

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

Obtenção de Derivados de Compostos Isolados de *Zingiber officinale* por Biotransformação e Semi-síntese e Avaliação Frente à Cisteinil-proteases.

Roberta Marques Dias de Ávila

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

Orientador: Paulo Cezar Vieira

* bolsista (CAPES)

**São Carlos - SP
2016**

Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da Biblioteca Comunitária UFSCar
Processamento Técnico
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Á958o Ávila, Roberta Marques Dias de
 Obtenção de derivados de compostos isolados de
Zingiber officinale por biotransformação e semi-
síntese e avaliação frente à cisteinil-proteases /
Roberta Marques Dias de Ávila. -- São Carlos :
UFSCar, 2016.
 161 p.

 Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São
Carlos, 2016.

 1. Biotransformação. 2. Zingiber officinale. 3.
Colletotrichum gloesporioides. 4. Fusarium
oxysporum. 5. Semi-síntese. I. Título.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia
Programa de Pós-Graduação em Química

Folha de Aprovação

Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Tese de Doutorado da candidata Roberta Marques Dias de Ávila, realizada em 01/07/2016:

Prof. Dr. Paulo Cezar Vieira
UFSCar

Prof. Dr. Sérgio Ricardo Ambrósio
UNIFRAN

Profa. Dra. Níge Araceli Jacometti Cardoso Furtado
FCFRP/USP

Prof. Dr. João Batista Fernandes
UFSCar

Prof. Dr. Márcio Weber Paixão
UFSCar

Esta tese é dedicada aos meus amados pais, Carlos e Sônia, exemplos de paciência, força e determinação a despeito de todas as dificuldades enfrentadas.

*“Porque ao homem que é bom diante dele,
dá Deus a sabedoria e conhecimento, e
alegria...*

*...Assim que compreendi que não há nada
melhor do que ter prazer no trabalho; essa é
a nossa recompensa. Pois como é que
podemos saber o que vai acontecer depois
da nossa morte?” (Eclesiastes 2:26a e 3:22)*

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Paulo Cezar Vieira, pela oportunidade em trabalhar com a Química Medicinal dentro do Departamento de Química da UFSCar, dando a liberdade de escolha do projeto, o acesso a todos os recursos disponíveis para que o desenvolvesse e por transmitir todo o seu conhecimento e sempre incentivar a busca por melhores resultados, mas respeitando o meu tempo. Tudo isso foi de grande importância para o meu crescimento profissional.

Ao Prof. Dr. João Batista Fernandes que se tornou meu co-orientador e com muita paciência me ensinou e corrigiu as fragmentações em espectrometria de massas em momentos em que eu não raciocinava.

Aos demais professores do Departamento de Química da UFSCar, Antônio Gilberto Ferreira, Arlene Gonçalves Corrêa, Maria Fátima das Graças Fernandes da Silva, Quezia Bezerra Cass, por todos os ensinamentos, essenciais para a minha formação, e contribuições que tornaram possível a realização deste trabalho.

À professora Dra. Mônica Tallarico Pupo do Departamento de Ciências Farmacêuticas da USP-Ribeirão Preto pela colaboração e todo ensinamento. Bem como os seus alunos que me auxiliaram muito, especialmente Eduardo Afonso da S. Junior e sua esposa Camila R. Paludo.

Aos funcionários e técnicos do DQ-UFSCar, que gentilmente me proporcionaram todas as condições nos momentos em que a meningite (neurotuberculose) praticamente não me permitia trabalhar.

A todos os amigos do Laboratório de Produtos Naturais, Síntese de Produtos Naturais, Síntese Orgânica e CLAE, Espectrometria de Massas e Ressonância Magnética Nuclear, que ajudaram em todos os sentidos, nestes anos de doutorado, contribuindo para que tudo se tornasse mais fácil.

Aos meu pais, Carlos Magno e Sônia, ao meu irmão Dangelo Magno e sua esposa Elaine que estiveram sempre me apoiando em orações e palavras de conforto e por me proporcionar sobrinhos maravilhosos.

A CAPES pelo apoio financeiro.

E, a Deus, pelo dom e milagre da vida.

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS, SÍMBOLOS E FÓRMULAS

δ	Deslocamento químico do hidrogênio
δ	Deslocamento químico do carbono
$\alpha.K_i$	Constante de ionização do complexo
Ac	Extrato em acetato de acetila
CCD	Cromatografia em camada delgada
$CDCl_3$	Clorofórmio deuterado
CD_3COCD_3	Acetona deuterada
CG	Cromatografia gasosa
DMSO	Dimetilsulfóxido
Extrato Ac	Extrato em acetato de etila
E64	[1-[N-[(L-3-trans-carboxyoxirane-2-carbonyl)-L-leucyl]amino]-4-guanidinobutane]
EtOH	Etanol
Hz	Hertz
I	Inibidor
J	Constante de acoplamento
CD_3OD	Metanol deuterado
CH_3OH	Metanol
LC-MS	Liquid chromatography tandem mass spectrometry
LC-IT-MS	Liquid chromatography/ ion trap tandem mass spectrometry
LC-ESI-MS	Liquid chromatography/ electrospray ionization tandem mass spectrometry
LC-NMR	Liquid chromatography tandem Nuclear Magnetic Ressonance
<i>p</i> TSA	Ácido <i>para</i> -toluenosulfônico
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	Sulfato de magnésio heptaidratado
RMN 1H	Ressonância magnética nuclear de hidrogênio
RMN ^{13}C	Ressonância magnética nuclear de carbono 13
UV	Ultravioleta
V_{max}	Velocidade máxima da reação enzimática

LISTA DE TABELAS

TABELA 3.1 – Parâmetros para MS e MS/MS	25
TABELA 4.1 – Condições cromatográficas avaliadas para os extratos Ac das amostras do experimento de biotransformação (Continua).....	49
TABELA 4.2 – Análise de <i>íons selecionados</i> por ESI-MS Triplo Quadrupolo.	70
TABELA 4.2 – Valores de m/z $[M+H]^+$ e de seus fragmentos com abundância relativa para cada pico entre 5 a 7 min	97

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1.1 – Componentes não-voláteis do gengibre (SHUKLA e SINGH, 2007).....	2
FIGURA 1.2 – Fontes vegetais mais frequentemente utilizadas (MOREIRA et al., 2006).	3
FIGURA 1.3 – Estrutura química da diosgenina (17).....	8
FIGURA 1.4 – As cisteinil-proteases como catepsinas K, L e V, pertencem a subfamília das papaínas (GIANOTTI et al., 2008).	9
FIGURA 1.5 – Estrutura co-cristalizada da pirimidina (18) com a catepsina K (1.9 Å resolution; PDB 3KWZ) (RANKOVIC et al., 2010).....	10
FIGURA 3.1 – Fluxograma para obtenção dos extratos tanto para a cultura do fungo em que a biotransformação foi realizada quanto para o controle A. (MeOH= Metanol e AcOEt= acetato de etila).....	22
FIGURA 4.1 – A zingerona (1) vem da reação retro-aldólica do 6-gingerol (2) e pode estar presente no gengibre.....	39
FIGURA 4.2 – “Teste e citotoxicidade” da zingerona (1) frente ao fungo <i>Colletotrichum gloesporioides</i> e isolamento de um dímero.	40
FIGURA 4.3 – Tipos de acoplamentos oxidativos aromáticos possíveis para a formação do dímero da zingerona (1).	41
FIGURA 4.4 – Espectro da inserção direta, no modo positivo, do produto de biotransformação da zingerona N-4 (20), no espectrômetro de massas de alta resolução.....	42
FIGURA 4.5 – Espectro da inserção direta, no modo negativo, do produto de biotransformação da zingerona N-4 (20), no espectrômetro de massas de alta resolução.....	42
FIGURA 4.6 – Espectro de RMN de ¹ H (400 MHz) em clorofórmio-d do produto de biotransformação intitulado N-4 (20).	43
FIGURA 4.7 – Espectro de íons produtos por (-) ESI-MS/MS (A) do dímero da zingerona (20) intitulado N-4 e uma proposta de fragmentação (B).....	44
FIGURA 4.8 – Espectro de RMN ¹ H da zingerona (1) (A) e acima esquema reacional para se obter a zingerona marcada isotopicamente (1').	45
FIGURA 4.9 – Espectro de RMN ¹ H da zingerona isotopicamente marcada (1').	46

FIGURA 4.10 – Em (A), espectro de massas da zingerona (1) e em (B), da zingerona-5 D (1').	47
FIGURA 4.11 – (-) ESI-MS/MS: Espectro de fragmentação da zingerona (1) e da zingerona-5 D (1').	48
FIGURA 4.12 – Sobreposição dos cromatogramas dos produtos de biotransformação (em azul) depois de seis dias. Em verde, produção de metabólitos do fungo. Em vermelho padrão da zingerona (1). Condição cromatográfica 4 da TABELA 4.1.	51
FIGURA 4.13 – Sobreposição do cromatograma do extrato Ac (AcOEt) dos produtos de biotransformação (verde), depois de seis dias, e do produto de biotransformação N-4 (20), depois de 15 dias, em azul. Condição cromatográfica 3 da TABELA 4.1	52
FIGURA 4.14 – (-) ESI-MS: Cromatograma do pico base (<i>BCP</i>) do extrato Ac (AcOEt) dos produtos de biotransformação no 3°, 6°, 8° e 10 ° dia.....	53
FIGURA 4.15 – (A) Cromatograma do pico base (<i>BCP</i>) do extrato Ac (AcOEt) do 10° dia e em (B) fragmentos do íon <i>m/z</i> 385; (C) (-) ESI-MS/MS: Fragmentos por inserção direta do composto N-4 (20).	54
FIGURA 4.16 – Em (A), na cor azul, cromatograma do íon extraído (<i>EIC</i>) (ESI-MS) para o <i>m/z</i> 387. Em vermelho <i>EIC</i> (ESI-MS/MS) para o íon <i>m/z</i> 387 em cada ponto. Em (B), fragmentação MS ² do íon <i>m/z</i> 387, 29 a 9,5 minutos.	55
FIGURA 4.17 – Uma proposta de fragmentação para o íon <i>m/z</i> 387.	56
FIGURA 4.18 – (-) ESI-MS: Cromatograma do pico base do extrato Ac (AcOEt) dos controles (A) do 1°, 6° e 10° dia e dos produtos de biotransformação do 10° dia.	57
FIGURA 4.19 – (-) ESI-MS: Cromatograma de pico base (<i>BCP</i>) do extrato Ac (AcOEt) do 1°, 5° e 6° dia da biotransformação da zingerona- 5 D (1').	58
FIGURA 4.20 – (-) ESI-MS/ MS – Em (A) os fragmentos isotopicamente marcados e em (B) os fragmentos do dímero da zingerona (1) sem marcação.....	59
FIGURA 4.21 – O composto 6-gingerol (2) foi biotransformado por <i>C.gloesporioides</i> . 60	
FIGURA 4.22 – Gráfico de DAD-2D para o cromatograma do extrato acetato de etila (Ac) dos produtos de biotransformação do 10° dia do 6-gingerol (2).	61
FIGURA 4.23 – Sobreposição dos cromatogramas dos produtos de biotransformação em azul. Em verde, produção de metabólitos do fungo <i>C. gloesporioides</i> . Em vermelho e verde palha, controle de degradação e padrão do 6-gingerol (2).	62

FIGURA 4.24 – Espectro de RMN H^1 (600 MHz) em MeOH-d ₄ (B) do primeiro sinal do cromatograma com o tempo de retenção em torno de 12,5 minutos (A).....	63
FIGURA 4.25 – Ampliação da região mais blindada do espectro de RMN H^1 (600 MHz) em MeOH-d ₄ do primeiro sinal do cromatograma com o tempo de retenção em torno de 12,5 minutos.....	64
FIGURA 4.26 – Espectro de RMN H^1 (600 MHz) em MeOH-d ₄ (B) do segundo sinal do cromatograma com o tempo de retenção em torno de 16,3 minutos.....	65
FIGURA 4.27 – Ampliação do espectro de RMN H^1 (600 MHz) em MeOD do segundo sinal do cromatograma com o tempo de retenção em torno de 16,3 minutos.....	66
FIGURA 4.28 – O fungo <i>C.gloesporioides</i> apresenta polifenoloxidasas como laccases ou tirosinases que promovem reações de acoplamento oxidativo aromático.....	67
FIGURA 4.29 – Experimento de íons produtos, no modo negativo, para o álcool (21), o íon m/z 167 [M-H] ⁻ mostrou o fragmento m/z 93 como o mais intenso.....	67
FIGURA 4.30 – Experimento de íons produtos para o m/z 333 [M-H] ⁻ relacionado com o dímero do álcool (21), o fragmento m/z 215 foi o mais intenso.....	68
FIGURA 4.31 – Análise por SRM das transições m/z 167 →93 e m/z 333→215 de sete pontos do experimento de biotransformação.....	69
FIGURA 4.32 – Possíveis origens do álcool (21) m/z 167 [M-H] ⁻ e do seu dímero m/z 333 [M-H] ⁻	71
FIGURA 4.33 – Análise por LC-MS <i>Ion Trap</i> , em (A) e (B), (-) ESI-MS e (-) ESI-MS/MS do extrato Ac dos produtos de biotransformação; em (C) (-) ESI-MS do extrato Ac do controle Controle A (metabólitos do fungo).....	73
FIGURA 4.34 – Análise por LC-MS <i>Ion Trap</i> , ESI-MS/MS no modo negativo do extrato Ac da biotransformação do 6-gingerol mostrando o padrão de fragmentação para m/z 333,21 em 11,2 minutos.....	74
FIGURA 4.35 – Análise por LC-MS, em (A) e (B), (+) ESI-MS e (+) ESI-MS/MS do extrato Ac dos produtos de biotransformação do 6-gingerol no décimo dia de experimento; em (C) espectro de fragmentação MS ² do íon m/z 335 [M+H] ⁺	75
FIGURA 4.36 – Proposta de fragmentação o íon m/z 335 [M+H] ⁺	76
FIGURA 4.37 – Esquema da reação de marcação isotópica do 6-gingerol (2) e seu espectro de RMN de H^1	77
FIGURA 4.38 – Espectro de RMN de H^1 depois da reação de marcação isotópica.....	78

FIGURA 4.39 – Espectro por <i>inserção direta</i> do produto da reação de marcação do 6-gingerol com deutério (A), espectro MS ² do íon m/z 296 (B), espectro MS ³ do íon 196 (C).	79
FIGURA 4.40 – Análise por LC-MS <i>Ion Trap</i> , em (A) e (B), (-) ESI-MS e (-) ESI-MS/MS do extrato Ac dos produtos de biotransformação; em (C) (-) ESI-MS do extrato Ac do controle Controle A (metabólitos do fungo); em (D) controle da possível degradação do 6gingerol- 3D (ControleB).....	80
FIGURA 4.41 – Análise por LC-MS <i>Ion Trap</i> no modo positivo do 6-gingerol-3D (2') mostrando o pico mais intenso m/z 179,04 (B).....	81
FIGURA 4.42 – Análise por LC-MS, (-) ESI-MS/MS do extrato Ac da biotransformação do 6-gingerol-3D (2') mostrando o padrão de fragmentação para m/z 503 em 15,7 minutos.....	82
FIGURA 4.43 – Reações envolvidas para formação do produto de biotransformação do 6-gingerol-3-D (2') pelo <i>C. gloesporioides</i>	83
FIGURA 4.44 – Esquema reacional para se obter o derivado metil-6-gingerol (3).....	84
FIGURA 4.45 – Análise por CG-EM do derivado metil-6-gingerol (3), em (A) produto da degradação térmica, a metil-zingerona (26); em (B) desidratação formando o metil-6-shogaol (27); em (C) 4-metil-6-gingerol (3). (RML)= Rearranjo de MacLafferty	85
FIGURA 4.46 – Espectro de RMN de ¹ H (CDCl ₃) do derivado metil-6-gingerol (3) (A) comparado ao espectro do 6-gingerol (2), em (B).....	86
FIGURA 4.47 – Análise por LC-MS: Em (A) Cromatograma do pico base (BPC) no modo positivo, em (B) (+) ESI-MS e em (C) (+) ESI-MS/MS do metil-6-gingerol (3). ...	88
FIGURA 4.48 – Proposta de fragmentação por (+) ESI-MS/MS para o metil-6-gingerol (3).	89
FIGURA 4.49 – Sobreposição dos cromatogramas dos extratos Ac (AcOEt), em azul, experimento de biotransformação do metil-6-gingerol (3), em verde, controle (B) e em vermelho padrão da substância (3). Em (A) o quinto dia e em (B), décimo dia de biotransformação.....	90
FIGURA 4.50 – Em (A), Análise por CG-EM do extrato Ac (AcOEt) do quinto dia de biotransformação do meti-6-gingerol (3). Em (B) e (C) fragmentos dos picos em 16,0 e 15,5 minutos.	92

FIGURA 4.51 – Análise por GC-MS do tirosol (23), padrão da substância fornecida pela aluna de doutorado Luciana da Silva Amaral.	93
FIGURA 4.52 – Em (A), espectro de RMN ¹ H (600 MHz) em CDCl ₃ do extrato Ac (AcOEt) do experimento de biotransformação do metil-6-gingerol (3), e em (B), espectro em MeOH-d ₄ (B) do álcool (20).....	94
FIGURA 4.53 – Espectro de COSY (CDCl ₃ , 600 MHz) do extrato Ac (AcOEt) do experimento de biotransformação do metil-6-gingerol (3) evidenciando as correlações dos hidrogênios das posições (1) e (2) do álcool (29).	95
FIGURA 4.54 – Cromatograma do Pico Base (BCP) para as amostras do experimento de biotransformação no ‘quinto’ (A) e ‘décimo’ (B) dias, que foram misturadas; em (C) comparação com o controle (B).....	96
FIGURA 4.55 – Reações de hidroxilação e de redução da carbonila de metil-6-gingerol (3) por <i>C.gloesporioides</i>	97
FIGURA 4.56 – Espectro MS ² para o íon <i>m/z</i> 325 [M+H] ⁺ com tempo de retenção de 6,4 min.....	98
FIGURA 4.57 – Proposta de fragmentação para o íon <i>m/z</i> 325 [M+H] ⁺ com tempo de retenção de 6,4 min.....	98
FIGURA 4.59 – Proposta de fragmentação para o íon <i>m/z</i> 327 [M+H] ⁺ com tempo de retenção de 6,0 e 6,3 min.....	99
FIGURA 4.60 – Proposta de fragmentação para o íon <i>m/z</i> 327 [M+H] ⁺ com tempo de retenção de 5,8 e 5,9 min.....	100
FIGURA 4.61 – Esquema reacional para se obter o 6-shogaol (4) (SILVA, 2011).	100
FIGURA 4.62 – Em (A) e (B), análise por GC-MS do produto reacional para obtenção de 6-shogaol (4) e proposta das principais fragmentações em (C) (adaptado de JOLAD et al, 2004).....	101
FIGURA 4.63 – Nova proposta de fragmentação para os íons do espectro de GC-MS do produto reacional, o 6-shogaol (4).	102
FIGURA 4-64 – Espectro de RMN de ¹ H (CDCl ₃) do 6-shogaol (4) (A) comparado ao espectro do 6-gingerol (2), em (B).	103
FIGURA 4.65 – Espectro MS ² no modo negativo para o 6-shogaol (4).	104

