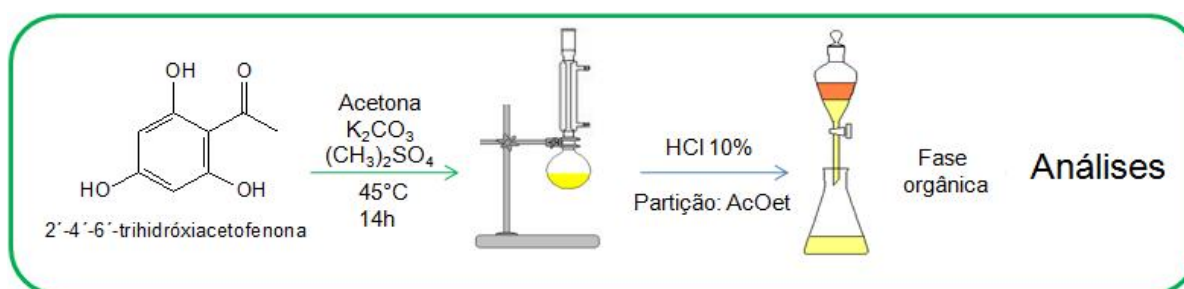


FIGURA 4.57 – Reação de metilação da 2',4',6'-trihidróxiacetofenona.

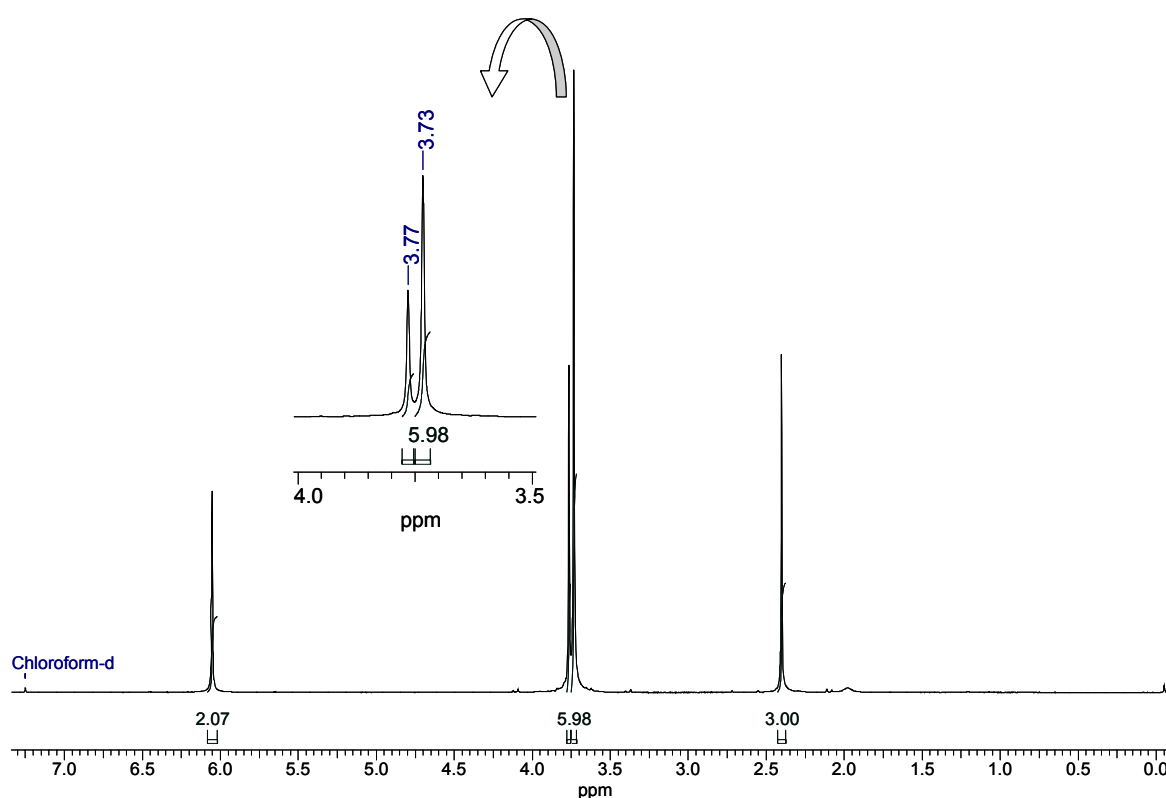


FIGURA 4.58 – Espectro de hidrogênio da 2',4',6'-trimetóxiacetofenona (200MHz – CDCl₃).

Através do espectro obtido, pode-se observar a presença de apenas um sinal em δ 6,05 integrando para dois hidrogênios, referente aos hidrogênios do anel aromático. O mesmo deslocamento químico observado para esses hidrogênios deve-se a semelhança existente nas suas vizinhanças, tornando-os equivalentes quimicamente. Já os sinais obtidos em δ 3,77 e 3,73 (região ampliada do espectro) referem-se as metoxilas. No entanto, três metoxilas eram esperadas, mas somente dois sinais foram observados, este fato deve-se também a equivalência química de duas das metoxilas, as quais apresentam o mesmo deslocamento químico em δ 3,73, comprovado ainda pela integração do sinal, referente a presença de seis hidrogênios. E por fim um sinal em δ 2,40 referente a metila, com integração para três hidrogênios. A estrutura, finalmente, comprovada encontra-se ilustrada abaixo (FIGURA 4.59).

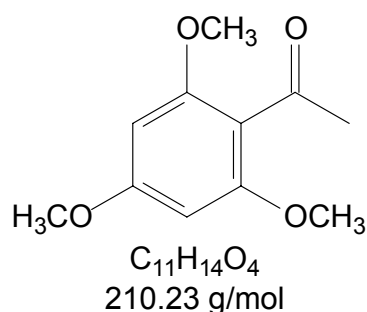


FIGURA 4.59 – Estrutura química do produto 2',4',6'-trimetóxiacetofenona metilado.

Dessa forma, a reação foi comprovada com sucesso sendo obtidos 76,6 mg do produto purificado.

4.1.9 – Biotransformação da 2',4',6'-trimetoxiacetofenona

Analisando-se os dados obtidos com os flavonóides e o fungo *Penicillium griseoroseum* podemos afirmar a grande afinidade que o mesmo apresenta frente à substratos contendo em especial o grupo aromático funcionalizado. Supondo-se que o sistema enzimático do fungo fosse capaz de reconhecer os flavonóides através da presença de tais grupos, seria bastante favorável a utilização de um composto aromático substituído para uma reação de biotransformação.

Um primeiro teste foi a utilização de um composto aromático substituído, principalmente com grupos funcionais metoxilados, no caso, utilizou-se a 2',4',6'-trimetoxiacetofenona, obtida através de reação de metilação da 2',4',6'-trihidroxiacetofenona (item 4.1.8).

Cultivou-se o fungo durante sete dias em ambiente estático, transferiu-se o micélio para o meio líquido mais pobre já acrescido do substrato. Sob agitação o experimento foi mantido por doze dias, sendo o conteúdo dos frascos filtrado (item 3.3.2.9).

As alíquotas foram diretamente analisadas por CLAE/UV-EM (item 3.3.2.9.1). As amostras obtidas do extrato orgânico foram inicialmente analisadas por CCDA, na qual observou-se claramente a presença de um produto de biotransformação. O produto foi identificado na CCDA pelas mesmas características apresentadas pelo substrato padrão, porém com um tempo de retenção menor, ou seja, mais polar (FIGURA 4.60).

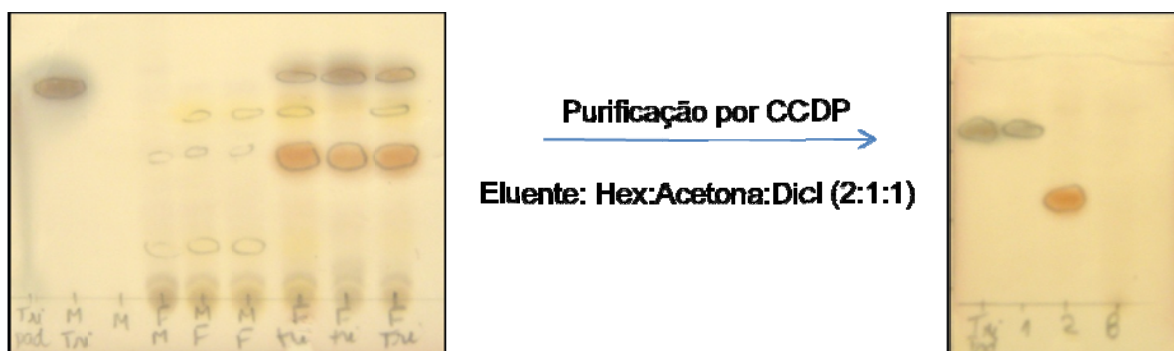


FIGURA 4.60 – CCDA das amostras do extrato orgânico do experimento contendo 2',4',6'-trimetoxiacetofenona e produto de biotransformação purificado através de CCDP.

Como o experimento foi realizado em triplicata, uma das amostras foi submetida à CCDP e posteriormente submetida à análises por CLAE/UV-EM.

O cromatograma obtido para a banda de coloração alaranjada (FIGURA 4.60) apresentou duas bandas quando analisada por CLAE/UV-EM (FIGURA 4.61), com diferentes espectros de UV.

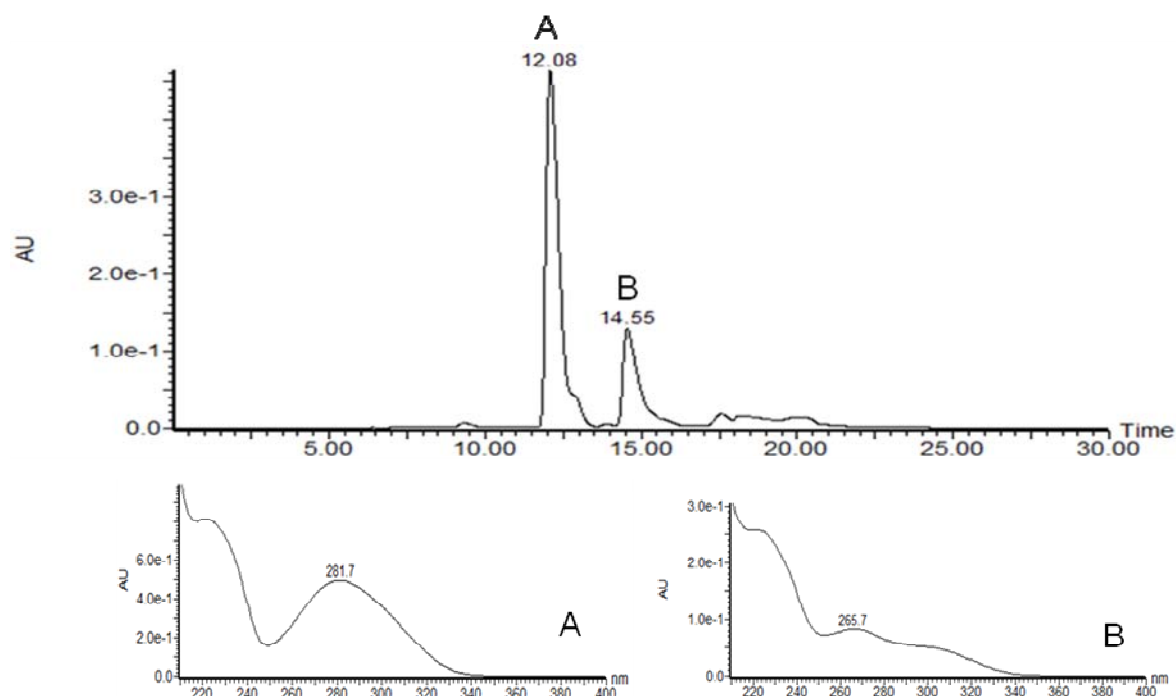


FIGURA 4.61 – Cromatograma referente ao produto de biotransformação isolado via CCPD e seus respectivos espectros de UV.

A partir do CIT obteve-se os espectros de massas de cada uma das bandas observadas. A primeira banda com tempo de retenção em 12,08 minutos apresentou como íon *quasi* molecular de m/z 197 (FIGURA 4.62)

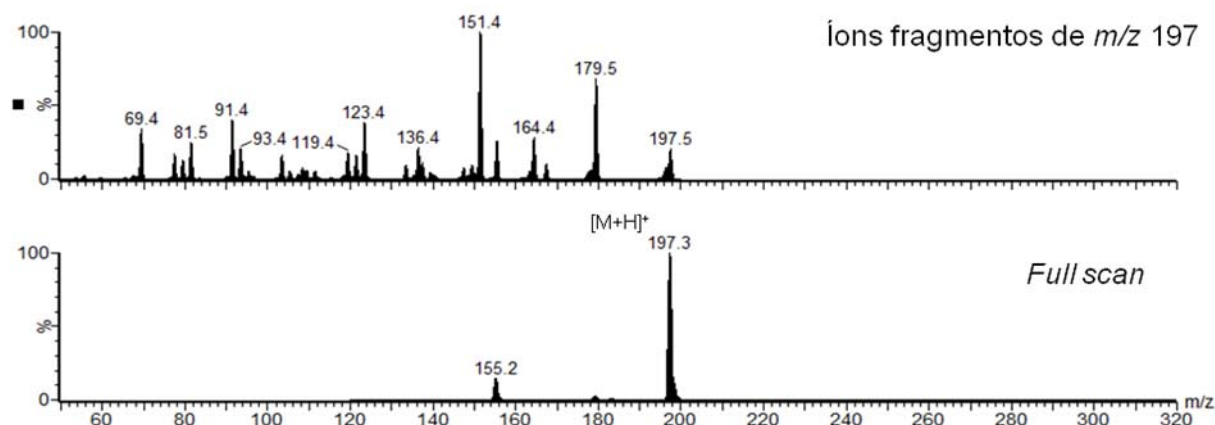


FIGURA 4.62 – Espectros de massas da banda em 12,08 minutos e espectro de íons fragmentos de m/z 197.

O substrato utilizado 2',4',6'-trimetoxiacetofenona possui massa 210 Da, no entanto a possível massa observada foi 196 Da, sendo a diferença 14 Da. A redução de 14 Da indicou a desmetilação de uma posição das metoxilas do

substrato. Assim, o produto majoritário da biotransformação foi a dimetoxiacetofenona.

Já a banda observada em 14,55 minutos gerou o espectro de massas da FIGURA 4.63.

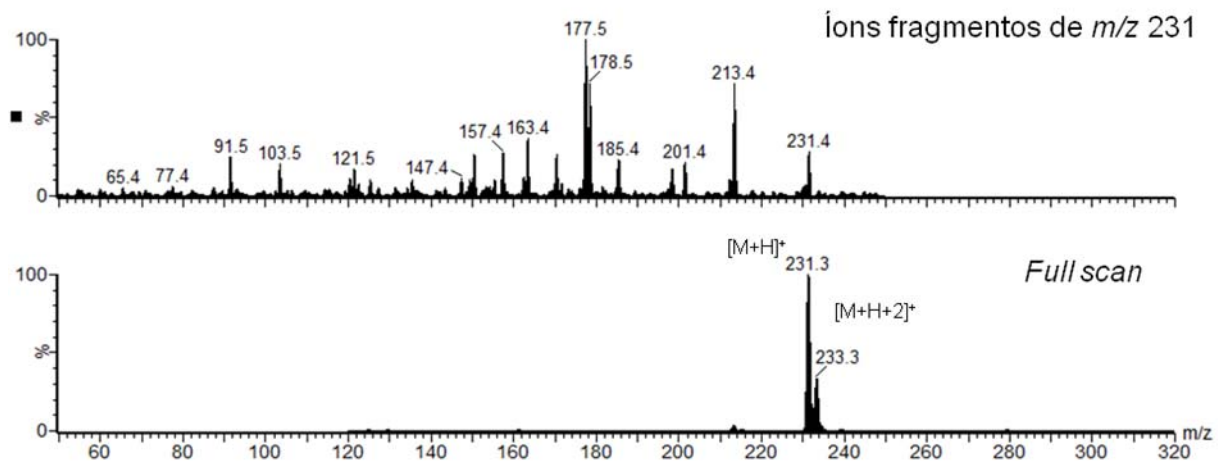


FIGURA 4.63 – Espectros de massas da banda em 14,55 minutos e espectro de íons produtos de m/z 231.

O íon *quasi* molecular de m/z 231 indicou a possível massa do produto biotransformado ser 230 Da. A diferença de 20 Da para o substrato utilizado não corresponde a nenhum fragmento comumente adicionado ou perdido. Porém quando comparado com a massa do produto dimetoxiacetofenona (196 Da) tem-se em torno de 34 Da a diferença.

A diferença de 34 Da poderia ser atribuída à adição de cloro na substância. Contudo, o isótopo do cloro 37,5 Da deveria ser facilmente observado como $[M+H+2]^+$, o que de fato foi obtido com m/z 233 com aproximadamente 30% da intensidade do íon $[M+H]^+$ (FIGURA 4.63). Outra forma de verificar a presença de isótopos trata-se da simulação do espectro de massas através do software MassLynx 4.1. Bastou adicionar a fórmula molecular do composto e o programa gerou o espectro de massas com a contribuição isotópica dos elementos, como ilustrado na FIGURA 4.64.

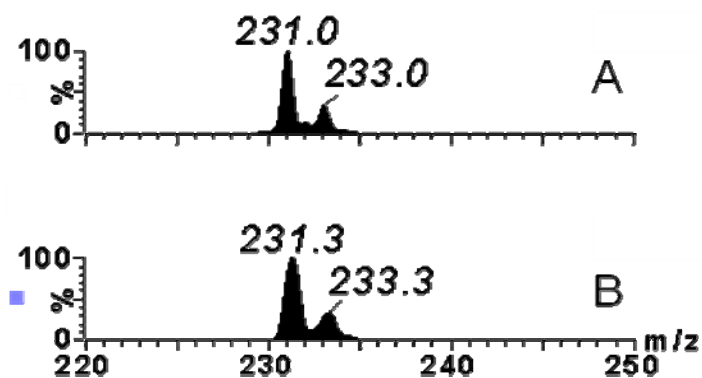


FIGURA 4.64 – (A) Espectro de massas simulado e (B) espectro de massas real da amostra biotransformada.

O espectro simulado foi praticamente idêntico ao espectro obtido para a amostra, confirmando a presença do cloro no produto biotransformado.

Para a certificação dos produtos de biotransformação obtidos, foi realizado ainda análises de RMN¹H (FIGURA 4.65).

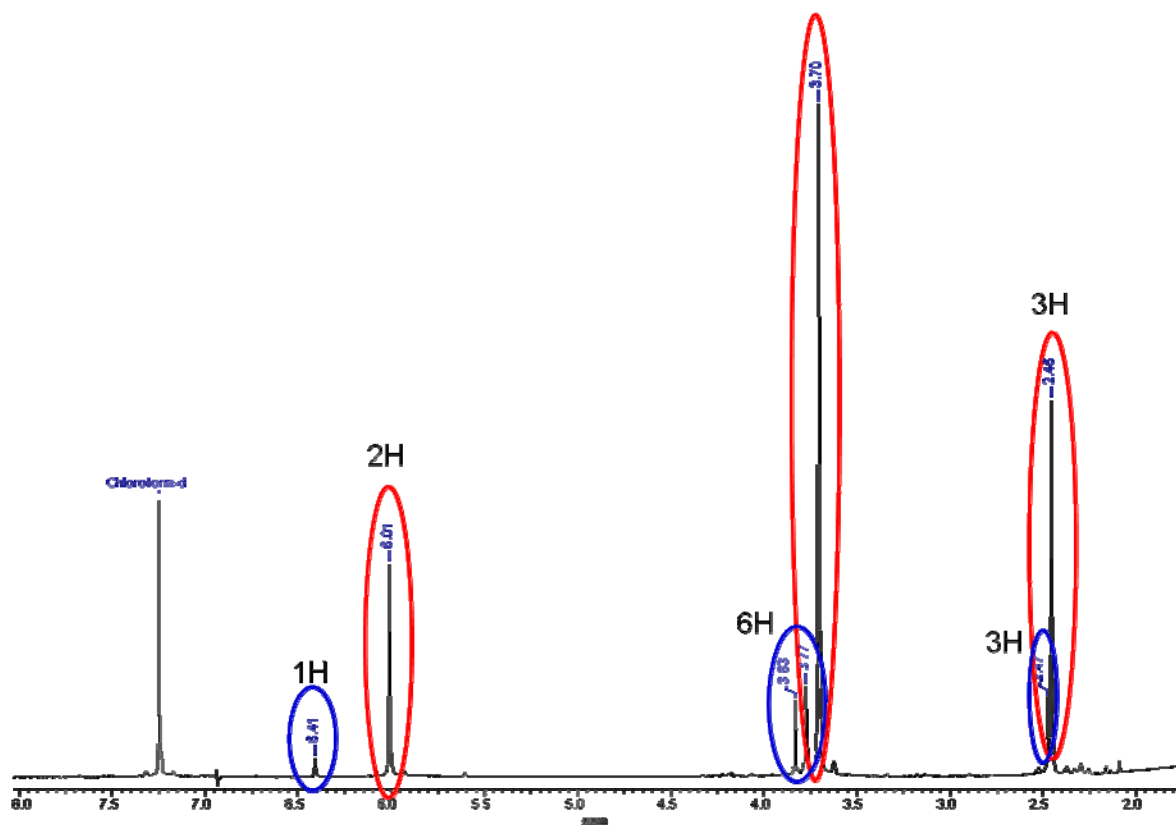


FIGURA 4.65 – Espectro de hidrogênio da amostra biotransformada (200MHz – CDCl₃).

Como o esperado a amostra encontrava-se em mistura. No entanto, as proporções dos produtos são bem diferenciadas. Os sinais assinalados em azul

escuro, referem-se ao composto dimetoxiacetofenona, sendo dois hidrogênios aromáticos observados em δ 6,01; seis hidrogênios metoxilados em δ 3,70, referente as duas metoxilas quimicamente equivalentes e três hidrogênios em δ 2,45, referentes a metila. Os deslocamentos obtidos comprovaram um dos produtos como sendo a 2',6'-dimetoxiacetofenona (196 Da) (FIGURA 4.66).

Os sinais observados com menor intensidade apresentaram a substituição no anel aromático, pois somente um hidrogênio foi obtido em δ 6,41; as metoxilas também apresentaram uma modificação, já que não são mais equivalentes quimicamente e sofreram uma diferenciação ocasionada pela substituição no anel aromático. Em δ 2,47 manteve-se a metila. Dessa forma, com a ausência de qualquer outro sinal de hidrogênio, a substituição do anel pode ser comprovada como sendo oriunda de cloração (FIGURA 4.66).

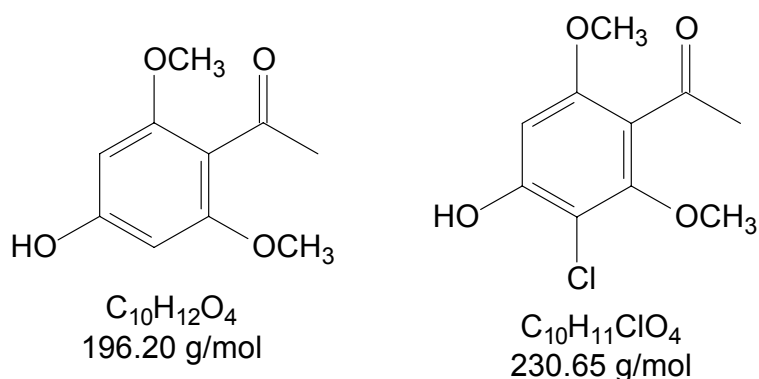


FIGURA 4.66 – Produtos biotransformados: 4'-hidroxi-2',6'-dimetoxiacetofenona e 3'-cloro-4'-hidroxi-2',6'-dimetoxiacetofenona.

Assim, o micro-organismo apresentou a capacidade de desmetilar a 2',4',6'-trimetoxiacetofenona além de ser capaz de realizar halogenação, no caso, a cloração do produto biotransformado gerado.

Normalmente, os micro-organismos realizam a desalogenação das substâncias na tentativa de diminuir a toxicidade das mesmas. Na literatura há relatos de halogenação por micro-organismos marinhos, porém por micro-organismos terrestres e ainda endofíticos é até o momento desconhecida.

O composto clorado obtido, apesar da simplicidade estrutural também é inédito na literatura, como produto de biotransformação.

Portanto, de fato o fungo *Penicillium griseoroseum* confirmou sua habilidade em desmetilar substâncias, fortificando a presença de citocromo P450.

Ainda a substância aromática utilizada foi capaz de ativar outra habilidade do micro-organismo, até então desconhecida, a capacidade de realizar halogenação nas substâncias.

4.1.10 – Substância isolada do metabolismo do fungo *Penicillium griseoroseum*

Paralelamente aos estudos de biotransformação, foi realizado o estudo do metabolismo secundário do fungo *Penicillium griseoroseum*. Inúmeras colunas cromatográficas foram realizadas, como descrito no item 3.3.2.10. E dentre as substâncias isoladas, somente uma delas foi obtida em quantidade suficiente para as análises. Com a substância purificada, realizaram-se primeiramente análises por RMN¹H (FIGURA 4.67).

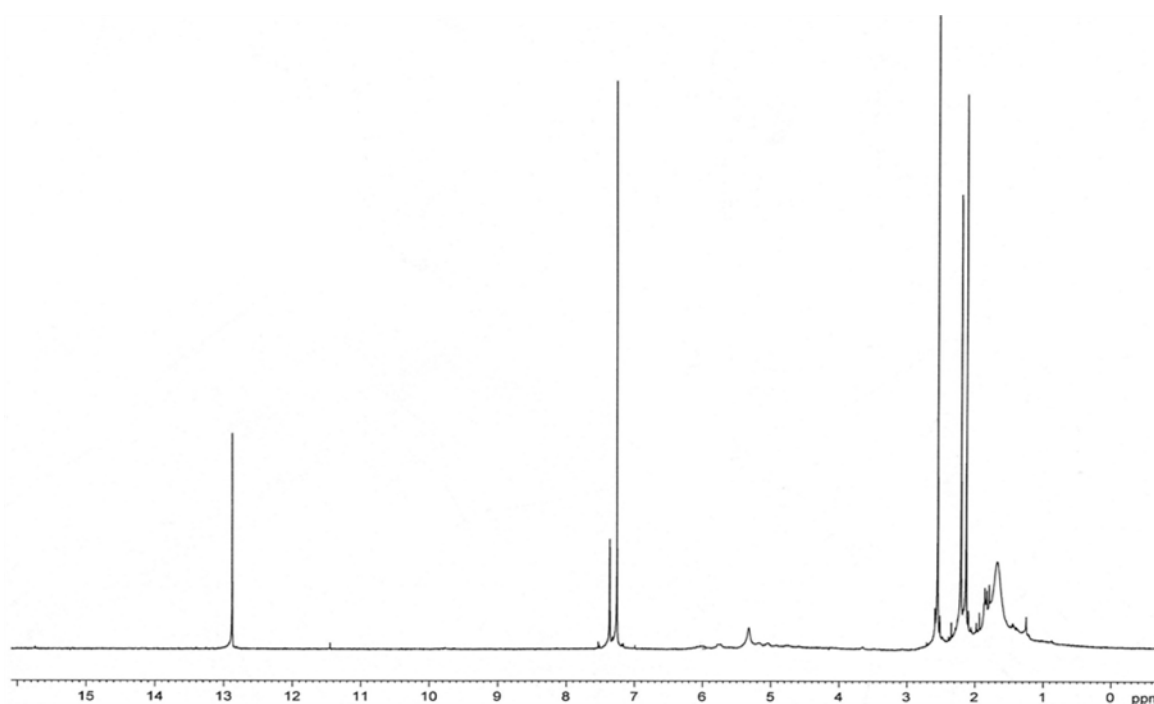


FIGURA 4.67 – Espectro de hidrogênio da amostra isolada. (200MHz – CDCl₃).

O sinais obtidos em δ 2,1 e 2,2 indicam a presença de possíveis metilas; em torno de δ 2,6 envolve o deslocamento de metila vizinha ao carbono carbonílico; em δ 7,3 um sinal de hidrogênio aromático e por fim a presença de uma hidroxila, possivelmente quelada com uma carbonila, com sinal em δ 12,9. Assim, a

estrutura proposta somente com os dados de hidrogênio encontra-se ilustrada na FIGURA 4.68.

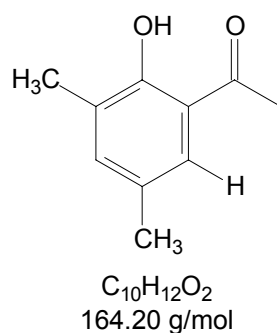


FIGURA 4.68 – Estrutura proposta com os dados do espectro de hidrogênio.

Em seguida, foram realizadas análises por CLAE/UV-EM. Porém a banda cromatográfica detectada gerou um espectro de massas com m/z 179 como íon *quasi* molecular (FIGURA 4.69).

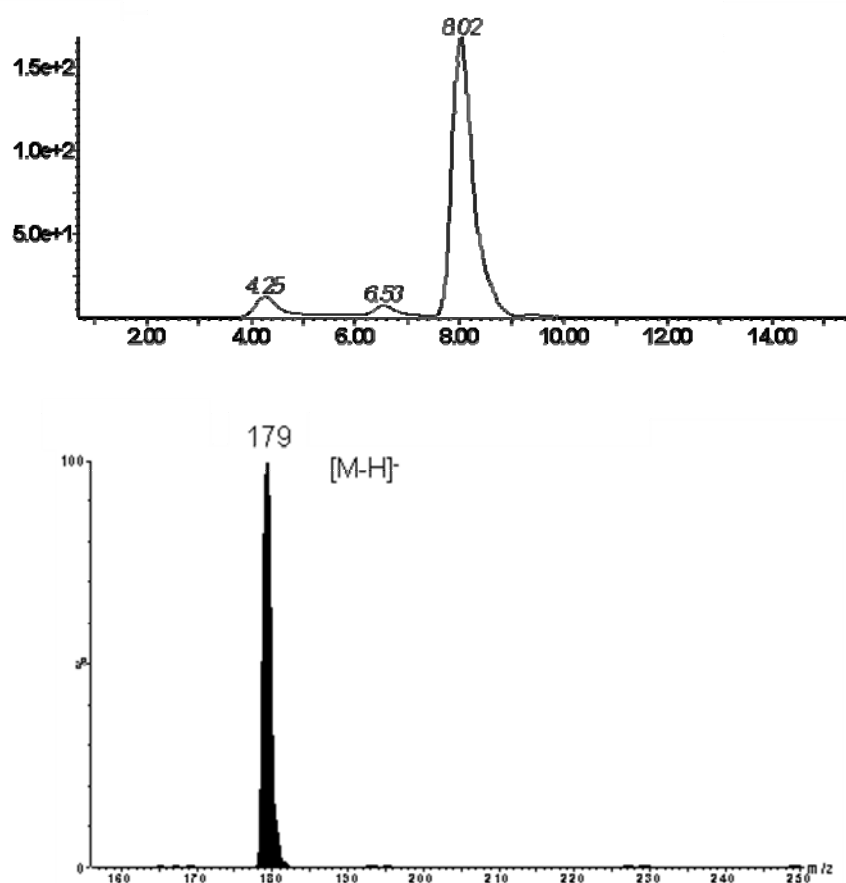


FIGURA 4.69 – Cromatograma da amostra isolada e seu respectivo espectro de massas.

A massa obtida para a amostra (180 Da) não corresponde a estrutura proposta inicialmente (164 Da). A diferença de 16 Da indicou a presença de uma hidroxila no anel aromático. A substituição de uma hidroxila no anel aromático confirmou o único hidrogênio observado no espectro de hidrogênio. Dessa forma, o produto isolado trata-se do 2',4'-dihidroxi-3',5'-metil-acetofenona (180 Da) (FIGURA 4.70).

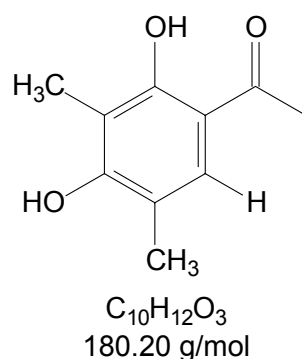


FIGURA 4.70 – Estrutura proposta para o produto do metabolismo secundário do fungo.

A estrutura produzida pelo fungo, apesar de ser considerada simples para um metabólito secundário, foi de extrema importância, uma vez que a capacidade de produzir compostos aromáticos tais como o isolado, confirmou a habilidade do fungo de introduzir um grupo aromático no flavonóide polimetoxilado inicialmente testado (FIGURA 4.12). A grande semelhança entre os grupos aromáticos indicou que o fungo é produtor de grupos aromáticos como o isolado, além de promover a formação de ligação C-C.

4.2 – Experimentos de biotransformação utilizando *Penicillium brasilianum*

4.2.1 - Reação de Oxidação da 1-indanona

A reação de oxidação *in vitro* da 1-indanona tornou-se necessária para servir de padrão de um possível produto de biotransformação realizado pelo fungo *Penicillium brasilianum*.

O procedimento adotado para tal oxidação encontra-se detalhado no item 3.3.3.1. Para a caracterização do produto obtido realizou-se uma análise de

RMN¹H. O espectro do produto reacional (FIGURA 4.71) ao ser comparado com os dados mostrados na Tabela 4.7, indica a obtenção do produto de oxidação de Baeyer-Villiger.

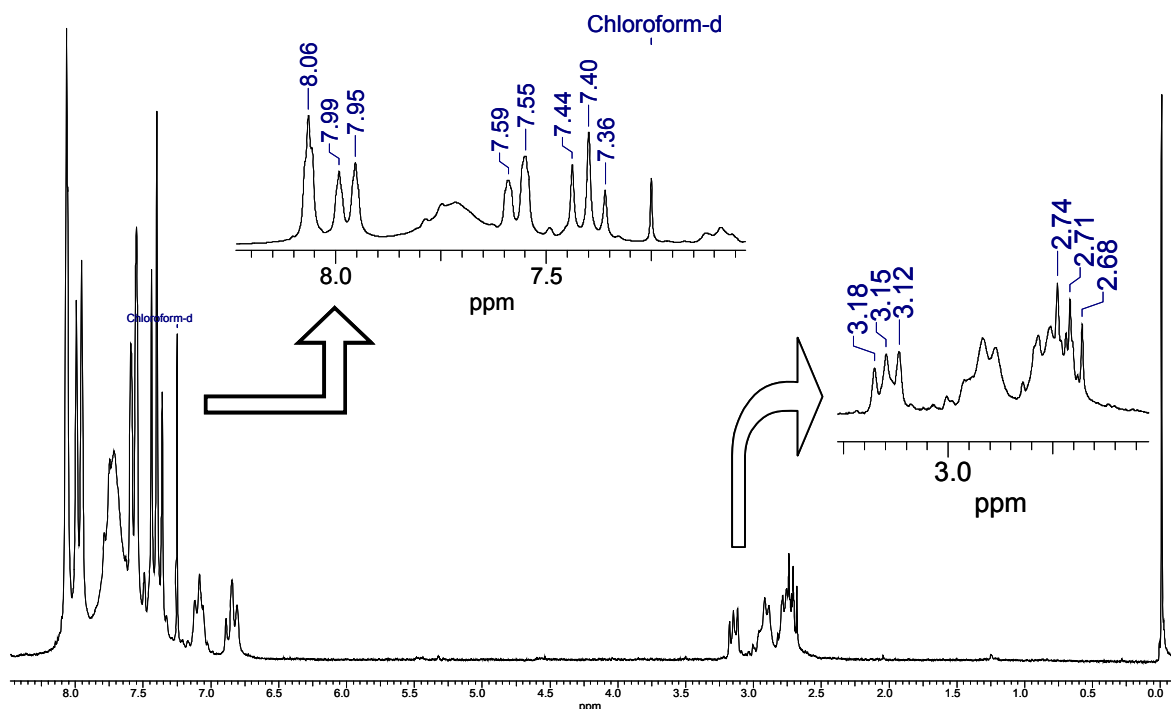


FIGURA 4.71 – Espectro de hidrogênio da dihidrocumarina obtida via reação de oxidação da 1-indanona (200MHz – CDCl₃).

TABELA 4.7 - Dados de RMN¹H obtidos para 1-indanona padrão e dihidrocumarina.

| ¹ H | δ ¹ H 1-indanona padrão (ppm) | δ ¹ H dihidrocumarina (ppm) |
|-----------------------|--|--|
| Anel Aromático | 7,77 | 7,38 |
| | 7,6 | 7,29 |
| | 7,49 | 7,25 |
| | 7,39 | 7,0 |
| Anel de cinco membros | 3,1 | 3,1 |
| | 2,6 | 2,7 |

Os sinais dos aromáticos encontram-se na mesma faixa de deslocamento químico tanto para o padrão, quanto para o produto oxidado, em torno de δ 7,5. Os tripletos referentes aos hidrogênios do anel de cinco e seis membros também foram observados em δ 3,1 e 2,7, confirmando assim, a estrutura química

da substância como sendo o produto da reação de oxidação de Baeyer-Villiger (FIGURA 4.68). No entanto, o espectro de hidrogênio (FIGURA 4.71) apresentou outros sinais, provavelmente referentes a impurezas residuais da reação. Assim, a estrutura obtida para o produto foi confirmada como sendo a lactona dihidrocumarina, como ilustra a FIGURA 4.72.

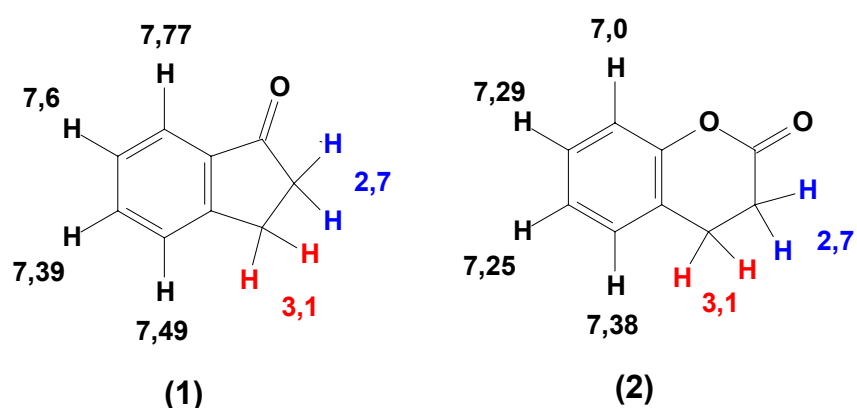


FIGURA 4.72 – Estruturas químicas das substâncias: (1) 1-indanona padrão e (2) dihidrocumarina.

O rendimento obtido para a reação foi de 95%, indicando a eficácia da mesma para a obtenção deste tipo de oxidação.

4.2.2 – Biotransformação da 1-indanona

O fungo *Penicillium brasilianum* foi isolado como endofítico de *Melia Azedarach* e armazenado na micoteca do LABioMMi pela Dra. Regina Maria Geris dos Santos (FIGURA 4.73).



FIGURA 4.73 – *Penicillium brasilianum* isolado como endofítico de *Melia azedarach*.

Além da exploração do metabolismo do mesmo¹²⁴, foram realizados estudos sobre as possíveis transformações que o fungo era capaz de realizar, e dentre os estudos realizados, observou-se a forte tendência deste em realizar reações de Baeyer-Villiger, a qual trata-se de uma reação de oxidação onde um átomo de oxigênio é introduzido em uma molécula contendo uma função cetona (como citado no item 1.5.1). Como o presente trabalho trata-se do estudo de biotransformações, resolveu-se analisar a real capacidade deste micro-organismo em realizar uma reação de Baeyer-Villiger frente a um substrato diferente, não testado anteriormente (1-indanona). Paralelamente, realizou-se para fins de comparação, a mesma reação de Baeyer-Villiger *in vitro* sobre o mesmo substrato (item 4.2.1). Assim, seria comparado o potencial enzimático do fungo *versus* a síntese química. Lembrando que em termos de reagentes, geração de resíduos e rendimentos de reação, a reação microbiana é (em teoria) muito mais vantajosa.

O experimento foi realizado de acordo com o procedimento descrito no item 3.3.3.2.1. Após obtidas as amostras partiu-se para as análises das mesmas.

Através de análises por CCDA pode-se observar que nenhum material de partida foi detectado nas amostras contendo o fungo, o que evidenciou uma conversão totalmente eficaz do substrato pelo micro-organismo. Para certificar-se de que a substância não tivesse sido simplesmente degradada pelo fungo realizou-se o experimento de RMN¹H tanto para a amostra padrão quanto para a amostra possivelmente biotransformada.

Esperava-se um espectro de hidrogênio, praticamente semelhante ao da 1-indanona padrão, uma vez que o produto desejado apresentaria somente um átomo de oxigênio de diferença, afetando de maneira sutil o espectro da mesma. De fato o espectro obtido (FIGURA 4.74) revelou-se similar ao espectro obtido na FIGURA 4.71, onde pequenos deslocamentos dos hidrogênios aromáticos foram observados, porém os hidrogênios do anel de cinco membros permaneceram semelhantes ao da amostra padrão. A biotransformação observada foi, então, a reação de oxidação de Baeyer-Villiger.

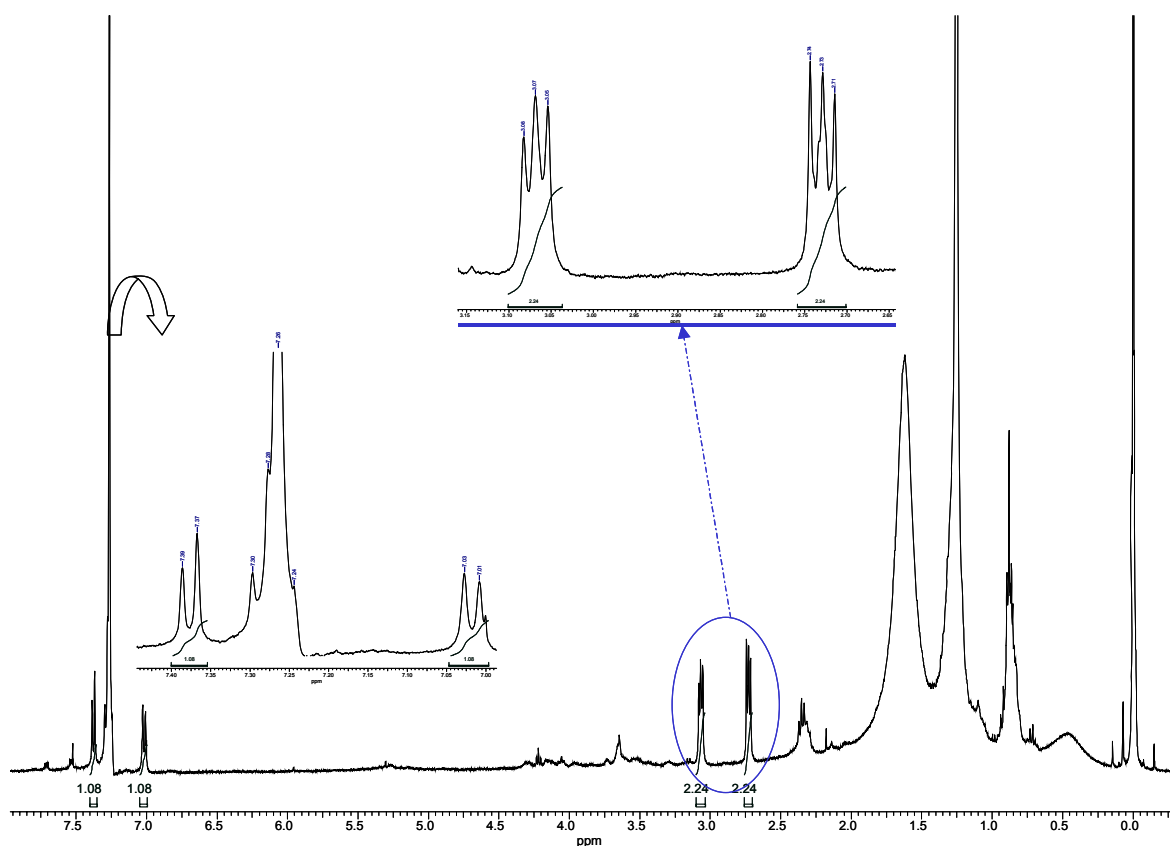


FIGURA 4.74 – Espectro de hidrogênio da amostra biotransformada (400MHz - CDCl_3).

Os sinais obtidos para os hidrogênios aromáticos encontraram-se, alguns, encobertos pelo sinal do solvente deuterado utilizado, no caso, clorofórmio deuterado. Porém, ao se calcular as constantes de acoplamento, conseguiu-se facilmente identificar a presença de todos os quatro sinais dos hidrogênios aromáticos, os quais apresentaram a multiplicidade de dupletos com $J = 8\text{Hz}$ em δ 7,38; 7,29; 7,25 e 7,0. Os sinais referentes aos hidrogênios do anel de cinco membros foram detectados em δ 3,1 e δ 2,7 como tripletes.

Dessa forma, todos os hidrogênios puderam ser identificados, não restando dúvidas sobre a posição do oxigênio, pois se este estivesse no outro carbono (no caso no lugar do carbono carbonílico) o deslocamento dos hidrogênios α ao heteroátomo seria muito maior, pois estariam mais desblindados. Outro fator que determinou a posição do átomo de oxigênio adicionado trata-se da migração do grupo substituinte com maior densidade eletrônica, como normalmente é observado para as reações de Baeyer-Villiger. A substância obtida encontra-se ilustrada na FIGURA 4.75, com os respectivos valores para os hidrogênios observados no espectro de hidrogênio.

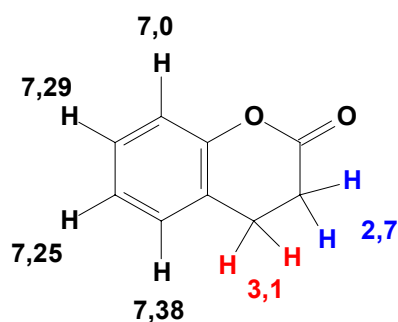


FIGURA 4.75 – Estrutura do possível produto biotransformado (148,0 Da) com os respectivos deslocamentos químicos dos seus hidrogênios.

Uma outra análise realizada para comprovar a biotransformação foi a inserção direta no espectrômetro de massas, uma vez que a diferença entre ambos é de 16 unidades de massa, exatamente um oxigênio a mais na molécula. Através do espectro de varredura de íons obtido para a amostra (FIGURA 4.76), pode-se verificar a presença do íon em m/z 149 ($[M+H]^+$), uma vez que as análises estavam sendo realizadas no modo positivo de ionização.

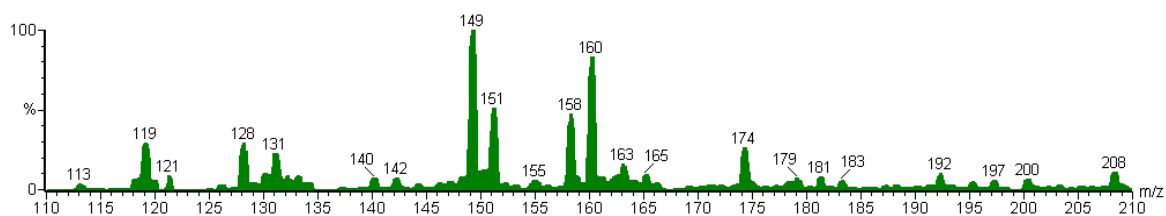


FIGURA 4.76 – Espectro de massas da amostra biotransformada, m/z 149 comprova realmente que a 1-indanona foi biotransformada.

As diversas massas observadas no espectro podem tratar-se de pequenas impurezas presentes na amostra, ou mesmo no próprio injetor do equipamento. Necessitava-se descobrir se m/z 149 estava presente e poderia ser detectado, e isto foi claramente obtido. Portanto, a indanona foi realmente oxidada pelo fungo *Penicillium brasilianum*, devido a presença da enzima Baeyer-Villigerase, responsáveis então pela reação que possui o nome da mesma: Oxidação de Baeyer-Villiger.

Como em todos os experimentos já realizados e discutidos anteriormente, os substratos utilizados para a biotransformação foram adicionados ao meio líquido juntamente com o micro-organismo. No entanto, para a possível

investigação e posterior fracionamento e isolamento de enzimas torna-se necessário que o micro-organismo seja hábil em realizar tais reações após o seu desenvolvimento. Em outras palavras, torna-se necessário verificar a existência de biotransformação quando o substrato é adicionado ao meio com o fungo já desenvolvido.

Dessa forma, iniciou-se o experimento com o cultivo do micro-organismo *Penicillium brasilianum* em meio líquido Czapek's enriquecido com extrato de levedura por três dias sob agitação constante (item 3.3.3.2.2). Como trata-se de um micro-organismo que se reproduz muito fácil e rapidamente, três dias de cultivo foi tempo suficiente para um considerável crescimento micelial.

Adicionaram-se os substratos já solubilizados em acetona, pois o DMSO não foi capaz de solubilizar os substratos. A solubilização dos substratos é de extrema importância, pois torna-os mais acessíveis ao micro-organismo.

Outro fator que possibilita a maior interação entre os substratos e o micro-organismo é a agitação constante. O experimento foi monitorado nos dias três e dez (contados após a adição dos substratos). Realizou-se a extração com acetato de etila e analisou-se primeiramente através de CCDA, sendo o eluente hexano:acetato de etila (6:4) (FIGURA 4.77).

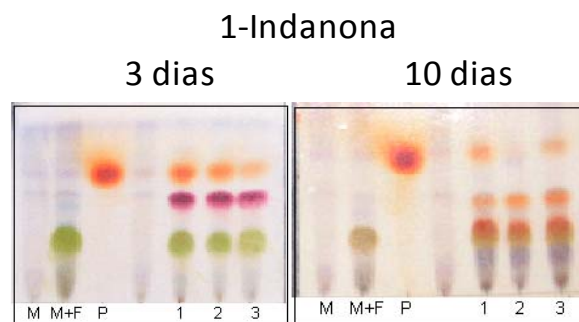


FIGURA 4.77 – CCDA das amostras obtidas após extração com acetato de etila, sendo: M (meio), M+F (meio + fungo), P (padrão dos substratos) e 1, 2 e 3 (amostras contendo meio + fungo + substratos).

Pelas análises iniciais por CCDA, pode-se observar que os substratos adicionados ao fungo foram consumidos e/ou biotransformados principalmente após 10 dias de cultivo. No caso de 1-indanona, observou-se claramente a produção de uma substância mais polar do que o material de partida e de mesma coloração, podendo esta ser fruto de reações de oxidação.

Para maiores detalhes dos resultados obtidos, partiu-se para as análises de CG-EM (condições descritas no item 3.3.3.2.4).

As amostras selecionadas para as análises de CG-EM foram as amostras contendo somente o meio, contendo meio e o fungo, 1-indanona padrão, amostra contendo fungo+meio+substrato com 3 dias e com 10 dias. O cromatograma de íons totais (CIT) encontra-se na FIGURA 4.78.

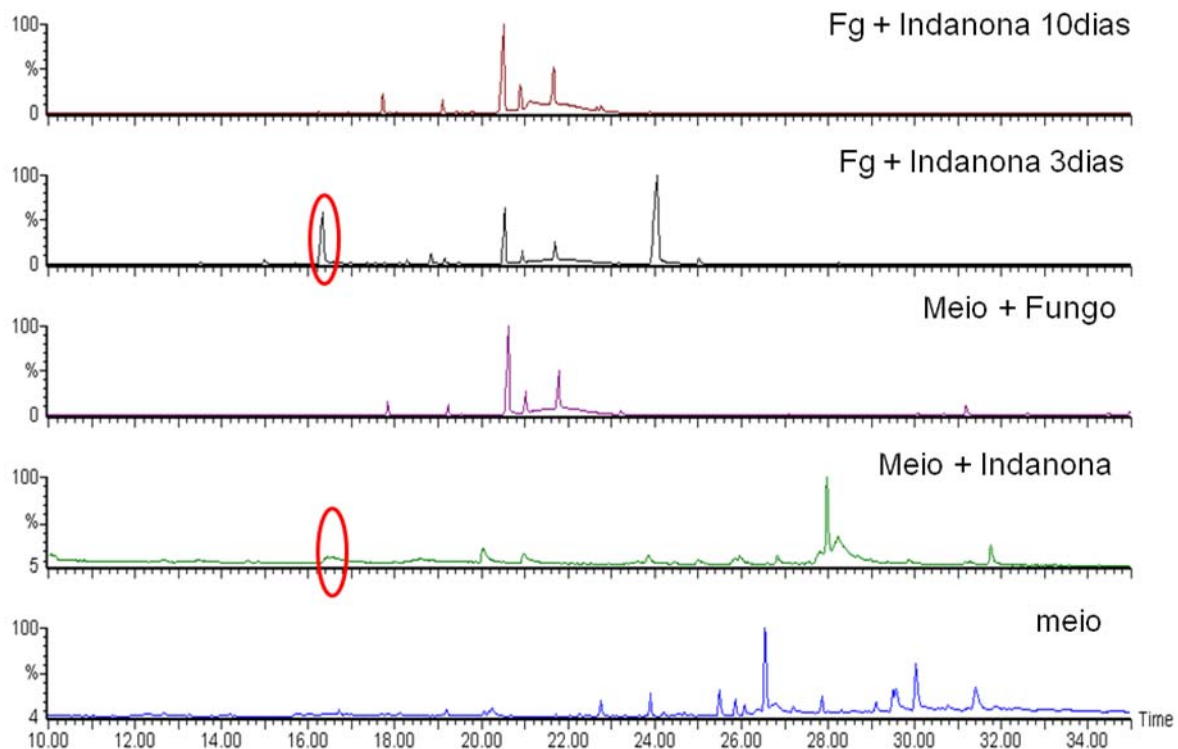


FIGURA 4.78 – Cromatogramas de íons totais (CIT) para as amostras: 1-indanona e cânfora, meio +fungo+indanona 10 dias, meio+fungo+indanona 3 dias, meio+fungo, Meio+indanona e somente meio.

Comparando-se os cromatogramas pode-se observar que o substrato 1-indanona presente no meio controle (meio + indanona), assinalada em vermelho encontra-se presente na amostra contendo o fungo e indanona após 3 dias de cultivo, porém após 10 dias de incubação o substrato está praticamente ausente (FIGURA 4.78).

Os cromatogramas ilustraram também uma variedade de substâncias tanto presentes no meio líquido quanto no meio líquido + fungo. Para facilitar o processamento dos dados, ampliou-se região por região do cromatograma e comparou-se efetivamente as diferenças obtidas entre eles.

As bandas diferenciadas observadas foram processadas para a obtenção dos respectivos espectros de massas. Dentre as substâncias obtidas, detectou-se o produto obtido da oxidação de Baeyer-Villiger, com a adição de 16 unidades de massa, produzindo assim m/z 148, como ilustra a FIGURA 4.79.

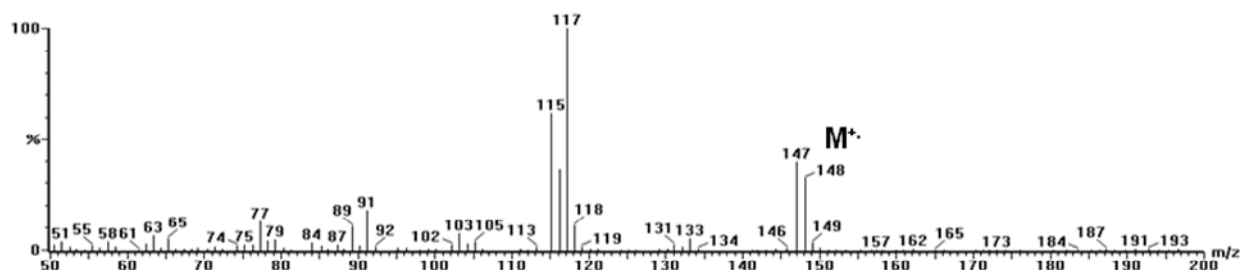


FIGURA 4.79 – Espectro de massas obtido para a banda em 14.6 minutos.

Outra banda detectada em 19.2 minutos gerou um espectro de massas com m/z 180, indicando provavelmente a abertura da lactona previamente formada (FIGURA 4.80). No entanto, a ausência de um padrão para tal substância, torna-se necessário seu isolamento para a confirmação estrutural da mesma.

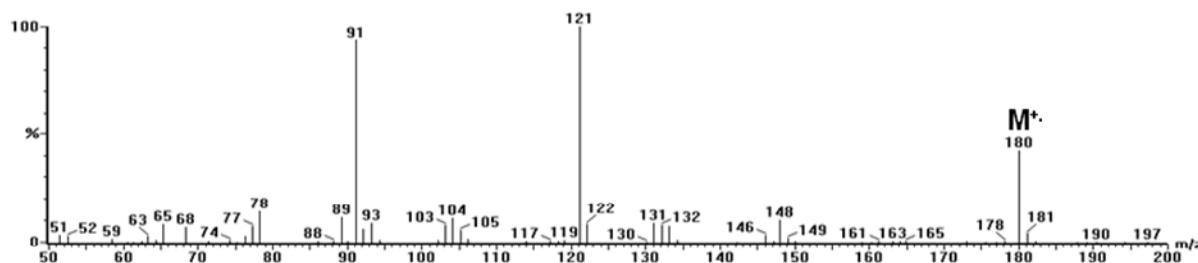


FIGURA 4.80 – Espectro de massas obtido para banda em 19.2 minutos.

Duas outras bandas foram detectadas gerando m/z 148 e 162 (FIGURA 4.81). Como já havia sido observado a formação da lactona (em um tempo de retenção menor), atribuiu-se essa substância como sendo produto de hidroxilação, uma vez que foram adicionados novamente 16 unidades de massa. Já m/z 162 com 14 unidades de massa a mais do que o possível produto hidroxilado (148 Da), indica a possível ocorrência de O-metilação. Contudo as substâncias devem ser isoladas para a total confirmação e elucidação estrutural.

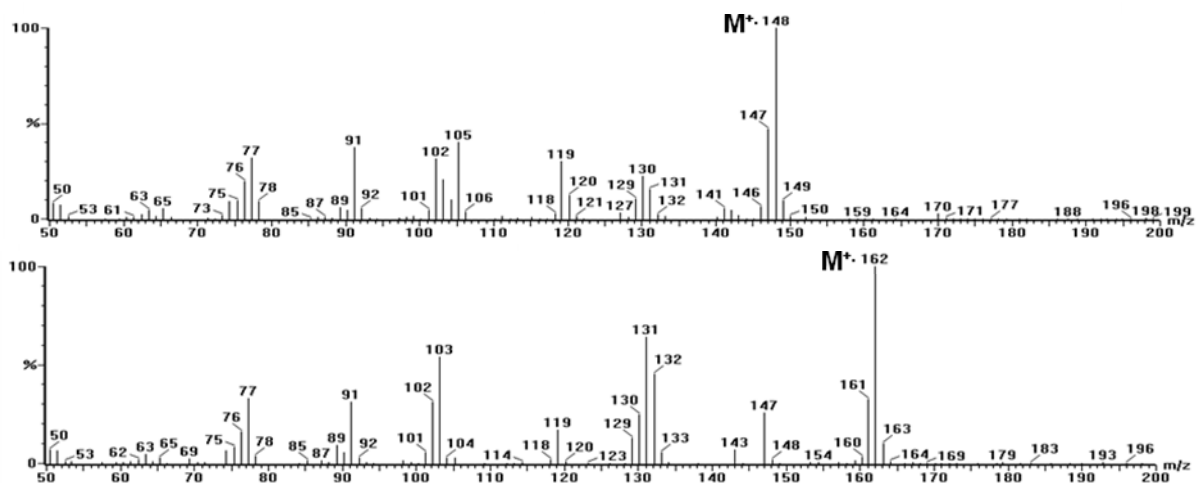


FIGURA 4.81 – Espectros de massas para as bandas em 20.1 e 21.3 minutos.

Dessa forma, o fungo *Penicillium brasilianum* confirmou sua capacidade oxidativa mesmo quando os substratos são adicionados após o seu desenvolvimento inicial. Os possíveis produtos biotransformados obtidos encontram-se resumidos na FIGURA 4.82.

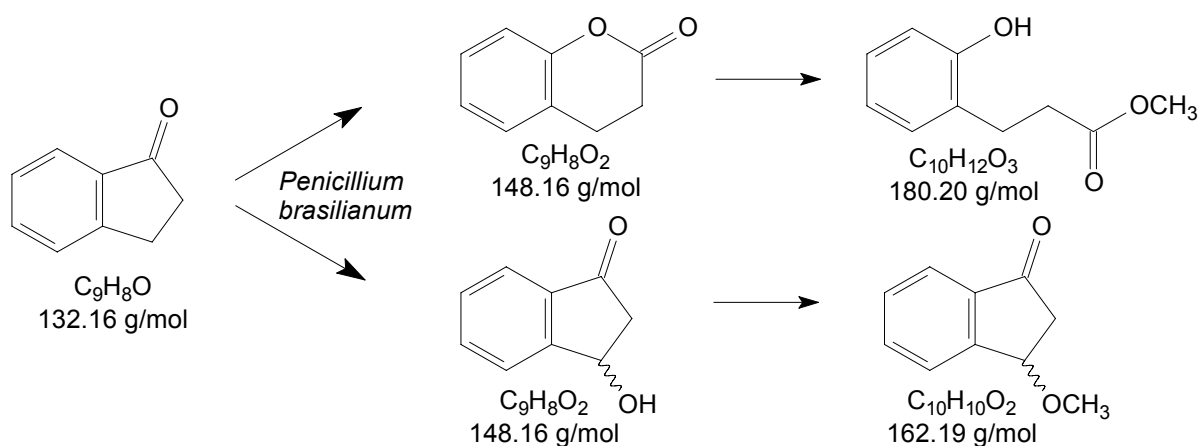


FIGURA 4.82 – Produtos de oxidação obtidos com 1-indanona e *Penicillium brasilianum*.

No entanto, para a confirmação das estruturas obtidas, realizou-se uma purificação das amostras obtidas através de CCDP (FIGURA 4.83).

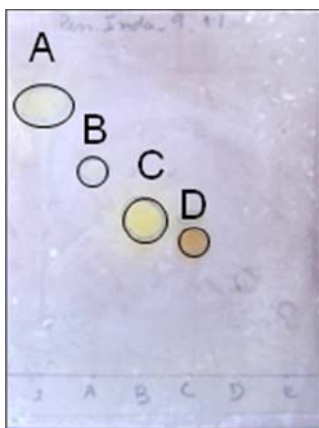


FIGURA 4.83 – CCDA das frações purificadas após CCDP.

As substâncias isoladas foram submetidas a análises de RMN¹H. A banda indicada pela letra A (FIGURA 4.83), corresponde ao substrato 1-indanona. A banda B (FIGURA 4.83), de acordo com o espectro de hidrogênio, corresponde ao produto de oxidação de Baeyer-Villiger, uma vez que o espectro obtido foi comparado ao do padrão sintetizado (FIGURA 4.71). A banda D (FIGURA 4.83) corresponde ao metabólito secundário produzido pelo fungo, o ácido penicílico, o qual foi caracterizado posteriormente através de análises por CLAE/UV-EM.

Já a banda C (FIGURA 4.83) de coloração amarela intensa apresentou um espectro de hidrogênio (FIGURA 4.84) um pouco diferenciado.