FIGURA 4.66 – Sobreposição dos cromatogramas dos extratos Ac (AcOEt), em azul, experimento de biotransformação do 6-shogaol (4), em verde, controle (B) e em vermelho padrão da substância (4). Em (A) o quinto dia e em (B), décimo dia de biotransformação.....	105
FIGURA 4.67 – Análise por GC-MS do extrato Ac (AcOEt) do quinto dia de biotransformação de 6-shogaol (4).....	107
FIGURA 4.68 – Análise por GC-MS do extrato Ac (AcOEt) do décimo dia de biotransformação de 6-gingerol (2) por <i>Colletotrichum gloesporioides</i>	108
FIGURA 4.69 – Análise por GC-MS do extrato Ac (AcOEt) do décimo dia de biotransformação de 6-shogaol (4) evidenciando o pico em 26,7 minutos.....	109
FIGURA 4.70 – Proposta de fragmentação para o íon m/z 292 $[M]^+$ que ocorre no pico com tempo de retenção em 26,7 minutos.	110
FIGURA 4.71 – Análise por GC-MS do extrato Ac (AcOEt) do décimo dia de biotransformação evidenciando os fragmentos do íon m/z 294 $[M]^+$	111
FIGURA 4.72 – Análise por GC-MS do composto 6-gingerol (2).....	112
FIGURA 4.73 – Cromatograma do pico base (BCP), no modo negativo, do extrato Ac (AcOEt) da biotransformação do 6-shogaol (4), no quinto (A) e no décimo (B) dia; em (C) comparação com o controle (B).....	113
FIGURA 4.74 – Cromatograma do pico base (BCP), no modo positivo, do extrato Ac (AcOEt) do experimento de biotransformação do 6-shogaol (4) no quinto (A) e no décimo (B) dia; em (C) comparação com o controle (B).....	114
FIGURA 4.75 – (A) Cromatograma do pico base (BCP), no modo negativo, do quinto dia de biotransformação do 6-shogaol (4); (B) cromatograma de íon extraído (EIC) para íon m/z 295.....	115
FIGURA 4.76 – (A) e (C) ESI-MS/MS para o íon m/z 295 $[M-H]^-$; (B) cromatograma de íon extraído (EIC) para os íons m/z 295 e m/z 461.	116
FIGURA 4.77 – (A) Cromatograma do pico base (BCP), no modo positivo, do quinto dia de biotransformação do 6-shogaol (4); (B) Cromatograma de íon extraído (EIC) para íon m/z 261 e para o íon m/z 297 (C).....	117
FIGURA 4.78 – ESI-MS para a banda no intervalo de 7,1 a 7,4 minutos (A) e para o intervalo de 7,5 a 7,6 minutos (C), (B) sobreposição do extrato de íon comum (EIC) para o íon m/z 261, para o íon m/z 463 e para o íon m/z 485.	118

FIGURA 4.79 – (A) Sobreposição do EIC do íon m/z 261 com o TIC da amostra; (B) ESI-MS/MS para o íon m/z 261,25 em 7,3 minutos (C).....	120
FIGURA 4.80 – Espectro MS ² para padrões comerciais de (3R,5S) e (3S,5S)-6-gingerdiol (LV et al, 2012). RT (do inglês Retention Time, Tempo de Retenção).....	120
FIGURA 4.81 – Sobreposição do cromatograma do pico base (BCP) do quinto (A) e do décimo (B) dia de biotransformação, no modo negativo, com o cromatograma de íon extraído (EIC) para o íon m/z 291 [M-1] ⁻ (vermelho) e para o íon m/z 293 [M-1] ⁻ (fúcsia).	121
FIGURA 4.82 – ESI-MS/MS para o íon m/z 291 (A); (B) sobreposição do extrato de íon comum (EIC) para o íon m/z 291, e para o íon m/z 329.....	122
FIGURA 4.83 – (A) ESI-MS/MS para o íon m/z 291 [M-1] ⁻ no intervalo de 9,2 a 9,6 minutos e em (B) uma proposta de fragmentação para a provável estrutura do éster (33) obtida por reação de Baeyer Villeger.	123
FIGURA 4.84 – Proposta de fragmentação para o íon m/z 291, segundo o trabalho TAO et al 2009, formando o pico base m/z 155, caso a 6-gingerdiona (32) fosse um produto de biotransformação do 6-shogaol (4).....	124
FIGURA 4.84 – Proposta da rota de semi-síntese para a obtenção da nova Série A de éteres de oxima (D).	125
FIGURA 4.85 – Reação para obtenção e análise por CG-MS para o composto 3,4-dimetoxi-zingerona (P-19).	126
FIGURA 4.86 – Reação para a obtenção do composto 4-etilzingerona (P56) e espectro de RMN de ¹ H (CDCl ₃ , 400 MHz).	127
FIGURA 4.87 – Proposta da rota de semi-síntese da nova Série A de éter de oxima (D) com o grupamento hidroxila (OH) livre.	129
FIGURA 4.88 – Análise por GC-MS para o intermediário oximínico P-20	130
FIGURA 4.89 – Análise por RMN de ¹ H (CDCl ₃ , 400 MHz) do intermediário oxímico P-20 evidenciando a região mais blindada do espectro.....	131
FIGURA 4.90 – Análise por RMN de ¹ H (CDCl ₃ , 400 MHz) do intermediário oximínico P-20 evidenciando as regiões mais desblindadas do espectro.....	132
FIGURA 4.91 – Espectro de RMN de ¹³ C (CDCl ₃ , 400 MHz) do intermediário oximínico P-20	133
FIGURA 4.92 – Esquema reacional para obtenção dos éteres de oxima (Série A)...	133

FIGURA 4.93 – Análise por GC-MS do composto etil éter de oxima P-47	135
FIGURA 4.94 – Análise por RMN ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) da mistura de diastereoisômeros do etil éter de oxima P-47	136
FIGURA 4.95 – Espectro de RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 400 MHz) do composto etil éter de oxima (P-47).....	137
FIGURA 4.96 – Análise por GC-MS para o composto éter de oxima P-33	138
FIGURA 4.97 – Espectro de RMN de ^1H (Acetona- d_6 , 400 MHz) para o composto éter de oxima P-33	139
FIGURA 4.98 – Região de hidrogênios aromáticos do espectro de RMN de ^1H (Acetona- d_6 , 400 MHz) para o composto éter de oxima P-33	139
FIGURA 4.99 – Regiões mais blindadas do espectro de RMN de ^1H (Acetona- d_6 , 400 MHz) para o composto éter de oxima P-33	140
FIGURA 4.100 – Espectro de RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 400 MHz) para o composto éter de oxima P-33	141
FIGURA 4.101 – Análise por GC-MS do composto (2 <i>E/Z</i>)- <i>N</i> -(4-clorobenziloxi)-4-(3,4-dimetoxifenil)butan-2-imina (P-36).....	142
FIGURA 4.102 – Espectro de RMN de ^1H (Acetona- d_6 , 400 MHz) para o composto éter de oxima P-36	143
FIGURA 4.103 – Regiões mais blindadas do espectro de RMN de ^1H (Acetona- d_6 , 400 MHz) para o composto éter de oxima P-36	143
FIGURA 4.104 – Espectro de RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 400 MHz) para o composto éter de oxima P-36	144
FIGURA 4.105 – Análise por GC-MS do composto (2 <i>E/Z</i>)- <i>N</i> -(4-bromobenziloxi)-4-(3,4-dimetoxifenil)butan-2-imina (P-37).....	146
FIGURA 4.106 – Análise por GC-MS para o composto (P-50).....	147
FIGURA 4.107 – Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) para o composto P-50	148
FIGURA 4.108 – Espectro de RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 400 MHz) para o composto P-50	149
FIGURA 4.109 – Análise por GC-MS para o composto P-57	150
FIGURA 4.110 – Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) para o composto (P-57).	150
FIGURA 4.112 – Espectro de RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 400 MHz) para o composto (P-57).	151

FIGURA 4.113 - Ensaio da porcentagem de inibição dos extratos Ac, Aq e MM dos experimentos conduzidos com o fungo <i>Fusarium oxysporum</i> , em vermelho e com o fungo <i>Colletotrichum gloesporioides</i> , em azul.	152
FIGURA 4.114 - Halo de inibição para o derivado oxímico do 8-gingerol (P-57) sobre o fungo <i>C. gloesporioides</i>	153

LISTA DE ESQUEMAS

ESQUEMA 1.1 – Reação para formação da hidrazona SSi6 (8) obtida da reação do 6- gingerol (1) com a 2,4-dinitrofenilhidrazina (2,4-DNPH) (SILVA et al., 2011).	5
ESQUEMA 1.2 – Biotransformação de tetrahydrogeraniol (9) e tetrahidrolavandulol (11) por <i>C. gloesporioides</i> . (NANKAI, MIYAZAWA e KAMEOKA, 1998).	6
ESQUEMA 1.3 – Biotransformação do ácido betulínico (13) e ácido betulônico (15) por <i>Colletotrichum sp.</i> isolado das folhas do milho (BASTOS et al., 2007). RPM: Rotações por minuto.....	7
ESQUEMA 4.2 – Possível reação de Bayer Villegger seguida de hidrólise promovida por <i>C.gloesporioides</i> em metil-6-gingerol (3) (KÜRTI e CZAKÓ, 2005).....	91
ESQUEMA 4.3 – Possível reação de Baeyer Villegger seguida de hidrólise promovida por <i>C.gloesporioides</i> em 6-shogaol (4) (KÜRTI e CZAKÓ, 2005).	106

RESUMO

OBTENÇÃO DE DERIVADOS DE COMPOSTOS ISOLADOS DE *Zingiber officinale* POR BIOTRANSFORMAÇÃO E SEMI-SÍNTESE E AVALIAÇÃO FRENTE A CISTEÍNO-PROTEASES

A obtenção de novos derivados de policetídeos aromáticos encontrados no gengibre (*Zingiber officinale*), como a zingerona, o 6-gingerol e o 6-shogaol, empregando-se reações de biocatálise e semi-síntese foram alcançados, bem como a avaliação frente à cisteíno-proteases. Os derivados obtidos por semi-síntese foram avaliados na forma de um primeiro *screening* quanto à capacidade de inibição do crescimento dos fungos fitopatogênicos como *Colletotrichum gloesporioides* e *Fusarium oxysporum*. A biotransformação de quatro compostos: a zingerona, obtida comercialmente, a biotransformação do 6-gingerol, isolado do gengibre e de seus derivados 4-metil-6-gingerol e 6-shogaol por células totais de *C. gloesporioides* foi investigada tendo-se o reconhecimento do *pool* enzimático do fungo capaz de utilizar tais compostos como substrato. Todos os experimentos foram conduzidos em meio líquido estéril BD (Batata e Dextrose) sob a agitação de 120 rpm e temperatura de 30°C, obtendo-se o extrato metanólico da massa micelial (MM), o extrato aquoso (Aq), sendo o sobrenadante após obtenção do extrato em acetato de etila (Ac) do fluido da cultura. Os extratos Ac foram analisados por GC-MS e ESI-MS/MS usando técnicas de LC-MS. O fungo *C. gloesporioides* mostrou ser capaz em promover uma reação de acoplamento oxidativo aromático da zingerona, formando um dímero desta molécula, tal produto foi isolado e a estrutura química proposta com as análises dos espectros de RMN obtidos bem como por espectrometria de massas de alta resolução; o experimento de biotransformação também foi realizado com a zingerona marcada com deutério. A análise do extrato Ac por (-) ESI-MS/MS usando LC-IT-MS mostrou que desde o primeiro dia há formação do dímero o que foi confirmado pela formação de fragmentos isotopicamente marcados. A reação de acoplamento oxidativo aromático também ocorre na biotransformação para o composto fenólico 6-gingerol pelo *C. gloesporioides*, sendo que, provavelmente há consumo da cadeia lateral pelo fungo como fonte de carbono formando um álcool com a massa molecular de 168 Da, sendo o dímero desse álcool que aparece como produto de biotransformação. Dentre a proposta de reação de semi-síntese, o produto da reação de inserção da subunidade éter de oxima, tendo zingerona como material de partida foi obtido e apesar da modelagem molecular indicar boa complementariedade com o modelo de sítio catalítico de cisteinil-preoteases, o produto obtido não apresentou atividade de inibição contra as enzimas L e V a 25 µM. O derivado oximínico do 8-gingerol, apresentou halo de inibição contra a proliferação do fungo *C. gloesporioides* em teste de difusão em disco em meio BDA (Batata-Dextrose-Ágar) em placa de Petri, sendo que existem trabalhos que investigam a relação entre a atividade antifúngica de compostos com a propriedade de inibição de cisteíno-preoteases como papaína e catepsina B e L. O extrato acetato de etila (Ac) do décimo dia mostrou um bom resultado de inibição da catepsina V (80%).

ABSTRACT

BIOPROSPECTING OF DERIVATIVES COMPOUNDS ISOLATED FROM GINGER (*ZINGIBER OFFICINALE*) USING BIOCATALYTIC REACTIONS AND SEMI-SYNTHESIS: CYSTEINE-PROTEINASE INHIBITION PROPERTIES

Several aromatic polyketide derivatives from Ginger (*Zingiber officinale*), like zingerone, 6-gingerol and 6-shogaol were obtained by biocatalytic reactions and semi-synthesis and both their antifungal and cysteine-proteinase inhibitory properties were investigated. The derivatives obtained by semi-synthesis were evaluated in the form of a first screening for inhibition property of growth of phytopathogenic fungi *Colletotrichum gloesporioides* and *Fusarium oxysporum*. The biotransformation of four compounds: zingerone purchased from Sigma Aldrich, 6-gingerol isolated from ginger and its derivatives 4-methyl-6-gingerol and 6-shogaol was investigated using whole cells of *C. gloesporioides* and showed recognition of the fungal pool of enzymes capable of using such compounds as substrates. All experiments were conducted in sterile liquid medium BD (Potato and Dextrose) under agitation (120 rpm) and constant temperature (30° C), obtaining the methanol extract of mycelial mass (MM), the aqueous extract (Aq) and the ethyl acetate extract (Ac) of culture fluid. The ethyl acetate extract was analyzed by GC-MS and ESI-MS/MS using LC-MS techniques. The fungus *C. gloesporioides* proved able to promote a reaction of aromatic oxidative coupling of zingerone, forming a dimer of this molecule. This product was isolated, identified by NMR spectroscopy and high resolution mass spectrometry. The biotransformation experiment was also made with isotopically labeled zingerone with deuterium. Analysis of the ethyl acetate extract (Ac) by (-) ESI-MS / MS using LC-IT-MS showed that dimer formation since the first day once the isotopically labeled fragments were detected. The aromatic oxidative coupling reaction also occurs in the biotransformation to phenolic compound 6-gingerol by *C. gloesporioides*. It is probable that side chain of 6-gingerol was used as carbon source forming an alcohol with molecular mass 168 Da. The dimer of the alcohol appears as biotransformation product. Among the proposed semi-synthesis reactions, the insertion of an oxime ether subunit from zingerone as starting material was obtained. Despite the molecular modeling indicates good complementarity with the catalytic site model cysteinyl preteases, the product obtained does not show inhibitory activity against the enzymes L and V to 25 uM. The oximine derivative of 8-gingerol, presented halo of inhibition against the proliferation of fungus *C.gloesporioides* in disk diffusion test on PDA (Potato Dextrose Agar) in a Petri dish. The ethyl acetate extract (Ac) from the tenth day showed a good result of inhibition of cathepsin V (80%). There are studies that investigate the relationship between the antifungal activity of compounds of the property of inhibiting cysteine-preteases as papain and cathepsin B and L.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS, SÍMBOLOS E FÓRMULAS	vii
LISTA DE TABELAS	viii
LISTA DE FIGURAS.....	ix
ABSTRACT	xx
1 – INTRODUÇÃO	1
1.1 – Usos do Gengibre.....	1
1.2 – A biotransformação como fonte de novas moléculas	5
1.3 Cisteíno-proteases como alo alvo biológico	8
2 – OBJETIVOS	12
3 – MATERIAIS E MÉTODOS.....	13
3.1 – Material.....	13
3.2 – Equipamentos.....	14
3.3 – Procedimento experimental	16
3.3.1 – Isolamento de 6-gingerol (2)	16
3.3.2 – Reação de marcação isotópica do 6-gingerol (2).....	17
3.3.3 – Reação de marcação isotópica da zingerona (1).....	18
3.3.4 – Obtenção do 4-metil-6-gingerol (3)	19
3.3.5 – Obtenção do 6-shogaol (4)	20
3.3.6 – Reações de biocatálise	20
3.3.7 – Análises e identificação dos compostos obtidos	23
3.3.7.1– Procedimentos para análise por LC-MS	23
A – Condições cromatográficas para realização de análises por LC-MS dos extratos Ac dos experimentos de biotransformação	23
B – Condições espectrométricas para realização de análises por LC-MS dos extratos Ac dos experimentos de biotransformação	24
3.3.6 – Reações de semi-síntese.....	26
3.3.6.1 – Obtenção da nova série de éteres de oxima.....	26
3.3.6.2 – Obtenção do derivado oximínico a partir de 6-gingerol (2) e de 8-gingerol (5).....	35
3.3.7 – Ensaio bioquímico e biológico	37
4 – RESULTADOS E DISCUSSÕES	39
4.1 – Biotransformação da zingerona (1) por <i>Colletotrichum gloesporioides</i>	39
4.1.2 – Estudo do extrato em acetato de acetila (Ac) da biotransformação da zingerona (1) marcada ou não com deutério	45
4.2 – Biotransformação do 6-gingerol (2) por <i>Colletotrichum gloesporioides</i>	60

4.2.1 – Estudo do extrato em acetato de etila (Ac) da biotransformação de 6-gingerol (2) marcado ou não com deutério	60
4.3 – Biotransformação do metil-6-gingerol (3) e 6-shogaol (4) por <i>Colletotrichum gloesporioides</i>	84
4.3.1 – Biotransformação do metil-6-gingerol (3)	84
4.3.2 Biotransformação do 6-shogaol (4)	100
4.4 – Reações de semi-síntese	124
4.4.1 – Obtenção da nova série de éteres de oxima.....	124
4.4.1– Obtenção do derivado oximínico a partir de 6-gingerol (2) e de 8-gingerol (5)	147
4.5 – Ensaio bioquímico e biológico	151
5 – CONCLUSÕES	155
6 – REFERÊNCIAS	157

1 – INTRODUÇÃO

1.1 – Usos do Gengibre

As plantas aromáticas e seus subprodutos atraem a atenção de grupos de pesquisa, não somente no Brasil, como em outros países, por suas propriedades medicinais e organolépticas. O gengibre, planta herbácea nativa do sudoeste da Ásia, por apresentar tais propriedades, tem sido utilizado no oriente há mais de 2.000 anos, havendo referências de que nos séculos XII a XIV era tão popular na Europa quanto à pimenta-do-reino. Antes do descobrimento da América já era largamente utilizado pelos árabes, como expectorante e afrodisíaco, sendo difundido por toda a Ásia tropical, da China à Índia (SILVESTRINI et al., 1996). Esta planta (*Zingiber officinale*) é composta por parte aérea e numerosos rizomas, dos quais são extraídos elementos resinosos aromáticos e de gosto picantes, motivo pelo qual é empregado no preparo de condimentos e temperos. Além da culinária, o gengibre também é utilizado para fins medicinais (PARK e PIZZUTO, 2002). Artigos publicados descrevem o seu uso, desde a antiguidade, na medicina asiática, indiana e árabe, no tratamento de doenças infecciosas e helmintíases, na desobstrução das vias aéreas, no alívio dos sintomas do reumatismo, dores musculares, de garganta, gengivite e dor de dente e no tratamento de doenças gastrointestinais, como indigestão e prisão de ventre (ALI et al., 2008; ALTMAN e MARCUSSEN, 2001). Além dessas propriedades, o estudo de DUGASANI et al. 2010 indica que os compostos presentes no gengibre são eficazes no alívio dos sintomas de doenças inflamatórias crônicas, sendo que a administração do gengibre em pacientes com artrite reumatóide reduziu significativamente os sintomas da doença. O trabalho de SHUKLA e SINGH (2007), por sua vez, relata as propriedades do gengibre na prevenção contra o câncer.