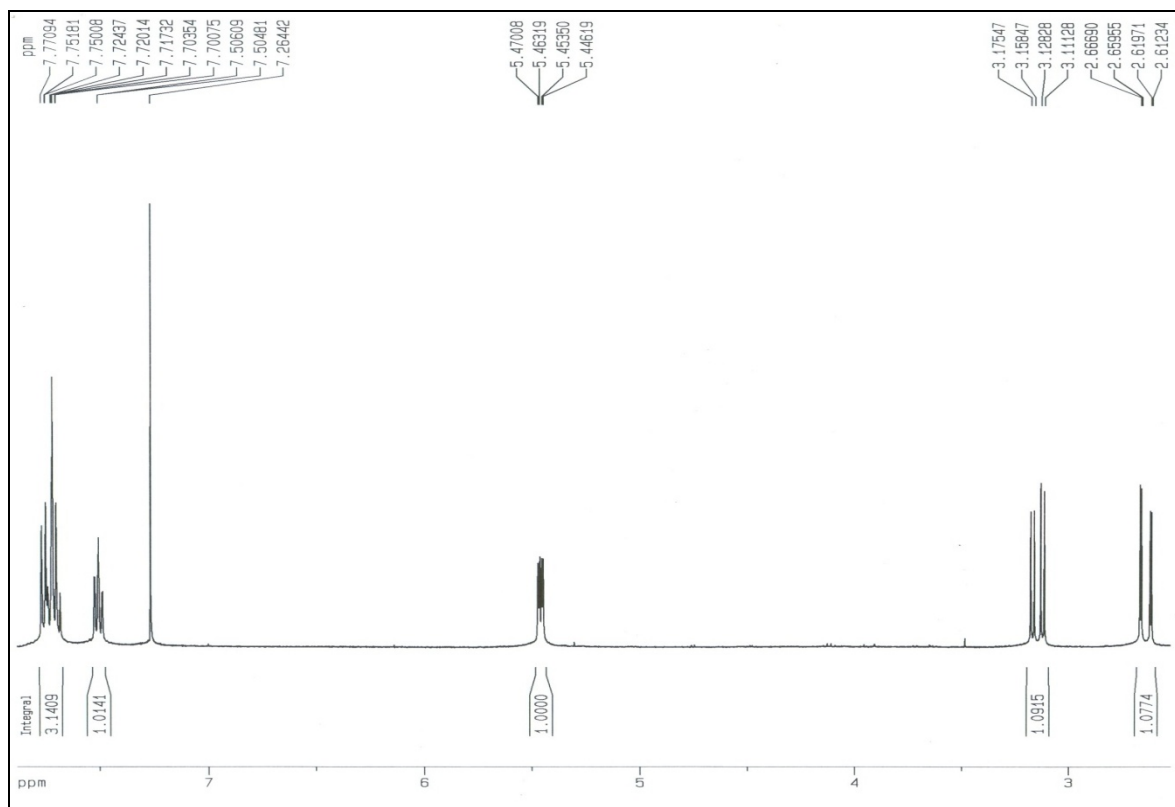


FIGURA 4.84 – Espectro de hidrogênio da banda C (FIGURA 4.83) (CDCl₃ – 400MHz).

A análise do espectro obtido indicou a presença dos quatro sinais dos hidrogênios aromáticos em δ 7,76, 7,72, 7,70 e 7,50, os quais evidenciaram que nenhuma mudança aparente tenha ocorrido em relação à substituição do anel aromático, uma vez que a integração para cada um dos sinais foi equivalente a um hidrogênio. Já os duplos dubletos em δ 5,45 ($J = 2,9$ e $6,8$ Hz), em δ 3,1 ($J = 6,8$ e 19 Hz) e em δ 2,6 ($J = 2,9$ e 19 Hz), indicaram a ocorrência de alguma substituição no anel de cinco membros (FIGURA 4.82), já que os três sinais obtidos equivalem um total de três hidrogênios, enquanto no substrato padrão (1-indanona), seriam observados quatro. Outro indício da presença de um substituinte trata-se da diferenciação observada para os hidrogênios geminais em δ 3,1 e 2,6, os quais acoplam entre si com uma constante de 19 Hz, caracterizando a existência de um carbono quiral vizinho. A substituição foi atribuída a uma hidroxilação, contudo como nenhum outro sinal foi observado no espectro, nenhuma informação mais precisa pode ser obtida somente com essa análise.

Para maiores investigações sobre o substituinte adicionado pelo fungo ao substrato utilizado, partiu-se para as análises por CG-EM.

Os cromatogramas de íons totais (CIT) para as frações B e C da CCDP realizada (FIGURA 4.83), estão apresentados na FIGURA 4.85 abaixo.

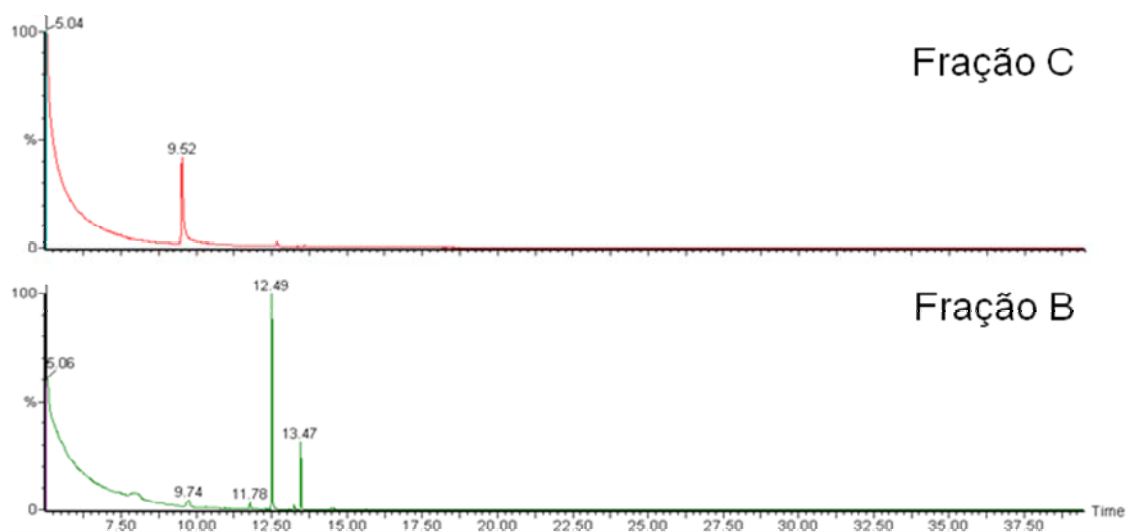


FIGURA 4.85 – Cromatogramas de íons totais das frações B e C (FIGURA 4.83).

Para o cromatograma da fração B, obteve-se um espectro de massas (FIGURA 4.86) com m/z 148.

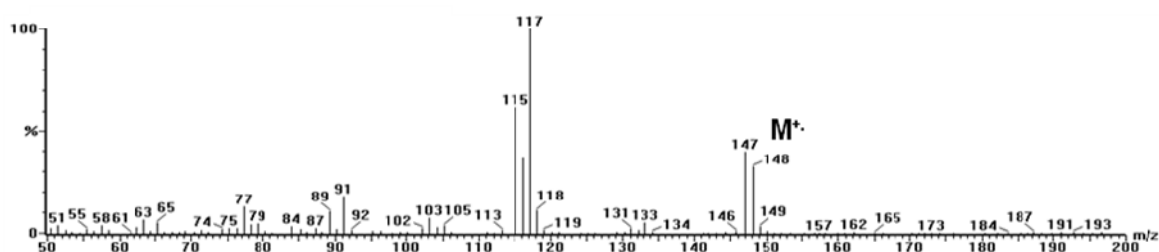


FIGURA 4.86 – Espectro de massas para o pico em 9,74 min do cromatograma da FIGURA 4.85.

Essa relação massa/carga da banda em 9,74 minutos confirmou a ocorrência da reação de oxidação de Baeyer-Villiger, pois a massa do substrato padrão é 132 Da e com a adição de um átomo de oxigênio levaria a 148 Da, a massa então obtida. Além de tratar-se de uma fração referente a banda mais polar do que o substrato padrão e mais apolar do que o outro produto biotransformado de coloração amarela (banda C – FIGURA 4.83).

A análise do cromatograma da fração C (banda amarela intensa) gerou uma banda em 9,52 minutos (FIGURA 4.85), a qual ao ser processada forneceu o espectro de massas da FIGURA 4.87, também com m/z 148.

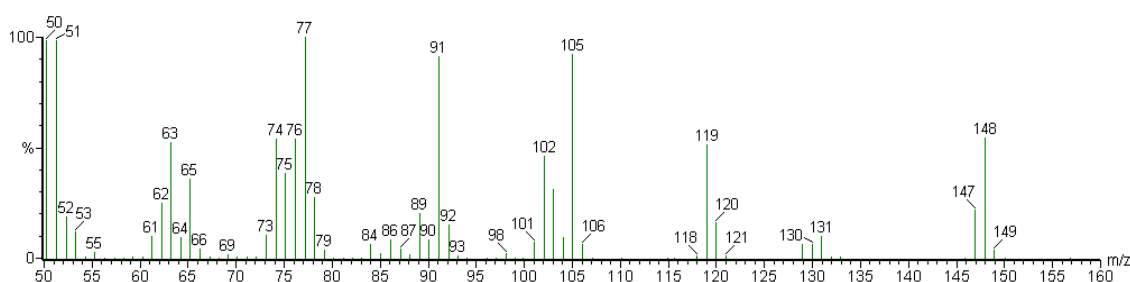
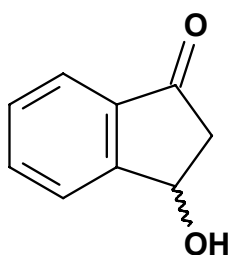


FIGURA 4.87 – Espectro de massas para o pico em 9,52 minutos do cromatograma da FIGURA 4.85.

A massa 148 Da indicou então o acréscimo de 16 u.m.a., ou seja, a adição de um átomo de oxigênio ao substrato padrão. Mas a adição deste oxigênio não poderia ser na forma de lactona, caso contrário apresentaria um espectro de hidrogênio muito similar ao do substrato padrão, assim como um espectro de massas semelhante, o que não foi observado em ambos os casos. No entanto, como houve uma substituição no anel de cinco membros e a adição de um átomo de oxigênio, esta substituição só poderia ser pela adição de uma hidroxila ao substrato, já que o sinal do hidrogênio da hidroxila é lábil muitas vezes não captado pelo RMN¹H, devido a troca com deutério do solvente utilizado (FIGURA 4.88). Sendo o fungo capaz de realizar tanto uma oxidação de Baeyer-Villiger quanto uma hidroxilação.



148.16 g/mol

FIGURA 4.88 - Estrutura química proposta do produto biotransformado a partir da 1-indanona.

Como os resultados obtidos com o experimento discutido anteriormente foram satisfatórios, ou seja, o fungo foi eficaz na transformação da cetona cíclica para uma lactona (oxidação de Baeyer-Villiger), partiu-se para a determinação otimizada de quanto tempo o fungo levaria para realizar tal transformação. Para isso utilizou-se o procedimento descrito no item 3.3.3.2.3.

Como as amostras já haviam sido analisadas por CG-EM, partiu-se para a análise por CLAE/UV, pois talvez substâncias mais polares não estavam sendo detectadas pelo CG-EM. As amostras foram analisadas por CLAE/UV nas condições descritas no item 3.3.3.2.4.

O estudo das amostras analisadas por CLAE/UV iniciou-se pela injeção da amostra padrão (FIGURA 4.89).

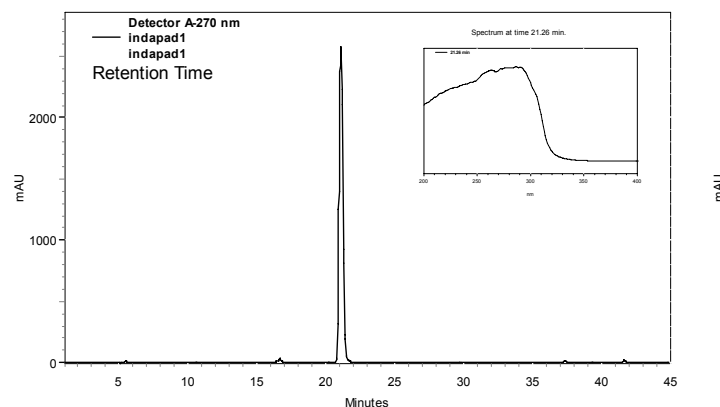


FIGURA 4.89 – Cromatograma do substrato 1-indanona com seu respectivo espectro de UV.

De acordo com o cromatograma obtido, pode-se observar que o substrato 1-indanona apresentou um tempo de retenção de 21,26 minutos, encontrando-se praticamente no centro do cromatograma, facilitando assim, sua identificação nas amostras a serem analisadas, além de permitir a análise de produtos com maiores e com menores tempos de retenção.

Dentre as amostras analisadas do fungo *Penicillium brasilianum* encontram-se discutidas somente algumas delas, pois apresentaram, de um modo geral, os mesmos resultados e as mesmas considerações. Para as amostras eluídas com diclorometano:metano (9,9:0,1) obteve-se os cromatogramas para Cont_Pen_3dias_1%, Pen_Inda_3dias_1%, Cont_Pen_12dias_1% e Pen_Inda_12dias_1% (FIGURA 4.90).

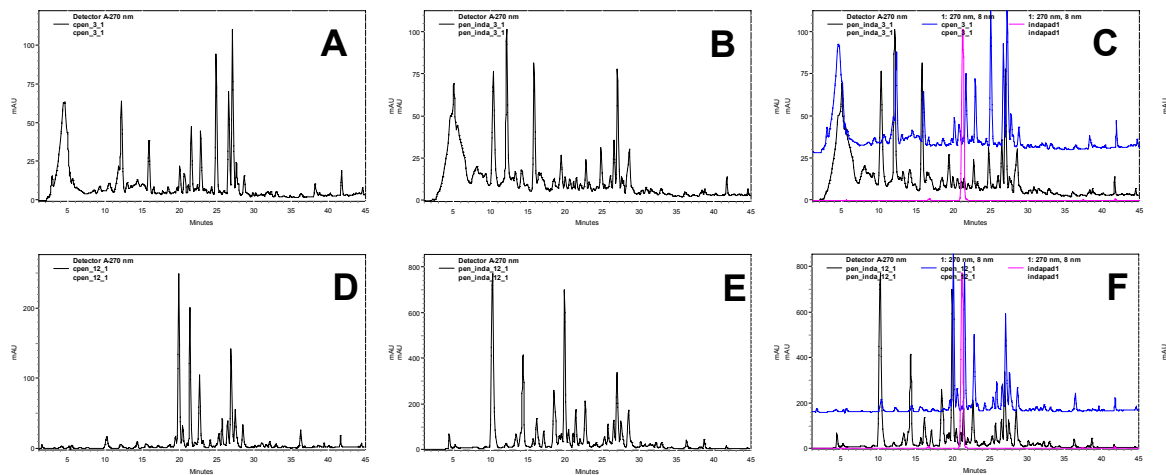


FIGURA 4.90 – Cromatogramas: **(A)** Cont_Pen_3dias_1%, **(B)** Pen_Inda_3dias_1%, **(C)** Sobreposição de A e B e 1-indanona padrão em rosa, **(D)** Cont_Pen_12dias_1%, **(E)** Pen_Inda_12dias_1% e **(F)** Sobreposição de D e E e 1-indanona padrão em rosa.

De acordo com os cromatogramas obtidos pode-se observar que muitas são as substâncias presentes nas amostras do experimento. Muitas das bandas observadas encontram-se ausentes nas amostras controles, indicando que possam ter ocorrido biotransformações. No entanto, o substrato adicionado pode ter ativado o sistema enzimático do fungo tanto para sofrer transformações quanto para a produção de outros metabólitos.

Os cromatogramas indicaram também que com apenas três dias de cultivo muitas já são as substâncias produzidas pelo fungo, um número ainda maior é observado para 12 dias. A quantidade de bandas tornou as análises bastante complexas, pois diversas bandas poderiam ser produtos de biotransformação ou ainda diferentes metabólitos.

Com o experimento monitorado pode-se observar que a conversão realizada pelo fungo é eficaz mesmo e poucos dias de cultivo. O metabolismo acelerado do micro-organismo torna-se um atrativo para as biocatálises, uma vez que quanto mais otimizada a reação, maiores são as chances de serem empregadas para diferentes fins.

Assim, a conversão da 1-indanona para a isocumarina poderia ser usada para monitorar futuros experimentos de fracionamento enzimático.

4.2.2.1 – Biotransformação da 1-indanona utilizando células em suspensão

Os experimentos realizados com o fungo *Penicillium brasilianum* e 1-indanona mostraram a capacidade do micro-organismo de reconhecer o substrato mesmo quando adicionado ao meio após o seu desenvolvimento inicial. Entretanto, o meio ainda continha nutrientes para manter o fungo em crescimento. Isso possibilitou, como discutido anteriormente, uma grande quantidade de metabólitos produzidos pelo fungo, que dificultaram a identificação dos produtos de biotransformação.

Uma maneira que minimizar tal efeito seria a adição do substrato em um meio onde o fungo não estivesse mais em crescimento, ou seja, onde se utiliza as células adultas do micro-organismo em suspensão.

A metodologia de utilizar as células em suspensão trata-se de uma etapa determinante para as posteriores extrações enzimáticas, uma vez que após desenvolvidas, as enzimas são extraídas em uma solução, normalmente, tampão e testadas frente ao substrato de interesse.

Com o objetivo de determinar a atividade enzimática das reações de oxidação realizada pela enzima Baeyer-Villigerase, o fungo *Penicillium brasilianum* foi testado em solução tampão de fosfato de sódio como descrito no item 3.3.3.3. As amostras foram obtidas após extração com acetato de etila e analisadas por CLAE/UV-EM.

Os dados cromatográficos obtidos inicialmente revelaram a facilidade de interpretação, como ilustrada na FIGURA 4.91.

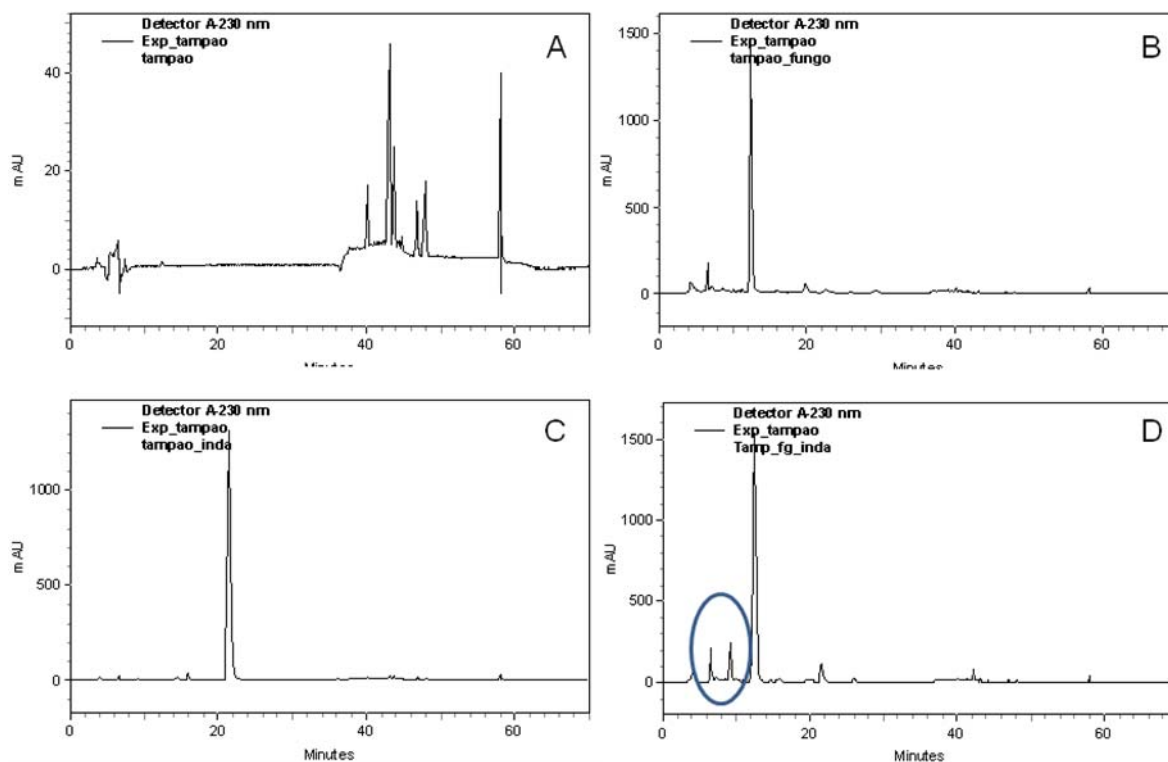


FIGURA 4.91 – Cromatogramas obtidos das amostras: **(A)** somente tampão, **(B)** tampão + fungo, **(C)** tampão + indanona e **(D)** tampão + fungo + indanona.

Os cromatogramas tanto do controle do fungo quanto do fungo e indanona apresentaram pouca interferência de metabólitos secundários, que provavelmente foram excretados no meio líquido Czapek's. Quando o micélio foi transferido para a solução tampão pouco foram os metabólitos extraídos para a solução, facilitando assim a identificação de produtos de biotransformação.

O metabólito majoritário do fungo encontra-se em 12,8 minutos enquanto que o substrato 1-indanona apresentou tempo de retenção em torno de 21 minutos (FIGURA 4.91). Os produtos de biotransformação detectados encontram-se assinalados em azul no cromatograma D (FIGURA 4.91).

Para a identificação dos produtos analisaram-se as amostras por CLAE/UV-EM. A banda referente ao metabólito secundário gerou o espectro de massas ilustrado na FIGURA 4.92.

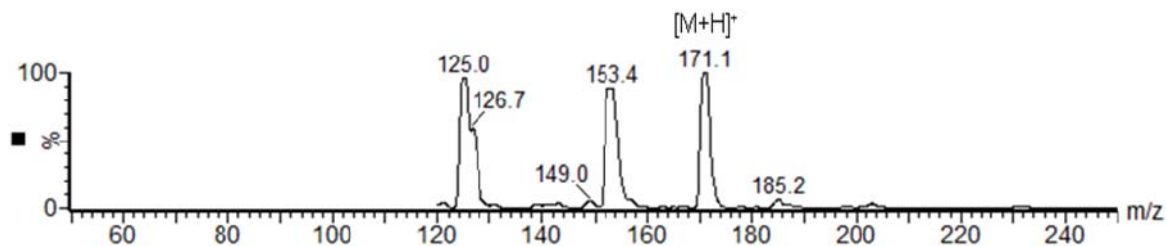


FIGURA 4.92 – Espectro de massas da banda em 12,8 minutos, referente ao metabólito secundário do *Penicillium brasilianum*.

As características já observadas para o composto, como intensa absorção no UV, espectro de UV e massa molecular detectada (170 Da), levaram a identificação do composto como sendo o ácido penicílico (FIGURA 4.93).

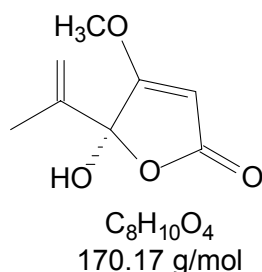


FIGURA 4.93 – Estrutura do ácido penicílico, substância produzida por *Penicillium brasilianum*.

O ácido penicílico já havia sido isolado anteriormente por Santos (2003)¹²⁴, como um dos metabólitos majoritários produzidos por *Penicillium brasilianum*.

As demais bandas obtidas no cromatograma D (FIGURA 4.91) geraram os seguintes espectros de massas (FIGURA 4.94).

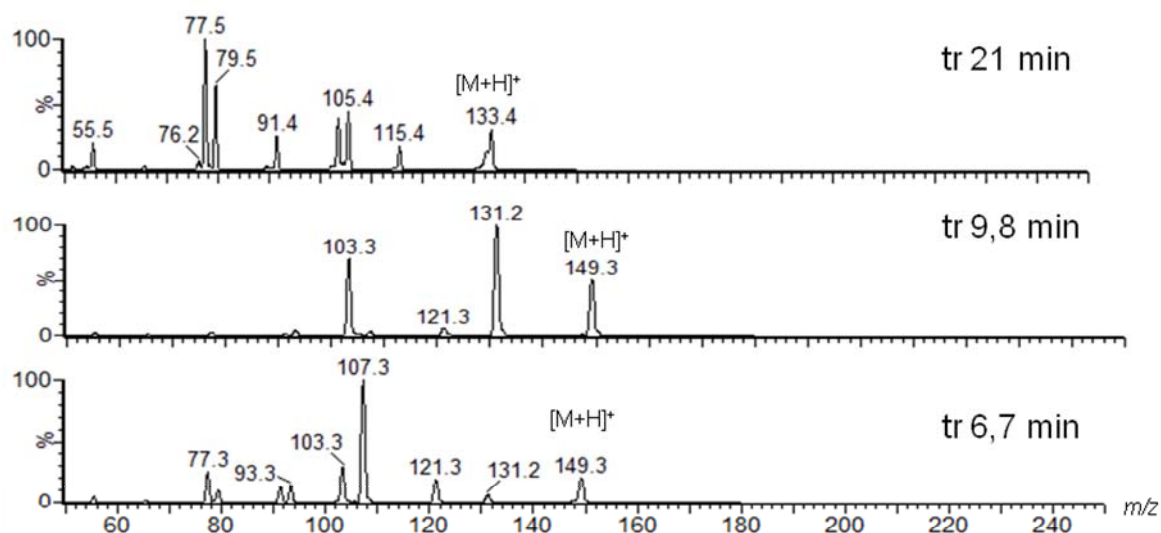


FIGURA 4.94 – Espectros de massas das bandas nos tempos de retenção: 6,7, 9,8 e 21 minutos.

Como esperado, o substrato 1-indanona (132 Da) ainda encontra-se presente no meio, como mostrado pelo espectro da banda com tempo de retenção 21 minutos (m/z 133). As bandas mais polares foram identificadas como oriundas das reações de oxidação: em 6,7 minutos observou m/z 149 para o produto hidroxilado e em 9,8 minutos a mesma relação massa/carga m/z 149 para o produto da oxidação de Baeyer-Villiger. As substâncias referentes aos espectros de massas discutidos encontram-se ilustradas na FIGURA 4.95.

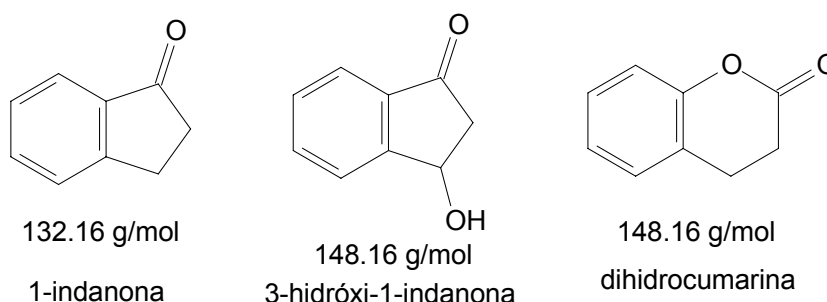


FIGURA 4.95 – Estruturas referentes aos espectros de massas (FIGURA 4.90).

Assim, o micro-organismo realizou a oxidação da 1-indanona já com as células adultas e ressuspensas em solução tampão, o que facilitou a identificação desses produtos.

Como o experimento utilizando a solução tampão permitiu a fácil detecção dos produtos (sem grandes interferências de metabólitos secundários), adotou-se tal metodologia para verificar a capacidade de oxidação do fungo frente a

um novo espectro de substâncias. O estudo adicional realizado sobre a tolerância da enzima à variações estruturais do substrato delinearía as possibilidades reais de sua aplicação em sínteses orgânicas, por exemplo. Os experimentos a seguir foram desenvolvidos com esses objetivos.

4.2.2.2 – Reação de biotransformação da 1-indanona utilizando *Aspergillus flavus*

Quando o *Aspergillus flavus* foi testado com os flavonóides, tinha-se por objetivo comparar seu comportamento patogênico com o comportamento mutualista do fungo *Penicillium griseoroseum*, utilizando para isto os flavonóides glicosilados e polimetoxilados. Ainda restava comparar a capacidade oxidativa deste fungo em relação a outro fungo mutualista – *Penicillium brasilianum*, o qual por sua vez se mostrou hábil em oxidar substâncias.

Como o fungo *Aspergillus flavus* também possui um metabolismo rico em oxidações (FIGURA 4.27), investigou-se a capacidade deste fungo em realizar oxidações do tipo Baeyer-Villiger na molécula teste 1-indanona, de acordo com a metodologia já empregada para o fungo *Penicillium brasilianum* (item 4.2.2).

As análises iniciais por CCDA indicaram a presença de uma banda de coloração amarela intensa inexistente nas amostras contendo somente o meio + fungo (FIGURA 4.96).



FIGURA 4.96 – CCDA das amostras contendo 1-indanona e *Aspergillus flavus*.

Como indicado na FIGURA 4.92, a banda de coloração amarela foi isolada por CCDP e submetida às análises por RMN¹H (FIGURA 4.97).

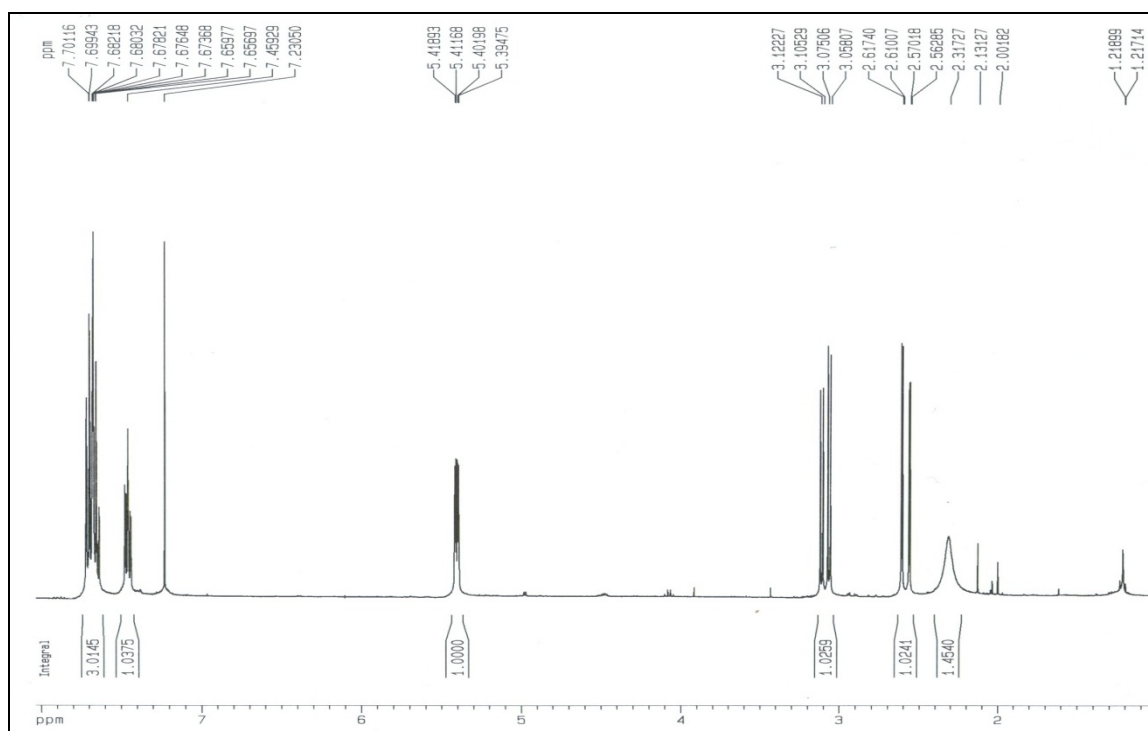


FIGURA 4.97 – Espectro de hidrogênio da fração biotransformada de 1-indanona por *Aspergillus flavus* (CDCl₃ – 400MHz).

Observou-se a presença dos sinais referentes aos hidrogênios aromáticos em δ 7,71, 7,68, 7,65 e 7,46, integrados para um total de quatro hidrogênios. Os duplos dubletos em δ 5,40 ($J = 2,9$ e 6,8Hz), em δ 3,09 ($J = 6,8$ e 19Hz) e em δ 2,58 ($J = 2,9$ e 19Hz) também indicaram a presença de um centro quiral, já que os hidrogênios geminais possuem $J = 19$ Hz. Assim, a substituição do produto ocorreu na mesma posição do produto obtido com o fungo *Penicillium brasilianum*. A semelhança entre os espectros de hidrogênio também puderam ser observadas (FIGURA 4.84 e 4.97).

Para a confirmação do produto obtido, realizaram-se análises por CG-EM da amostra purificada (FIGURA 4.98) e ainda selecionou-se o íon m/z 148 para detectar a presença ou não do produto hidroxilado, como suspeitava-se pela análise de RMN¹H.