Os componentes voláteis do óleo essencial do gengibre, que contribuem para o seu aroma e sabor característico, consistem majoritariamente de hidrocarbonetos sesquiterpênicos e, em menor porcentagem, de hidrocarbonetos monoterpênicos. Por sua vez, os princípios não-voláteis, como os gingeróis, shagaois, o paradol e a zingerona, produzem o sabor picante (SHUKLA e SINGH, 2007) (FIGURA 1.1). Os gingeróis apresentam atividade analgésica, antipirética e cardiotônica, além de inibirem a biossíntese de prostaglandinas. O 6-gingerol (**2**), o 8-gingerol (**5**) e o 10-gingerol (**7**),

uma série de compostos químicos homólogos diferenciados pelo comprimento da cadeia alquila, são os principais componentes ativos no rizoma fresco (SHUKLA e SINGH, 2007). Dentre eles, o 6-gingerol (**2**) é o constituinte mais abundante, sendo que sua concentração diminui durante o armazenamento e processamento pós-colheita, especialmente com o tratamento térmico. As suas propriedades farmacológicas, bem como o mecanismo de ação, são bastante exploradas e a este composto são atribuídas atividades antioxidantes e anti-inflamatórias, além de suprimir a formação de citocinas e promover a angiogênese (SCHWERTNER e RIOS, 2007).

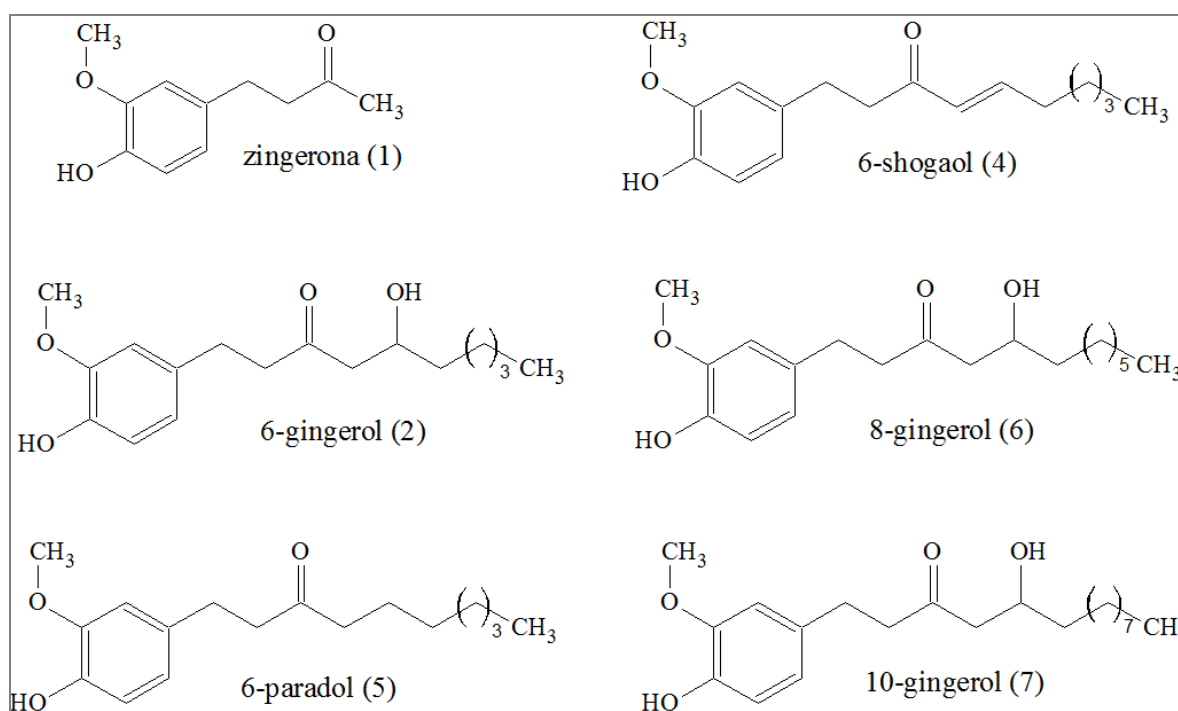


FIGURA 1.1 – Componentes não-voláteis do gengibre (SHUKLA e SINGH, 2007).

O sabor picante do gengibre seco resulta principalmente dos shogaóis, que são as formas desidratadas dos respectivos gingeróis. O 6-shogaol (**4**), por exemplo, é derivado do 6-gingerol (**2**). No trabalho publicado por DUGASANI et al. (2010), os autores relatam que o 6-shogaol (**4**) apresentou maior atividade de inibição dos mediadores inflamatórios e da produção de ROS (do inglês, Espécies Reativas de Oxigênio) do que o 6-gingerol (**2**), o que justifica o uso do gengibre seco para o tratamento de algumas doenças relacionadas ao estresse oxidativo e à inflamação. A maior potência e eficácia do 6-shogaol (**4**) pode estar associada à presença da carbonila α,β -insaturada em sua estrutura química, sendo necessário, no entanto, um

estudo mais aprofundado sobre os mecanismos de ação e propriedades farmacológicas deste composto.

Desde 2011, na VII reunião da Sociedade Latinoamericana de Fitoquímica, a Profa Dâmaris Silveira (Universidade de Brasília), trouxe o dado de que os princípios ativos isolados de produtos naturais, mobilizam em torno de 6,25% do mercado farmacêutico, isso quer dizer mais de 20 bilhões de dólares e tem crescido a cada ano. No trabalho de MOREIRA et al. 2010, de mais de 738 documentos de patentes, 89,3% são usadas para tratamento de doenças e 10,7 % para suplementos alimentares ou repelentes, sendo que o *Zingiber officinale* está entre as 15 fontes vegetais mais frequentemente utilizadas.

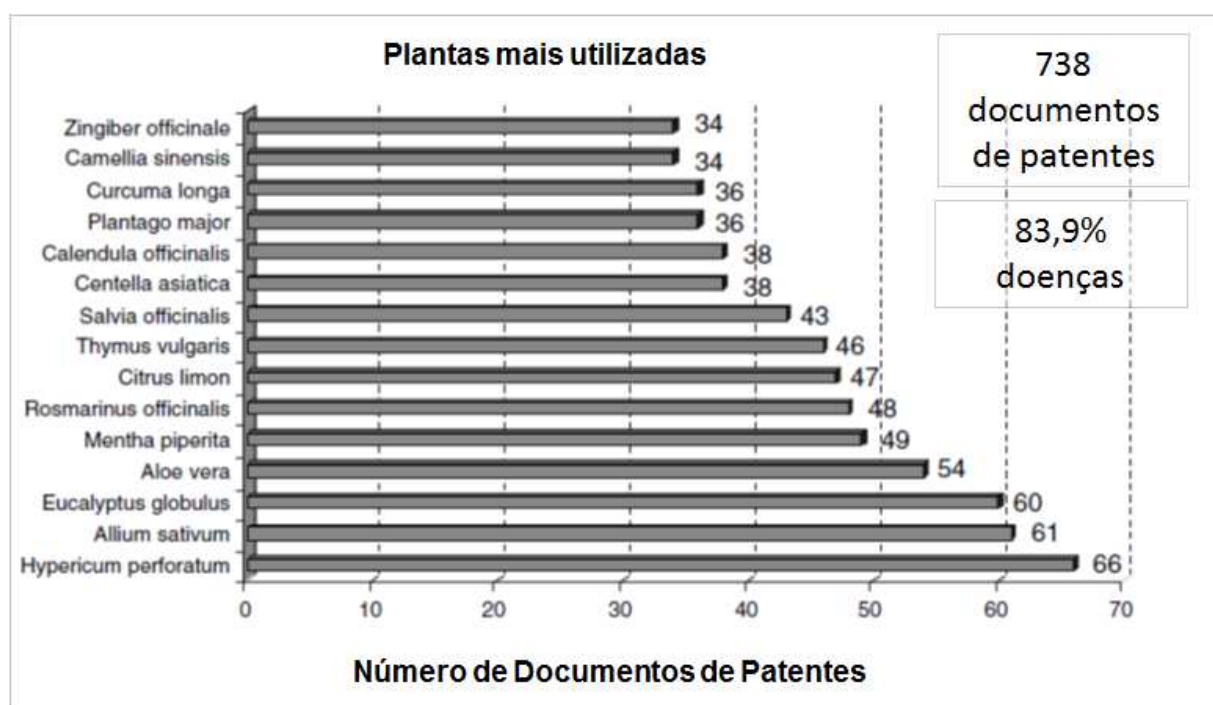


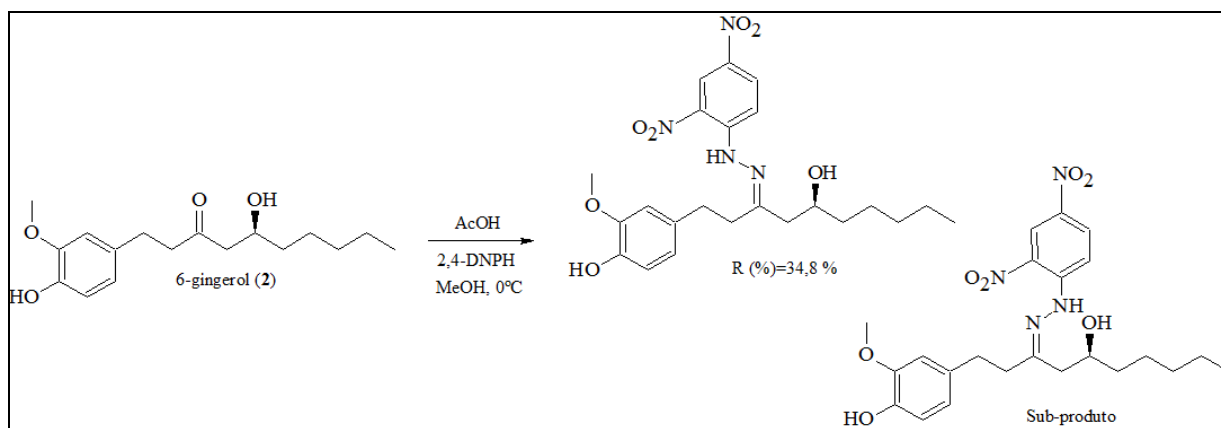
FIGURA 1.2 – Fontes vegetais mais frequentemente utilizadas (MOREIRA et al., 2006).

No trabalho de SILVA (2011), tese desenvolvida no Laboratório de Produtos Naturais do Departamento de Química da UFSCar, foi realizado um estudo de sobrecarga em coluna C18. A partir de uma fração rica em gingeróis e shogóis, após fracionamento prévio, quantidades cada vez maiores de amostra foram injetadas, a fim de se chegar ao máximo em massa que poderia ser injetado na coluna utilizada, sem que houvesse perda de resolução das bandas cromatográficas. A quantidade máxima injetada na coluna analítica C18, 10 μ , 25 x 0,46 cm, utilizando detector UV a 282 nm e fase móvel

MeOH/H₂O (75:25) foi de 30 mg. Uma observação importante neste trabalho é de que a sobrecarga da coluna pode não ter sido atingida devido a saturação eletrônica do detector, o que dificultou o estudo de sobrecarga por não permitir o aumento da massa de amostra injetada de forma que se pudesse visualizar esta sobrecarga.

O mesmo trabalho foi realizado por SILVA (2011), na escala semi-preparativa, utilizando um comprimento de onda de menor absorção pelos gingeróis, 254 nm. Neste momento o que se observou é que não houve a perda de resolução e alargamento das bandas cromatográficas de interesse, sendo que massas maiores de amostra puderam ser injetadas, chegando mais próximo da sobrecarga da coluna cromatográfica. SILVA (2011) conseguiu injetar aproximadamente 170 mg de amostra em escala semi-preparativa, para o isolamento dos gingeróis, obtendo-se 94 mg do 6-gingerol (**2**), 22 mg do 8-gingerol (**6**) e 17 mg do 10-gingerol (**7**), em apenas 30 minutos de corrida.

Além do isolamento e caracterização dos constituintes do gengibre (*Zingiber officinale*), SILVA (2011), avaliou frente a cisteinil-proteases, sendo que o 6-gingerol (**1**) apresentou um IC₅₀ de 70,33 µM e o 6-shogaol (**4**) um IC₅₀ de 22,93 µM frente à catepsina K. Além disso fez modificações estruturais do 6-gingerol (**1**), sendo que das sete substâncias obtidas, quatro levaram à um aumento considerável do poder inibitório. Das substâncias obtidas, três, SSi6 (**8**), 10-gingerol (**7**), 6-shogaol (**4**), foram selecionadas para ensaios posteriores: determinação do tipo de inibição frente à catepsina K e de inibição da produção de óxido nítrico (NO), em meio celular. Os condrócitos são células do tecido cartilaginoso, que produzem enzimas proteolíticas, como a catepsina K, capazes de causar erosão da cartilagem de pacientes com doenças osteoarticulares (VINARDELL et al., 2009 apud SILVA, 2011). O óxido nítrico é um importante mediador da inflamação e sua determinação em meios biológicos pode ser utilizada para a busca de inibidores de enzimas que participam da sua biossíntese, principalmente a óxido nítrico sintase induzível (iNOS) (SILVA, 2011).



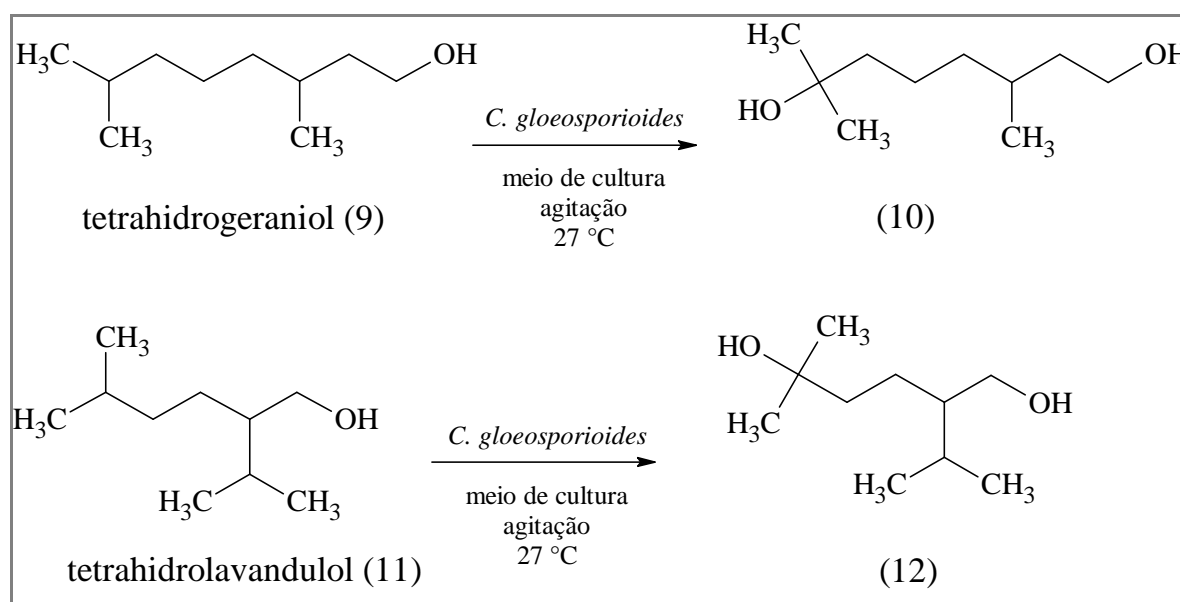
ESQUEMA 1.1 – Reação para formação da hidrazona SSi6 (**8**) obtida da reação do 6-gingerol (**1**) com a 2,4-dinitrofenilhidrazina (2,4-DNPH) (SILVA et al., 2011).

1.2 – A biotransformação como fonte de novas moléculas

Os fungos e leveduras, bem como as bactérias e outros organismos inferiores, são utilizados há algum tempo para a transformação biológica de compostos orgânicos. O uso de micro-organismos, ou de suas enzimas isoladas, para realizar modificações específicas ou interconversões químicas de grupos funcionais vem ganhando destaque, principalmente no que concerne à síntese assimétrica de moléculas com atividades biológicas importantes (GARCÍA-PAJÓN, HERNÁNDEZ-GALÁN e COLLADO, 2003). Uma grande variedade de produtos naturais, tais como compostos aromáticos, esteróides, alcalóides, cumarinas, flavonóides e terpenóides, são alvos de biotransformações por fungos, bactérias, leveduras, células vegetais e enzimas derivadas dessas fontes (LIU e YU, 2010). Entre os fungos fitopatogênicos, o gênero *Colletotrichum* é um dos mais importantes, principalmente nas regiões tropicais e subtropicais, uma vez que envolve espécies que causam doenças de expressão econômica em leguminosas, cereais, hortaliças e diversas culturas frutíferas. Como exemplo, podemos citar a antracnose, uma doença causada por um fungo pertencente a este gênero, que pode atacar os ramos novos, folhas, inflorescências e frutos das plantas (FEMENÍA-RÍOS et al., 2006; MOALEMIYAN et al., 2007).

Nos últimos anos, um grande número de trabalhos publicados descreve o uso de várias espécies de *Colletotrichum* sp. para biotransformação (GARCÍA-PAJÓN, HERNÁNDEZ-GALÁN e COLLADO 2003). Tais espécies possuem considerável

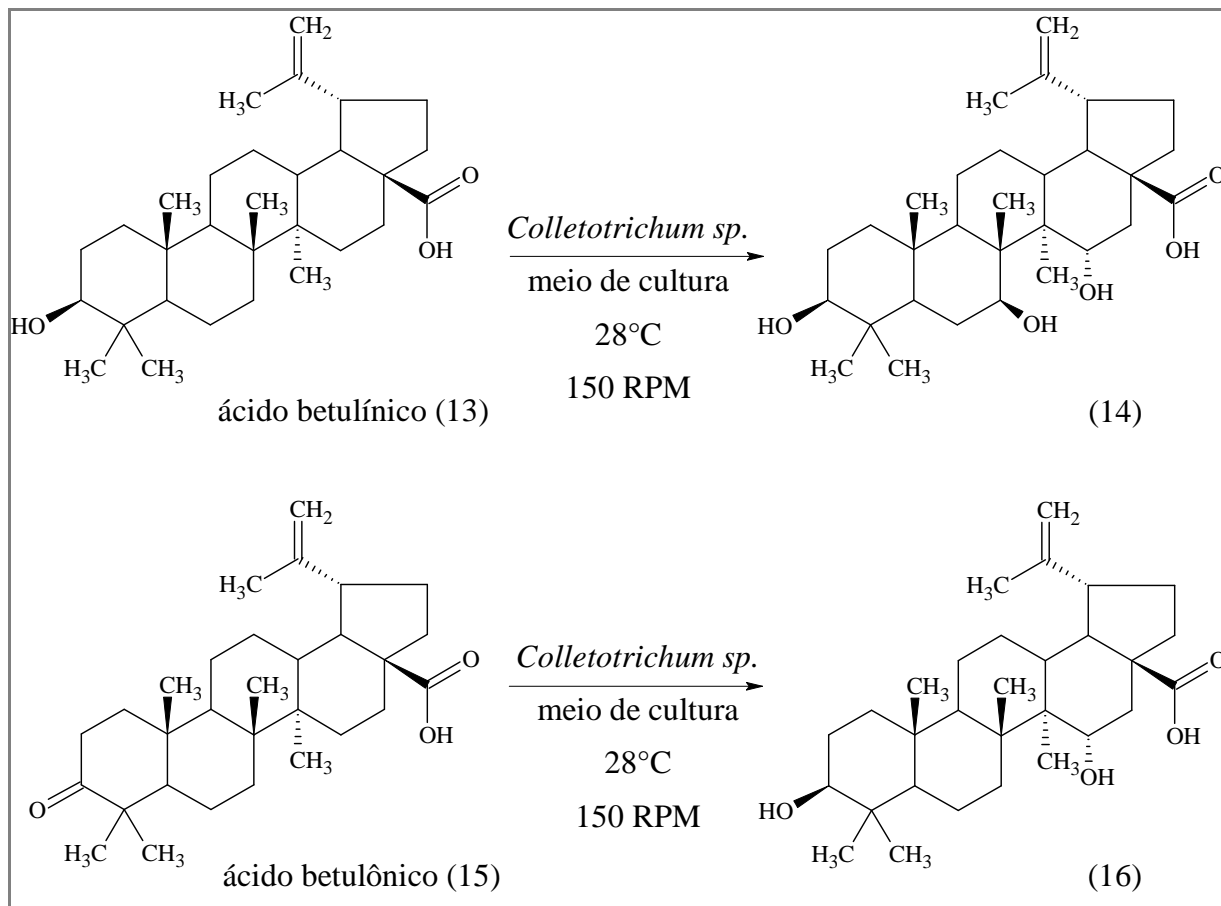
atividade oxido-redutase, capaz de promover hidroxilações regioseletivas e reduções diástero e enantiosseletivas em diferentes substratos. No caso de compostos terpenóides, *Colletotrichum* sp. exibe expressiva atividade hidrolase e forte poder de redução (MIYAZAWA et al., 2000; MIYAZAWA, NANKAI e KAMEOKA, 1995). Como exemplo, podemos citar a biotransformação de tetrahydrogeraniol (**9**) e tetrahidrolavandulol (**11**) por *C. gloeosporioides*, com a oxidação regioseletivamente na unidade isopropila dos monoterpenos saturados (NANKAI, MIYAZAWA e KAMEOKA, 1998) (ESQUEMA 1.2). Neste trabalho, o meio de cultura líquido estéril era constituído de 1,5% de sacarose, 1,5% de glicose, 0,5% de peptona, 0,05% de MgSO₄.7 H₂O, 0,05% de KCl, 0,1% de K₂HPO₄, 0,001% de FeSO₄.7H₂O, água destilada. O experimento de biotransformação foi realizado em frascos de 200 mL com 100 mL de meio de cultura e 50 mg do o tetrahydrogeraniol (**9**) e do tetrahidrolavandulol (**11**) foram acrescentados ao meio, após três dias de pré-fermentação.



ESQUEMA 1.2 – Biotransformação de tetrahydrogeraniol (**9**) e tetrahidrolavandulol (**11**) por *C. gloeosporioides*. (NANKAI, MIYAZAWA e KAMEOKA, 1998).

Outro exemplo é a biotransformação do ácido betulínico (**13**) em ácido 3-oxo-15 α -hidroxilup-20(29)-en-28-óico (**14**) e a conversão do ácido betulônico (**15**), obtido por

derivatização química do ácido betulínico, para o ácido 3-oxo-7 β ,15 α -dihidroxiup-20(29)-en-28-óico (**16**) (ESQUEMA 1.3) (BASTOS et al. 2007).



ESQUEMA 1.3 – Biotransformação do ácido betulínico (**13**) e ácido betulônico (**15**) por *Colletotrichum sp.* isolado das folhas do milho (BASTOS et al., 2007). RPM: Rotações por minuto.

A literatura também mostra vários exemplos do emprego de fungos do gênero *Fusarium* em processos de biotransformação, tais como reações de hidrogenação, de oxidação e de hidroxilação nas posições 6 β , 12 β e 15 α de esteróides (WILSON; GALLIMORE e REESE 1999). Sabe-se que a maioria das espécies deste gênero são fungos do solo com distribuição cosmopolita, ativos na decomposição de substratos celulósicos de plantas, sendo que alguns isolados são parasitas de plantas. A espécie mais comum do gênero é o *Fusarium oxysporum*, um patógeno capaz de penetrar nas raízes da planta por meio de hifas e, assim, colonizar o córtex pelo crescimento inter e

intracelular. Após atingir o tecido vascular, o fungo espalha-se rapidamente através dos vasos do xilema, provocando os sintomas típicos da murcha (POLI et al., 2009). Como exemplo de inovação biotecnológica e a biotransformação, como ferramenta de modificação estrutural, podemos citar o trabalho de ARUANA et al. 2009, cuja patente descreve o processo otimizado para a transformação de *diosgenin (25R)-spirost-5-en-3 β -ol*, a partir do extrato de plantas pertencentes ao gênero *Dioscorea*, usando cepas de *Fusarium oxysporum* e *Mucor circinelloides*. As linhagens de fungos apresentam alta tolerância ao substrato e a digestão completa do substrato propicia uma alta produção de diosgenina (17) (FIGURA 1.3), um composto precursor de hormônios esteróides, encontrado em algumas espécies de *Solanum* e *Dioscorea*, com propriedades anti-inflamatória, antioxidante, antineoplásica, dentre outras (JUNG et al., 2010; SUR et al., 2001; YAMADA et al., 1997).

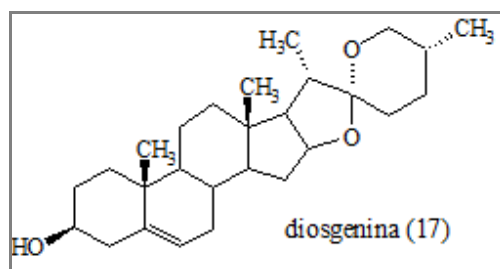


FIGURA 1.3 – Estrutura química da diosgenina (17).

1.3 Cisteíno-proteases como alo alvo biológico

As enzimas proteolíticas participam na maioria dos processos fisiológicos seja ao nível celular ou no organismo como todo (DUNAEVSKY et al., 2014). As cisteinil-proteases tem a função primária de degradar de forma não seletiva as proteínas, é um complexo grupo de enzimas de variadas propriedades físicas e bioquímicas. A família C₁ é a mais conhecida, sendo a papaína uma das mais estudadas, compreende 11 genes (B, C, H, F, K, L, O, S, V, W, X/Z) sendo amplamente expressa nos reinos animal, vegetal e também podem ser identificados nos micro-organismos (DUNAEVSKY et al., 2014; GIANOTTI et al., 2008). Muitos trabalhos que empregam o uso de inibidores de peptidases em agricultura e na busca de novos protótipos a fármacos podem ser encontrados na literatura (DUNAEVSKY et al., 2014; IMADA et al. 2004). A busca e

investigação de novos inibidores de proteases a partir de várias fontes pode revelar novas especificidades e promover novas ideias (DUNAEVSKY et al., 2014).

Assim como na papaína a estrutura terciária da enzima madura da família das cisteinil-proteases (FIGURA 1.4) apresentam a estrutura terciária bilobada, consistindo de um domínio L (*left (L-)domain*), que compreende principalmente três α -hélices da metade N-terminal, e um domínio R (*right (R-)domain*), que compreende um motivo barril- β da metade C-terminal da molécula. O sítio ativo se encontra na fenda dos dois lóbulos, estando a cisteína catalítica no domínio L e a histidina no domínio R. Na maioria das enzimas deste grupo, esta estrutura é estabilizada por três pontes dissulfeto, duas no domínio L e uma no domínio R. Estruturalmente, as enzimas da família C₁ são similares quanto ao número e posição de α -hélices e folhas- β , e a maioria das mutações entre proteínas ocorre nos *loops* e *turns* que ligam esses elementos, o que é consistente com uma ancestralidade em comum (GIANOTTI et al., 2008).

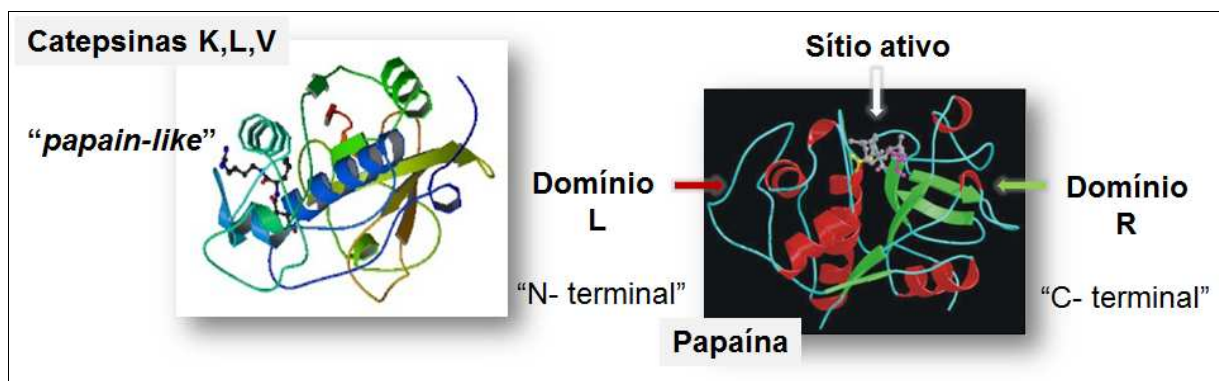


FIGURA 1.4 – As cisteinil-proteases como catepsinas K, L e V, pertencem a subfamília das papaínas (GIANOTTI et al., 2008).

De maneira geral, as moléculas desenhadas como inibidores de catepsinas, devem se ligar reversivelmente à enzima, afim de se evitar a antigenicidade decorrente da modificação covalente de proteínas através da inibição irreversível. A seletividade também é desejável para evitar efeitos adversos, sendo que, existem vários exemplos na literatura, por exemplo de inibidores da catepsina K, planejados de forma a explorar as diferenças no subsítio S2 desta enzima, obtendo-se assim, seletividade em relação às demais proteinases (DEATON e TAVARES, 2005). A região S2 é formada pelos

resíduos Tyr 67, Met 68, Ala 134 e Ala 163, tratando-se de um bolso raso, com cerca de 4 Å de profundidade, mas largo, e por isso grupos substituintes mais volumosos podem facilmente ocupar este subsítio (PAN et al., 2005). Além da diferença em S2 para catepsina K, que se apresenta como um bolso mais raso, em relação às catepsinas S e L, por exemplo, modificações estruturais que favoreça a ligação em S3 (Gly 66 e Tyr 67), também pode garantir a seletividade (BROMME et al., 1996; MARQUIS et al., 2001). Como exemplo, nos trabalhos de ALTMANN et al. (2007) e de RANKOVIC et al. (2010), estudos de modelagem molecular investigado modificações em P2 e P3, resultaram em moléculas, pertencentes à classe das 2-ciano-pirimidinas (**19**), FIGURA 1.5, que se apresentaram como inibidores potentes e mais seletivos à catepsina K. Já para alguns dos compostos pertencentes à classe de cetoamidas, maior seletividade foi alcançada, explorando-se o subsítio principal S1 da catepsina K, uma região formada pelos resíduos Gly 23, Ser 24, Gly 64, e Gly65, tratando-se de um bolso raso, com cerca de 5 Å de comprimento, onde grupos substituintes lineares e hidrofóbicos têm melhor interação (PAN et al., 2005; TAVARES et al., 2004; BARRET et al., 2005). Outro dado importante para o desenho de novos inibidores de catepsinas, trata-se do modelo animal utilizado nos estudos, sendo necessário considerar a identidade da sequência/homologia interespécie (DEATON e TAVARES, 2005).

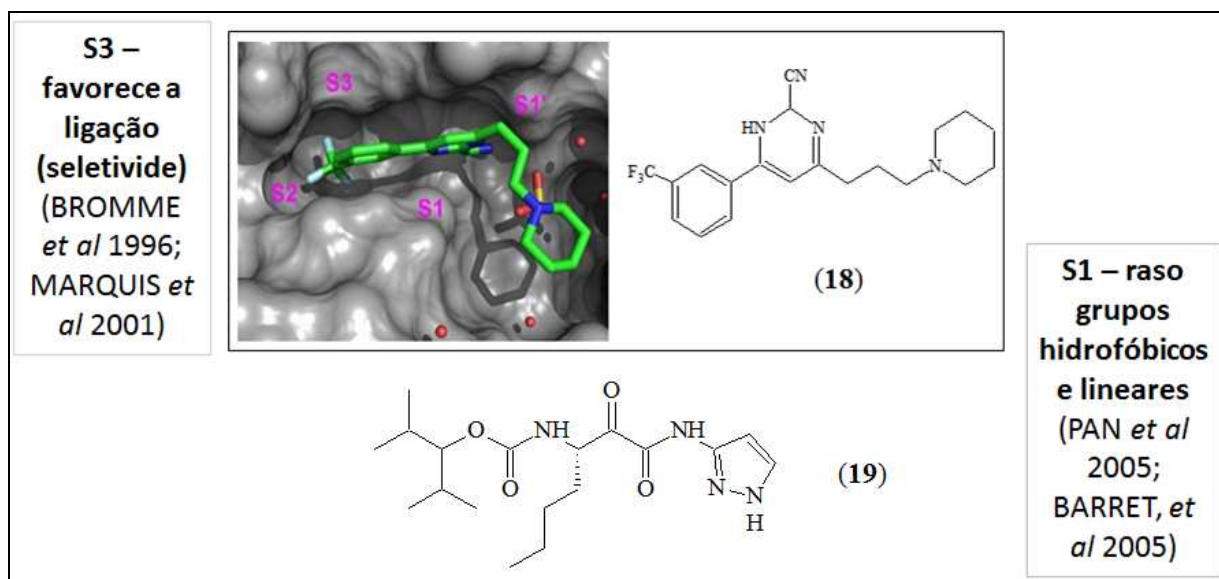


FIGURA 1.5 – Estrutura co-cristalizada da pirimidina (**18**) com a catepsina K (1.9 Å resolution; PDB 3KWZ) (RANKOVIC et al., 2010).

2 – OBJETIVOS

Dentre as classes de compostos relatados na literatura como inibidores de cisteinil-proteases, praticamente não existem trabalhos que explorem a atividade de derivados oxímicos, sendo o objetivo deste projeto, a inserção de tal unidade estrutural em compostos isolados do gengibre. A biotransformação também será uma ferramenta para estudo do potencial enzimático do fungo fitopatogênico, *Colletotrichum gloesporioide*, em promover modificações químicas de compostos de origem natural, derivados do gengibre, na busca por novos inibidores de cisteinil-proteases.

Os objetivos específicos foram:

a) A biotransformação por *Colletotrichum gloesporioides* dos substratos:

- Zingerona e zingerona-D (zingerona isotopicamente marcada)
- 6-gingerol e 6-gingerol-D (6-gingerol isotopicamente marcado)
- metil-6-gingerol e 6-shogaol

Obtendo uma diversidade estrutural por meio de reações biocatalizadas por fungo.

b) Reações de semi-síntese:

- Inserção da subunidade éter de oxima utilizando a zingerona como material de partida
- Obtenção do derivado oximínico a partir do 6-gingerol e do 8-gingerol.

Obtendo uma diversidade estrutural por meio das reações biocatalizadas.

c) Ensaio bioquímicos tanto dos derivados obtidos por reações de semi-síntese quanto dos extratos em acetato de etila (Ac) dos produtos da biotransformação. Também ensaio biológico de teste de disco-difusão em meio sólido avaliando o halo de inibição do crescimento do fungo *Colletotrichum gloesporioides* e do fungo *Fusarium oxysporum* de alguns dos compostos obtidos por reações de semi-síntese.