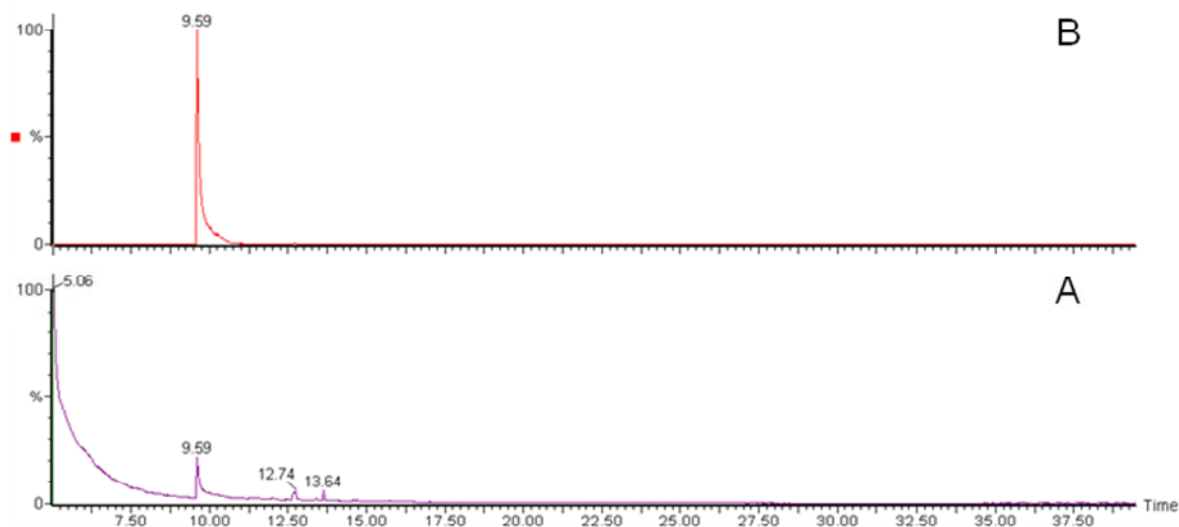


FIGURA 4.98 – (A) Cromatograma de íons totais e (B) cromatograma de íon selecionado (m/z 148).

Como o esperado, a substância majoritária da amostra tratava-se do produto hidroxilado, assim como o obtido com o fungo *Penicillium brasilianum*. O espectro de massas para a banda observada em 9,59 minutos comprovou a massa do produto 148 Da (FIGURA 4.99).

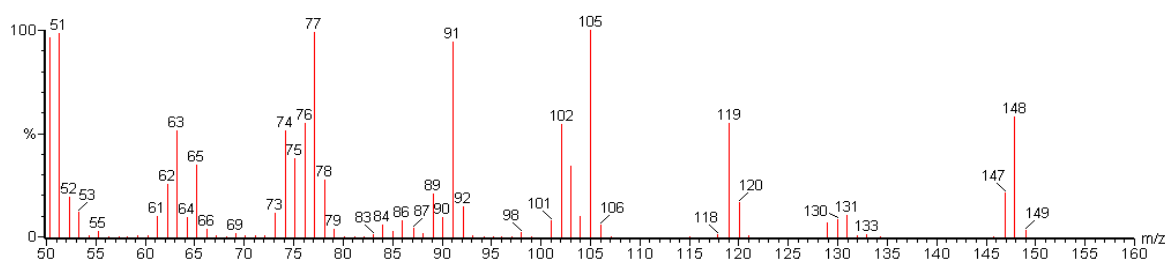


FIGURA 4.99 – Espectro de massas da banda em 9,59 minutos (FIGURA 4.98).

O espectro de massas obtido (FIGURA 4.99) para a amostra biotransformada do fungo *Aspergillus flavus* mostrou o íon m/z 148 e o mesmo perfil do produto já obtido para o fungo *Penicillium brasilianum* (FIGURA 4.87).

As demais amostras obtidas foram analisadas e buscou-se a detecção do possível produto oxidado a partir da oxidação de Baeyer-Villiger, porém nenhum outro íon m/z 148 foi detectado, indicando que o fungo foi hábil na reação de hidroxilação, mas não realizou a reação de Baeyer-Villiger (FIGURA 4.100).

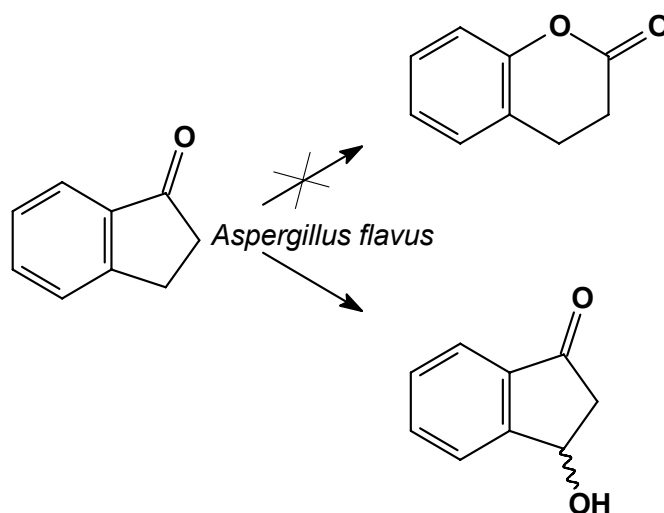


FIGURA 4.100 – Biotransformação de 1-indanona por *Aspergillus flavus*.

4.2.3 – Reação de Oxidação da α,β -amirina

Para a reação de oxidação da substância α,β -amirina seguiu-se um procedimento descrito por HATA *et al.*¹⁴⁵, o qual utilizou PCC como oxidante (descrito no item 3.3.3.4). Assim, 500 mg da substância foram dissolvidos em diclorometano tratado sob agitação magnética constante. Após a extração do produto realizou-se CCDA com o eluente hexano:acetato de etila (4,75:0,25) e observou-se a presença de impurezas na amostra (FIGURA 4.101 A), provavelmente devido aos resíduos dos reagentes.

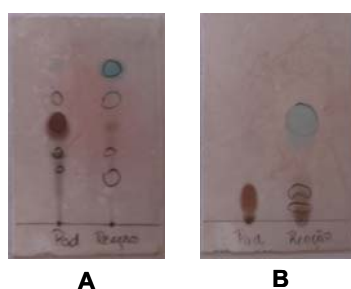


FIGURA 4.101 – CCDA da amostra extraída da reação de oxidação da α,β -amirina.

Definiu-se o eluente, que foi hexano e duas gotas de acetato de etila, (FIGURA 4.101 B), para a realização de coluna cromatográfica. Foram recolhidas ao todo dez frações da coluna, sendo 320,9 mg obtidos do produto purificado, levando ao rendimento de 64%.

Para a caracterização do produto obtido realizou-se uma análise de RMN¹H e RMN¹³C, FIGURAS 4.102 e 4.103.

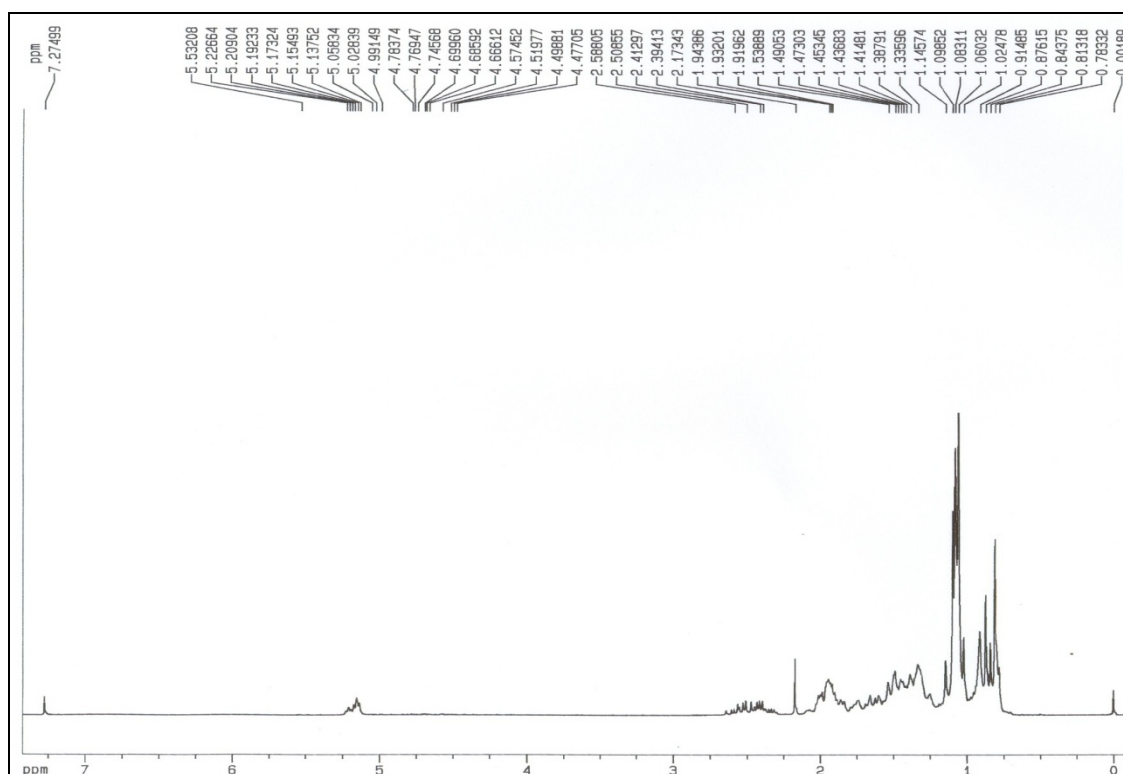


FIGURA 4.102 – Espectro de hidrogênio do produto oxidado (CDCl₃ – 200MHz)

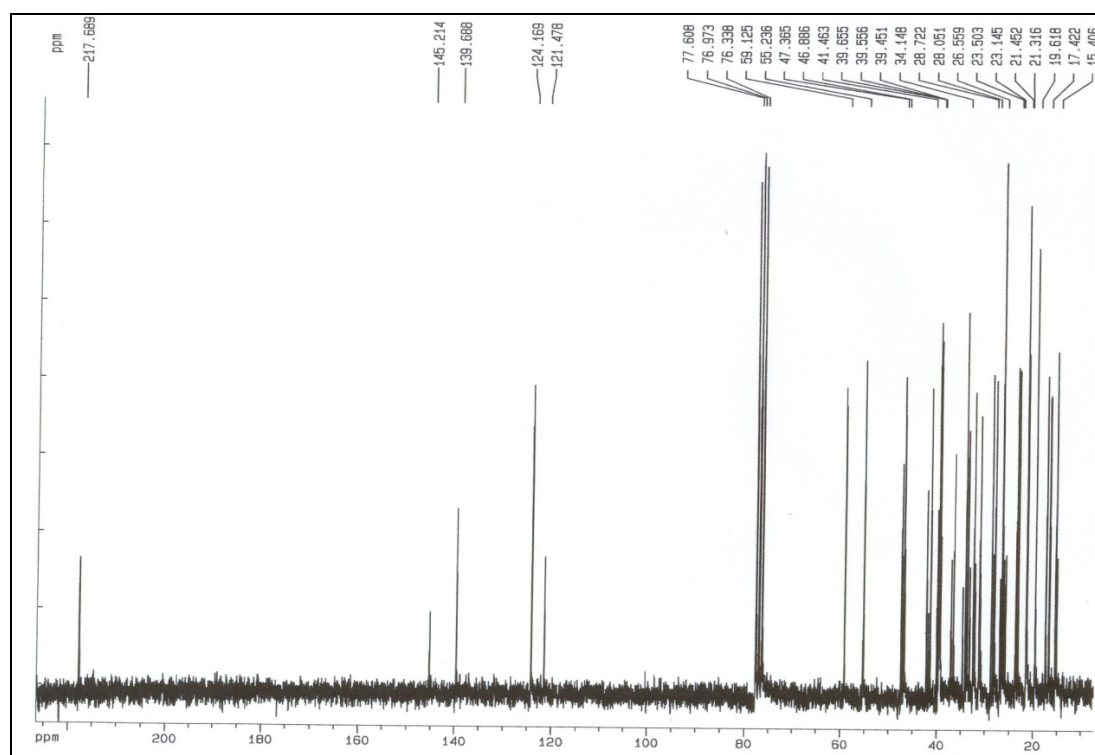


FIGURA 4.103 – Espectro de carbono 13 do produto oxidado (CDCl₃ – 200MHz).

Analisando-se o espectro de hidrogênio (FIGURA 4.102) pode-se observar a ausência do sinal referente ao hidrogênio da hidroxila, o qual poderia ser observado em torno de δ 4,0. Os demais sinais observados referem-se aos hidrogênios do esqueleto do triterpeno.

O sinal obtido em δ 218, no espectro de carbono 13 (FIGURA 4.103), indicou a formação da carbonila, já que se trata de um sinal característico desta função orgânica, que apresenta um elevado deslocamento químico, devido a alta deficiência destes carbonos.

Dessa forma, o produto pode ser caracterizado como sendo a α,β -amirinona, indicando a eficiência da reação (FIGURA 4.104).

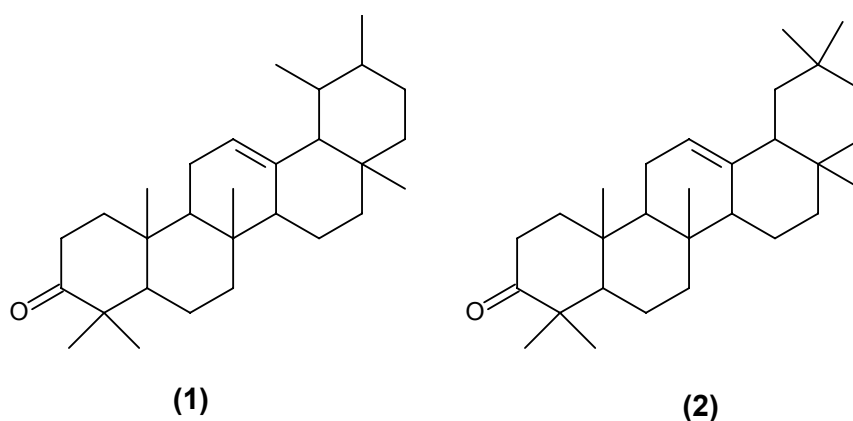


FIGURA 4.104 - Estruturas químicas de (1) α -amirinona e (2) β -amirinona.

4.2.4 – Biotransformação de diversas cetonas por *Penicillium brasilianum*

Devido a alta eficiência do fungo *Penicillium brasilianum* em converter o substrato 1-indanona, partiu-se para a exploração da capacidade enzimática deste fungo em oxidar uma ampla variedade de cetonas (FIGURA 4.105).

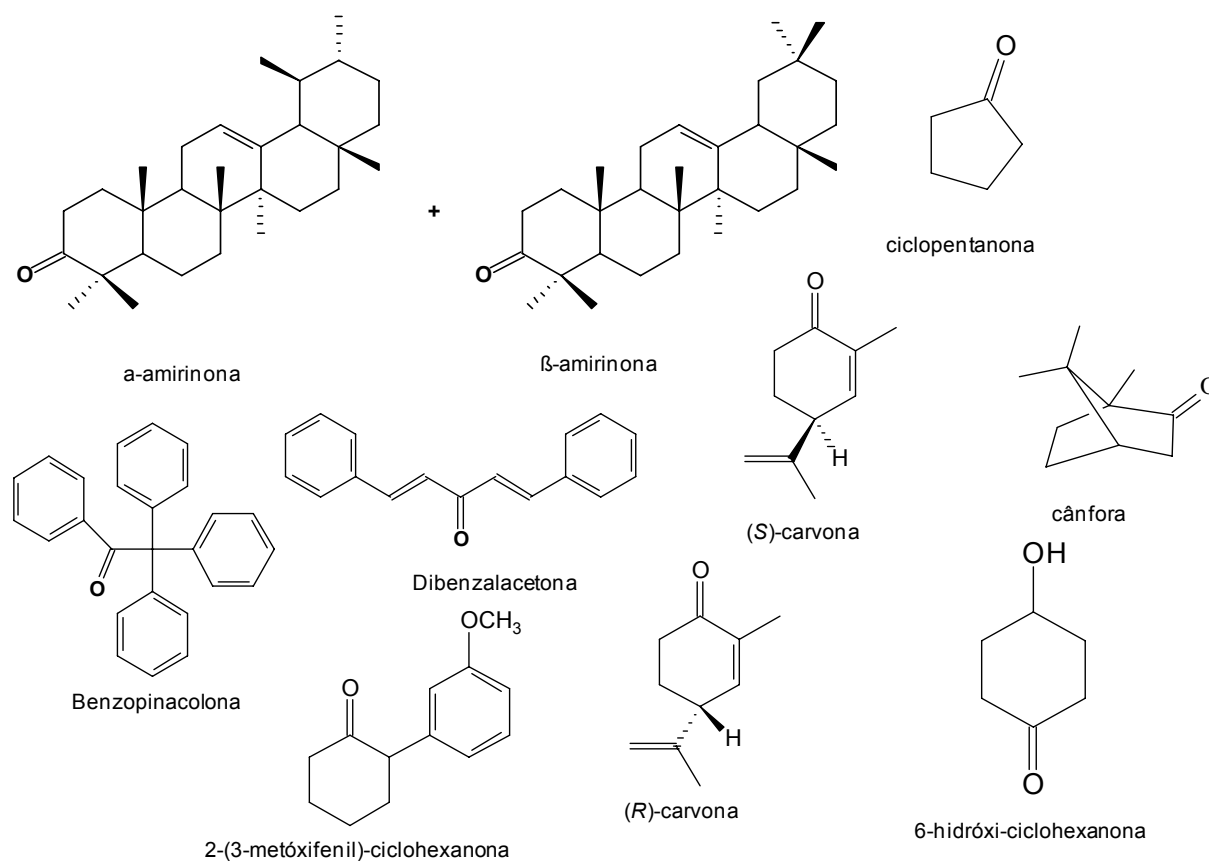


FIGURA 4.105 – Estruturas das cetonas utilizadas no experimento de biotransformação com *Penicillium brasilianum*.

Como descrito no item 3.3.3.5 os substratos foram adicionados a solução tampão de fosfato de sódio. O experimento foi mantido por 12 dias. Os extratos orgânicos (neutro e ácidos) foram previamente analisados via CCDA (FIGURA 4.106).

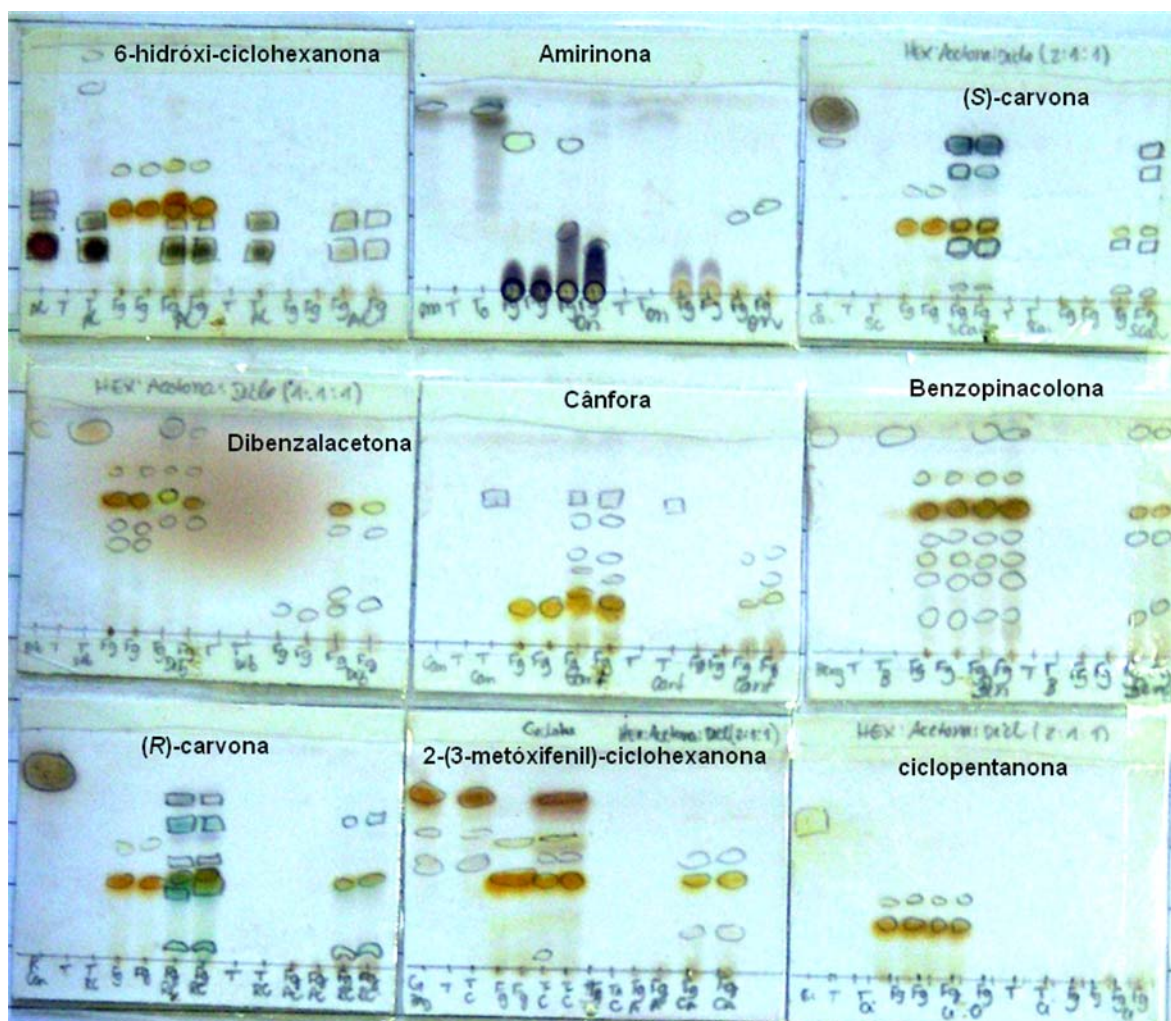


FIGURA 4.106 – CCDAs das amostras obtidas do experimento com as diversas cetonas.

As análises das CCDAs indicaram claramente a biotransformação de alguns dos substratos de partida, como nos casos da (*R*)-carvona e (*S*)-carvona. Algumas das bandas observadas encontram-se ausentes na amostra controle provavelmente por serem produtos oriundos de biotransformação (FIGURA 4.106).

Alguns dos substratos, como a ciclopentanona e dibenzalacetona aparentemente foram completamente consumidos e/ou biotransformados.

Devido a baixa polaridade dos substratos, foram realizadas análises por CLAE/UV-EM somente das amostras contendo dibenzalacetona e benzopinacolona.

As análises com a amostra do controle de benzopinacolona mostraram a estabilidade do substrato no tempo de incubação utilizado para o experimento em solução tampão (FIGURA 4.107).

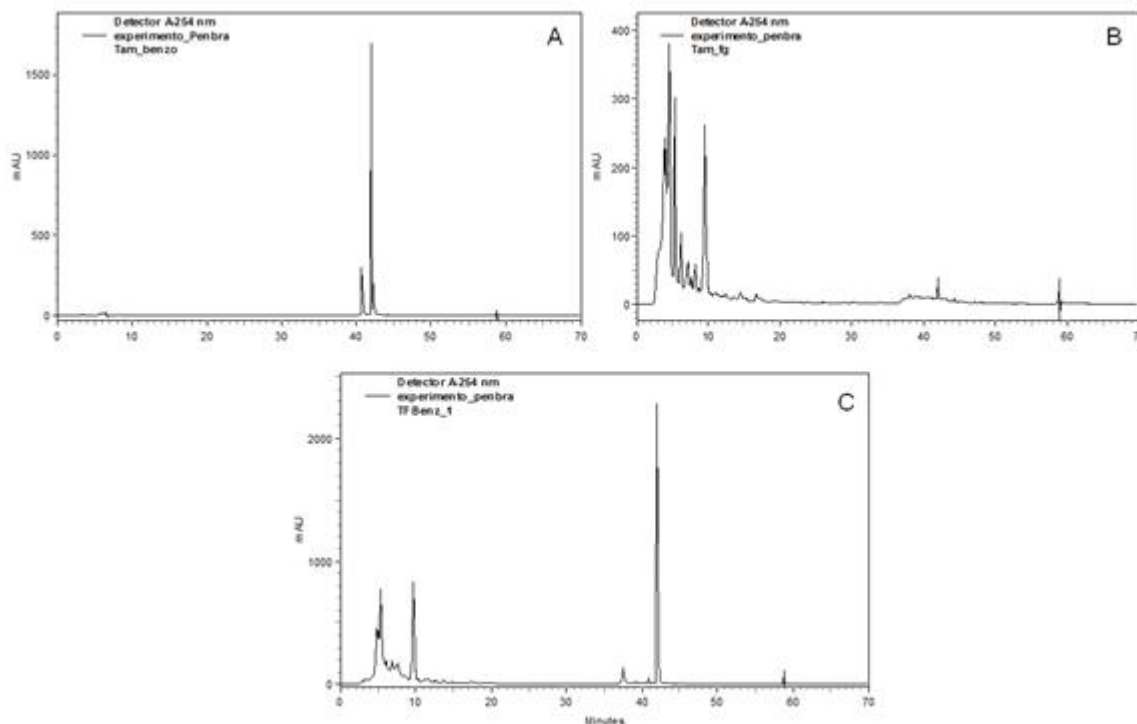


FIGURA 4.107 – Cromatogramas das amostras: **(A)** tampão + benzopinacolona, **(B)** tampão + fungo e **(C)** tampão + fungo + benzopinacolona.

Comparando-se os três cromatogramas apresentados (FIGURA 4.107), observou-se que mesmo após 12 dias de cultivo, o substrato de partida ainda encontrava-se em quantidade considerável na amostra contendo o fungo. A ausência de bandas diferenciadas entre os cromatogramas indicaram a possível inexistência de produtos de biotransformação para o substrato.

Já as amostras do substrato dibenzalacetona também comprovaram a estabilidade do mesmo durante o experimento (FIGURA 4.108).

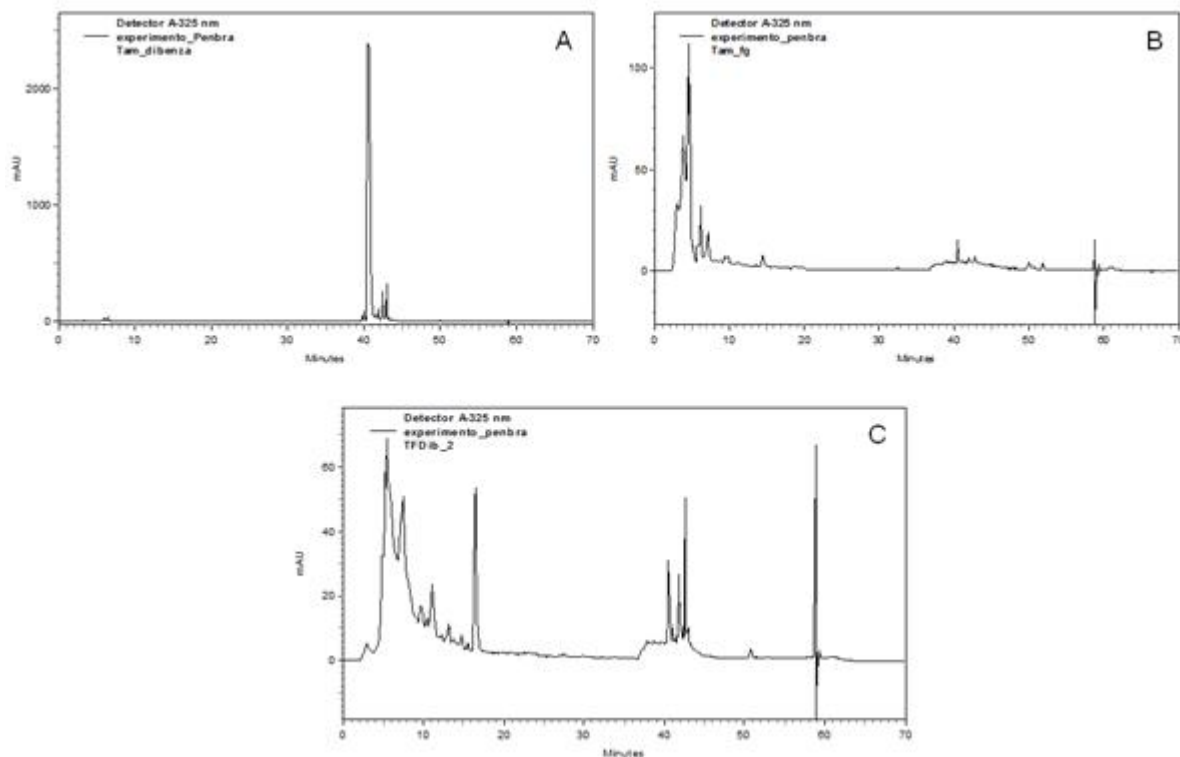


FIGURA 4.108 – Cromatogramas das amostras: **(A)** tampão + dibenzalacetona, **(B)** tampão + fungo e **(C)** tampão + fungo + dibenzalacetona.

Os cromatogramas apresentados ilustraram pequenas diferenças entre as amostras controles (tampão + dibenzalacetona e tampão + fungo) e a amostra contendo o fungo e o substrato (FIGURA 4.108). Infelizmente, devido a baixa quantidade de material obtido, nenhum produto pode ser isolado ou identificado.

As demais cetonas testadas deveriam ser analisadas por CG-EM, porém com o equipamento em manutenção, as amostras ainda não foram analisadas.

4.3 – Triagem para a detecção da enzima Baeyer-Villigerase

A reação de oxidação do substrato 1-indanona por *Penicillium brasilianum* e *Aspergillus flavus* serviu para monitorar a presença da enzima Baeyer-Villigerase, no caso, nos experimentos realizados somente o *Penicillium brasilianum* possuiu a enzima presente.

Como a biotransformação da 1-indanona promoveu a obtenção de dois produtos (oxidação de Baeyer-Villiger e hidroxilação), ambos os produtos foram analisados por CLAE/UV-EM. As técnicas *tandem* por espectrometria de massas

possibilitou a fácil detecção da presença desses produtos em quaisquer amostras analisadas pela simples fragmentação de m/z 149, sendo as bandas detectadas correspondentes aos produtos.

Assim, analisou-se a mistura dos produtos (FIGURA 4.109) através da fragmentação de m/z 149.

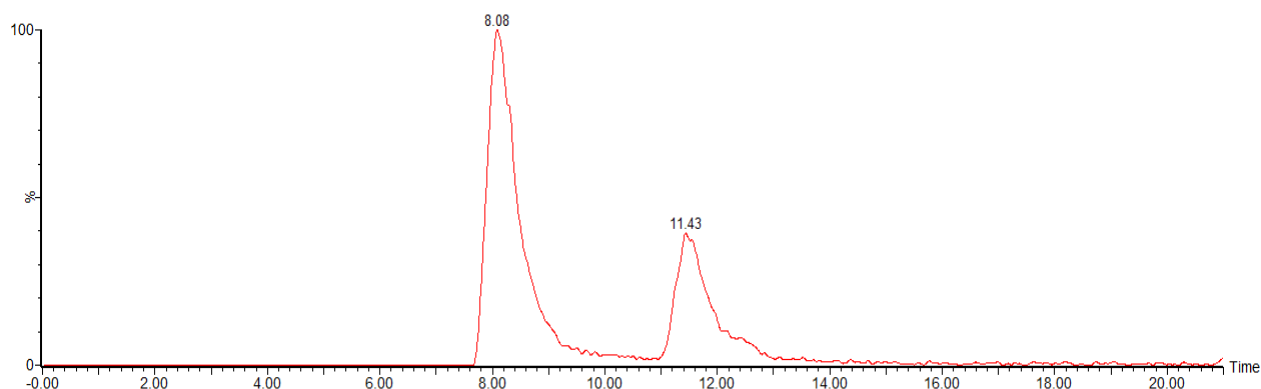


FIGURA 4.109 – Cromatograma da mistura dos produtos de oxidação de Baeyer-Villiger e hidroxilação, pelo experimento de íons fragmentos de m/z 149.

As duas bandas observadas referem-se as substâncias de massas 148 Da, que se fragmentam gerando os espectros de massas característicos dos produtos (FIGURA 4.110).