3 – MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 – Material

Suportes para cromatografia de adsorção em coluna

- Sílica gel 60 comum (70-230 mesh), Sigma.
- Sílica gel 60 “flash” (230-400 mesh), Sigma

Solventes e reagentes

- Foram utilizados solventes (n-hexano, diclorometano, acetato de etila, acetona e água) comerciais destilados no DQ-UFSCar e solventes deuterados (clorofórmio, metanol), obtidos da Merck e Aldrich, para a obtenção dos espectros de RMN.
- Inibidor irreversível de cisteino peptidases E-64 (L-3-carboxi-trans-2,3-epoxipropionil-leucilamido (4-guanino) butano, DTE (ditiol'eritritol) e 5-nitrosalicilaldeido foram obtidos da Sigma.
- Substrato Z-Phe-Arg-MCA (Cbz-Phe-Arg-MCA ou carbobenzoxi-fenilalaninaarginina-7-amino-4-metilcumarina ou benziloxycarbonil- fenilalanina-arginina-4-metil-7-coumarilamida) e Z-Gly-Pro-Arg-4MβNA, da Sigma e Bachem, respectivamente.
- Meios de cultivo estéril batata-dextrose (B.D) e batata-dextrose-ágar (B.D.A) da marca Acumédia ®.

Cromatografia em camada delgada analítica

- Utilizaram-se folhas de alumínio com sílica 60 F254, ($\phi = 0,2$ mm) da Merck.

Cromatografia em camada delgada preparativa

- Foram utilizadas placas preparativas de sílica gel 60 F254, (5 x 20 cm) da Merck.

Reveladores

- Câmara de radiação ultravioleta, nos comprimentos de onda 254 nm e 365 nm.
- Solução de vanilina: a vanilina (3,0 g) foi dissolvida em uma solução contendo 135 mL de água destilada, 135 mL de MeOH e 30 mL de H₂SO₄ concentrado.

3.2 – Equipamentos

Evaporadores rotativos

- Büchi, rotaevaporador R-114 equipado com banho Büchi B-480 e recirculador refrigerado NESLAB, modelo CFT-25 mantido a 5°C;
- Büchi, rotavapor R-200 equipado com banho Büchi 490 e recirculador refrigerado NESLAB, modelo CFT-25 mantido a 5°C.

Sistemas Cromatográficos

Sistema 1 (analítico): Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência Agilent Technologies modelo 1260, equipado com bomba quaternária G1311C, degaseificador G1322A, amostrador automático G1329B, detector de Ultravioleta G1314B e compartimento termostaticado de coluna G1316A.

Sistema 2 (analítico e preparativo): Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência da Shimadzu SCL-10AVP com sistema de reciclo, válvula Rheodyne 7725i, bomba Shimadzu LC-6AD.

Sistema 3 (GC-MS): Cromatógrafo Gasoso 17A SHIMADZU acoplado ao espectrômetro de massas modelo QP 5000, ionização por impacto eletrônico (70 eV). Coluna Optima-5 (30 x 0,25 mm) filme= 0,25 µm. Todas as mostras foram injetadas utilizando a temperatura do injetor de 250°C e a temperatura do detector de 260°C, modo Split e volume de injeção de 1 µL. A maior parte das análises foram realizadas utilizando o seguinte programa de temperatura: 70 °C (6 min); 15 °C/ min até 160 °C; 5°C/ min até 200°C; 200°C (2 min); 20°C/ min até 260°, 260 °C (10 min) (Total: 35,92 minutos).

Sistema 4 (LC-MS): Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência Agilent Technologies modelo 1200, equipado com bomba quaternária G1311A, degaseificador G1322A, amostrador automático G1367B e detector de arranjo de diodo G1316A. Acoplado a espectrômetro de massas Applied Biosystems modelo API 2000 analisador Triplo Quadrupolo utilizando ionizador eletrospray Turbolon Spray.

Sistema 5 (LC-MS): Cromatográfico líquido SHIMADZU (Kyoto, Japão), composto de duas bombas LC-20AD, uma delas equipada com válvula solenoide de quatro linhas, degaseificador DGU-20As, autoinjeter SIL-20A, detector de ultravioleta SPD 20A; todas as unidades interligadas através de uma interface CBM 20A e operados por computador, sendo os cromatogramas registrados pelo software Class VP. O sistema cromatográfico foi acoplado por meio de um divisor de vazão (“splitter”) ao espectrômetro de massas com fonte de eletrospray e analisador tipo íon trap modelo Esquire 6000[®] (Bruker Daltonics, Alemanha); os espectros de massas foram registrados pelo software Data Analysis.

Sistema 6 (LC-RMN):

→ Equipamento acoplado HPLC-SPE: Cromatógrafo Agilent modelo 1200 acoplado a uma unidade Prospekt 2. O sistema de HPLC é equipado com bomba quaternária (Agilent Pump Control, Bruker Daltonik GmbH, G1311A, degaseificador (G1322A), detector de arranjo de diodos com comprimento de onda variável (G1315D) e amostrador automático (LC Autosampler Control, Bruker Daltonik GmbH, G1329A).

→ Equipamento de ressonância (RMN): Bruker Avance III – 14,1 Tesla (600 MHz para frequência do hidrogênio) equipado com trocador automático de amostra, cryo-sonda TCI (1H/13C/15N) de 5 mm com ATMA[®] (Automatic Tunning MAtching) e gradiente de campo em z, sonda BBI de 5 mm com ATMA[®], gradiente de campo em z, unidade de temperatura variável, unidade geradora de gradiente de campo, unidade cryo-fit[®] e unidade HPLC-SPE acoplado.

Balança analítica

- Shimadzu AUW séries

Câmara de análise de fluorescência por luz ultravioleta

Cabine tipo Spectroline modelo CM-10 com luz tipo Spectroline modelo ENF-260C

Espectros de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

- Bruker DRX 9,4 T (400 MHz para espectros de RMN 1H e 100 MHz para espectros de RMN 13C) equipado com trocador automático de amostra, sonda de 5 mm BFO (smart

probe com ATMA[®]) e bobina de gradiente de campo em z, unidade geradora de gradiente de campo e unidade de temperatura variável.

- Bruker Avance III – 14,1 Tesla (600 MHz para frequência do hidrogênio) equipado com trocador automático de amostra, cryo-sonda TCI (1 H/13 C/15 N) de 5 mm com ATMA[®] (Automatic Tunning MAtching) e gradiente de campo em z, sonda BBI de 5 mm com ATMA[®], gradiente de campo em z, unidade de temperatura variável, unidade geradora de gradiente de campo, unidade cryo-fit[®] e unidade LC-SPE acoplado.

Espectrofluorímetro

- Leitor de placa de ELISA: Molecular Devices Corporation – Spetra MAX GEMINI XS.

Espectrofotômetro

- Leitor de placa de ELISA: Dynex Technologies Opsy MR.

3.3 – Procedimento experimental

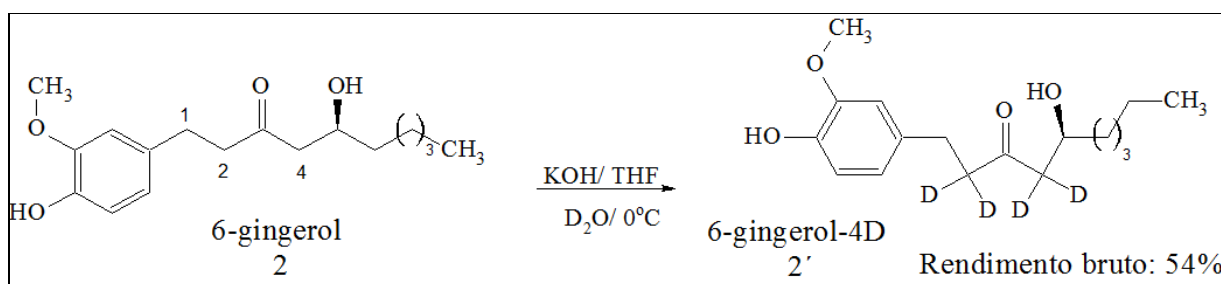
3.3.1 – Isolamento de 6-gingerol (2)

Utilizando como referência o trabalho de SILVA (2011), em sua tese de doutorado, que traz o isolamento e caracterização dos constituintes do gengibre (*Zingiber officinale*), bem como o isolamento em escala semi-preparativa de 6, 8 e 10-gingerol (2, 5, 7), foi possível obter a matéria-prima para o desenvolvimento desta tese. Gengibre fresco (6 Kg), foi comprado no supermercado *Carrefour* de São Carlos, passou pelo processo de higienização, corte em pedaços pequenos e secagem em estufa climatizada a 40°C com circulação de ar. Depois de três dias na estufa, o material seco foi pulverizado e macerado, utilizando-se álcool etílico (99,5 %) por nove dias, com troca de solvente a cada três dias. O álcool etílico foi evaporado sob pressão reduzida, obtendo-se desta forma um extrato livre de solvente que foi reservado em freezer para posterior utilização. A massa do extrato foi de 30 g.

O fracionamento do extrato bruto foi realizado sob cromatografia a vácuo, em coluna de vidro (20 x 8 cm) preenchida com sílica gel 60 (70 - 230 mesh) utilizando-se solventes com polaridades diferentes. Primeiramente foi empregado o hexano (1 litro), seguido por uma mistura de hexano/acetato de etila (1:1) (2,5 litros), para se obter uma fração rica em gíngerois e shogaois (8,3 g). Uma coluna de vidro (28,0 x 5,0 cm)

recheada com sílica gel 60 (230- 400 mesh), eluída sob pressão, foi utilizada a mistura de hexano/acetato (6:4), para se obter a fração rica em 6, 8 e 10-gingerol (**2**, **5**, **7**). Estes, por sua vez, foram separados por HPLC, utilizando o sistema cromatográfico 2 como equipamento e no modo semi-preparativo. Uma coluna C18 (1,0 x 30 cm) foi empregada como fase estacionária e metanol/água (75:25) como eluente, para se obter o 6-gingerol (**2**) (980 mg). O 6-gingerol (**2**) isolado e caracterizado por técnicas espectroscópicas e por métodos espectrométricos foi utilizado como substrato para as reações de biotransformação, bem como reações de derivação química, obtendo os demais compostos a fim de se fornecer ao fungo.

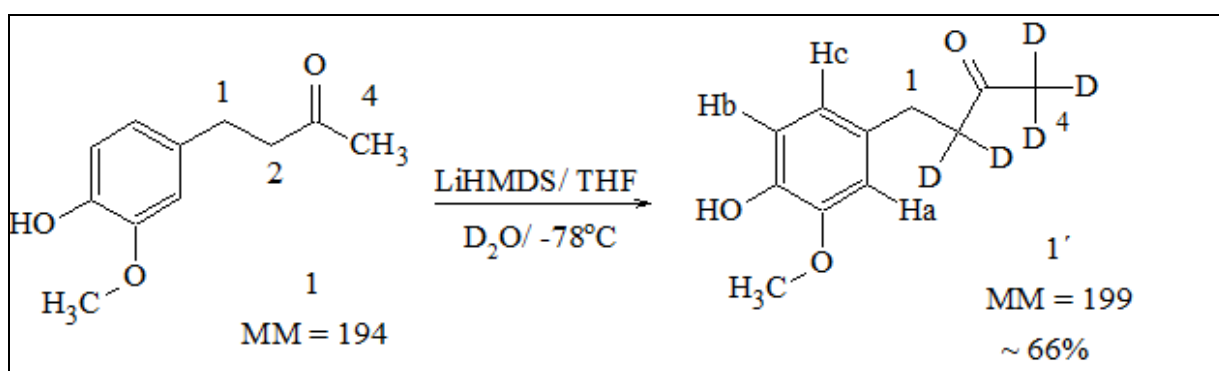
3.3.2 – Reação de marcação isotópica do 6-gingerol (**2**)



Em balão monotubulado de 10 mL, foi adicionado o 6-gingerol (**2**) (20 mg; 0,068 mmol) dissolvido em tetraidrofurano (THF) (69 mg/mL), grau HPLC e previamente resfriado em banho de gelo (0°C). No balão reacional, já havia sido adicionado o hidróxido de potássio (KOH) (14 mg; 0,250 mmol) dissolvido no THF (5,0 mL). Após três horas, mantendo o sistema resfriado à temperatura de zero graus (0°C), a análise por CCD constatou a formação de uma mancha com fator de retenção menor que o material de partida, sendo assim, a água deuterada (D₂O) (105 µL, 5,440 mmol) foi adicionada em excesso. Deixou-se a reação uma noite, ainda no banho de gelo/ água fria e posteriormente a reação foi finalizada adicionando-se água (10 mL) ao meio reacional, seguida de 250 µL de solução de ácido cítrico (1 M) para neutralizar o excesso de base (KOH), o pH foi ajustado em torno de seis, com o auxílio de uma solução de hidróxido de sódio (NaOH) a 20%. Posteriormente, o produto reacional foi extraído da fase aquosa com acetato de etila (AcOEt) por três vezes (20 mL). As

frações foram reunidas em uma só, lavada com solução saturada de cloreto de sódio (NaCl), seca com sulfato de sódio anidro P.A. (Synth ®) e a fase orgânica evaporada. O produto da reação apresentou-se como um óleo marrom escuro (11 mg) com rendimento bruto de 54%, já que não foi purificado em coluna e após ser analisado por RMN de ^1H foi adicionado a cultura do fungo *C. gloesporioides*.

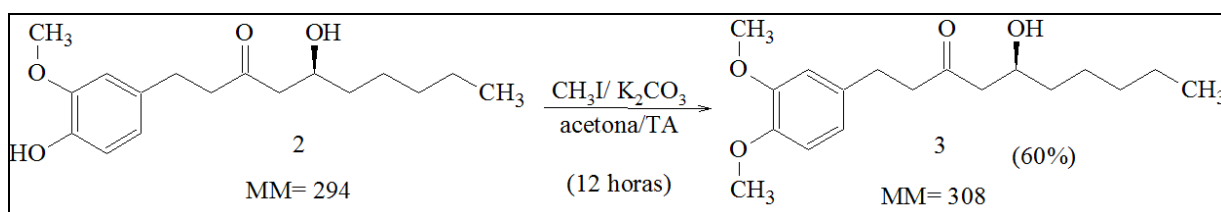
3.3.3 – Reação de marcação isotópica da zingerona (1)



Em balão monotubulado de 25 mL, em sistema hermeticamente fechado e mantido em banho à -78°C , foi adicionado a zingerona (1) (Sigma Aldrich ® - CAS 122-48-5) (200 mg; 1,030 mmol) dissolvida em quantidade suficiente de tetraidrofurano (THF), destilado e tratado. O volume de 5 mL de THF foi acrescido ao balão, bem como uma quantidade da solução de bis(trimetilsilil)amida (LiHMDS) (2,550 mL; 3,825 mmol) (Sigma Aldrich ® - CAS 4039-32-1) suficiente para que ocorresse a abstração dos prótons, sendo a reação acompanhada por placa de CCD. A formação de uma mancha com o fator de retenção menor que o material de partida foi monitorada, e à medida que se precipitou o sal (diânion: enolato/ fenolato) mais 10 mL de THF foi adicionado. A água deuterada (D_2O) (0,200 mL; 11,000 mmol) foi acrescida em excesso, para a reação permanecer por uma noite, sendo o sistema mantido à temperatura de -75°C . A reação foi esgotada, adicionando água (10 mL) e em seguida, 3,825 mL (3,825 mmol) de solução de ácido cítrico (1M) para neutralizar o excesso de base (LiHMDS). O pH da reação foi checado mantendo em torno de cinco e o produto reacional foi extraído da fase aquosa com acetato de etila (AcOEt) por quatro vezes (20 mL). As frações foram

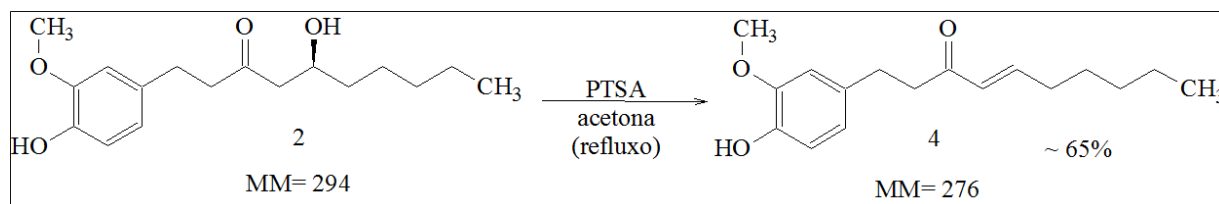
reunidas, lavadas com solução saturada de cloreto de sódio (NaCl), seca com sulfato de sódio anidro P.A. (Synth ®) e a solução orgânica evaporada. O produto reacional (176 mg) foi purificado em coluna de vidro recheada com sílica *flash* (2,5 x 11 cm) eluída sobre pressão e utilizando acetato/hexano 20% (400 mL), acetato 100% (100 mL), metanol 100% (100 mL) como solvente. No final foram um total de 55 frascos (40 mL) coletados, e das frações de 13 a 25 estava o produto reacional (136 mg; 66,3%) de interesse.

3.3.4 – Obtenção do 4-metil-6-gingerol (3)



Em balão monotubulado de 100 mL, 50 mg (0,17 mmol) de 6-gingerol (**2**) foi adicionado juntamente com 87 mg (0,51 mmol) de carbonato de potássio (K_2CO_3) e 42 μL (0,68 mmol) de iodeto de metila (CH_3I) utilizando acetona como solvente. A reação foi conduzida por 12 horas à temperatura ambiente até que a CCD indicasse formação de produto. Decorrido esse tempo a acetona foi evaporada e água foi adicionada ao meio reacional que foi extraído com diclorometano (4 X10 mL). A fase orgânica foi lavada com solução saturada de cloreto de sódio (NaCl), seca com sulfato de sódio anidro, filtrada e concentrada em evaporada sob pressão reduzida. O produto reacional foi purificado em coluna cromatográfica utilizando sílica *flash* e hexano e acetato como eluente. O rendimento foi de aproximadamente 60%.

3.3.5 – Obtenção do 6-shogaol (4)



A massa de 100 mg (0,34 mmol) de 6-gingerol (**2**) foi solubilizada em 3,0 mL de acetona, a quantidade de 683 mg (3,40 mmol) de ácido p-tolueno-sulfônico (PTSA) e peneira molecular foram utilizados e a reação seguiu sob temperatura de refluxo por quatro horas. O solvente foi evaporado e o produto reacional foi purificado em coluna cromatográfica recheada com sílica *flash* utilizando hexano: acetato (3:1). O rendimento da reação foi em torno de 65%.

3.3.6 – Reações de biocatálise

Microrganismos

As culturas dos fungos *Fusarium oxysporum* e *Colletotrichum gleosporioides*, foram fornecidas pelo Laboratório de Fisiologia e Bioquímica Fitopatológica da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ), Universidade de São Paulo (USP), campus de Piracicaba-SP.

Manutenção e pré-ativação dos microrganismos

Os fungos foram preservados em Tubo Castellani e no momento do uso foram pré-ativados em placas de Petri em meio Batata Dextrose Ágar (BDA), sendo inoculados sobre a superfície do meio de maneira homogênea, deixando-os crescer em estufa tipo B.O.D. à temperatura de 25°C.