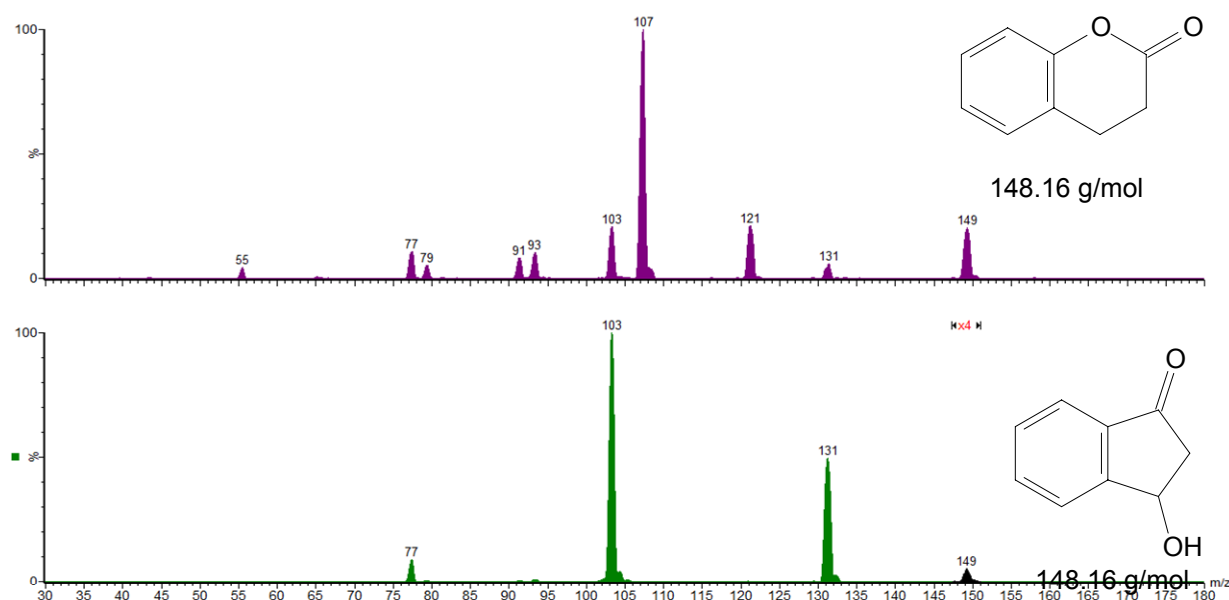


FIGURA 4.110 – Espectros de massas das bandas em 8,08 minutos (produto hidroxilado) e em 11,43 minutos (oxidação de Baeyer-Villiger).

A substância com menor tempo de retenção trata-se do produto hidroxilado, facilmente caracterizado pelo seu espectro de fragmentação. A proposta de fragmentação para o produto identificou todos os íons presentes no espectro (FIGURA 4.111).

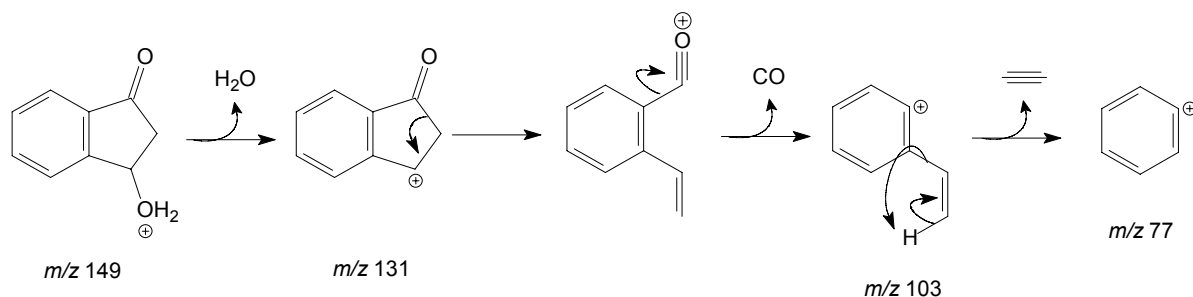


FIGURA 4.111 – Proposta de fragmentação para o produto hidroxilado.

Já a banda observada no tempo de retenção de 11,43 minutos, corresponde ao produto da reação de Baeyer-Villiger. O espectro de íons fragmentos para m/z 149 deste produto foi caracterizado pela presença do pico base em m/z 107 (FIGURA 4.110). A proposta de fragmentação apresentada confirma a detecção deste íon (FIGURA 4.112).

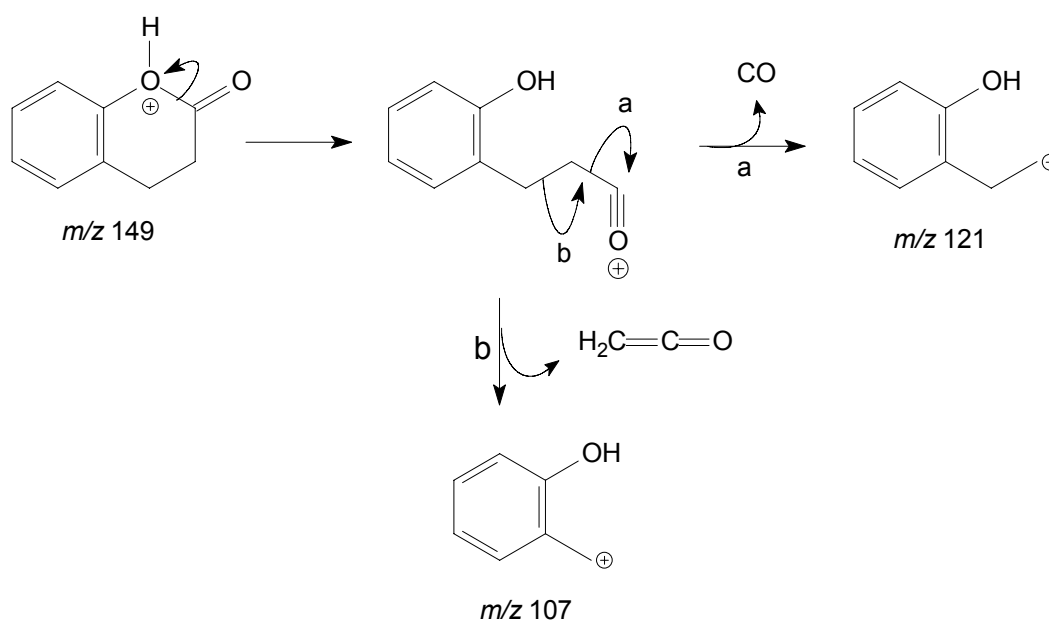


FIGURA 4.112 – Proposta de fragmentação para o produto da reação de Baeyer-Villiger.

Assim, com os espectros de íons fragmentos para os padrões das reações obtidos, realizou-se um experimento com os mais diferenciados tipos de *Penicillium* e *Aspergillus* da micoteca do LaBioMMi para a detecção de atividade oxidativa destes micro-organismos.

O objetivo do experimento seria, principalmente, monitorar a presença de Baeyer-Villigerases, para tanto as amostras obtidas foram todas analisadas por CLAE/UV-EM/EM.

As análises foram realizadas através de íons fragmentos m/z 149, assim as bandas obtidas corresponderiam aos produtos da reação de Baeyer-Villiger e/ou hidroxilado. Os cromatogramas obtidos para as diferentes espécies de *Penicillium* detectaram duas bandas cromatográficas referentes a fragmentação de m/z 149 (FIGURA 4.113).

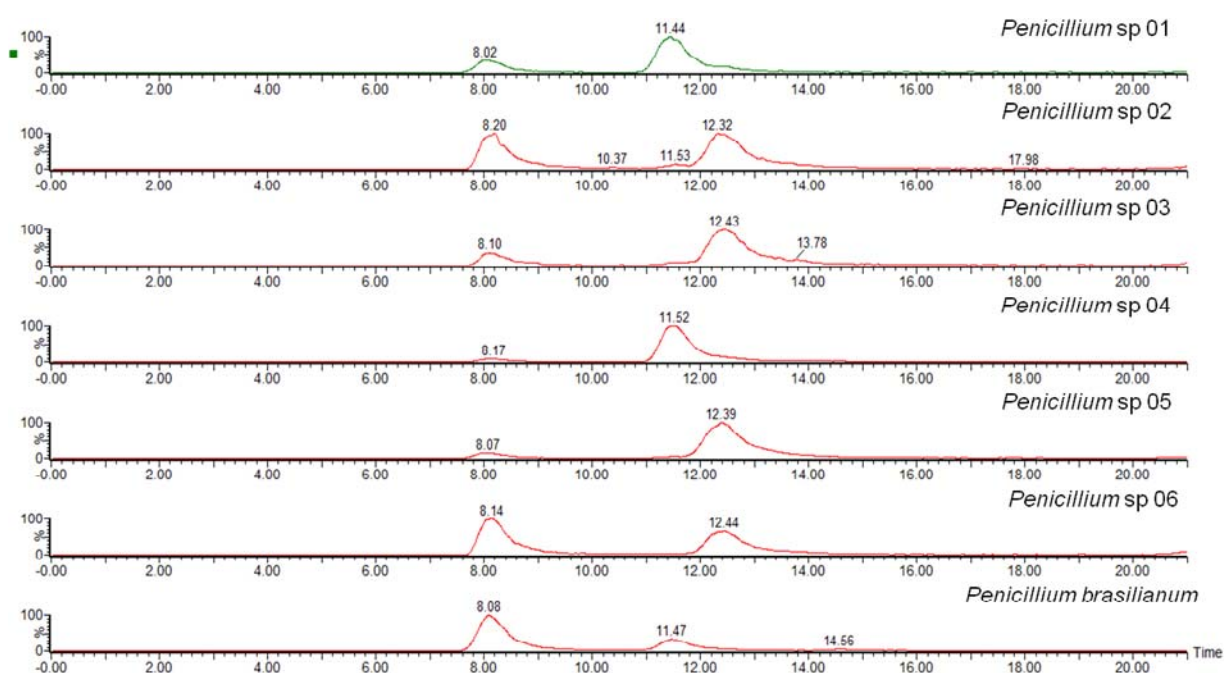


FIGURA 4.113 – Cromatogramas de íons fragmentos de m/z 149 para as espécies de *Penicillium*.

Como detectado nos padrões, as bandas com tempo de retenção em torno de 8,00 minutos referem-se ao produto de hidroxilação, como ilustrado nos respectivos espectros de massas da FIGURA 4.114.

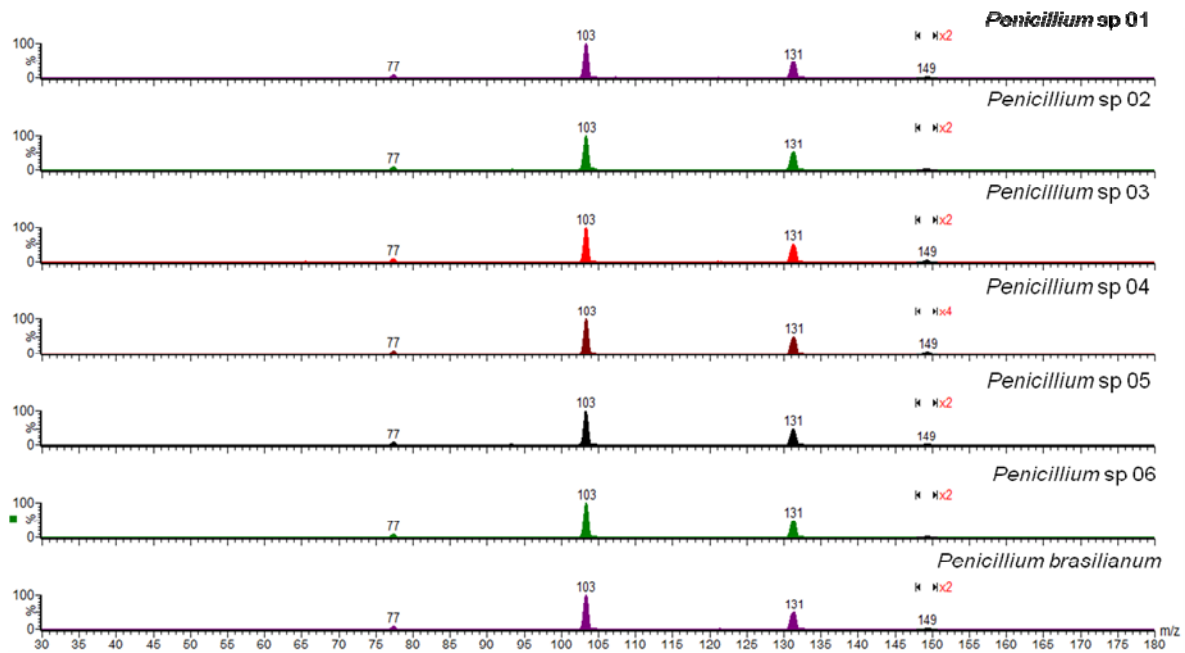


FIGURA 4.114 – Espectros de íons fragmentos de m/z 149 para as bandas com tempo de retenção em torno de 8,00 minutos.

Todas as bandas geraram o mesmo espectro de massas, o que confirmou a reação de hidroxilação em todos os fungos testados. O fungo *Penicillium brasilianum*, já discutido anteriormente, foi utilizado como controle positivo tanto para a reação de hidroxilação quanto a reação de Baeyer-Villiger, a qual para este fungo foi detectada em torno de 11,47 minutos (FIGURA 4.113).

Contudo, somente dois outros fungos *Penicillium* sp 01 e *Penicillium* sp 04 apresentaram a reação de Baeyer-Villiger como o fungo *Penicillium brasilianum*, devido a presença de bandas com o mesmo tempo de retenção e mesmo espectros de íons fragmentos (FIGURAS 4.113 e 4.115).

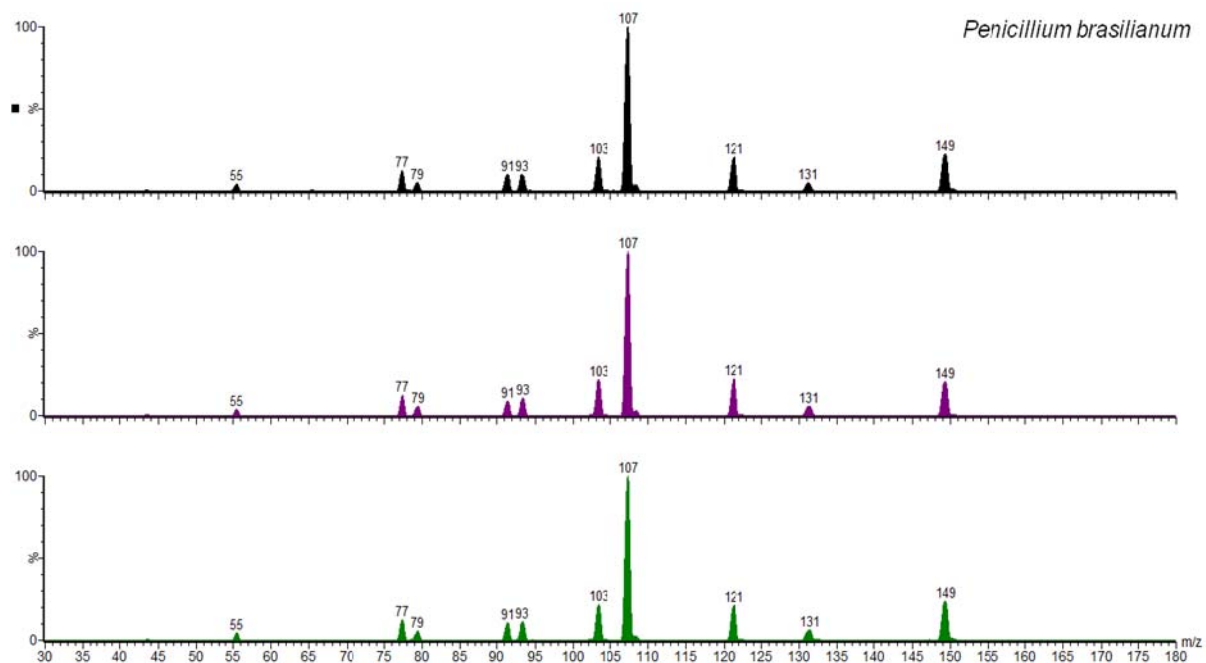


FIGURA 4.115 – Espectros de íons fragmentos para as bandas detectadas em torno de 11,47 minutos (FIGURA 4.113).

As demais bandas observadas com tempos de retenção em torno de 12,30 minutos (FIGURA 4.113), também são correspondentes a substâncias com massas moleculares de 148 (FIGURA 4.116), já que realizou-se experimento de íons fragmentos de m/z 149.

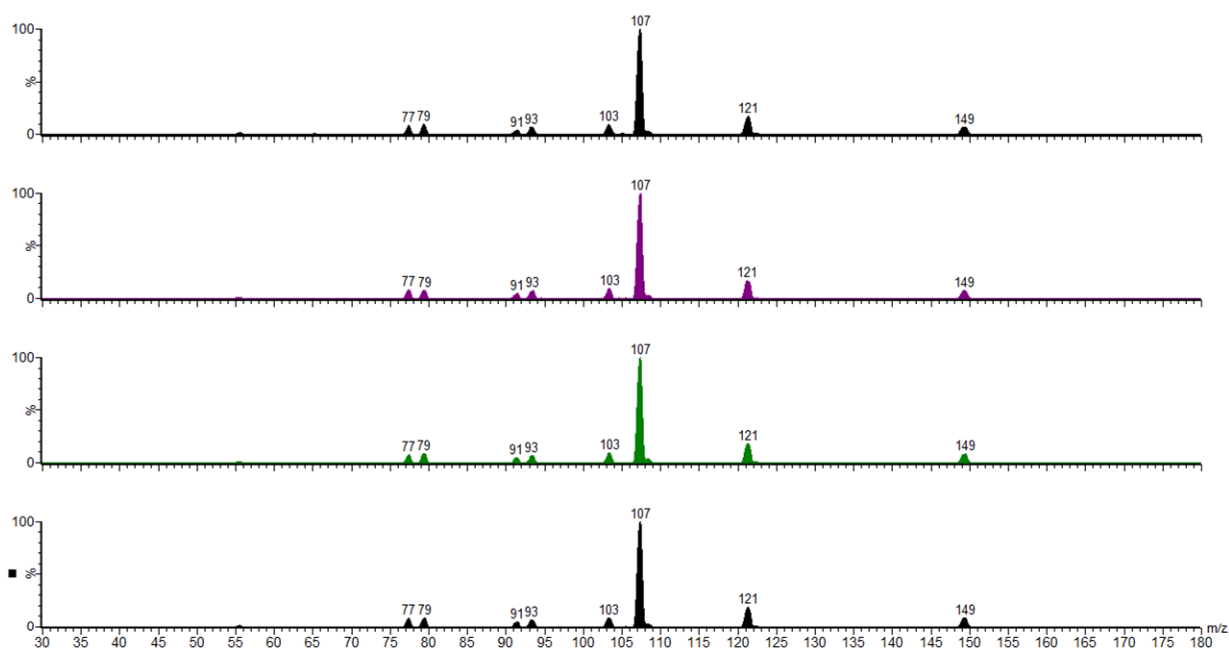


FIGURA 4.116 – Espectros de íons fragmentos para as bandas em torno de 12,30 minutos (FIGURA 4.113).

A diferença observada nos tempos de retenção indicou uma nova possibilidade de biotransformação, contudo a massa molecular obtida e a semelhança existente entre os espectros de íons fragmentos tanto para as bandas em 11,47 minutos (FIGURA 4.115) e 12,30 minutos (FIGURA 4.116), mostraram a similaridade estrutural entre os produtos.

Dessa forma, a diferença nos tempos de retenção pode ser explicada por uma possível reação de Baeyer-Villiger, porém a adição do átomo de oxigênio não seguiu a orientação já observada (FIGURA 4.117).

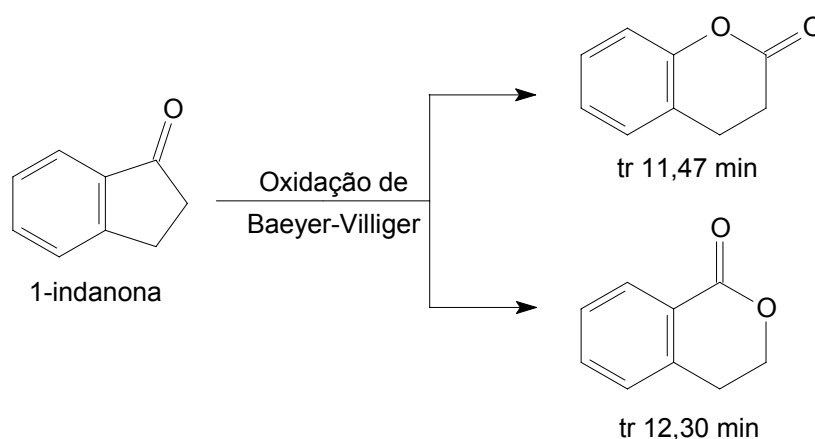


FIGURA 4.117 – Oxidação de Baeyer-Villiger catalisada pelos micro-organismos.

No entanto, a confirmação do novo produto obtido para os demais *Penicillium* testados ainda deve ser investigada, através do isolamento do produto e análises por RMN¹H, o que pode ser observado somente pelo deslocamento que dos hidrogênios metilênicos.

Já para o experimento das diversas espécies de *Aspergillus*, utilizou o fungo *Aspergillus flavus*, já discutido anteriormente, como um controle positivo para a detecção de hidroxilação, uma vez que o mesmo não apresentou a Baeyer-Villigerase ativa. Os cromatogramas de íons fragmentos de m/z 149 indicaram a presença dos produtos de oxidação (FIGURA 4.118).

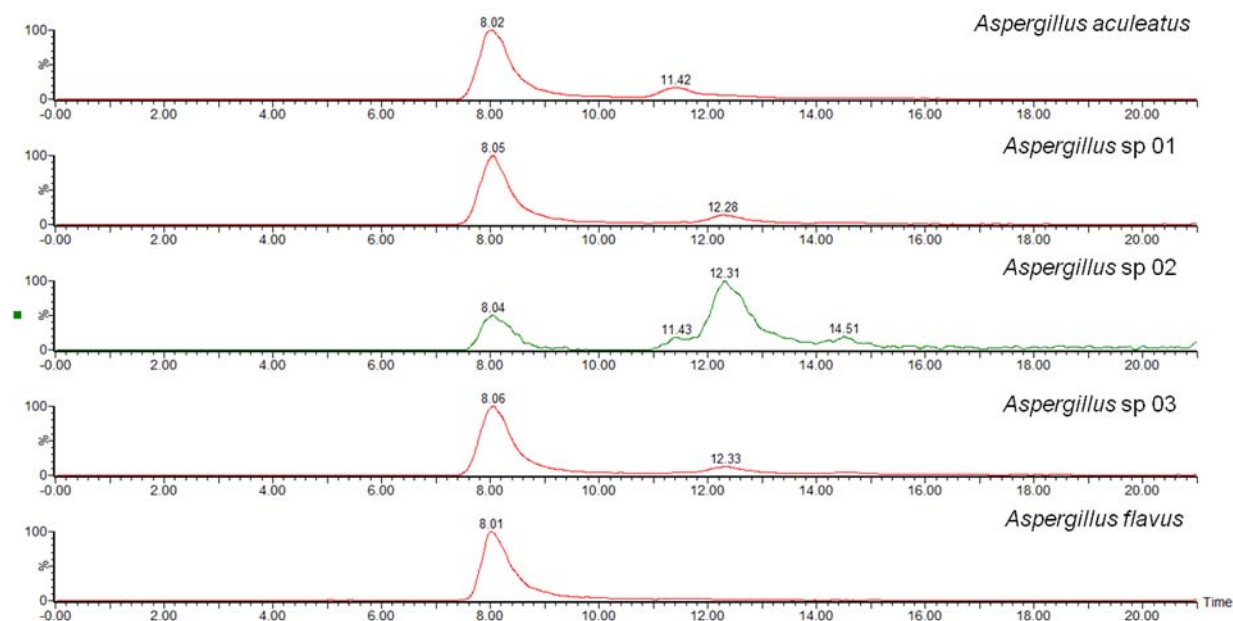


FIGURA 4.118 – Cromatogramas de íons fragmentos de m/z 149 para as espécies de *Aspergillus*.

Como observado para o fungo *Aspergillus flavus*, a banda em torno de 8,00 minutos corresponde ao produto de hidroxilação. Os espectros de massas correspondentes às bandas observadas neste mesmo tempo de retenção encontram-se ilustradas na FIGURA 4.119.

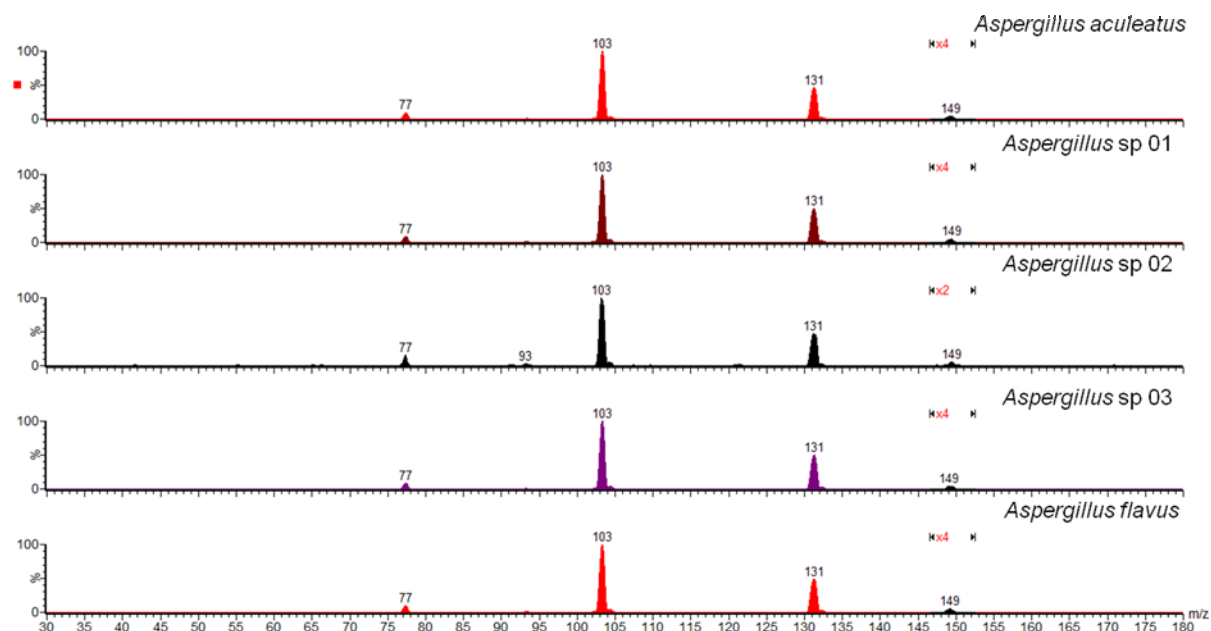


FIGURA 4.119 – Espectros de massas para as bandas em 8,00 minutos (FIGURA 4.118).

Dessa forma, todos os fungos testados foram capazes de realizar a hidroxilação do substrato 1-indanona. Entretanto, diferentemente do fungo *Aspergillus flavus*, os demais *Aspergillus* apresentaram bandas em torno de 11,42 minutos (*Aspergillus aculeatus*) e em torno de 12,30 minutos (demais *Aspergillus*) como ilustrado na FIGURA 4.118. As bandas observadas, de acordo com os respectivos espectros de massas correspondem a reação de oxidação Baeyer-Villiger (FIGURA 4.120).

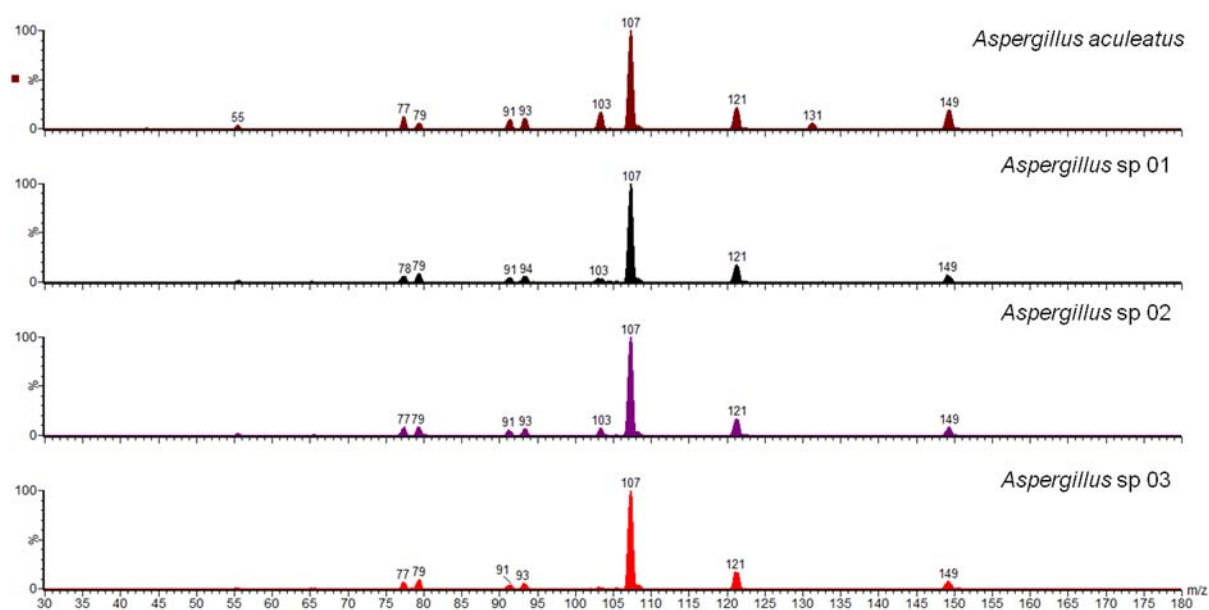


FIGURA 4.120 – Espectros de massas para as bandas em 11,42 minutos e 12,30 minutos (FIGURA 4.119).

Somente o fungo *Aspergillus aculeatus* apresentou a seletividade diferenciada dos demais fungos. A banda em 11,42 minutos corresponde a lactona, onde o átomo de oxigênio está ligado diretamente ao anel aromático (FIGURA 4.117).

A seletividade da reação de Baeyer-Villiger é de extrema importância para a obtenção das mais diferenciadas lactonas, principalmente quando se trata da seletividade oposta àquela obtida em sínteses clássicas. Normalmente, o mecanismo da reação de Baeyer-Villiger envolve a adição do perácido à carbonila da cetona (ou aldeído), seguida de migração de um dos grupos (R^1 ou R^2) para o átomo de oxigênio do perácido, acompanhada de clivagem da ligação peróxido (O-O) e regeneração da carbonila (FIGURA 4.121).

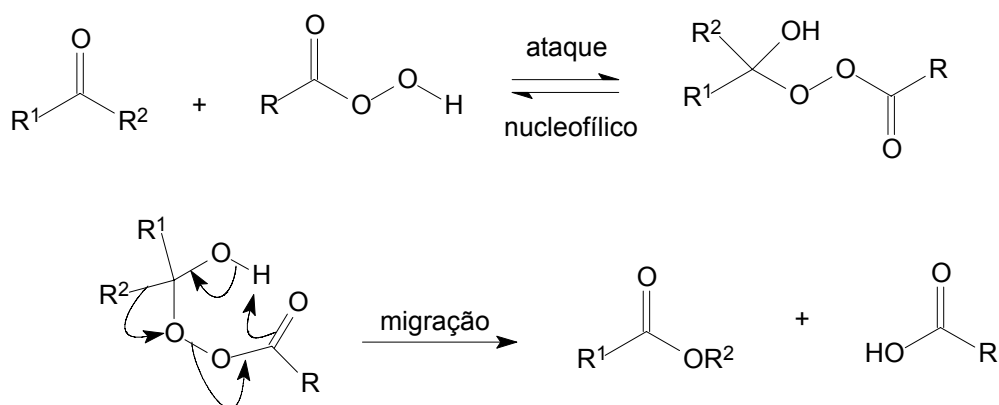


FIGURA 4.121 – Mecanismo de reação de oxidação de Baeyer-Villiger.

A migração do grupo substituinte segue dos mais ricos em elétrons, ou seja, dos grupos mais substituídos para os menos substituídos. Portanto, as oxidações observadas para as bandas nos tempos de retenção em 12,30 minutos indicam a obtenção não clássica dessa oxidação, o que dificilmente se observa em sínteses.

A obtenção dessas enzimas, portanto, seria de grande valia para estudos de lactonização de substâncias.

Como todos os fungos do gênero *Aspergillus* apresentaram a enzima Baeyer-Villigerase ativa exceto o fungo *Aspergillus flavus*, resolveu-se realizar um novo experimento com o fungo *Aspergillus flavus*, porém utilizando-se a agitação com o objetivo de aumentar a oxigenação do meio de cultura e ainda ressuspendeu-se as células em solução tampão contendo o substrato 1-indanona (item 3.3.5.2).

As amostras foram analisadas como as amostras anteriores, ou seja, monitoraram-se os fragmentos de m/z 149 (FIGURA 4.122).

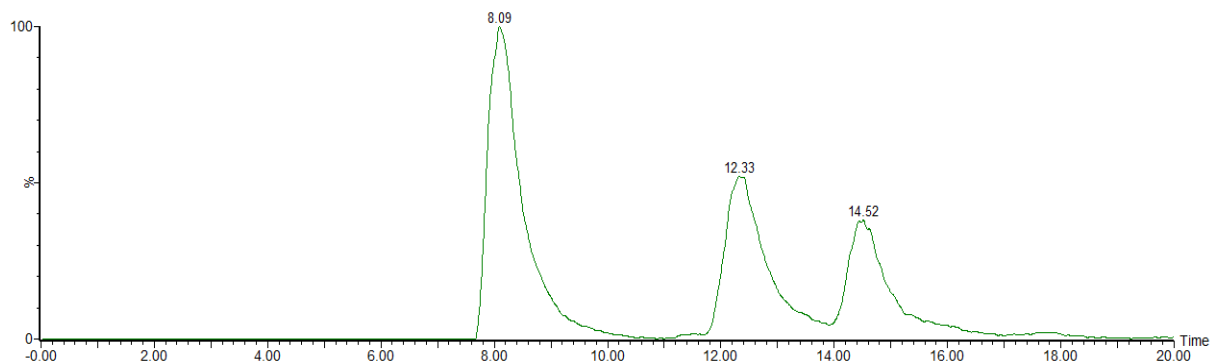


FIGURA 4.122 – Cromatograma de íons fragmentos de m/z 149 para a amostra do fungo *Aspergillus flavus* em solução tampão.

Como o observado, três bandas foram detectadas para íons fragmentos de m/z 149. A banda em 8,09 minutos corresponde ao produto hidroxilado, já a banda em 12,33 minutos corresponde ao produto de oxidação de Baeyer-Villiger, como observado para os demais *Aspergillus*. Os respectivos espectros de massas confirmam os produtos (FIGURA 4.123).

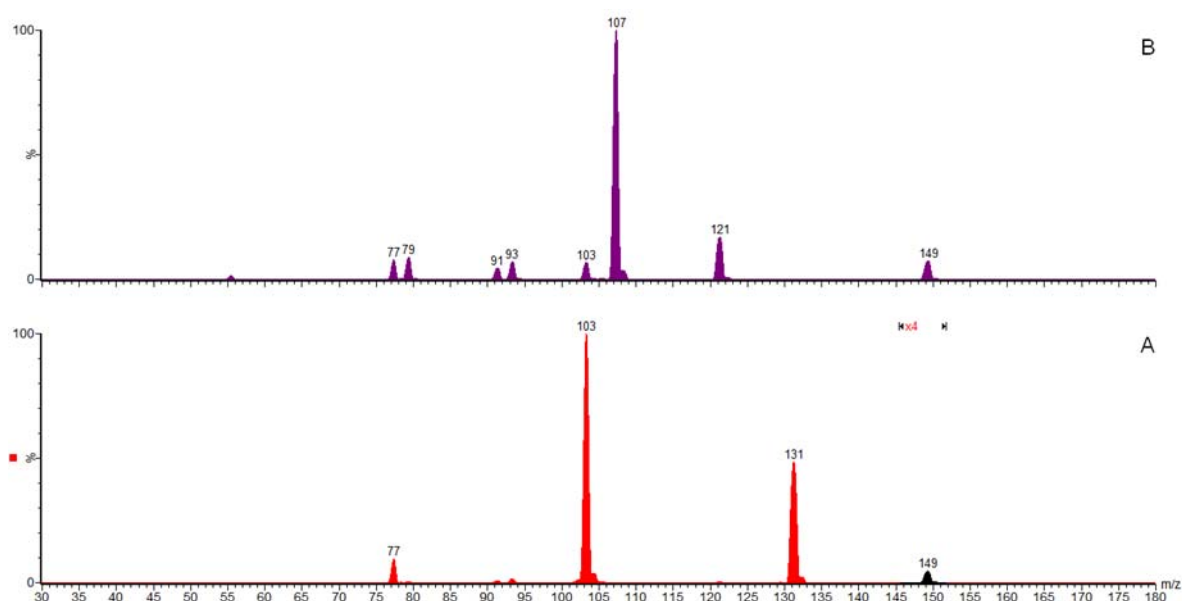


FIGURA 4.123 – Espectros de massas para as bandas em (A) 8,09 minutos e (B) 12,33 minutos (FIGURA 4.122).

Porém, em 14,52 minutos (FIGURA 4.122) obteve-se outra banda para a fragmentação de m/z 149. O espectro de massas para a banda encontra-se ilustrado na FIGURA 4.124.

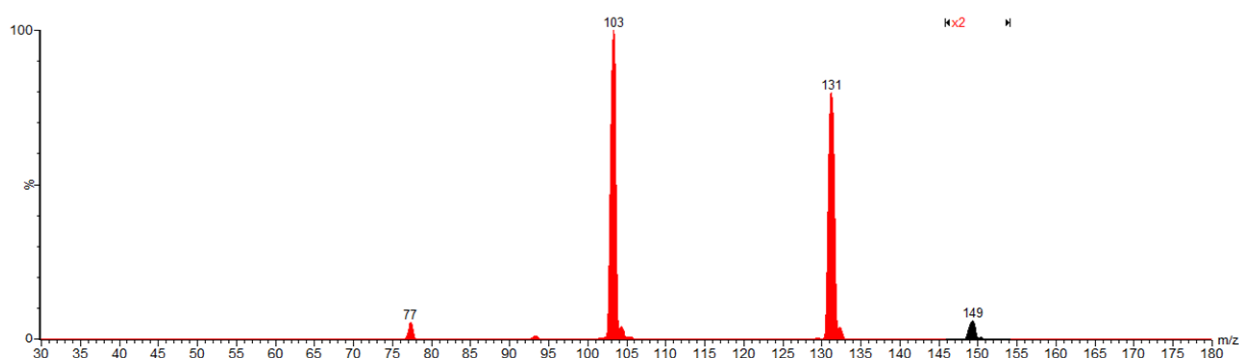


FIGURA 4.124 – Espectro de massas para a banda em 14,52 minutos (FIGURA 4.122).

De acordo com o espectro de massas obtido (FIGURA 4.124), pode-se observar a grande semelhança entre este e o espectro para o produto hidroxilado (FIGURA 4.123 A). Contudo, a diferença do tempo de retenção entre os dois compostos pode ser atribuída a interação intramolecular do hidrogênio da hidroxila com a carbonila, sendo a hidroxila introduzida no carbono α carbonílico (FIGURA 4.125).

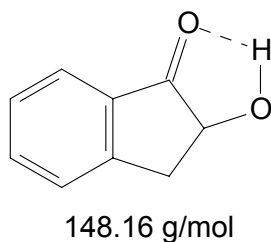


FIGURA 4.125 – Estrutura proposta para a segunda hidroxilação observada.

A interação observada provocaria a maior retenção do composto e portanto o tempo de retenção obtido foi em 14,52 minutos (FIGURA 4.122).

Dessa forma, com a simples agitação foi detectado para o fungo *Aspergillus flavus* a capacidade de oxidar a 1-indanona de três diferentes maneiras (dois produtos hidroxilados e a lactona). Assim, a enzima Baeyer-Villigerase se tornou ativa com a maior oxigenação do meio.

Portanto, as enzimas Baeyer-Villigerase encontram-se ativas nos diversos micro-organismos testados, porém suas seletividades variam de espécie para espécie, o que torna o estudo dessas reações ainda mais interessante.

4.4 – Experimentos de biotransformação utilizando *Aspergillus aculeatus*

Em estudos realizados sobre o metabolismo secundário do micro-organismo *Aspergillus aculeatus*¹⁴⁶(FIGURA 4.126), observou-se que o mesmo possui uma notável habilidade de produzir substâncias dimerizadas, como por exemplo, orlandina (**1**), kotanina (**2**), fonseciona A (**3**), e fonseciona B (**4**) (FIGURA 4.127).

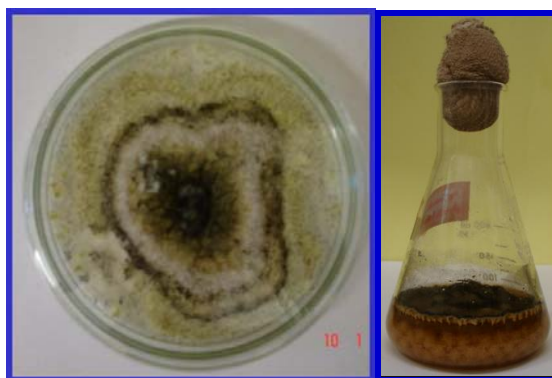


FIGURA 4.126 – *Aspergillus aculeatus*.

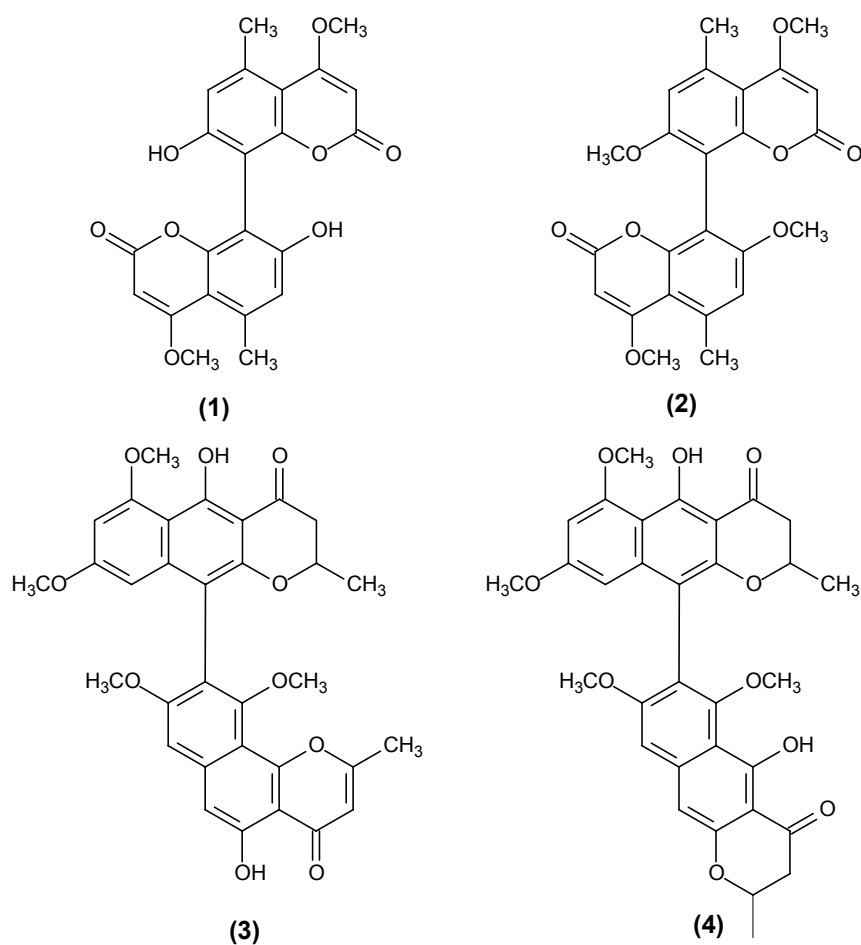


FIGURA 4.127 – Estrutura química dos dímeros isolados de *Aspergillus aculeatus*: (1) orlandina, (2) kotanina, (3) fonseciona A e (4) fonseciona B.

Na tentativa de investigar quais seriam os monômeros produzidos por este fungo, Rodrigues (2006)¹⁴⁷ realizou experimentos monitorados por dias e horas de cultivo, mas nenhum monômero foi isolado, nem ao menos identificado. Ou seja, assim que os primeiros produtos eram formados, estes já apresentavam-se na forma de dímeros.

O fato observado despertou interesse, pois alguma enzima muito eficaz para a formação de dímeros deveria ser produzida pelo micro-organismo, para que mesmo em pequeníssimas quantidades o fungo já fosse capaz de produzir os dímeros como produtos principais do seu metabolismo.

Buscando a capacidade de dimerização da(s) enzima(s) foram realizados experimentos de biotransformação utilizando substâncias fenólicas e análogas, as quais são propícias formadoras de dímeros. A FIGURA 4.128 ilustra a estrutura das substâncias utilizadas.

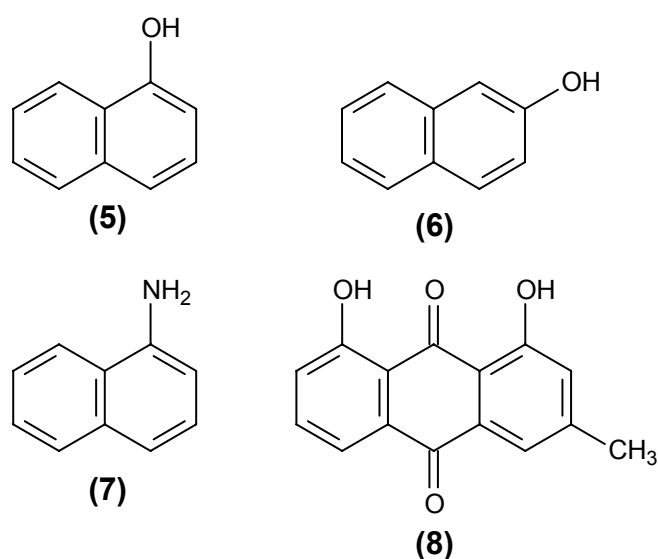


FIGURA 4.128 – Estrutura química das substâncias (5) α -naftol, (6) β -naftol, (7) α -naftilamina e (8) crisofanol.

Para o primeiro experimento foram utilizados 15 frascos de Erlenmeyers (como descrito no item 3.3.4), contendo 100 mL de meio líquido Czapek's e 20 mg dos substratos α -naftol, β -naftol e α -naftilamina, enquanto do substrato crisofenol foram utilizados 5 mg. Ao término do cultivo os frascos foram extraídos e foram obtidas, três amostras de cada grupo de frascos segundo as extrações: ácida, básica e neutra. Em seguida, as amostras foram submetidas a análises por CLAE/UV-EM, de acordo com o método descrito no item 3.3.4.1.

Iniciou-se as análises com as amostras contendo o substrato β -naftol + meio e β -naftol + meio + fungo (FIGURA 4.129).

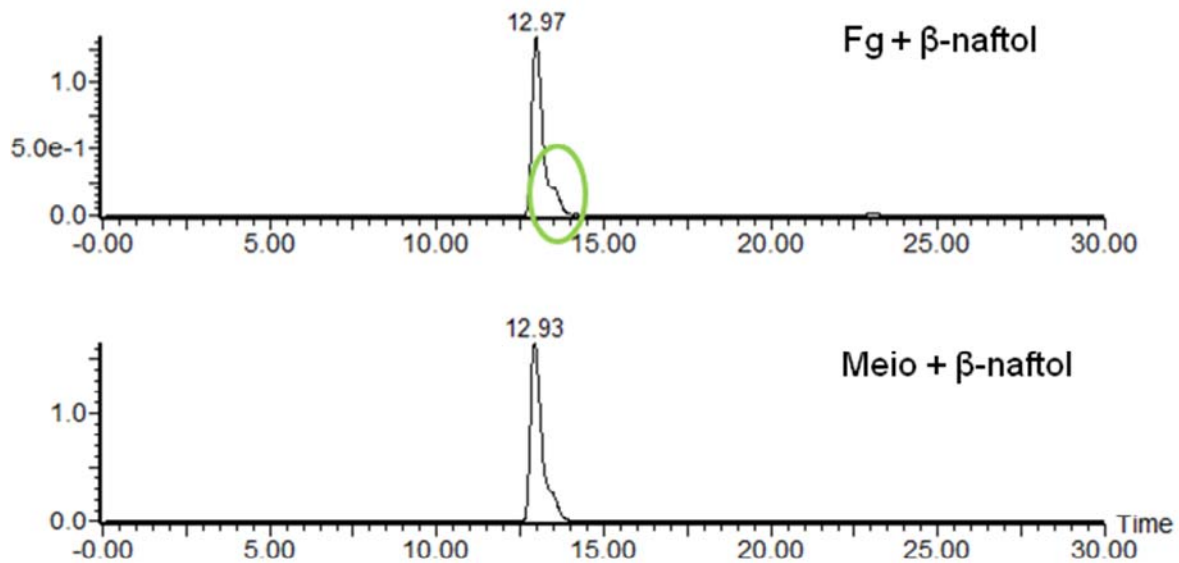


FIGURA 4.129 – Cromatogramas das amostras contendo meio + β -naftol e meio + β -naftol + fungo.

Comparando-se ambos os cromatogramas, observou-se uma sutil diferença (assinalada em verde – FIGURA 4.129) entre os mesmos. Os espectros de massas gerados a partir das duas bandas obtidas para o cromatograma da amostra contendo fungo e substrato e apresentaram em 12,97 minutos o íon m/z 143, referente ao substrato padrão β -naftol (144 Da), FIGURA 4.130.

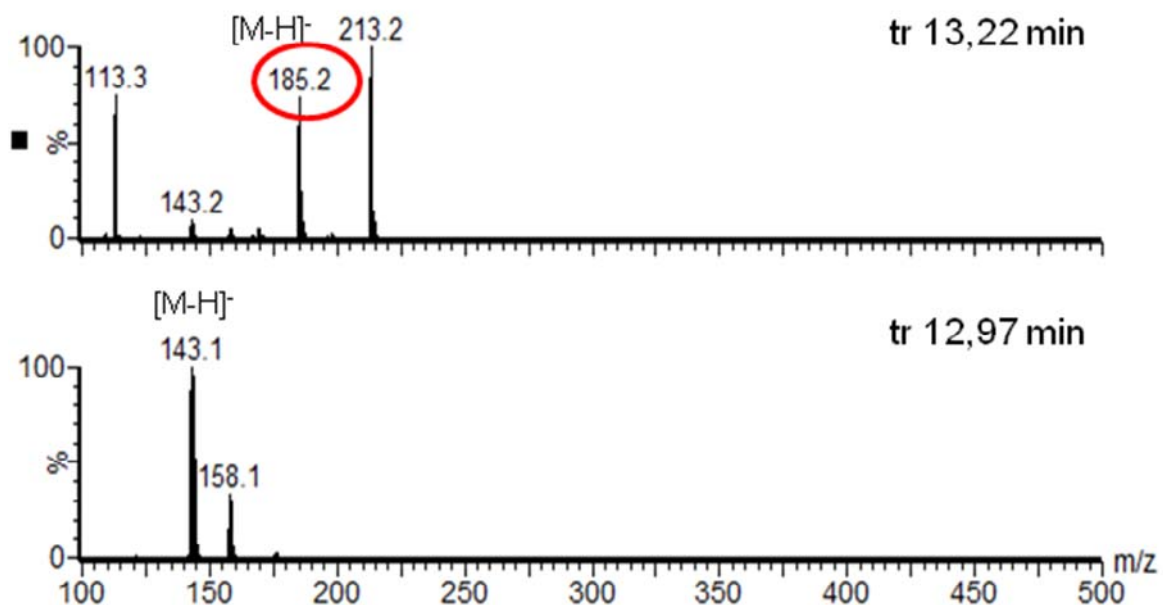


FIGURA 4.130 – Espectros de massas para as bandas obtidas no cromatograma do fungo + β -naftol (FIGURA 4.129).

Como já observado em análises prévias por CCDA, o substrato não foi consumido completamente pelo micro-organismo, sendo este, portanto, detectado na amostra contendo meio + fungo + substrato. Contudo, a banda observada em 13,22 minutos, ausente na amostra do controle (meio + β -naftol), apresentou como possível íon *quasi* molecular m/z 185 (FIGURA 4.130).

O provável composto biotransformado apresentava uma diferença de 42 unidades de massa ($186 - 144 = 42$) do substrato padrão. Um possível grupo de 42 Da é o cetil ($-\text{COCH}_3$).

A adição de grupo cetil em um composto via biotransformação pode ter ocorrido por uma simples reação de acetilação (FIGURA 4.131).

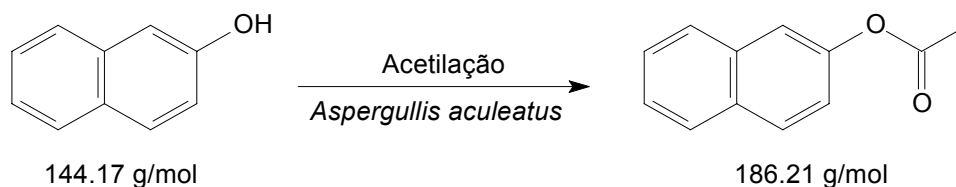


FIGURA 4.131 – Reação de acetilação por *Aspergillus aculeatus*.

Entretanto, sabe-se que o composto gerado (naftil acetato – 186 Da) pode sofrer um rearranjo de Fries, onde o grupo cetil encontra-se localizado no anel aromático (FIGURA 4.132).

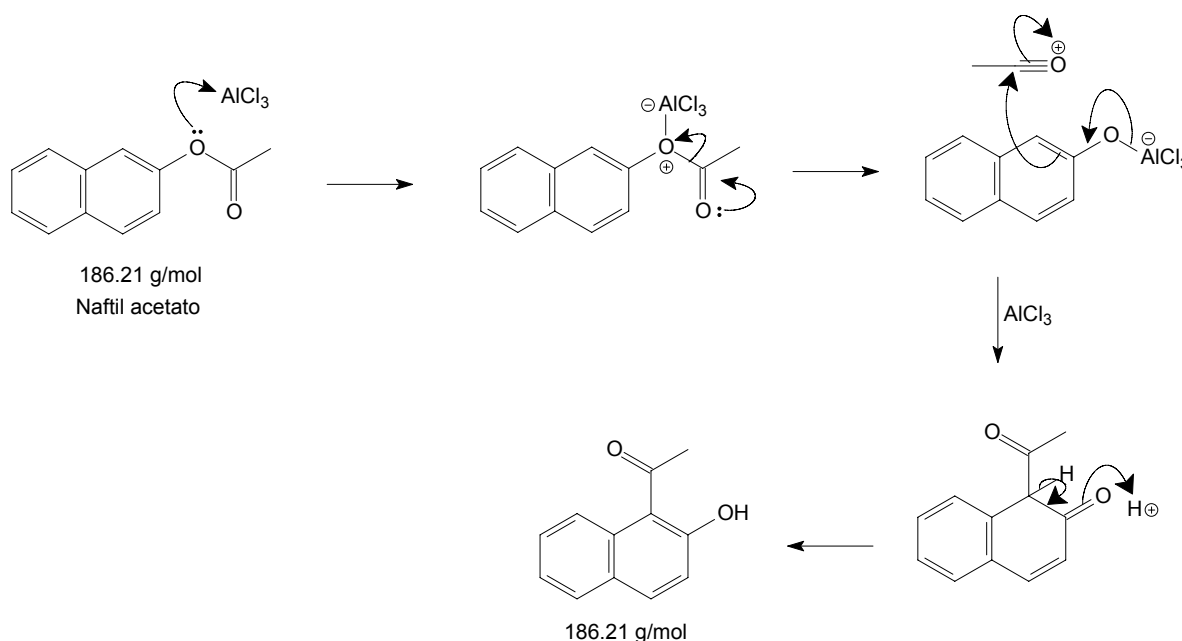


FIGURA 4.132 – Rearranjo de Fries para o composto naftil acetato.

Assim, tornaram-se necessárias análises dos padrões de cada um dos possíveis produtos para a comparação com os extratos obtidos do experimento. Ambos os compostos, naftil acetato e o produto do rearranjo de Fries, foram obtidos junto ao laboratório de ensino do Departamento de Química da UFSCar.

A amostra obtida do extrato orgânico do experimento foi submetida a purificação por CCDP, sendo uma fração isolada, a qual foi analisada por CLAE/UV-EM e comparada com as amostras padrões, principalmente com relação ao tempo de retenção (FIGURA 4.133).

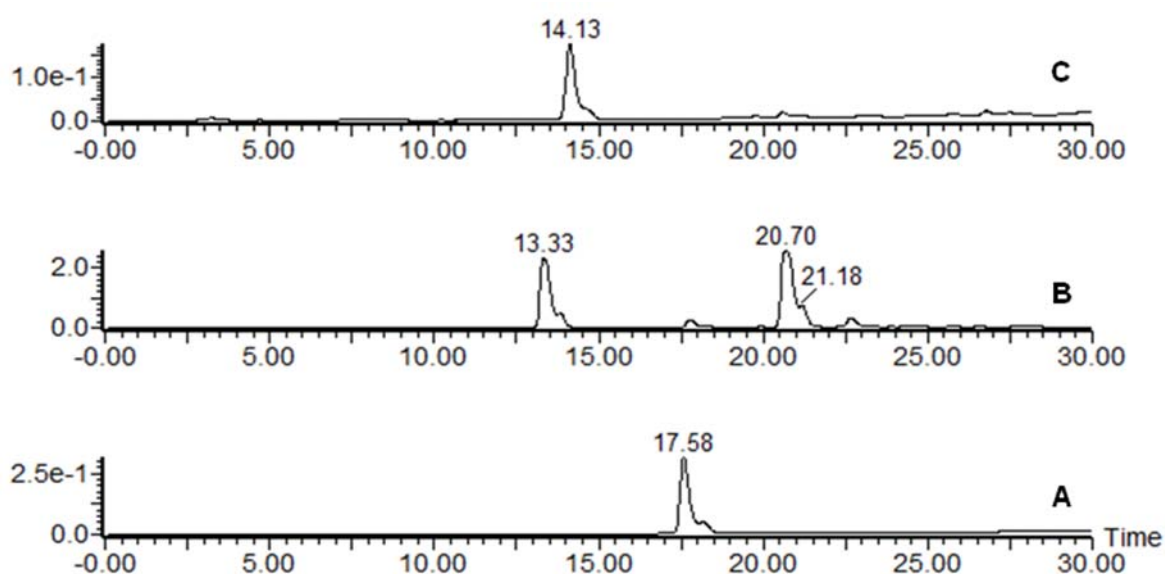


FIGURA 4.133 – Cromatogramas obtidos para as amostras: **(A)** naftil acetato, **(B)** produto do rearranjo de Fries e **(C)** fração biotransformada.

Como pode-se observar, o cromatograma B (FIGURA 4.133) referente a amostra do produto do rearranjo de Fries, apresentou diversas bandas. As impurezas observadas foram atribuídas a falta de purificação do produto após a reação.

Os espectros de massas de cada uma das bandas referentes as amostras (FIGURA 4.133) mostraram como o esperado a detecção do íon m/z 185 (FIGURA 4.134) em todas as bandas processadas.

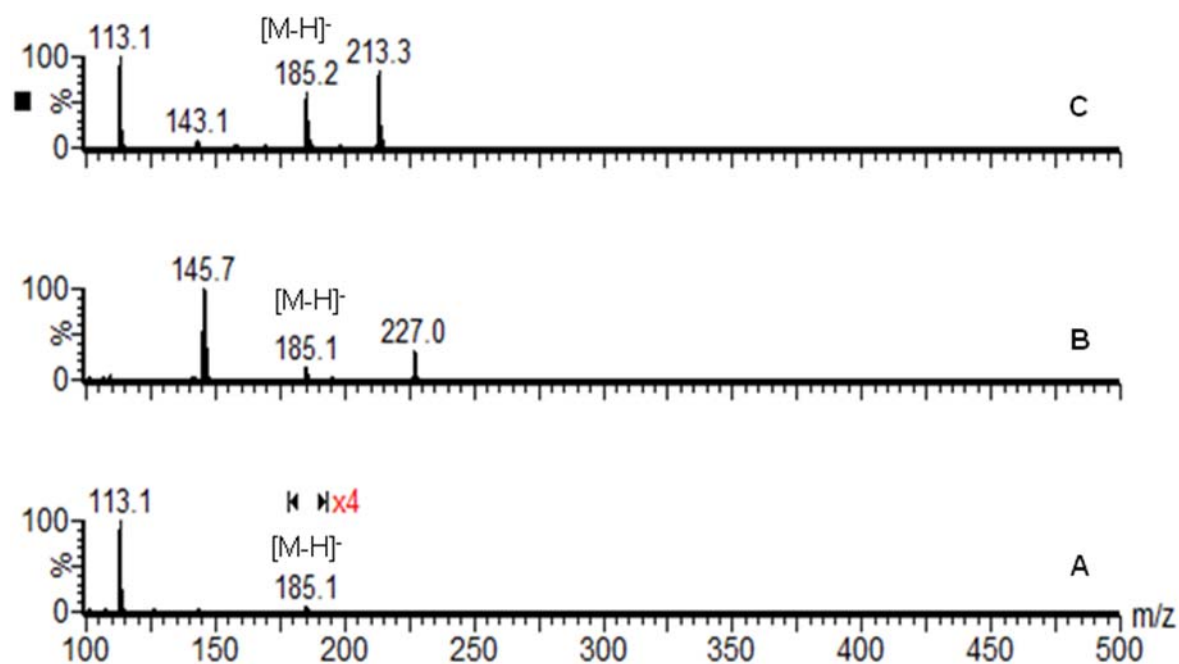


FIGURA 4.134 – Espectros de massas das amostras: **(A)** naftil acetato, **(B)** produto do rearranjo de Fries e **(C)** fração biotransformada.

Os dados obtidos indicaram provavelmente que a fração biotransformada trata-se de um produto de rearranjo de Fries ao invés da acetilação, já que o tempo de retenção das amostras são muito próximos (rearranjo de Fries 13,33 min e fração biotransformada 14,12 min, FIGURA 4.133). A pequena diferença observada no tempo de retenção de ambas as amostras pode estar relacionada a grande quantidade de substâncias presente na amostra contendo o produto de rearranjo de Fries. Interações intermoleculares podem afetar o tempo de retenção do composto em relação a amostra contendo o mesmo composto, mas purificado.

Os espectros de massas (FIGURA 4.134) confirmam a massa molecular do composto obtido (186 Da – m/z 185). Contudo para afirmar a semelhança estrutural entre as amostras, tornou-se necessário realizar experimentos de íons fragmentos do íon m/z 185 para ambas as amostras (FIGURA 4.135), com a finalidade de se confirmar se tratam-se do mesmo composto.

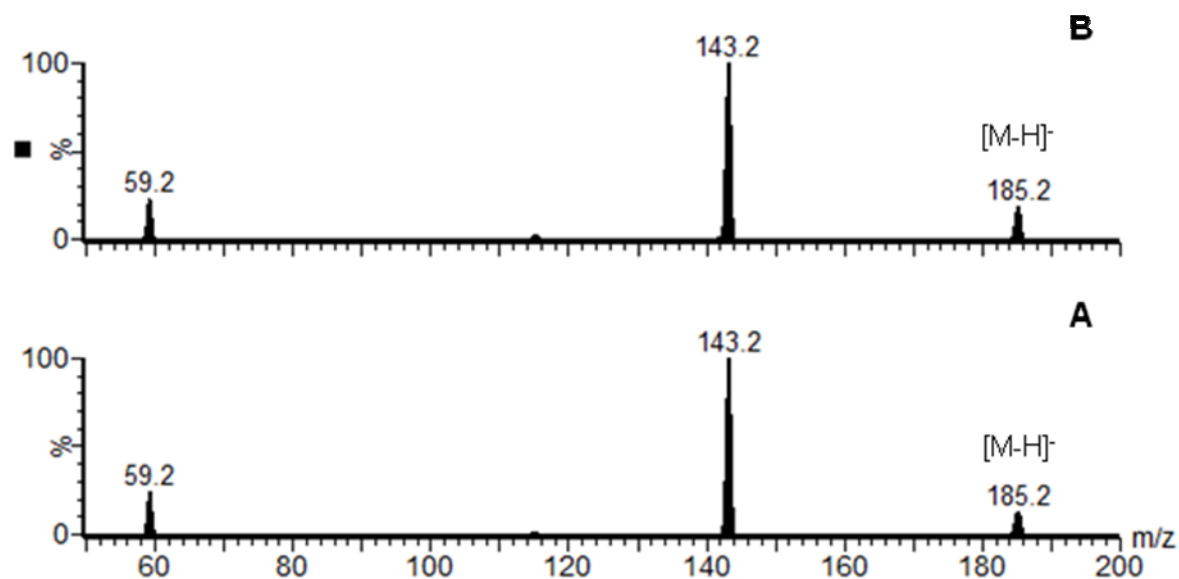


FIGURA 4.135 – Espectros de íons fragmentos de m/z 185 para as amostras: (A) produto do rearranjo de Fries e (B) fração biotransformada.

Como observado, os espectros obtidos para o experimentos de íons fragmentos (FIGURA 4.135) mostraram, com clareza, a semelhança estrutural entre as amostras, pois apresentaram o mesmo perfil de fragmentação. Assim, uma proposta de fragmentação foi elucidada para o composto analisado (FIGURA 4.136).