Determinação das concentrações inibitórias mínimas

As concentrações inibitórias mínimas (CIMs) foram determinadas para verificar a partir de qual concentração os substratos fornecidos ao fungo seriam tóxicas para cada microrganismo e obter as concentrações ideais de trabalho. Para isso, os fungos foram

primeiramente cultivados em placas de petri contendo o meio B.D.A. (Ágar Dextrose Batata). Após sete dias de crescimento, foi obtida uma suspensão de esporos e micélio, vertendo 2 mL de água destilada e estéril sobre a placa de petri de cada fungo raspando-se o micélio.

Em seguida, foram adicionados 100 μL de meio líquido em cada poço da primeira fileira da placa de ELIZA e foi realizada uma diluição seriada de razão 2 da solução estoque de cada substrato a ser biotransformado na concentração de $1600 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Por fim, foram adicionados 80 μL de meio e 20 μL da suspensão de células dos fungos. Dessa forma, foram avaliadas as concentrações de $400 \mu\text{g.mL}^{-1}$ a $0,781 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Na mesma placa, foram realizados os controles positivos de crescimento dos fungos no meio, os controles negativos com o antifúngico actidione, os controles de esterilidade dos meios e das soluções. As placas foram incubadas a 30°C e as CIMs foram determinadas visualmente pela comparação do crescimento fúngico com os dos controles. As CIMs foram consideradas as menores concentrações dos compostos capazes de inibir os crescimentos dos microorganismos.

Reações de biocatálise

Cada fungo foi inoculado em Erlenmeyers de 250 mL contendo 50 mL de meio de cultura líquido estéril B.D. (Batata Dextrose), sendo adicionados três discos miceliais de $1,0 \text{ cm}^2$ por frasco. Após 48 horas de fermentação em incubadora, sendo mantidos a 30°C e 120 rpm, as soluções dos compostos à concentração de $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ diluídos em DMSO foram preparadas e 0,5 mL de cada solução foi adicionada e a fermentação conduzida por 10 dias. No final, a concentração final de DMSO em cada Erlenmeyer era de 1%. Para o controle da produção de metabólitos do fungo sem a interferência dos compostos a serem biotransformados, não houve a adição dos mesmos, este foi chamado de controle A. Outro controle incluído no experimento, chamado de controle B, em que nas mesmas condições os compostos são adicionados ao meio B.D. sem inoculação do fungo, foi feito para acompanhar a possível degradação dos compostos.

Obtenção dos extratos brutos

A cultura do fungo contendo o caldo e o micélio foi filtrada, sendo o micélio extraído com metanol (MeOH) por quatro dias e posteriormente 30 minutos de ultrassom. O

fluido ou caldo da cultura (sobrenadante) foi submetido a uma partição líquido-líquido, com 20 mL de acetato de etila (AcOEt), por três vezes consecutivas, obtendo-se um extrato orgânico e outro aquoso FIGURA 3.1. As frações foram reunidas e secas sob pressão reduzida e as massas de cada extrato bruto calculadas, seja para o extrato aquoso (Aq), o extrato metanólico (MM) ou para o extrato em acetato de etila (Ac), FIGURA 3.1. Este processo foi realizado tanto para os frascos em que o composto a ser biotransformado foi adicionado, quanto para a produção de metabólitos, o controle A.

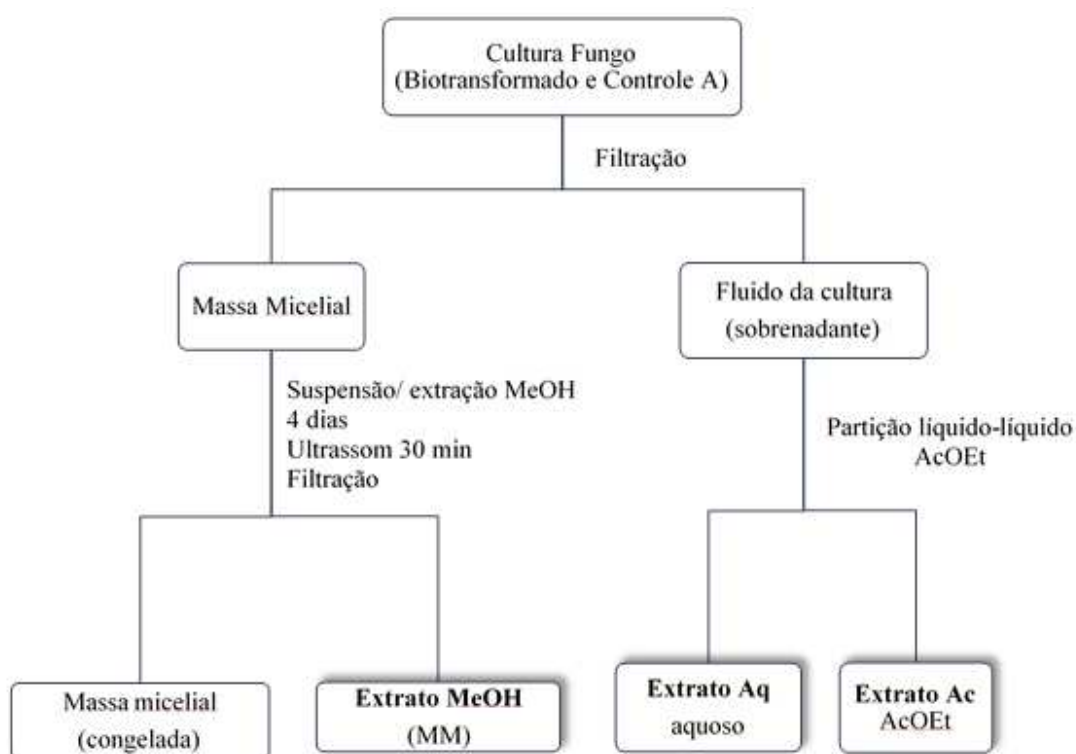


FIGURA 3.1 (6) – Fluxograma para obtenção dos extratos tanto para a cultura do fungo em que a biotransformação foi realizada quanto para o controle A. (MeOH= Metanol e AcOEt= acetato de etila).

Os fluidos dos frascos do controle B, possível degradação dos compostos, também foram submetidos a partição líquido-líquido por três vezes com 20 mL de acetato de etila (AcOEt), resultando em um extrato orgânico (Ac) e um aquoso (Aq), suas massas também foram calculadas.

3.3.7 – Análises e identificação dos compostos obtidos

A elucidação estrutural dos compostos foi feita através da análise dos espectros de Ressonância Magnética Nuclear de ^1H e ^{13}C (1D e 2D), Espectros de Massas e comparações com dados presentes na literatura.

3.3.7.1– Procedimentos para análise por LC-MS

A – Condições cromatográficas para realização de análises por LC-MS dos extratos Ac dos experimentos de biotransformação

O extrato Ac (AcOEt) das amostras, sendo as reações de biocatálise, o controle de produção de metabólitos pelo fungo, chamado de controle A, e a possível degradação dos substratos, controle B, foram preparadas à concentração de 1 mg/mL em solução hidroalcolica a 10% de metanol. Uma coluna da Agilent (Phenomnex, 5 μm , 150 x 4,6 mm, Eclipse XDB-C18 foi empregada, adaptada a uma pré-coluna C18 da Allcrom, 4 x 30 mm. As análises foram realizadas por dois métodos de eluição cromatográficos sendo que o primeiro foi utilizado no sistema cromatográfico 4 (LC Agilent[®] e espectrômetro AppliedBiosystems[®] API 2000) e o outro no sistema cromatográfico 5 (LC Shimadzu[®] e espectrômetro Brucker[®] Esquire 6000). Na etapa de preparo das amostras, aquelas que foram analisadas no sistema cromatográfico 4, previamente foram filtradas em filtros millipore (PTFE, 0,20 μm e diâmetro de 15 mm), para as amostras analisadas no sistema cromatográfico 5, foram previamente centrifugadas.

O primeiro método (Método 1) consistiu em uma eluição no modo reverso, sendo a fase móvel constituída por metanol (solvente B) e água (solvente A). A vazão foi de 1,0 mL/min apresentando o seguinte gradiente: condição inicial de 10% de metanol (B), mantendo isocrático até 5 minutos, seguindo uma variação de 10% a 100% de metanol (B) por até 25 minutos ($\Delta\%$ B= 4,5). Depois de 20 minutos de metanol (B) a 100%, o gradiente foi retornado para 10% metanol (B), sendo que a coluna foi condicionada por 30 minutos entre cada análise, totalizando um tempo de 75 minutos de análise.

O segundo método (Método 2) empregou a fase móvel constituída por solução de ácido fórmico 0,1 % (v/v) e acetonitrila como modificador orgânico. A vazão foi de 1 mL/min com o seguinte gradiente: condição inicial de 5% de acetonitrila, mantendo

isocrático até 5 minutos, seguindo inclinação de 10% a 100% de acetonitrila por até 25 minutos ($\Delta\%$ metanol= 4,5). Depois de 20 minutos de acetonitrila a 100% o gradiente foi retornado para 10% acetonitrila sendo que a coluna foi condicionada por 20 minutos entre cada análise, totalizando um tempo de 65 minutos de análise.

B – Condições espectrométricas para realização de análises por LC-MS dos extratos Ac dos experimentos de biotransformação

Experimento 1

O espectrômetro com analisador de massas do tipo triplo quadrupolo foi utilizado, sendo o equipamento da Applied Biosystems® (API 2000), aquele citado no sistema cromatográfico 4. Possui fonte de ionização por *electrospray* (TurbolonSpray®) e as análises foram realizadas no modo negativo, utilizando nitrogênio para todos os gases.

Os parâmetros utilizados no espectrômetro de massas, que são dependentes do analito, tanto para as aquisições em MS quanto para os experimentos em MS/MS, foram otimizadas pela infusão direta de uma solução metanólica de 6-gingerol (**2**) a 10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, bem como para os padrões do álcool (**21**) e de seu dímero (**22**), previamente isolados neste trabalho; foi utilizada uma seringa de 4,6 mm (\emptyset) e fluxo de 10 $\mu\text{L.mL}^{-1}$. Dentre esses parâmetros a serem otimizados, estão os potenciais de desagrupamento (DP), de focalização (FP), de entrada (EP), e voltagem do TurbolonSpray. As energias do gás de colisão (CAD), a energia de colisão (CE) e os potenciais de entrada e saída da célula (CEP e CXP, respectivamente) também foram otimizados.

Os parâmetros dependente da fonte, tais como a altura e distância da sonda do TurbolonSpray® (Vert e Hor, respectivamente), o gás de cortina (CUR), o gás nebulizador (GS1), o gás de aquecimento (GS2) e a temperatura da fonte (TEM) foram otimizados utilizando uma solução metanólica, em torno de 1 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ para cada padrão, por injeção em fluxo, utilizando como fase móvel MeOH: H₂O (70:30) (v/v) previamente selecionada nos parâmetros cromatográficos. Um divisor de fluxo foi adaptado na interface do cromatógrafo com o espectrômetro, direcionando apenas um terço da vazão total para a entrada da fonte de ionização, afim de se ter uma melhor adequação

entre as vazões usadas, promovendo uma melhor separação cromatográfica e para a inserção do analito no espectrômetro de massas.

Após a avaliação dos parâmetros acima, foram otimizados os valores para o modo de monitoramento de reação selecionada (SRM), como a energia do gás de colisão (CAD), energia de colisão (CE) e potenciais de entrada (CEP e CXP, respectivamente). As condições cromatográficas utilizadas nesse experimento de MS/MS, foram de acordo com o Método 1, utilizando um gradiente exploratório MeOH:H₂O. A otimização da temperatura da fonte (TEM) foi feita manualmente, na maior proporção de fase aquosa, como nas condições iniciais em que se trabalhou com 90 % de água, garantindo total vaporização da fase móvel na entrada do espectrômetro de massas. As energias e transições utilizadas nesse experimento podem ser verificadas na TABELA 3.1.

TABELA 3.1– Parâmetros para MS e MS/MS

DP (V)	FP (V)	EP (V)	IS (V)	CE (V)	CEP (V)	CXP (V)
-35	-365	-10.0	-4000	-50	-20	-3
Vert (pos)	Hor (pos)	TEM (°C)	CAD (psi)	CUR (psi)	GS1	GS2
3	5	400	4	25	40	45

Experimento 2

As condições cromatográficas nesse experimento estão dispostas no item anterior do procedimento experimental, conforme Método 2, utilizando o sistema cromatográfico 5. Os parâmetros do espectrômetro de massa para a análise foram: pressão do nebulizador (*nebulizer*) 30 psi, vazão do gás de secagem (*dry gas*) 8 L/min, temperatura de secagem (*dry temp.*) 325 °C, voltagem do capilar de 4,5 kV, condições aperfeiçoadas para uma relação massa/carga de 300 *m/z* para o modo negativo e de 277 *m/z* no modo positivo (*smart parameter settings* ligado), amplitude de fragmentação para o modo negativo foi de 0,50 V para o modo positivo de 1,0 V.

Inicialmente foi realizado um *full scan* das amostras nos modos positivo e negativo em um faixa de relação de massa/carga de 100 a 600 *m/z*, a vazão que chegava até o espectrômetro era de 0,1 mL/ min a qual era determinada por meio de um divisor de vazão (*splitter*). Posteriormente, realizaram-se análises de fragmentação utilizando auto-

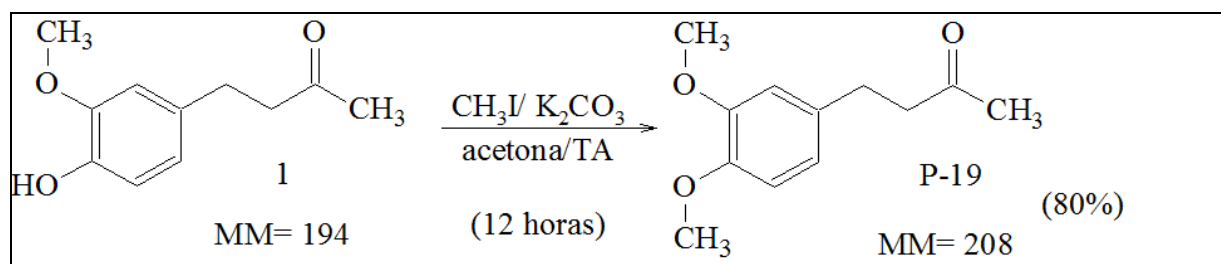
MS² tanto no modo negativo como positivo de ionização, no qual o instrumento analisa o espectro e determina os picos que serão fragmentados, a partir da intensidade (threshold) de 10000.

3.3.6 – Reações de semi-síntese

3.3.6.1 – Obtenção da nova série de éteres de oxima

A – Reações de O-alkilação da zingerona (1) e obtenção do sililéter (P-55)

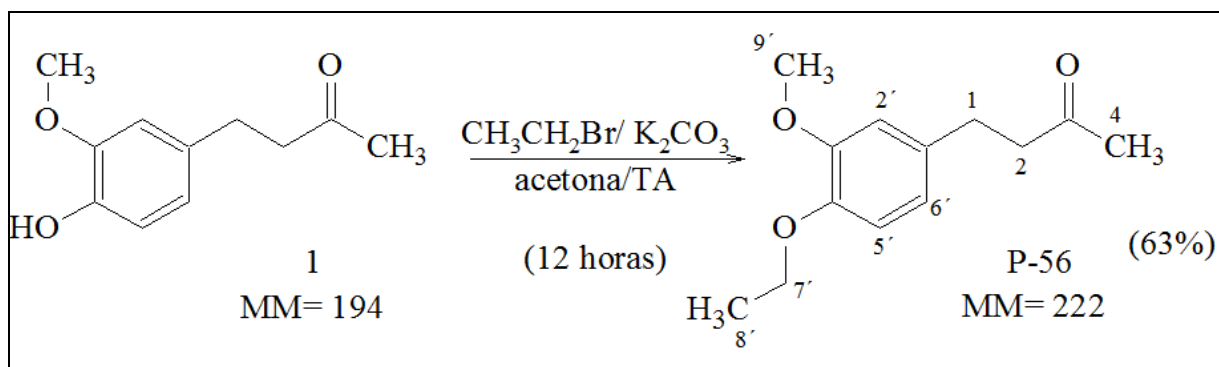
A.1 – Obtenção do 4-metilzingerona (P-19)



Em balão monotubulado de 100 mL, foram adicionados zingerona (1) (1,0 g; 5,1 mmol), carbonato de potássio (K₂CO₃) (2,6 g; 15,3 mmol) e iodeto de metila (CH₃I) (0,9 mL, 15,3 mmol) em acetona (20 mL) à temperatura ambiente por 12 horas. Decorrido este tempo, adicionou-se água (30 mL) ao meio reacional, em seguida o produto reacional foi extraído com diclorometano (4 x 15 mL). A fase orgânica foi lavada com solução saturada de NaCl, seca com Na₂SO₄ anidro, filtrada e concentrada em evaporador rotatório sob pressão reduzida, fornecendo um sólido amarelo claro com 80% de rendimento (BEZERRA-NETO, 2006, adaptado).

EM (t_R= 25 min) m/z (%): 208 [M⁺] (29%); 165 (23%); 151 (100%); 107 (12%); 91 (14,8%); 77 (15%); 43 (77%)

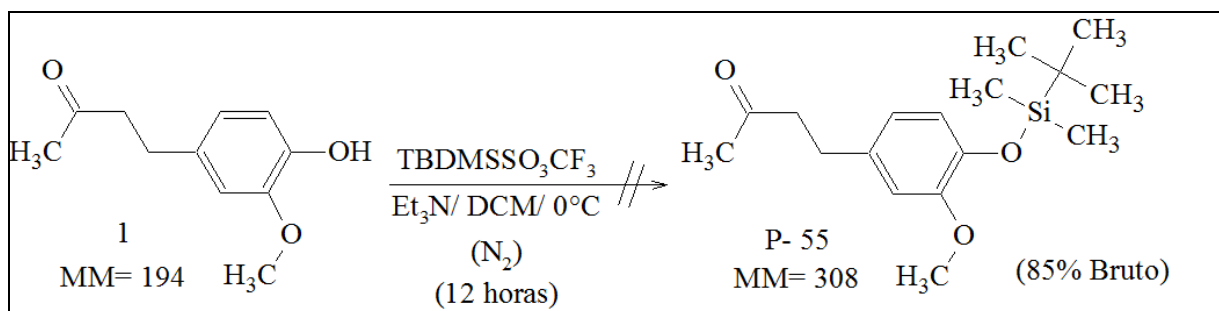
A.2 – Obtenção do 4-etilzingerona (P-56)



Em balão monotubulado de 50 mL, foram adicionados zingerona (1) (100 mg; 0,515 mmol), carbonato de potássio (K_2CO_3) (883 mg; 5,515 mmol) e brometo de etila ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{Br}$) (561 mg, 5,515 mmol) em acetona (2 mL) à temperatura ambiente por 12 horas. Decorrido este tempo, adicionou-se água (2 mL) ao meio reacional, em seguida o produto reacional foi extraído com diclorometano (4 x 5 mL). A fase orgânica foi lavada com solução saturada de NaCl, seca com Na_2SO_4 anidro, filtrada e concentrada em evaporador rotatório sob pressão reduzida, fornecendo um sólido amarelo claro com aproximadamente 63% (72 mg) de rendimento (BEZERRA-NETO, 2006, adaptado).