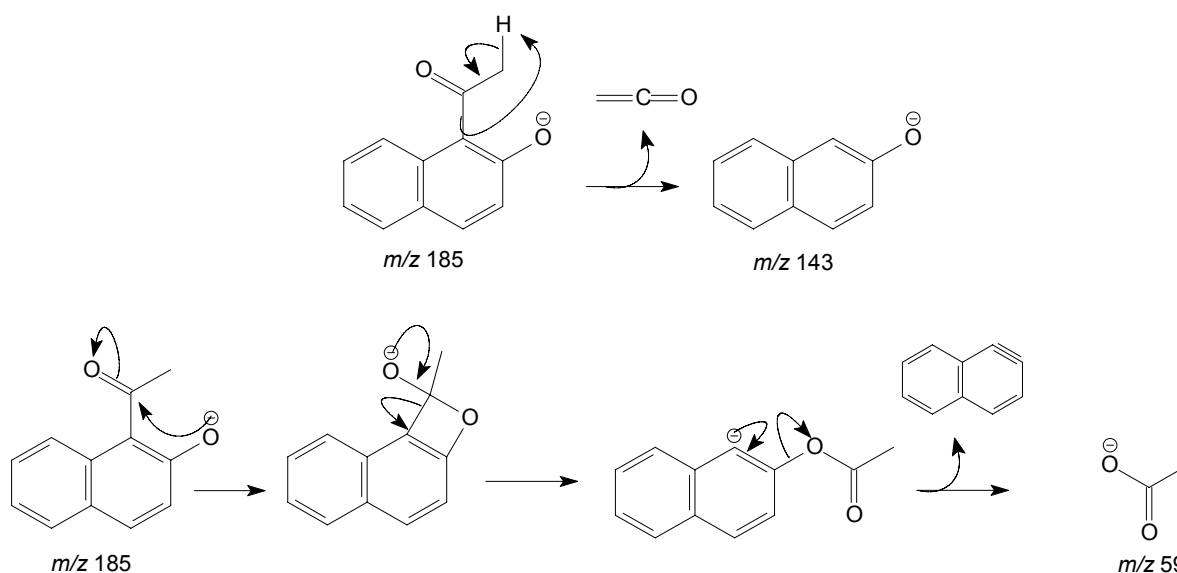


FIGURA 4.136 – Mecanismo de fragmentação proposto.

Dessa forma, tanto o pico base (m/z 143) quanto o íon m/z 59 foram identificados, sendo portanto a fração biotransformada um produto de rearranjo de Fries ao invés de reação de acetilação.

A posição do grupo cetil no produto biotransformado (FIGURA 4.136) foi indicada no carbono α do β -naftol. Tal afirmação foi obtida através dos sinais obtidos pelo espectro de hidrogênio (FIGURA 4.137) que comprovou a existência de seis hidrogênios aromáticos com multiplicidade de dubletos.

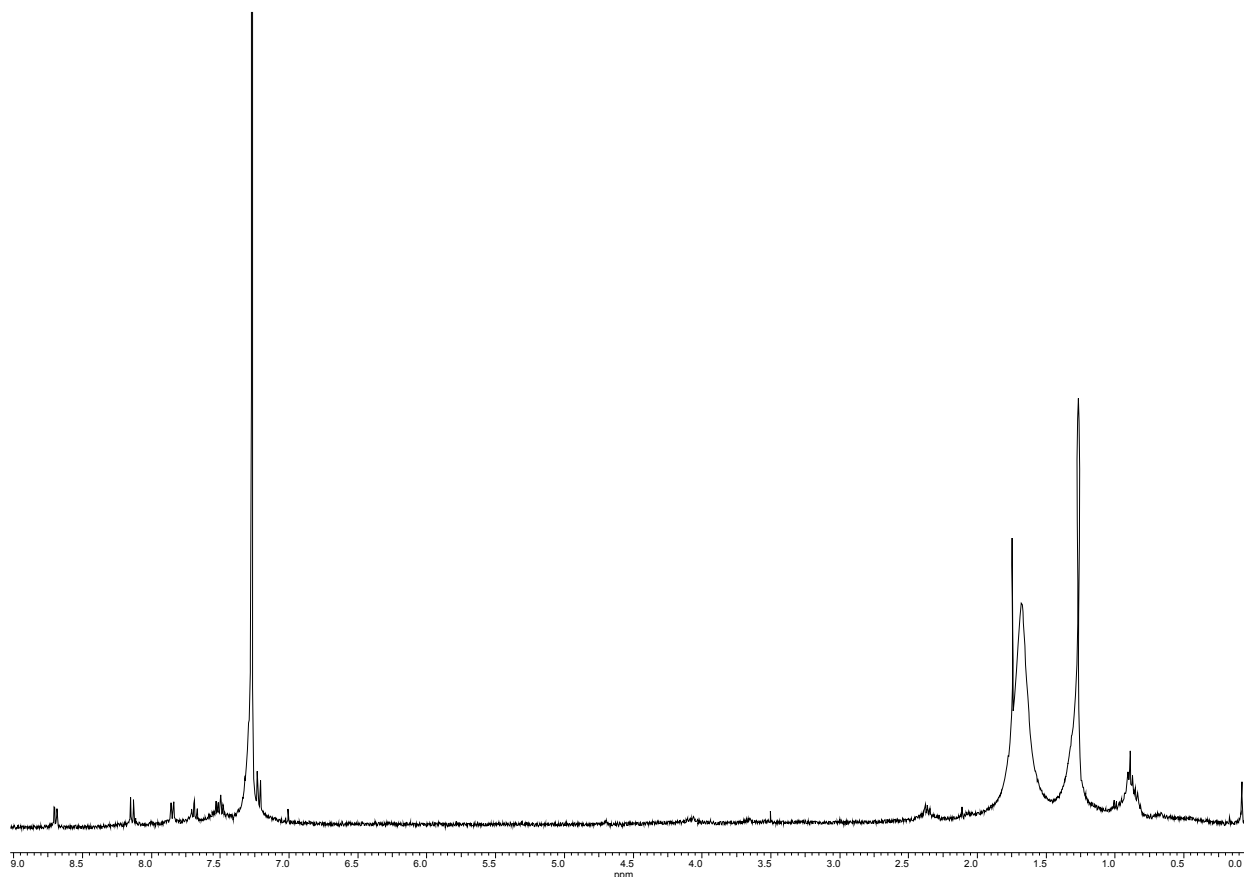


FIGURA 4.137 – Espectro de hidrogênio da fração biotransformada. (200MHz – CDCl_3).

Apesar da baixa concentração da amostra, o espectro foi satisfatório para a identificação da substituição aromática. Os seis hidrogênios aromáticos foram identificados: em δ 8,6, 8,1, 7,5, 7,7, 7,8, 7,2, sendo quatro dubletos e dois tripletos e em δ 1,7 hidrogênios referentes a metila do grupo cetil.

Para a certificação dos dados obtidos, o espectro de hidrogênio da amostra foi comparado com o espectro simulado no programa ACD/HNMR Predictor para a estrutura substituída na posição 3 (FIGURA 4.138).

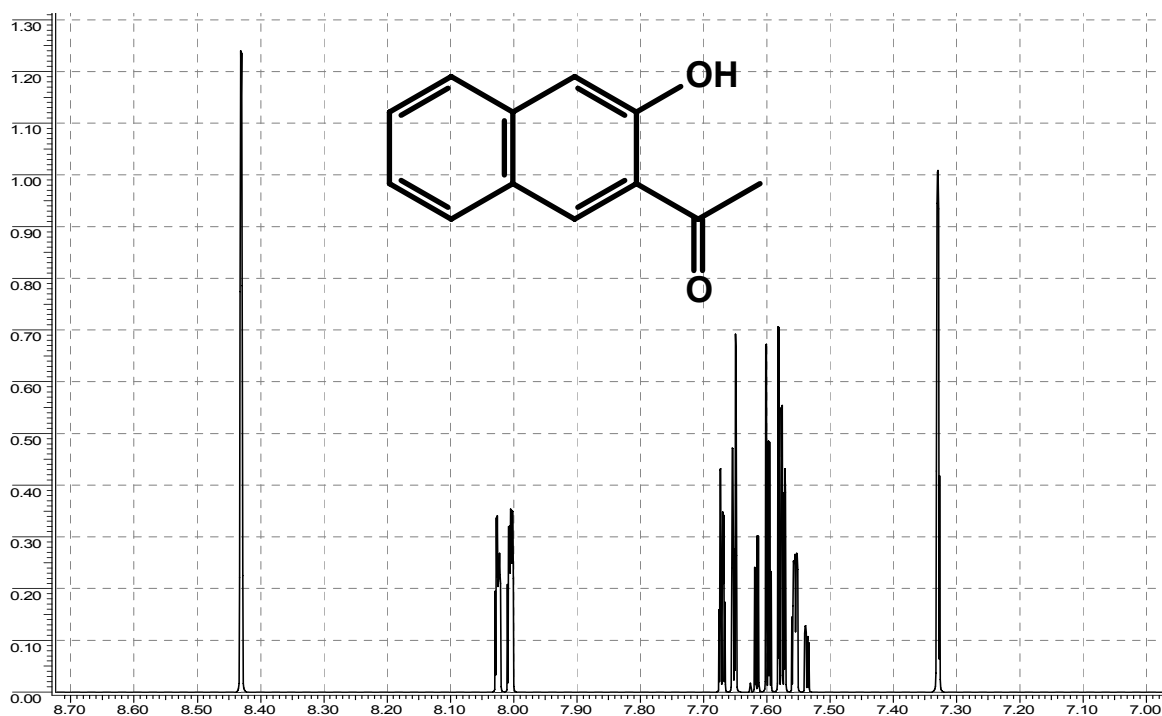


FIGURA 4.138 – Espectro simulado para a estrutura proposta indicada.

O espectro ilustrado na FIGURA 4.138 está ampliado na região dos aromáticos, onde pode-se observar a grande diferença entre este e o espectro da amostra na FIGURA 4.137. A principal justificativa da estrutura proposta trata-se da ausência de singletos para o anel disubstituído, como observado na FIGURA 4.138.

Assim, a posição correta de acordo com os dados de RMN¹H trata-se da substituição no carbono 1, como ilustra a FIGURA 4.139.

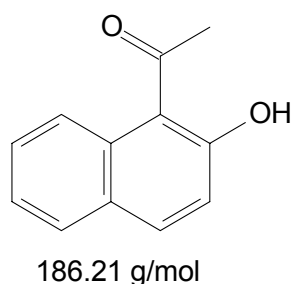


FIGURA 4.139 – Estrutura do produto biotransformado.

Até o presente documento, não há relatos na literatura sobre rearranjos de Fries biocatalisados, sendo a reação de biotransformação obtida inédita na literatura.

Os demais substratos também foram analisados por CLAE/UV-EM. Assim como o ocorrido para o substrato β -naftol, a amostra contendo α -naftol também apresentou produto de biotransformação. No entanto, com os resultados de adição de grupo cetil, selecionou-se o íon m/z 185 para a amostra com o objetivo de detectar a mesma reação para o composto α -naftol (FIGURA 4.140).

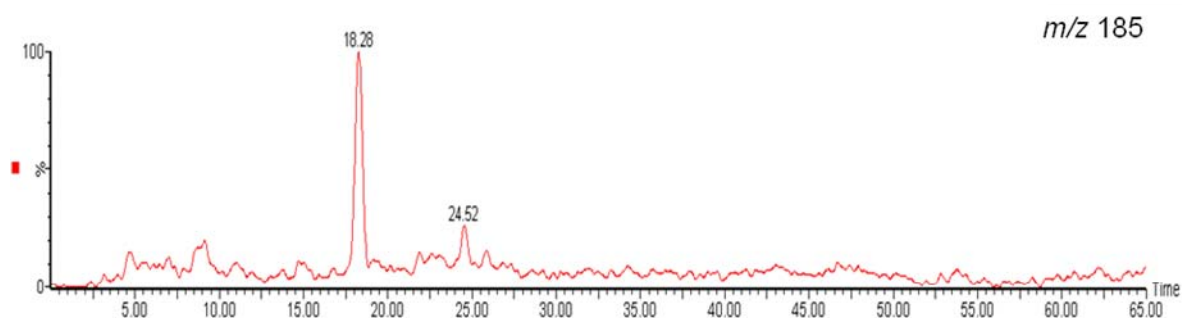


FIGURA 4.140 – Cromatograma de íon selecionado m/z 185, para a amostra contendo α -naftol.

O cromatograma obtido indicou, portanto, a presença de pelo menos duas bandas referentes ao íon m/z 185 (FIGURA 4.140). Experimentos de íons fragmentos foram realizados para ambas as bandas, porém somente a banda em 18,28 min indicou a mesma fragmentação já observada para o β -naftol (FIGURA 4.141).

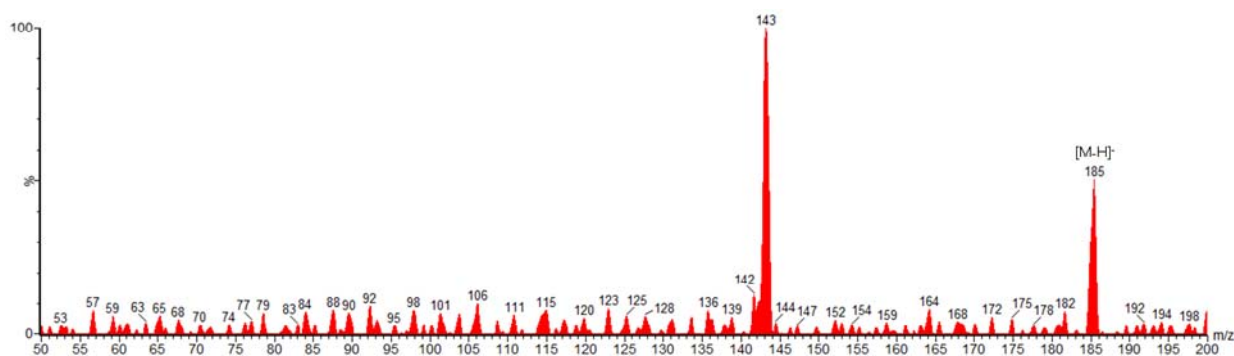


FIGURA 4.141 – Espectro de íons fragmentos de m/z 185 para a amostra contendo α -naftol.

Assim, o micro-organismo foi capaz de biotransformar ambos os naftóis, através da adição de um grupo cetil via rearranjo de Fries. Admitiu-se o rearranjo de Fries (FIGURA 4.142), pois foi a mesma reação observada

anteriormente para o substrato β -naftol, entretanto, novos experimentos devem ser realizados para a afirmação desse resultado.

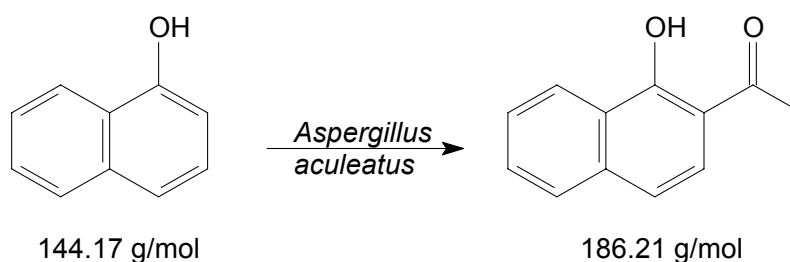


FIGURA 4.142 – Biotransformação do substrato α -naftol.

A mesma metodologia foi adotada para a amostra contendo o substrato α -naftilamina (FIGURA 4.143).

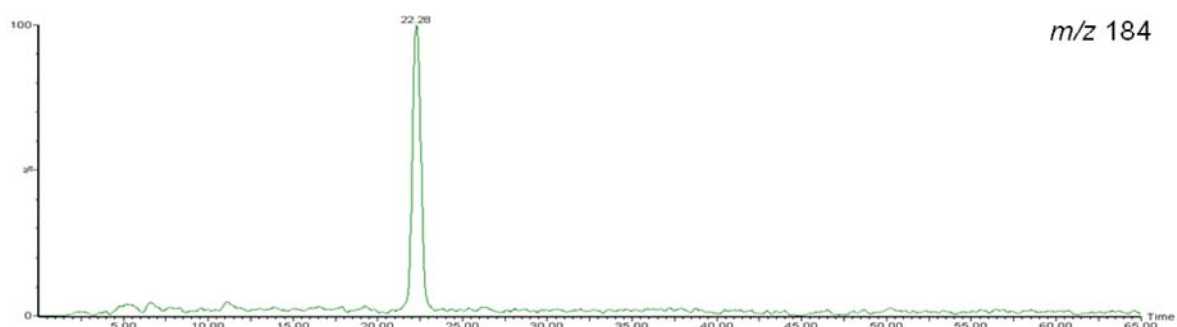


FIGURA 4.143 – Cromatograma de íon selecionado m/z 184 para a amostra contendo α -naftilamina.

A mesma reação observada para os naftóis foi detectada também para o substrato α -naftilamina (143 Da), onde a adição de 42 unidades de massa (grupo cetil) levaria ao composto de massa 185, detectado portanto em m/z 184 (FIGURA 4.143). Experimento de íons fragmentos foi também realizado (FIGURA 4.144).

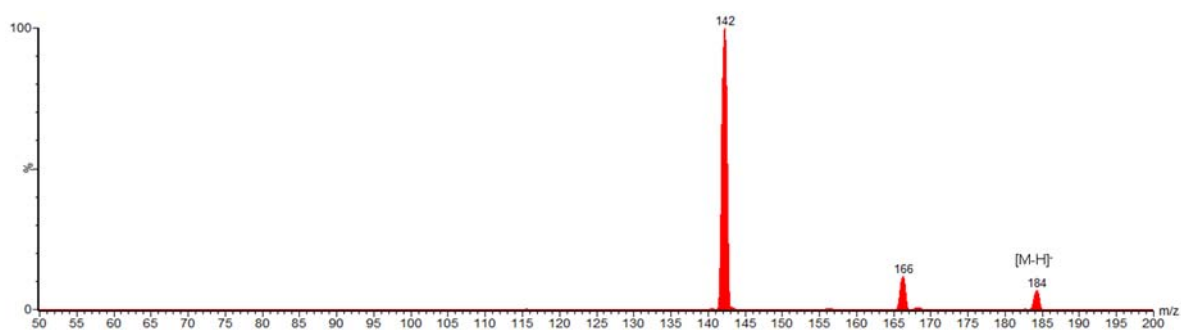


FIGURA 4.144 – Espectro de íons fragmentos de m/z 184 da amostra contendo α -naftilamina.

Portanto, o micro-organismo realizou um rearranjo de Fries nos compostos testados (FIGURA 4.145). Porém, para a completa elucidação do produto biotransformado obtido seria necessária a obtenção do padrão.

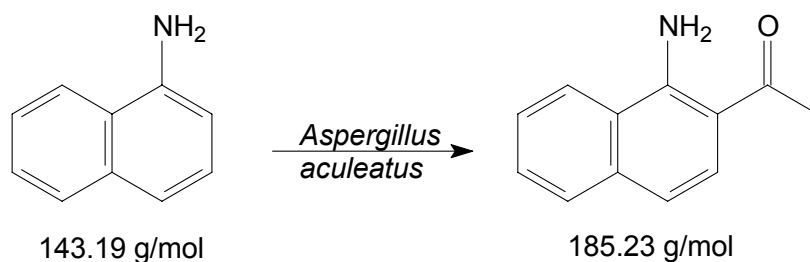


FIGURA 4.145 – Biotransformação do substrato α -naftilamina.

A capacidade de dimerizar substâncias como o observado durante todo o estudo de metabolismo secundário do micro-organismo *Aspergillus aculeatus* não foi detectado nos experimentos de biotransformação contendo os naftóis.

Entretanto, as substâncias induziram outra habilidade do micro-organismo, a qual se mostrou inédita frente as reações já descritas por fungos na literatura.

A possível enzima responsável pelo rearranjo de Fries, onde um grupo cetil é introduzido nos substratos, se mostrou pouco seletiva frente a posição da hidroxila ou ao grupo químico substituinte, sendo provavelmente o conjunto aromático, a parte química responsável pela ativação enzimática. A atividade expressada pelo fungo pode ser facilmente explorada para o preparo dos mais variados compostos orgânicos para as mais diversas aplicações.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

5 – CONSIDERAÇÕES FINAIS

A investigação enzimática dos micro-organismos endofíticos através do uso de substâncias químicas similares com as presentes no ambiente natural dos mesmos tratou-se de uma alternativa satisfatória para a obtenção de biotransformações.

O caso da biotransformação da cafeína por *Penicillium griseoroseum* (fungo endofítico isolado dos frutos verdes do café) confirmou o reconhecimento enzimático da substância, mesmo quando cultivado em meio artificial contendo a cafeína. A seletividade da reação de desmetilação, no entanto, foi decisiva para o estudo deste micro-organismo com outras substâncias, como no caso a 5,7,3',4',5'-pentametoxiflavanona. Buscava-se explorar as reações de desmetilação, contudo para a flavanona utilizada, outro complexo enzimático do fungo foi ativado. A desmetilação não foi obtida, porém o fungo realizou a introdução de um grupo aromático na molécula. Os dados espectroscópicos permitiram a elucidação estrutural do composto, o qual é inédito na literatura.

Os demais substratos adicionados aos meios de cultura do *Penicillium griseoroseum*, em particular os flavonóides glicosilados, não foram facilmente reconhecidos pelo sistema enzimático do fungo, restando somente a biotransformação de um dos flavonóides, a hesperidina, que sofreu a adição de 80 Da ainda desconhecido.

Os flavonóides naringenina e hesperetina foram utilizados como substratos e mostraram claramente a presença de produtos de biotransformação, porém devido a pouca quantidade de material obtido, não foi possível a elucidação estrutural dos produtos.

Tal resultado levou a investigação do sistema enzimático frente a substratos mais simples contendo no mínimo um anel aromático, pois a presença de substâncias altamente funcionalizadas poderia provocar o impedimento de atividade enzimática. A substância utilizada foi a 2',4',6'-trimetoxiacetofenona, foi a que promoveu a atividade enzimática do fungo tanto para a desmetilação quanto para a cloração da mesma. O experimento comprovou a capacidade do micro-organismo de reconhecer grupos aromáticos, desmetilar substâncias como também realizar halogenação. Tanto o produto da halogenação microbial quanto a estrutura do composto em si são inéditos na literatura.

O metabolismo pouco explorado do fungo *Penicillium griseoroseum*, permitiu ainda o isolamento da substância 2,4-dihidróxi-3,5-dimetilacetofenona, que se assemelha muito com o grupo introduzido no flavanona (5,7,3',4',5'-pentametoxiflavanona). A produção de substâncias aromáticas provou que o micro-organismo é capaz de reconhecer e produzir compostos com grupos aromáticos substituintes.

Já os experimentos de biotransformação, envolvendo o fungo *Penicillium brasilianum*, direcionados para a detecção de reação de oxidação de Baeyer-Villiger, informação também obtida pelo prévio estudo do fungo endofítico, foi realizada com sucesso. O fungo foi hábil em realizar tal reação, uma vez que o substrato adicionado foi completamente consumido e convertido para o produto esperado (uma lactona) facilmente identificado pelas técnicas utilizadas. O experimento monitorado deste substrato indicou ainda a velocidade de transformação apresentada pelo fungo, o qual em poucos dias foi capaz de biotransformar o substrato de partida. Partindo para estudos mais avançados buscando a otimização da reação, utilizou-se a administração do substrato com células em suspensão. A utilização de solução tampão com células ressuspendidas facilitou a detecção dos produtos de biotransformação, uma vez que parte do metabolismo do fungo foi eliminado. Os produtos da reação foram caracterizados e além da lactona, um produto de hidroxilação também foi obtido.

O metabolismo do fungo *Penicillium brasilianum* já havia indicado a forte presença de substâncias oxigenadas, porém a atividade enzimática em *in vivo* foi comprovada pelas biotransformações obtidas com o substrato 1-indanona.

Os experimentos realizados com os fenóis e análogos com o fungo *Aspergillus aculeatus* resultaram na identificação por CLAE/UV-EM de alguns produtos de biotransformação. O produto identificado foi oriundo de um rearranjo de Fries pela adição de um grupo cetil no anel aromático. Tal reação nunca foi descrita via enzimática na literatura, sendo o resultado obtido inédito. O sistema enzimático mostrou ainda a capacidade de realizar a mesma reação em substratos diferentes, como α -naftol, β -naftol e α -naftilamina.

Os resultados obtidos comprovaram a eficiência de se utilizar dados provenientes do ambiente natural dos fungos como também o prévio estudo de seu metabolismo para o direcionamento das biotransformações. Os dados com os fungos endofíticos mutualistas foram satisfatórios quanto as conversões obtidas.

Já para o fungo patógeno *Aspergillus flavus*, utilizou-se os flavonóides como substratos e observou-se a completa degradação dos mesmos quando cultivados com o fungo. O resultado obtido confirmou a atuação patógena do fungo frente a substâncias protetoras de plantas. Como patógenos, fungos como *Aspergillus flavus* devem possuir o sistema enzimático ativo e hábil com essas substâncias, para só assim conseguirem sobreviver. Portanto, nenhum produto de biotransformação foi observado com o fungo e os flavonóides.

Entretanto, quanto a capacidade oxidativa deste fungo, observaram-se enzimas ativas quando 1-indanona foi utilizado como substrato. O mesmo produto hidroxilado foi obtido, porém a lactona formada apresentou um tempo de retenção diferenciado, que poderia ser consequência da inversão na adição do oxigênio.

Outra característica detectada para as enzimas de *Aspergillus flavus* foi quando o fungo foi cultivado sob agitação. As enzimas foram mais seletivas e portanto dois produtos hidroxilados foram obtidos além de uma possível Baeyer-Villiger com a inversão da adição do átomo de oxigênio.

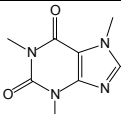
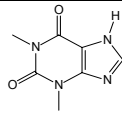
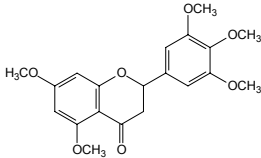
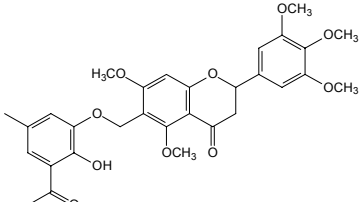
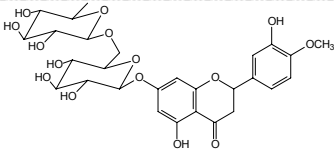
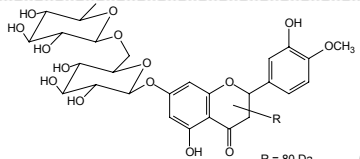
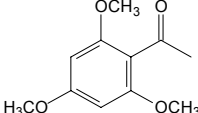
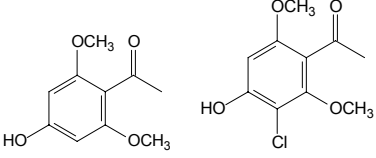
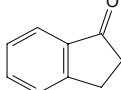
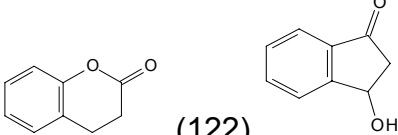
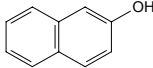
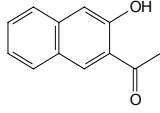
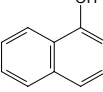
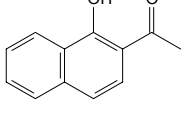
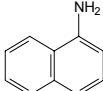
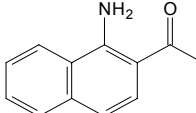
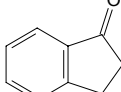
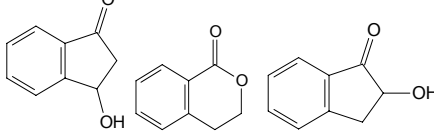
Dessa forma, tanto micro-organismos endofíticos mutualistas ou patógenos são fontes ricas de enzimas ativas para as mais diferenciadas substâncias. Sendo a principal riqueza do uso destes fungos, a capacidade reativa de cada um deles em particular, ou seja, um único composto pode gerar diferentes produtos quando adicionados ao meio de cultura de diferentes micro-organismos.

A tabela 5.1 resume todas as biotransformações obtidas no decorrer do trabalho.

Assim, pode-se concluir que todos os micro-organismos testados foram capazes de realizar as mais variadas biotransformações, que conferiu com os objetivos propostos.

Como futuras etapas pode-se seguir estudos de isolamento das enzimas oxidativas do fungo *Penicillium brasilianum*, já que testes em solução tampão foram obtidos com sucesso. Investigação da atividade de cloração apresentada pelo fungo *Penicillium griseoroseum*, que originaria futuros projetos de pesquisa, assim como o estudo do rearranjo de Fries com outros substratos pelo fungo *Aspergillus aculeatus*.

TABELA 5.1 – Resumo das biotransformações obtidas.

| Fungos | Substratos | Produtos biotransformados (pág.) |
|---------------------------------|---|---|
| <i>Penicillium griseoroseum</i> |  Cafeína |  Teofilina (55) |
| |  5,7,3',4',5'-pentametoxiflavanona |  (57) |
| |  Hesperidina |  (69) <small>R = 80 Da</small> |
| | Demais flavonóides testados | Nenhuma reação observada (96) |
| |  2',4',6'-trimetoxiacetofenona |  (112) |
| <i>Penicillium brasilianum</i> |  1-indanona |  (122) |
| <i>Aspergillus aculeatus</i> |  2-naftol |  (160) |
| |  1-naftol |  (160) |
| |  1-naftilamina |  (160) |
| <i>Aspergillus flavus</i> |  1-indanona |  (140) |
| | Naringina, hesperidina e rutina | Degradadas a CO₂ e H₂O (77) |
| | Naringina polimetoxilada e Chalcona polimetoxilada | Nenhuma reação observada(97) |

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

6 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. DEMIRJIAN, D. S.; SHAH, P. C. & MORIS-VAS, F. *Biocatalysis - From Discovery To Application.*, **200**: 12, 1999.
2. BOMMARIUS, A. S. & RIEBEL, B. R. *Biocatalysis*; WILEY-VHC Verlag GmbH & Co. KgaA: Weinheim, 2004, cap. 1.
3. HANSON, J. R. "The microbiological transformations of diterpenoids". *Nat. Prod. Rep.* **9**: 139, 1992.
4. FABER, K. *Biotransformations in Organic Chemistry*. 5th ed.; Springer-Verlag: New York, 2004.
5. NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. & SNADER, K. M. "Natural products as sources of new drugs over the period 1981-2002". *J. Nat. Prod.* **66**: 1022, 2003.
6. BUTLER, M. S. "The role of natural product chemistry in drug discovery". *J. Nat. Prod.* **67**(12): 2141, 2004.
7. LAM, K. S. "New aspects of natural products in drug discovery". *Trends in Microbiol.* **15**(6): 279, 2007.
8. GALM, U. & SHEN, B. "Natural product drug discovery: the times have never been better". *Chem. Biol.*, **14**: 1098, 2007.
9. STROBEL, G. & DAISY, B. "Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products". *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **67**: 491, 2003.
10. NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. & SNADER, K. M. "The influence of natural products upon drug discovery". *Nat. Prod. Rep.* **17**(3): 215, 2000.
11. DEMAINE, A. L. "Pharmaceutically active secondary metabolites of microorganisms". *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **52**: 455, 1999.
12. KONGSAEREE, P.; PRABPAI, S.; SRIUBOLMAS, N.; VONGVEIN, C. & WIYAKRUTTA, S. "Antimalarial dihydroisocoumarins produced by *Geotrichum* sp., an endophytic fungus of *Crassocephalum crepidioides*". *J. Nat. Prod.* **66**(5): 709, 2003.
13. MUELLER, G. M. & SCHMIT, J. P. "Global diversity and distribution of macrofungi". *Biodiversity and Conservation.* **16**(1): 37, 2007.
14. PEARCE, C. "Biologically active fungal metabolites". *Adv. Appl. Microbiol.* **44**: 1, 1997.
15. ADRIO, J. L. & DEMAINE, A. L. "Microbial cells and enzymes: A century of progress". IN: *Methods in Biotechnology, Vol. 17: Microbial Enzymes and Biotransformations*, **17**. BARREDO, J. L. (ed.). Totowa, NJ. Humana Press Inc, 2005, cap. 1.
16. SABU, A.; NAMPOOTHIRI, K. M. & PANDEY, A. "L-Glutaminase as a Therapeutic Enzyme of Microbial Origin" IN: *Methods in Biotechnology, Vol. 17: Microbial Enzymes and Biotransformations*. BARREDO, J. L. (ed.). Totowa, NJ. Humana Press Inc, 2005, cap. 4.
17. GLAZER, A. N. & NIKALDO, H. *Microbial Technology: fundamentals of applied microbiology*. 2nd ed. Nova York: W. H. Freeman & Co. 1995.
18. SAIKKONEN, K.; WÄLI, P.; HELANDER, M. & FAETH, S. H. "Evolution of endophyte-plant symbioses". *Trends Plant Sci.* **9**(6): 275, 2004.

- 19.FELLOUS, S. & SALVAUDON, L. "How can your parasites become your allies?". *Trends in Parasitology* **25**(2): 62, 2009.
- 20.PETERS, S.; DAMMEYER, B. & SCHULZ, B. "Endophyte-host interactions I. Plant defense reactions to an endophytic and a pathogenic fungus". *Symbiosis* **25**: 193, 1998.
- 21.REDMAN, R.; FREEMAN, S.; CLIFTON, D. R.; MORREL, J.; BROWN, G. & RODRIGUEZ, R. J. "Biochemical analysis of plant protection afforded by a nonpathogenic endophytic mutant of Colletotrichum magna". *Plant Physiology* **119**(2): 795, 1999.
- 22.YOSHIOKA, H.; SHIRAIISHI, T.; KAWAMATA, S.; NASU, K.; YAMADA, T.; ICHINOSE, Y. & OKU, H. "Orthovanadate suppresses accumulation of phenylalanine ammonia-lyase mRNA and chalcone synthetase mRNA in pea epicotyls induced by elicitor from Mycosphaerella pinodes". *Plant and Cell Physiology* **33**(2): 201, 1992.
- 23.MANDAL, S.; MITRA, A. "Reinforcement of cell wall in roots of Lycopersicon esculentum through induction of phenolic compounds and lignin by elicitors". *Physiological and Molecular Plant Pathology* **71**: 201, 2007.
- 24.KEEN, N. T.; HOLLIDAY, M. J. & YOSHIKAWA, M. "Effects of Glyphosate on Glyceollin Production and the Expression of Resistance to Phytophthora megasperma f. sp. glycinea in Soybean". *Phytopathology*, **72**(11): 1467, 1982.
- 25.PAXTON, J. D. "Phytoalexins – a work redefinition". *Phytopath. Z.*, **101**: 106, 1981.
- 26.DESJARDINS, A. E.; SPENCER, G. F.; PLATTNER, R. D. & BEREMAND, M. N. "Furanocoumarin phytoalexins, trichothecene toxins, and infection of Pastinaca sativa by Fusarium sporotrichioides". *Phytopathology*, **79**(2): 170, 1989.
- 27.SNYDER, B. A. & NICHOLSON, R. L. "Synthesis of phytoalexins in sorghum as a site-specific response to fungal ingress". *Science*, **248**: 1637, 1990.
- 28.SOBY, S.; CALDERA, S.; BATES, R. & VANETTEN, H. "Detoxification of the phytoalexins maackiain and medicarpin by fungal pathogens of alfalfa". *Phytochemistry*, **41**(3): 759, 1996; WELTRING, K. M.; WESSELS, J. & PAULI, G. F. "Metabolism of the tomato saponin α -tomatine by Gibberella pulicaris". *Phytochemistry*, **48**(8): 1321, 1998.
- 29.VANETTEN, H. D.; MATTHEWS, D. E. & MATTHEWS, P. S. "Phytoalexin Detoxification: Importance for Pathogenicity and Practical Implications". *Annu. Rev. Phytopathol.*, **27**: 143, 1989.
- 30.EVANS, C. K.; XIE, W.; DILL-MACKY, R. & MIROCHA, C. J. "Biosynthesis of deoxynivalenol in spikelets of barley inoculated with macroconidia of Fusarium graminearum". *Plant disease*, **84**(6): 654, 2000; WANG, Y. Z. & MILLER, J. D. "Effects of Fusarium graminearum metabolites on wheat tissue in relation to Fusarium head blight resistance". *J. Phytopathology*, **122**: 118, 1988.
- 31.HABERMEHL, G. G. "Secondary and tertiary metabolites as plant toxins". *Toxicon*, **36**(11): 1707, 1998.
- 32.CLAY, K. "Fungal endophytes of grasses: a defensive mutualism between plants and fungi". *Ecology*, **69**(1): 10, 1988.
- 33.ZIKMUNDOVA, M.; DRANDAROV, K.; HESSE, M. & WERNER, C. "Hydroxylated 2-Amino-3H-phenoxazin-3-one Derivatives as Products of 2-Hydroxy-1,4-enxoxazin-3-

- one (HBOA) Biotransformation by *Chaetosphaeria* sp., an Endophytic Fungus from *Aphelandra tetragona*". *Z. Naturforsch.* **57c**: 660, 2002b.
34. BORGES, K. B.; BORGES, W. S.; PUPO, M. T. & BONATO, P. S. "Endophytic fungi as models for the stereoselective biotransformation of thioridazine". *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **77**: 669, 2007.
35. BORGES, K. B.; BORGES, W. S.; PUPO, M. T. & BONATO, P. S. "Stereoselective analysis of thioridazine-2-sulfoxide and thioridazine-5-sulfoxide: An investigation of rac-thioridazine biotransformation by some endophytic fungi" *J. Pharm. Biomed. Anal.* **46**: 945, 2008.
36. HALE, P. W. JR. & POKLIS, A. "Cardiotoxicity of thioridazine and two stereoisomeric forms of thioridazine 5-sulfoxide in the isolated perfused rat heart". *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **86**(1): 44, 1986.
37. AGUILAR, S. J. "An open study of mesoridazine (Serentil) in chronic schizophrenics". *Diseases of the nervous system.* **36**(9): 484, 1975.
38. STOWE, B. B. & YAMAKI, T. "History and physiological action of the gibberellins". *Ann. Ver. Plant Physiology.* **8**: 181, 1957.
39. MACMILLIAN, J. "Biosynthesis of the gibberellin plant hormones". *Nat. Prod. Rep.*, **14**(3): 221, 1997.
40. HARBORNE, J. B. "Advances in chemical ecology". *Nat. Prod. Rep.*, **10**(4): 327, 1993.
41. JARVIS, B. B.; MIDIWO, J. O. & ABOULNASR, M. B. "The mystery of trichothecene antibiotics in *Baccharis* species". *J. Nat. Prod.*, **51**(4): 736, 1988.
42. TRAP, S. C.; HOHN, T. M.; MCCORMICK, S. & JARVIS, B. B. "Characterization of the gene cluster for biosynthesis of macrocyclic trichothecenes in *Myrothecium roridum*". *Molecular and General Genetics*, **257**(4): 421, 1998.
43. JARVIS, B. B.; COMEZOGU, S. N.; AMMON, H. L.; BREEDLOVE, C. K.; MILLER, R. W.; WOODE, M. K.; STREELMAN, D. R.; SNEDEN, A. T.; DAILEY, R. G. & KUPCHAN, S. M. "New Macrocyclic Trichothecenes from *Baccharis megapotamica*". *J. Nat. Prod.* **50**(5): 815, 1987.
44. JARVIS, B. B.; MOKHTARIREJALI, N. & SCHENKEL, E. P. "Trichothecene mycotoxins from Brazilian *Baccharis* species". *Phytochemistry*, **30**(3): 789, 1991.
45. HABERMEHL, G. G.; BUSAM, L. & STEGEMANN, J. "Miotoxin- A: a novel macrocyclic trichothecene from the Brazilian plant *Baccharis coridifolia*". *Z. Naturforsch.*, **39**(3-4): 212, 1984.
46. RIZZO, I.; VARSAVKY, M.; HAIDUKOWSKI, M. & FRADE, H. "Macrocyclic trichothecenes in *Baccharis coridifolia* plants and endophytes and *Baccharis artemisioides* plants". *Toxicon*, **35**(5): 753, 1997.
47. STIERLE, A.; STROBEL, G. & STIERLE, D. "Taxol and taxane production by *Taxomyces andreanae*". *Science.* **260**: 214, 1993.
48. STIERLE, A. & STROBEL, G. "The Search for a Taxol-Producing Microorganism Among the Endophytic Fungi of the Pacific Yew, *Taxus brevifolia*". *J. Nat. Prod.*, **58**(9): 1315, 1995.

49. SCHIFF, P. B.; FANT, J. & HORWITZ, S. B. "Promotion of microtubule assembly in vitro by taxol". *Nature*, **277**(5698): 665, 1979.
50. WANI, M. C.; TAYLOR, H. L.; WALL, M. E.; COGOON, P. & MCPHAIL, A. T. "Plant antitumor agents. VI. The isolation and structure of taxol, a novel antileukemic and antitumor agent from *Taxus brevifolia*". *J. Am. Chem. Soc.*, **93**(9): 2335, 1971.
51. STROBEL, G.; YAN, X.; SEARS, J.; KRAMER, R.; RAJINDER, SIDHU, R. J. & HESS, W. M. "Taxol from *Pestalotiopsis microspora*, an endophytic fungus of *Taxus wallachiana*". *Microbiology*, **142**: 435, 1996.
52. LI, J. Y.; STROBEL, G.; SIDHU, R.; HESS, W. M. & FORD, E. J. "Endophytic taxol-producing fungi from bald cypress, *Taxodium distichum*". *Microbiology UK*. **142**: 2223, 1996.
53. BASHYAL, B.; LI, J. Y.; STROBEL, G.; HESS, W. M. & SIDHU, R. "*Seimatoantlerium nepalense*, an endophytic taxol producing coelomycete from *Himalayan yew (Taxus wallachiana)*". *Mycotaxon*, **72**: 33, 1999.
54. LI, J. Y.; SIDHU, R.; FORD, E. J.; LONG D. M.; HESS, W. M. & STROBEL, G. A. "The induction of production in the endophytic fungus *Periconia* sp. from *Torreya grandifolia*". *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, **20**(5): 259, 1998.
55. STROBEL, G. A.; HESS, W. M.; LI, J. Y.; FORD, E. J.; SEARS, J.; SIDHU, R. & SUMMERELL, B. "*Pestalotiopsis guepenii* a taxol producing endophyte of the Wollemi Pine, *Wollemia nobilis*". *Aust. J. Botany*, **45**(6): 1073, 1997.
56. STROBEL, G. A.; FORD, E.; LI, J. Y.; SEARS, J.; SIDHU, R. S. & HESS, W. M. "*Seimatoantlerium tepuiense* gen. nov. a unique endophyte fungus producing taxol from the Venezuelan-Guayana System". *Systematic and Applied Microbiology*, **22**(3): 426, 1999.
57. HERR, J. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **36**(20): 2190, 1997.
58. VOET, D. & VOET, J. G. *Biochemistry*; 1st Ed; John Wiley & Sons; New York, 1990, p.771.
59. CAMACHO, F. J.; GERNANDT, D. S.; LISTON, A.; STONE, J. K. & KLEIN, A. S. "Endophytic fungal DNA, the source of contamination in spruce needle DNA". *Mol. Ecology*, **6**: 983, 1997.
60. ZHANG, W.; WENDEL, J. F. & CLARK, L. G. "Bamboozled Again! Inadvertent Isolation of Fungal rDNA Sequences from Bamboos (Poaceae: Bambusoideae)". *Mol. Phylogenetics and Evolution*, **8**(2): 205, 1997.
61. HUANG, E. X.; HUANG, T. L.; WILDUNG, M. R.; CROTEAU, R. & SCOTT, A. I. "Overproduction, in *Escherichia coli*, of soluble taxadiene synthase, a key enzyme in the taxol biosynthetic pathway". *Protein Expression and Purif.*, **13**(1): 90, 1998.
62. ZOOK, M.; HOHN, T.; TSUJI, J. & HAMMERSCHMIDT, R. "Characterization of Novel Sesquiterpenoid Biosynthesis in Tobacco Expressing a Fungal Sesquiterpene Synthase". *Plant Physiology*, **112**(1): 311, 1996.
63. BEYER, S.; KUNZE, B.; SILAKOWSKI, B. & MULLER, R. "Metabolic diversity in myxobacteria: identification of the myxalamid and the stigmatellin biosynthetic gene cluster of *Stigmatella aurantiaca* Sg a15 and a combined polyketide-(poly)peptide gene cluster from the epothilone producing strain *Sorangium cellulosum* So ce90". *Biochim. Biophys. Acta*, **1445**: 185, 1999.

- 64.SANTOS, R. M. G. & RODRIGUES-FO., E. "Endophytic fungi from Melia azedarach". *World J. Microbiol. Biotechnol.* **19**: 767, 2003.
- 65.SANTOS, R. M. G. & RODRIGUES-FO., E. "Meroterpenes from Penicillium sp found in association with Melia azedarach". *Phytochemistry*, **61**: 907, 2002.
- 66.SANTOS, R. M. & RODRIGUES-FO., E. "Structures of Meroterpenes Produced by Penicillium sp, an Endophytic Fungus found Associated with Melia azedarach". *J. Braz. Chem. Soc.*, **14**: 722, 2003.
- 67.SANTOS, R. M. G. & RODRIGUES-FO., E. "Análise de productos fitoterapêuticos comerciais de Catuaba por LC-UV-MS". *Noticias Técnicas del Laboratório*, **3**: 12, 2004.
- 68.SANTOS, R. M. G. & RODRIGUES-FO., E. "Further Meroterpenes Produced by Penicillium sp, an Endophyte Obtained from Melia azedarach". *Z. Naturforsch.*, **58c**: 663, 2003.
- 69.SIMPSON, T. J. S.; AHMED, A.; MCINTYRE, C. R.; SCOTT, F. E. & SADLER, I. H. "Biosynthesis of Polyketide-Terpenoid (Meroterpenoid) Metabolites Andibenin B and Andilesin A in Aspergillus varicolor". *Tetrahedron*, **53**: 4013, 1997.
- 70.AHMED, S. A.; SCOTT, F. E.; STENZEL, D. J. & SIMPSON, T. "Studies on the biosynthesis of the mycotoxin austin, a meroterpenoid metabolite of Aspergillus ustus". *J. Chem. Soc. Perkin Trans I.* 807, 1989.
- 71.GRUNDMANN, A. & LI, S-M. "Overproduction, purification and characterization of FtmPT1, a brevianamide F prenyltransferase from Aspergillus fumigatus". *Microbiology*, **151**: 2199, 2005.
- 72.BOUVIER, F.; RAHIER, A. & CAMARA, B. "Biogenesis, molecular regulation and function of plant isoprenoids". *Progress in Lipid Research.* **44**: 357, 2005.
- 73.OLANO, C.; MENDEZ, C. & SALAS, J. A. "Antitumor compounds from actinomycetes: from gene clusters to new derivatives by combinatorial biosynthesis". *Nat. Prod. Rep.* **26**(5): 628, 2009.
- 74.FORMICA, J. V. & REGELSON, W. "Review of the biology of quercetin and related bioflavonoids" *Food Chem. Toxicol.* **33**: 1061, 1995.
- 75.ESAKI, H.; ONOZAKI, H.; KAWAKISHI, S. & OSAWA, T. "New antioxidant isolated from tempeh". *J. Agric. Food Chem.* **44**: 696, 1996.
- 76.TERAQ, J.; PISKULA, M. & YAO, Q. "Protective effect of epicatechin, epicatechin gallate, and quercetin on lipid peroxidation in phospholipid bilayers". *Arch. Biochem. Biophys.* **308**: 278, 1994.
- 77.KAUL, T. N.; MIDDLETON, E. & AGRA, P. L. "Antiviral effect of flavonoids on human viruses". *J. Med. Virol.* **15**: 71, 1985.
- 78.FARMAKADILIS, E. & MURPHY, P. A. "Oestrogenic response of the CD-1 mouse to the soya-bean isoflavones genistein, genistin and daidzin". *Food Chem. Toxicol.* **22**(3): 237, 1984.
- 79.PARNISKE, M.; AHLBORN, B. & WERNER, D. "Isoflavonoid-inducible resistance to the phytoalexin glyceollin in soybean rhizobia". *J. Bacteriol.*, **173**: 3432, 1991.

80. GIL, B.; SANZ, M. J.; TERCENIO, M. C.; FERRÁNDIZ, M. L.; BUSTOS, G.; PAYÁ, M.; GUNASEGARAN, R. & ALCARAZ, M. J. "Effects of flavonoids on *Naja naja* and human recombinant synovial phospholipases A2 and inflammatory responses in mice". *Life Sci.* **54**: 333, 1994.
81. FERRÁNDIZ, M. L. & ALCARAZ, M. J. "Anti-inflammatory activity and inhibition of arachidonic acid metabolism by flavonoids". *Agents Actions*, **32**: 283, 1991.
82. LAUGHTON, M. J.; EVANS, P. J.; MORONEY, M. A.; HOULT, J. R. C. & HALLIWELL, B. "Inhibition of mammalian 5-lipoxygenase and cyclooxygenase by flavonoids and phenolic dietary additives: relationship to antioxidant activity and to ion-reducing ability". *Biochem. Pharmacol.* **42**: 1673, 1991.
83. HOULT, J. R. S.; MORONEY, M. A. & PAYÁ, M. "Action of flavonoids and coumarins on lipoxygenase and cyclooxygenase". *Methods Enzymol.* **234**: 443, 1994.
84. SIESS, M. H.; LECLERC, J. M.; CANIVENC-LAVIER, C.; RAT, P. & SUSCHETET, M. "Heterogenous effects of natural flavonoids on monooxygenase activities in human and rat liver microsomes". *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **130**: 73, 1995.
85. COTELLE, N.; BERNIER, J. L.; CATTEAU, J. P.; POMMERY, J.; WALLET, J. C. & GAYDOU, E. M. "Antioxidant properties of hydroxyflavones". *Free Radical Biol. Med.* **20**: 35, 1996.
86. ONO, K.; NAKANE, H.; FUKUSHIMA, M.; CHERMANN, J. C. & BARR-SINOUSI, F. "Differential inhibitory effects of various flavonoids on the activities of reverse transcriptase and cellular DNA and RNA polymerases". *Eur. J. Biochem.* **190**: 469, 1990.
87. RICE-EVANS, C. A.; MILLER, N. J.; BOLWELL, P. G.; BRAMLEY, P. M. & PRIDHAM, J. B. "The Relative Antioxidant Activities of Plant-Derived Polyphenolic Flavonoids". *Free Radical Res.* **22**: 375, 1995.
88. NAKAYAMA, T.; YAMADA, M.; OSAWA, T. & KAWAKISHI, S. "Suppression of active oxygen-induced cytotoxicity by flavonoids". *Biochem. Pharmacol.* **45**: 265, 1993.
89. ROBINSON, T. *The Organic Constituents of Higher Plants*; Cordus Press: North Amherst, MA. 1991, p. 187.
90. BREINHOLT, V. M., OFFORD, E. A., BROUWER, C., NIELSEN, S. E., BROSEN, K. & FRIEDBERG, T. "In vitro investigation of cytochrome P450-mediated Metabolism of dietary flavonoids". *Food and Chemical Toxicology*, **40**: 609, 2002.
91. YUNES, R. A. & CALIXTO, J. B. *Plantas Medicinais sob a ótica da química Medicinal Moderna*, Argos, Santa Catarina, 2001.
92. DI CARLO, G., MASCOLO, N., IZZO, A. A. & CAPASSO, F. "Flavonoids: old and news aspects of a class of natural therapeutic drugs". *Life Science*, **65** (4): 337, 1999.
93. STOBIECKI, M. "Application of mass spectrometry for identification and structural studies of flavonoids glycosides". *Phytochem.* **54**: 237, 2000.
94. MA, Y., VERDENIKOVA, I., HEUVEL, H. & CLAEYS, M. "Internal glucose residue loss in protonated O-diglycosil flavonoids upon low-energy collision-induced dissociation". *J. Am. Soc. Mass Spectr.* **11**: 136, 2000.

95. BEDNAREK, P., FRANSKI, R., KERHOAS, L., EINHOM, J., WOJTASZEK, P. & STOBIECK, M. "Profiling chances in metabolism of isoflavonoids and their conjugates in *Lupinus albus* treated with biotic elicitor". *Phytochem.* **56**: 77, 2001.
96. ORTUÑO, A.; BÁIDEZ, A.; GÓMEZ, P.; ARCAS, M. C.; PORRAS, I.; GARCÍA-LÍDON, A. & DEL RÍO, J. A. "Citrus paradisi and Citrus sinensis flavonoids: Their influence in the defence mechanism against *Penicillium digitatum*". *Food Chemistry* **98**: 351, 2006.
97. NIELSEN, S. E.; BREINHOLT, V.; CORNETT, C. & DRAGSTED, L. O. "Biotransformation of the citrus flavone tangeretin in rats. Identification of metabolites with intact flavane nucleus". *Food and Chemical Toxicology* **38**: 739, 2000.
98. ADER, P.; WESSMANN, A. & WOLFFRAM, S. "Bioavailability and metabolism of the flavonol quercetin in the pig". *Free Radical Biol. Med.* **28**: 1056, 2000.
99. NIELSEN S. E., BREINHOLT V., JUSTESEN U., CORNETT, C. & DRAGSTED, L. O. "In vitro biotransformation of flavonoids by rat liver microsomes". *Xenobiotica* **28**: 389, 1998.
100. VOET, D., VOET, J. G. & PRATT, C. W. *Fundamentos de Bioquímica*, Artmed, Porto Alegre, RS, 2000.
101. WERCK-REICHART, D. & FEYEREISEN, R. "Cytochrome P-450: a success story" *Gen. Biol.* **1**: 1, 2001.
102. TESTINO, S. A. & PATONAY, G. "High-throughput inhibition screening of major human cytochrome P450 enzymes using an in vitro cocktail and liquid chromatography-tandem mass spectrometry" *J. Pharm. Biom. Anal.* **30**: 1459, 2003.
103. HODEK, P., TREFIL, P. & STIBOROVÁ, M. "Flavonoids-potent and versatile biologically active compounds interacting with cytochromes P450". *Chemico-Biological Interactions*, **139**: 1, 2002.
104. MAKOVEC, T. & BRESKVAR, K. "Catalytic and immunochemical properties of NADPH-cytochrome P450 reductase from fungus *Rhizopus nigricans*" *J. Ster. Biochem. & Mol. Biol.* **82**: 89, 2002.
105. SCHRODER, G., WEHINGER, E., LUKACIN, R., WELLMANN, F., SEEFELDER, W., SCHWAB, W. & SCHRODER, J. "Flavonoid methylation: a novel 4'-O-methyltransferase from *Catharanthus roseus*, and evidence that partially methylated flavanones are substrates of four different flavonoid dioxygenases". *Phytochem.* **65** (8): 1085, 2004.
106. ROSAZZA, P. N. & DAS, S. "Microbial and Enzymatic Transformations of Flavonoids". *J. Nat. Prod. Rev. A-J*, 2006.
107. ROSAZZA, J. P. & SMITH, R. V. "Microbial models for drug metabolism". *Adv. Appl. Microbiol.* **25**: 169, 1979.
108. SMITH, R. V.; ACOSTA, D. & ROSAZZA, J. P. "Microbial and cellular models for mammalian metabolism". *Adv. Biochem. Eng.* **5**: 70, 1977.
109. CLARK, A. M. & HUFFORD, C. D. "Use of microorganisms for the study of drug metabolism: an update". *Med. Res. Rev.* **11**(5): 473, 1991.
110. IBRAHIM, A. R. & ABUL-HAJI, Y. J. "Microbiological Transformation of (±)-Flavanone and (±)-Isoflavanone". *J. Nat. Prod.* **53**: 644, 1990.

111. IBRAHIM, A. R. S. "Sulfation of naringenin by *Cunninghamella elegans*". *Phytochem.* **53**(2): 209, 2000.
112. CHUN, H., OHNISHI, Y., SHINDO, K., MISAWA, N., FURUKAWA, K. & HORINOUCI, S. "Biotransformation of flavone and flavanone by *Streptomyces lividans* cells carrying shuffled biphenyl dioxygenase genes". *J. Mol. Cat. B: Enz.* **21**: 113, 2003.
113. LI, Z.; BEILEN, J. B.; DUETZ, W. A.; SCHMID, A.; RAADT, A.; GRIENGL, H. & WITHOLT, B. "Oxidative biotransformations using oxygenases". *Curr. Opin. Chem. Biol.* **6**: 136, 2002.
114. LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L. & COX, M. M. In *Principles of Biochemistry*, Worth Publishers, New York, 1997.
115. RENZ, M. & MEUNIER, B. "100 Years of Baeyer-Villiger oxidation of ketones". *Eur. J. Org. Chem.* **1**: 737, 1999.
116. STRUKUL, G. "Transition metal catalysis in the Baeyer-Villiger oxidation of ketones". *Angew. Chem.* **37**: 1198, 1998.
117. BOLM, C. et al. "Enantioselective Baeyer-Villiger oxidations catalysed by chiral magnesium complexes". *Synlett* **1**: 1461, 2001.
118. WATANABE, A. et al. "Highly enantioselective Baeyer-Villiger oxidation using Zr (salen) complex as catalyst". *Tetrahedron Lett.* **43**: 4481, 2002.
119. WILLETS, A. "Structural studies and synthetic applications of Baeyer-Villiger monooxygenases". *Trends in Biotechnology* **15**: 55, 1997.
120. STEWART, J. D. *Curr. Org. Chem.* **2**: 195, 1998.
121. MIHOVILOVIC, M. D.; MÜLLER, B. & STANETTY, P. "Monooxygenase Mediated Baeyer-Villiger Oxidations". *Eur. J. Org. Chem.* 3711, 2002.
122. ROBERTS, S.M. & WAN, P.W.H. "Enzyme-catalysed Baeyer-Villiger oxidations". *J. Mol. Catal. B Enzym.* **4**: 111, 1998.
123. SANTOS, R. M. G. *Interação planta-microorganismos: o papel de metabólitos secundários na interação de Melia azedarach com fungos filamentosos*. São Carlos, Programa de Pós Graduação em Química – UFSCar, 1999. Dissertação de Mestrado.
124. SANTOS, R. M. G. *Metabolismo secundário dos fungos Penicillium sp e Fusarium moniliforme isolados como endofíticos de Melia azedarach (Meliaceae)*. São Carlos, Programa de Pós Graduação em Química – UFSCar, 2003. Tese de Doutorado.
125. FILL, T. P.; PEREIRA, G. K.; SANTOS, R. M. G. & RODRIGUES-FO, E. "Four additional meroterpenes produced by *Penicillium* sp found in association with *Melia azedarach*. Possible biosynthetic intermediate to austin". *Z. Naturforsch.* **62b**: 1035, 2007.
126. MIHOVILOVIC, M. D. "Enzyme Mediated Baeyer-Villiger Oxidations" *Curr. Org. Chem.*, **10**: 1265, 2006.
127. MIHOVILOVIC, M. D.; RUDROFF, F.; WINNINGER, A.; SCHNEIDER, T.; SCHULZ, F.; REETZ, M. T. "Microbial Baeyer-Villiger Oxidation – Stereopreference and

- Substrate Acceptance of Cyclohexanone Monooxygenase Mutants*. *Org. Lett.*, **8**(6): 1221, 2006.
128. VALENTE, A. M. P. *Análises de componentes fixos em frutos de Coffea arabica L. e dos seus produtos de fermentação*. São Carlos, Programa de Pós Graduação em Química – UFSCar, 2003. Dissertação de Mestrado.
129. SILVA, B. F. Estudos de biotransformação utilizando *Penicillium griseoroseum*. Projeto de Iniciação Científica. PIBIC/CNPq – UFSCar, 2003/04.
130. ROGMANN, N., JONES, P. & MISCHNICK, P. “*Determination of the substituent distribution in O-sulfonylbutyl-(1→4)-glucans*”. *Carbohydrate Research*, **327**: 275, 2000.
131. DEMYTTENAERE, J. C. R.; VANOVERSCHELDE, J. & DE KIMPET, N. “*Biotransformation of (R)-(+)-and (S)-(-)-citronellol by Aspergillus sp. and Penicillium sp, and the use of solid phase microextraction for screening*” *J. Chromatogr. A*, **1027**(1-2): 137, 2004.
132. ADAMS, A.; DEMYTTENAERE, J. C. R.; VANOVERSCHELDE, J. & DE KIMPE, N. “*Biotransformation of (R)-(+)- and (S)-(-)-limonene to a-terpineol by Penicillium digitatum — investigation of the culture conditions*”. *Food Chemistry*, **80**(4): 525, 2003.
133. HOLLAND, H. L.; DORE, S. & BROWN, F. M. “*Biotransformation of corticosteroids by Penicillium decumbens ATCC 10436*”. *Steroids*, **60** (9): 646, 1995.
134. HAKIL, M., DENIS, S., VINIEGRA-GONZÁLEZ, G. & AUGUR, C. “*Degradation and products analysis of caffeine and related dimethylxanthines by filamentous fungi*”. *Enz. Microb. Techn.* **22**: 355, 1998.
135. HAKIL, M., VOISINET, F., VINIEGRA-GONZÁLEZ, G. & AUGUR, C. “*Caffeine degradation in solid state fermentation by Aspergillus tamarii: effects of additional nitrogen sources*”. *Process Biochemistry*, **35**: 103, 1999.
136. MACDONALD, T.L., GUTHEIM, W.G., MARTIN, R.B. & GUENGERICH, F.P. “*Oxidation of substituted N,N-dimethylanilines by cytochrome P-450: Estimation of the effective oxidation-reduction potential of cytochrome P-450*”. *Biochemistry*, **28**(5):2071, 1989.
137. OKAZAKI, O. & GUENGERICH, F.P. “*Evidence for specific base catalysis in N-dealkylation reactions catalyzed by cytochrome-P450 and chloroperoxidase - differences in rates of deprotonation of aminium radicals as an explanation for high kinetic hydrogen isotope effects observed with peroxidases*”. *J. Biol. Chem.* **268**: 1546, 1993.
138. KARKI, S.B., DINNOCENZO, J.P., JONES, J.P. & KORZEKWA, K.R. “*Mechanism of oxidative amine dealkylation of substituted N,N-dimethylanilines by cytochrome P-450: application of isotope effect profiles*”. *J. Am. Chem. Soc.* **117**: 3657, 1995.
139. ARRUDA, A.C. *Flavonóides de Neoraputia Alba (Rutaceae)*. São Carlos, Programa de Pós Graduação em Química – UFSCar, 1990. Tese de Doutorado.
140. SHUN YAN MO, S. Y., HE, W. Y., YANG, Y. C. & SHI, J. G. “*Two Benzyl Dihydroflavones from Phellinus igniarius*”. *Chinese Chemical Letters* **14** (8): 810, 2003.

141. LEE, I-K, KIM, C., SONG, K., KIM, H-M. & YOO, I-D. "Two Benzylated Dihydroflavonols from *Cudrania tricuspidata*". *J. Nat. Prod.* **58**(10): 1614, 1995.
142. EL-SOHLI, H., LASSWELL, W. & HUFFORD, C. D. "Two New C-Benzylated Flavanones from *Uvaria chamae* and ^{13}C NMR Analysis of Flavanone Methyl Ethers". *J. Nat. Prod.* **42**(3): 264, 1979.
143. PEREIRA, G. K. *Aspectos químicos da interação de *Murraya paniculata* (Rutaceae) com microorganismos endofíticos*. São Carlos, Programa de Pós Graduação em Química – UFSCar, 2004. Tese de Doutorado.
144. HERRMANN, A. P., WILLEMS, M & JANKE, H. D. "Degradation of natural polyphenols by methanogenic consortia enriched from digested municipal sludge". *Wat. Res.*, **35**(11): 2575, 2001.
145. HATA, K., HORI, K. & TAKAHASHI, S. "Differentiation and apoptosis inducing activities by pentacyclic triterpenes on a mouse melanoma cell line". *J. Nat. Prod.* **65**: 645, 2002.
146. CAMPOS, F. R. *Metabolismo secundário de *Aspergillus aculeatus* e *Microbispora* sp. isolados como microrganismos endofíticos de *Melia azedarach* (Meliácea)*. São Carlos, Programa de Pós-Graduação em Química – UFSCar, 2005. Tese de Doutorado, 282p.
147. RODRIGUES, L. H. *Produção e análise de terpenóides por espécies de *Pestalotiopsis**. São Carlos, Programa de Pós-Graduação e Química – UFSCar, 2006. Dissertação de Mestrado.