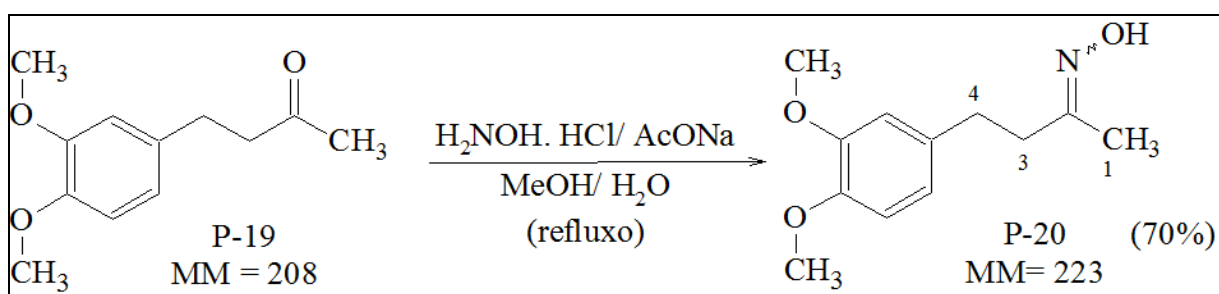
RMN de ^1H (400 MHz), CDCl_3 /TMS (δ -ppm): 1,45 (t, $J= 7,12$ Hz, 3H) (H-8'); 2,14 (s, 3H) (H-4); 2,74 (m, 2H) (H-2); 2,84 (m, 2H) (H-1); 3,86 (s, 3H) (H-9'); 4,07 (dd, $J= 6,98$, 2H) (H-7'); 6,70 ($J= 8,0$ e $J= 2,0$, 1H) (H-6'); 6,72 ($J\sim 2$, 1H) (H-5'); 6,79 ($J= 8,0$, 1H) (H-2').

A.3 – Obtenção do O-t-butil-dimetilsililzingenona (P-55)



Em balão monotubulado de 25 mL, sob atmosfera inerte (N₂), foram adicionados zingerona (50 mg; 0,257 mmol), t-butil-dimetilsililtrifluorometanosulfonato (TBDMSO₃CF₃) (118 µL; 0,515 mmol) e trietilamina (Et₃N) (71 µL; 0,515 mmol), em diclorometano (DCM) (3 mL) resfriado à temperatura de 0°C por 12 horas. Decorrido este tempo, adicionou-se água (2 mL) ao meio reacional, em seguida o produto reacional foi extraído com diclorometano (4 x 5 mL). A fase orgânica foi lavada com solução saturada de NaCl, seca com Na₂SO₄ anidro, filtrada e evaporada, fornecendo um sólido marrom claro com aproximadamente 85% (68 mg) de rendimento bruto. Entretanto essa reação não foi muito bem acompanhada e a análise por CCD não indicou a conversão do material de partida.

B – Reação para obtenção do intermediário-chave oximínico (P-20)



Em balão bitubulado de 50 mL, acoplado ao condensador de refluxo, a massa de 0,200 g (0,96 mmol) do intermediário 4-(3,4-dimetoxifenil) butan-2-ona (P-19) foi adicionada, 0,788 g (9,6 mmol) de acetato de sódio (AcONa) e 0,619 g (9,6 mmol) de cloridrato de hidroxilamina (NH₂OH.HCl), juntamente com 20 mL de metanol/água

(MeOH/H₂O) em proporção de 8:2. A reação foi mantida à temperatura de 65°C por três horas, decorrido este tempo, adicionou-se água (50 mL) ao meio reacional, que em seguida foi extraído com diclorometano (4 x 15 mL). A fase orgânica foi lavada com solução saturada de cloreto de sódio, seca com sulfato de sódio anidro, filtrada e concentrada em evaporador rotatório sob pressão reduzida. O produto reacional foi submetido à cromatografia em coluna utilizando-se sílica no modo *flash* e mistura de hexano e acetado (8:2) como eluente. A oxima (P-20) foi obtida em mistura diastereoisomérica apresentando-se como um sólido branco com 70% de rendimento (GOPALSAMY 2006 adaptado apud SILVA, 2010).

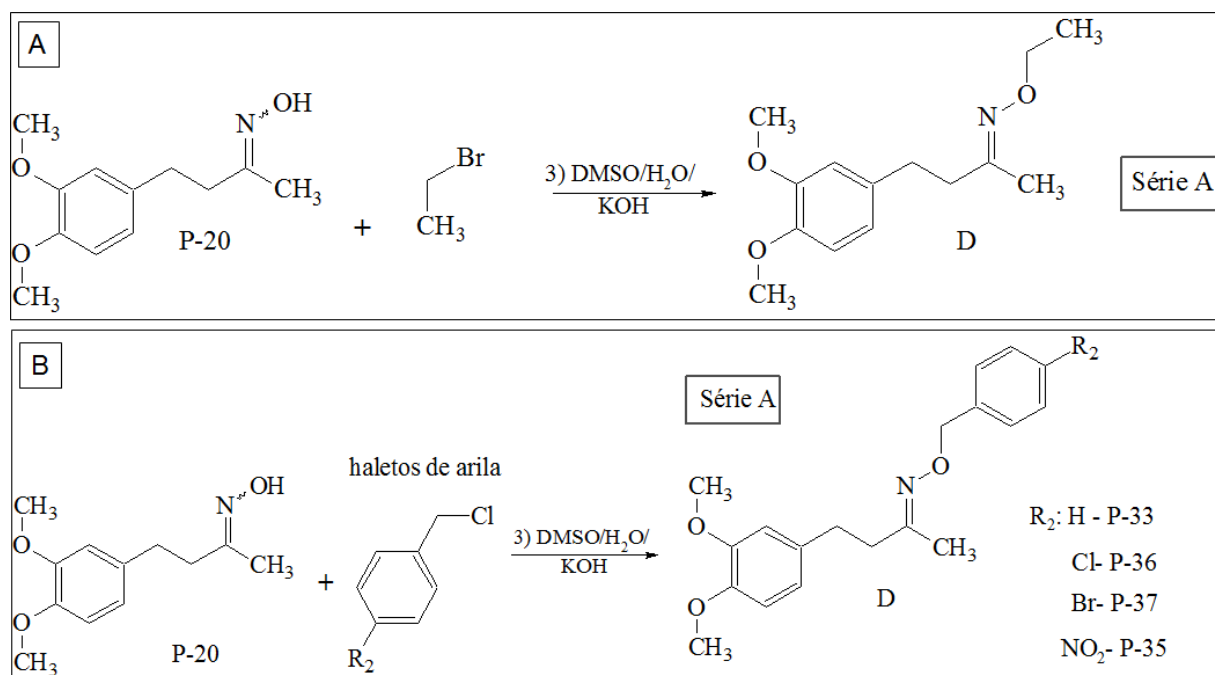
EM (t_R = 18,5 min) m/z (%): 223 [M^+] (10%); 207 (8%); 193 (3%); 164 (1%); 151 (100%); 107 (30%); 91 (31%); 77 (34%); 51 (23%).

EM (t_R = 18,8 min) m/z (%): 223 [M^+] (14%); 207 (8%); 192 (10%); 164 (1%); 176 (7%); 151 (100%); 135 (5%); 107 (11%); 91 (11%); 77 (13%); 51 (8%)

RMN de ¹H (400 MHz), CDCl₃ /TMS (δ-ppm) (em mistura): 1,83 (s, 0,7 H) e 1,91 (s, 2,0 H-1; 2,51 (m, 1,4 H), 2,66 (m, 0,5), 2,28 (m, 2 H), H-3 e/ou H-4; 3,84 (s, 6 H) (H-7' e H-8'); 6,70 a 6,9 (m, 3 H) H-Ar.

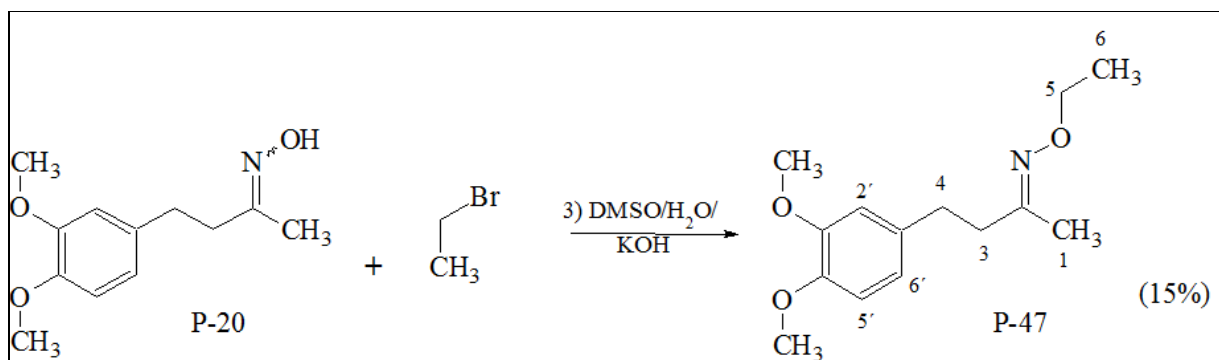
RMN de ¹³C (400 MHz), CDCl₃ /TMS (δ-ppm): 13 a 37 (C-1, C-3, C-4); 55 (C 7' e C8'); 148 a 111 (C aromático); 159 e 158 (C-2).

C – Reação para se obter a nova Série A dos éteres de oxima (D)



Em um balão monotubulado de 50 mL foram adicionados a oxima (P-20) (10 mg, 0,045 mmol), DMSO/H₂O (8:2) (2 mL) e KOH (32,7 mg, 0,594 mmol) que ficaram em agitação por 30 minutos a temperatura ambiente. Decorrido o tempo, adicionou-se os respectivos haletos de alquila (FIGURA 3.10-A) ou arila (FIGURA 3.10-B) (1,3 ou 0,090 mmol). As reações foram mantidas a temperatura ambiente por períodos que variaram de 3 a 12 horas, até que análise por CCD indicasse o consumo dos reagentes e a possível formação de produtos. As reações foram finalizadas, adicionando-se solução saturada de NaCl (6 mL) e o produto reacional extraído com AcOEt (3 x 4 mL). Posteriormente, a fase orgânica foi seca com Na₂SO₄, filtrada e concentrada em evaporador rotatório sobre pressão reduzida. Foi necessário realizar coluna cromatográfica para purificação de todos os compostos. (LI, C. B. et al.; 2002 apud SILVA, 2011).

C.1 – Obtenção do etil éter de oxima (P-47)



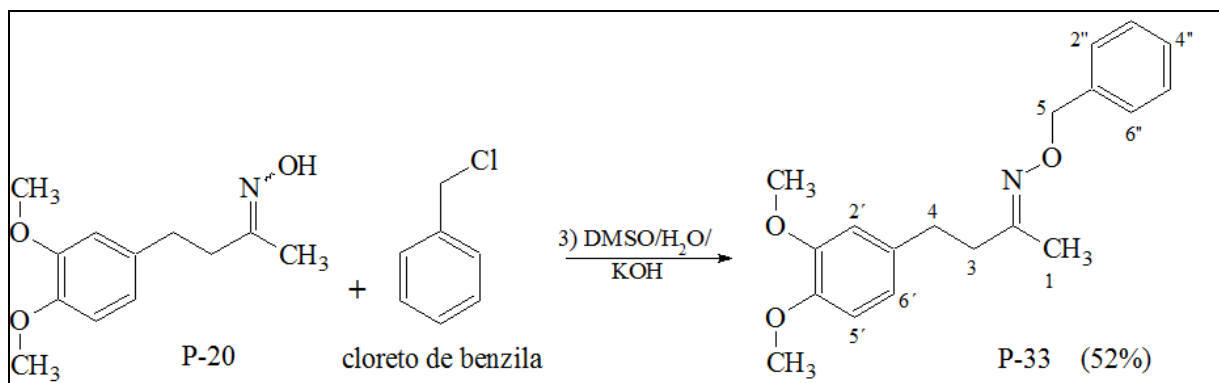
EM ($t_R = 13,7$ min) m/z (%): 251 [M^+] (19%); 206 (3%); 178 (1%); 165 (8%); 164 (25%); 152 (9%); 151 (100%); 149 (7%); 135 (3%); 121 (3%); 107 (25%); 105 (5%); 91 (9%); 77 (10%); 65 (7%); 51 (5%).

EM ($t_R = 13,9$ min) m/z (%): 251 [M^+] (23%); 206 (7%); 191 (1%); 178 (2%); 165 (26%); 164 (6%); 152 (12%); 151 (100%); 149 (3%); 135 (4%); 121 (3%); 107 (10%); 105 (6%); 91 (9%); 77 (12%); 65 (8%); 51 (5%).

RMN de 1H (400 MHz), $CDCl_3$ /TMS (δ -ppm) : 1,25 (t, 2,7 H) H-6; 1,87 (s, 0,7 H) e 2,15 (s, 2,3) H-1; 2,49 (m, 1,5 H), 2,80 (m, 2,0), 2,87 (m, 0,5 H), H-3 e/ou H-4; 3,87 (s, 6 H) (H-7' e H-8'); 4,08 (q, 1,5 H) H-5, 6,79 a 6,72 (m, 3H) H-Ar.

RMN de ^{13}C (400 MHz), $CDCl_3$ /TMS (δ -ppm): 14 a 38 (C-1, C-3, C-4); 56 (C 7' e C8'); 69 (C-5); 147 a 111 (C aromático); 156 (C-2).

C.2 – Obtenção do (2*E/Z*)-*N*-(benziloxi)-4-(3,4-dimetoxifenil)butan-2-imina (P-33)



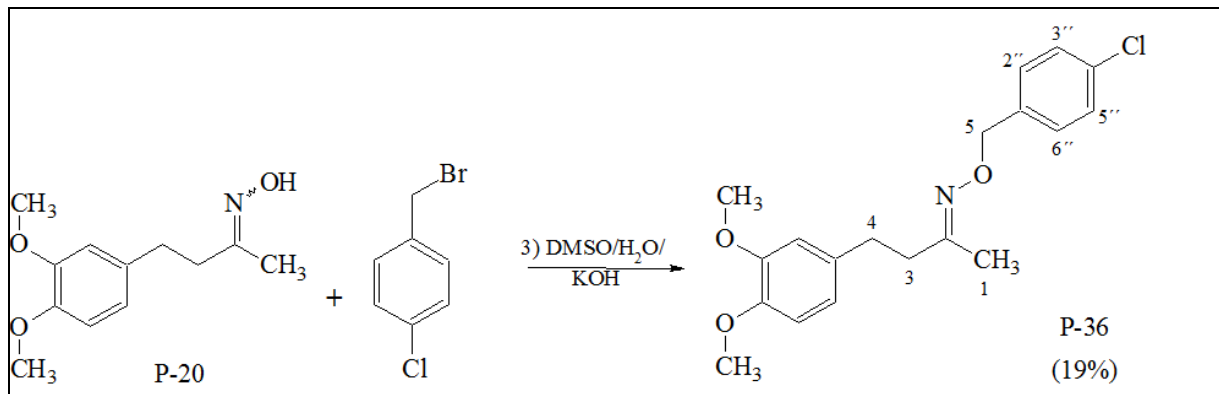
A obtenção do (2*E/Z*)-*N*-(benziloxi)-4-(3,4-dimetoxifenil)butan-2-imina (**P-33**) foi realizada através de uma reação de acoplamento, utilizando o cloreto de benzila e a oxima **P-20** como reagentes na proporção estequiométrica de 1:5. O produto reacional, sendo um óleo laranja foi obtido com 52% de rendimento após purificação em coluna cromatográfica utilizando sílica *flash* obtendo-se um dos isômeros majoritariamente.

EM ($t_R = 26,02$ min) m/z (%): 313 [M^+] (26%); 282 (1%); 241 (5%); 206 (10%); 191 (10%); 165 (35%); 151 (100%); 105 (25%); 91 (97%); 77 (41%); 65 (18%); 105 (5%); 91 (9%); 77 (10%); 65 (7%); 51 (12%).

RMN de 1H (400 MHz), $CDCl_3$ /TMS (δ -ppm): 1,83 (s, 0,3 H) H-1; 2,76 (m, 1,3 e 0,9 H), 2,42 (m, 0,8 e 1,7H), H-3 e/ou H-4; 3,75 (s, 6 H) (H-7' e H-8'); 5,03 (q, 1,9 H) H-5; 6,81 (d, 1 H), 6,72 (dd, 1 H) H-Ar, 7,24 a 7,35 (m, 5 H) H-Ar.

RMN de ^{13}C (400 MHz), $CDCl_3$ /TMS (δ -ppm): 14, 32, 37, (C-1, C-3, C-1); 56 (C 7' e C8'); 75 (C-5); 148 a 111 (C aromático); 157 (C-2).

C.3 – Obtenção do (2E/Z)-N-(4-clorobenziloxi)-4-(3,4-dimetoxifenil)butan-2-imina (P-36)



A obtenção do (2E/Z)-N-(4-clorobenziloxi)-4-(3,4-dimetoxifenil)butan-2-imina (**P-36**) foi realizada através de uma reação de acoplamento, utilizando o brometo de *para*-cloro benzila e a oxima **P-20** como reagentes na proporção estequiométrica de 1:2. Após o esgotamento e purificação em coluna cromatográfica utilizando sílica *flash* foi obtido o produto reacional com 19% de rendimento.

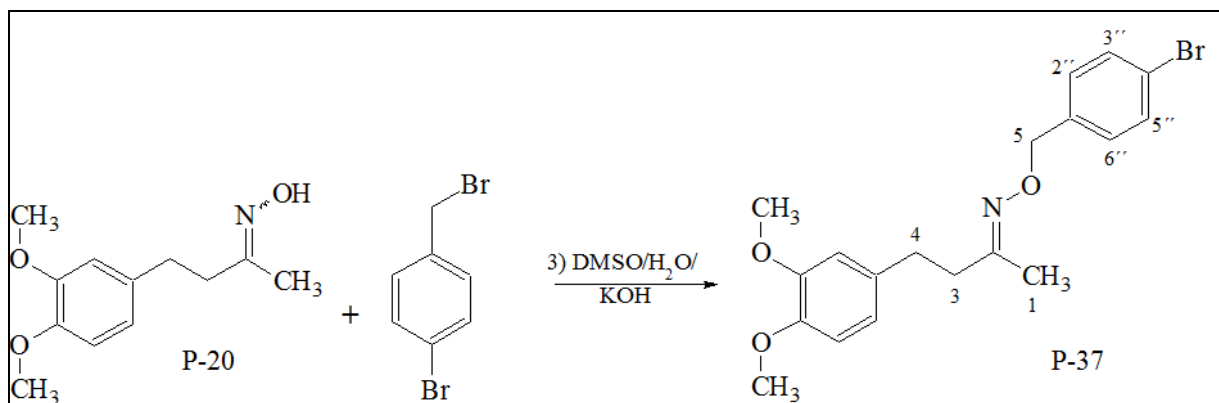
EM ($t_R = 27,1$ min) m/z (%): 347 [M^+] (26%); 275 (4%); 206 (10%); 165 (35%); 151 (100%); 125 (58%); 107 (10%); 77 (16%); 65 (18%); 105 (5%); 91 (9%); 77 (10%); 65 (7%); 51 (9%).

EM ($t_R = 27,4$ min) m/z (%): 347 [M^+] (16%); 275 (3%); 207 (10%); 164 (26%); 151 (100%); 125 (63%); 107 (15%); 77 (16%); 65 (18%); 105 (5%); 94 (11%); 77 (25%); 65 (7%); 51 (12%).

RMN de ^1H (400 MHz), CDCl_3 /TMS (δ -ppm): 1,89 (s, 2,2 H) H-1; 2,76 (m, 0,3 e 1,9 H), 2,46 (m, 1,8 H), H-3 e/ou H-4; 3,85 (s, 6 H) (H-7' e H-8'); 5,0 (q, 1,3 H) H-5; 6,69 a 6,78 (m, 3 H), H-Ar, 7,24 a 7,34 (m, 5 H) H-Ar.

RMN de ^{13}C (400 MHz), CDCl_3 /TMS (δ -ppm): 29, 37, 45, (C-1, C-3, C-1); 56 (C 7' e C8'); 75 (C-5); 133 a 111 (C aromático); 157 (C-2).

C.4 – Obtenção do (2E/Z)-N-(4-bromobenziloxi)-4-(3,4-dimetoxifenil)butan-2-imina (P-37)

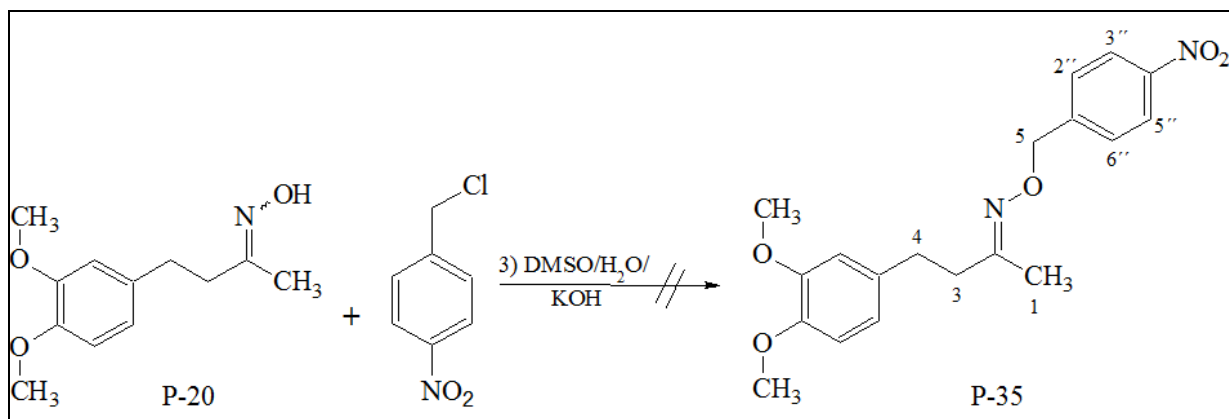


A obtenção do (2E/Z)-N-(4-bromobenziloxi)-4-(3,4-dimetoxifenil)butan-2-imina (**P-37**) foi realizada através de uma reação de acoplamento, utilizando o brometo de *para*-bromobenzila e a oxima **P-20** como reagentes, na proporção estequiométrica de 1:2. Devido ao erro na quantidade de hidróxido de potássio (KOH) utilizada no momento de executar a reação, 141 mg (2,5 mmol), não foi possível acompanhá-la muito bem por CCD, sendo esgotada antes que se obtivesse um melhor rendimento para a formação do produto desejado.

EM ($t_R = 27,1$ min) m/z (%): 347 [M^+] (26%); 275 (4%); 206 (10%); 165 (35%); 151 (100%); 125 (58%); 107 (10%); 77 (16%); 65 (18%); 105 (5%); 91 (9%); 77 (10%); 65 (7%); 51 (9%).

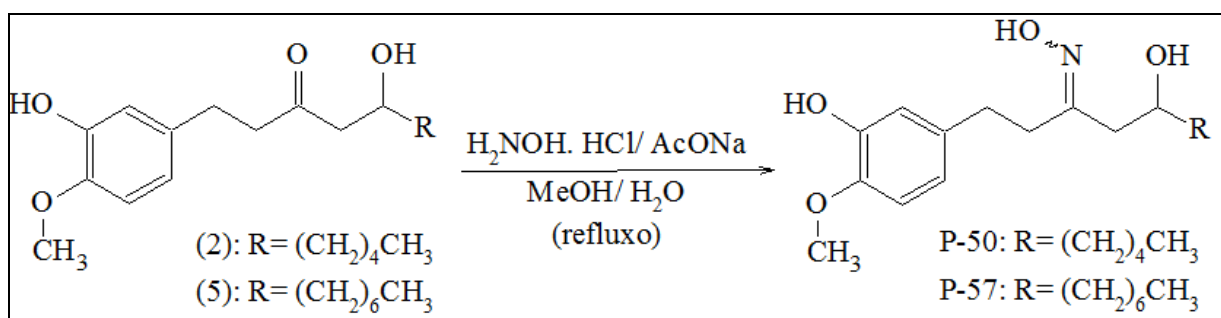
EM ($t_R = 27,4$ min) m/z (%): 347 [M^+] (16%); 275 (3%); 207 (10%); 164 (26%); 151 (100%); 125 (63%); 107 (15%); 77 (16%); 65 (18%); 105 (5%); 94 (11%); 77 (25%); 65 (7%); 51 (12%).

C.5 – Obtenção do (2E/Z)-N-(4-nitrobenziloxi)-4-(3,4-dimetoxifenil)butan-2-imina (P-35)



A obtenção do (2E/Z)-N-(4-nitrobenziloxi)-4-(3,4-dimetoxifenil)butan-2-imina (**P-35**) foi realizada através de uma reação de acoplamento, utilizando o cloreto de *para*-nitrobenzila e a oxima **P-20** como reagentes, na proporção estequiométrica de 1:2. Para essa reação é necessário otimizar as condições de trabalho pois de acordo com os dados no GC-MS e o espectro de RMN de ^1H o produto reacional não se formou.

3.3.6.2 – Obtenção do derivado oximínico a partir de 6-gingerol (2) e de 8-gingerol (5)



Em balão bitubulado de 10 mL, acoplado ao condensador de refluxo, a massa de 20 mg (0,068 mmol) de 6-gingerol (**2**) ou de 8-gingerol (**5**) foi adicionada, 55 mg (0,680 mmol) de acetato de sódio (AcONa) e 44 mg (0,680 mmol) de cloridrato de hidroxilamina ($\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$), juntamente com 2 mL de metanol/ água (MeOH/ H_2O) em proporção de 8:2. A reação foi mantida à temperatura de 65°C por três horas, decorrido

este tempo, adicionou-se água (5 mL) ao meio reacional, que em seguida foi extraído com diclorometano (4 x 5 mL). A fase orgânica foi lavada com solução saturada de cloreto de sódio, seca com sulfato de sódio anidro, filtrada e concentrada em evaporador rotatório sob pressão reduzida. O produto reacional foi submetido à cromatografia em coluna utilizando-se sílica no modo *flash* e mistura de hexano e acetado (8:2) como eluente. A oxima (**P-50**) foi obtida em mistura diastereoisomérica com 44% de rendimento e a mistura da oxima (**P-57**) foi obtida em torno de 84% sendo o rendimento bruto (sem purificação em coluna) (GOPALSAMY 2006 adaptado apud SILVA, 2010).

- Dados para a oxima (**P-50**):

EM ($t_R = 19,9$ min) m/z (%): 309 [M^+] (1,46%); 281 (23,4%); 207 (91%); 191 (11,6%); 177 (4,27); 160 (1,43%); 125 (58%); 107 (10%); 77 (16%); 65 (18%); 105 (5%); 91 (9%); 77 (10%); 65 (7%); 51 (9%).

RMN de 1H (400 MHz), $CDCl_3$ /TMS (δ -ppm): 0,9 (t, 3,13 H) H-10; 1,26 a 1,48 (sinal largo, 11 H), H-6, H-7, H-8, H-9; 2,20 a 2,81 H-1, H-2, H-3 e H-4; 3,89 (s, 3 H) $-OCH_3$; 6,85 a 6,70, (m, 3-H), H-Ar.

RMN de ^{13}C (400 MHz), $CDCl_3$ /TMS (δ -ppm): 14 a 41 (C-10 a C-6); 69 (C-5); 55 (C metoxila); 146 a 110 (C aromático); 159 (C-3).

- Dados para a oxima (**P-57**):

A análise por GC-MS não trouxe as informações desejadas provavelmente devido a degradação térmica do composto.

RMN de 1H (400 MHz), $CDCl_3$ /TMS (δ -ppm): 0,88 (t, 3,21 H) H-12; 1,28 a 1,49 (sinal largo, 12 H), H-6, H-11; 2,20 a 2,81 H-1, H-2, H-3 e H-4; 3,88 (s, 3 H) $-OCH_3$; 6,85 a 6,70, (m, 3-H), H-Ar.

RMN de ^{13}C (400 MHz), CDCl_3 /TMS (δ -ppm): 14 a 41 (C-10 a C-6); 69 (C-5); 55 (C metoxila); 146 a 110 (C aromático); 169 (C-3).

3.3.7 – Ensaios bioquímicos e biológicos

A – Ensaios de atividade enzimática frente às catepsinas

A atividade enzimática foi determinada através da observação do aumento de fluorescência devido à hidrólise do substrato Z-Phe-Arg-MCA. A medida de atividade enzimática foi monitorada através de um fluorímetro de placa, com uma fenda de excitação-emissão ajustada para λ_{ex} 380 nm e λ_{em} 460 nm, respectivamente. Nas determinações, as placas são mantidas em compartimento termostaticado a 27 °C com as catepsinas (concentração na ordem de nanomolar), previamente ativada com ditioneitol (DTT) (2,5 mM) por 5 min. Em seguida adicionaram-se 5 μL da solução a ser testada (extrato, 0,5 mg/mL, ou substância pura, 125 μM , dissolvida em DMSO), incubando-se por 5 min e em seguida o substrato Z-Phe-Arg-MCA (10 μM), fazendo-se a leitura em tempo real. DMSO foi utilizado com controle negativo e o inibidor irreversível E-64 como controle positivo de inibição enzimática. A concentração final de DMSO nos ensaios foi 2,5 % (SEVERINO, 2008).

Os ensaios bioquímicos com a catepsinas foram realizados em fluorímetro SpectraMax M3 da Molecular Devices, com placa de ELISA preta de 96 poços e com volume final de 200 μL . Os parâmetros cinéticos foram calculados usando equações de Hanes Woolf, utilizando o programa SoftMax Pro.

Para o cálculo da inibição enzimática foi utilizada a equação.

$$\text{Inibição}(\%) = 100 \cdot \left(1 - \frac{V_i}{V_0} \right)$$

Equação na qual, V_i e V_0 são as velocidades na presença e ausência de inibidor, respectivamente

B – Teste de disco-difusão em meio sólido

Em placas de Petri de 10 cm, contendo o meio BDA (Batata Dextrose Ágar) inoculado com uma suspensão de esporos com um número médio de $18,5 \times 10^5$ para o fungo *Colletotrichum gloeosporioides* e de $5,5 \times 10^5$ esporos para o *Fusarium oxysporum*,

um disco de papel de 9 mm impregnado com a substância a ser testada à concentração de 200 µg (20 µL; 20 mg/ mL) foi colocado no centro da placa e o possível halo de inibição médio, feito em triplicata, foi medido a cada 24 horas. No controle se tratou da inoculação da mesma solução de esporos sobre a placa de Petri com os discos de papel embebidos com acetona que foi evaporada para se colocar no meio de cultura. As substâncias testadas foram apenas o etil éter de oxima (**P-47**) e o derivado oxímico do 8-gingerol (**P-57**).

4 – RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 – Biotransformação da zingerona (1) por *Colletotrichum gloesporioides*

A zingerona (1), também chamada de vanililacetona, é um dos constituintes aromáticos encontrados no gengibre, especialmente pós tratamento térmico, em que o 6-gingerol (2), é convertido na zingerona (1) por reação retro-aldólica (SHIMODA et al, 2007), FIGURA 4.1. Tal composto foi submetido ao processo de biotransformação em meio de cultura líquido estéril B.D. (Batata-Dextrose), pelo fungo *Colletotrichum gloesporioides* às concentrações que variaram de 100 µg/ mL a 15 mg/mL, sendo que o processo foi acompanhado por 10 a 15 dias, tendo-se o controle (A) de produção dos metabólitos produzidos pelo fungo, sem a presença da zingerona (1), FIGURA 4.1, e o controle (B) da possível degradação dessa substância nas mesmas condições de trabalho.

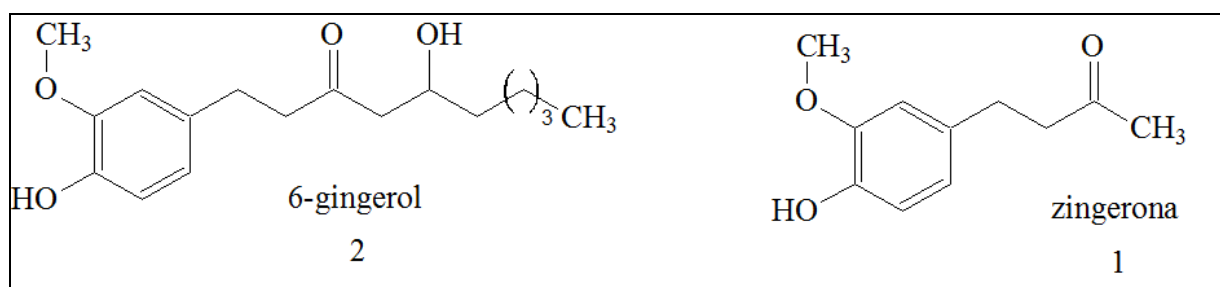


FIGURA 4.1 – A zingerona (1) vem da reação retro-aldólica do 6-gingerol (2) e pode estar presente no gengibre.

O primeiro experimento de biotransformação da zingerona (1) foi realizado em tubo de ensaio como um “teste de citotoxicidade” para avaliar a concentração máxima em que visivelmente existia o crescimento micelial, como pode-se ver na FIGURA 4.2. Em tubos de ensaio de 60 mL, foram colocados 15 mL de meio de cultura BD (Batata-Dextrose) estéril e dois discos miceliais de 0,5 cm, deixando-se crescer por sete dias como um período de pré-incubação. Posteriormente um mililitro da suspensão deste meio de pré-ativação foi colocado em 8,0 mL do meio BD e 1,0 mL da solução hidroalcoólica da zingerona (1) a 3%, tendo-se as concentrações finais de 1,0; 5,0; 10,0 e 15 mg/mL em

cada tubo pequeno de 30 mL, todo experimento foi feito em quintuplicata, como se pode ver na FIGURA 4.2. Depois de 15 dias foi possível observar crescimento micelial até a concentração de 1 mg/mL, o que não ocorreu com as demais concentrações.

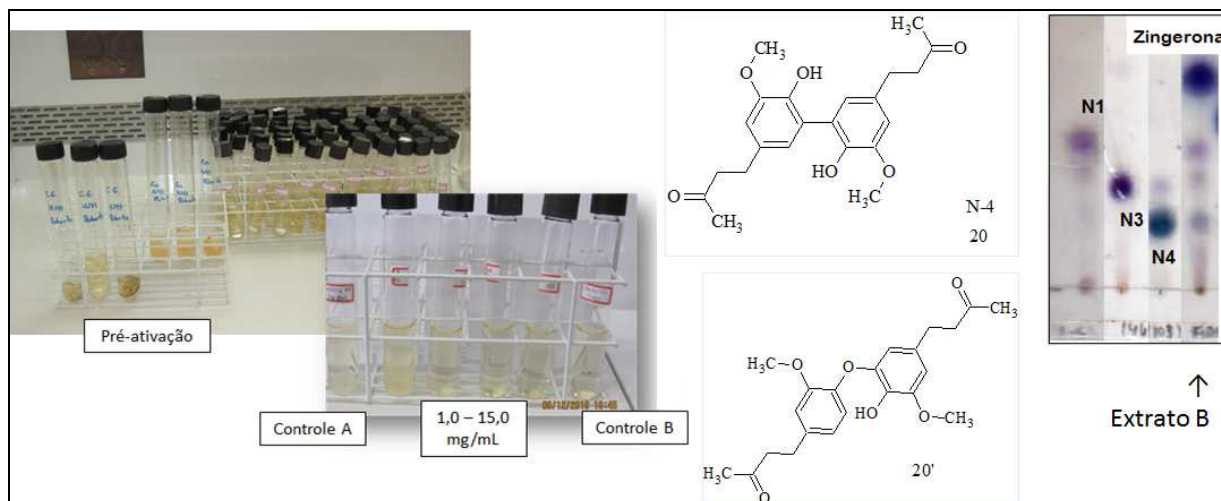


FIGURA 4.2 – “Teste e citotoxicidade” da zingerona (1) frente ao fungo *Colletotrichum gloesporioides* e isolamento de um dímero.

O conteúdo dos cinco tubos nos quais a concentração da zingerona era de 1 mg/mL foi reunido e uma extração líquido-líquido com acetato de etila do sobrenadante foi feita obtendo-se o extrato (A). Os demais tubos cujas concentrações eram de 5,0; 10,0 e 15,0 mg/mL foram agrupados e também extraídos com acetato de etila (extrato B). Do extrato (B) cuja massa foi de 960 mg é que foi possível observar o reconhecimento da zingerona (1) como substrato pelas enzimas do fungo *Colletotrichum gloesporioides*, sendo que, após separação em coluna cromatográfica, utilizando sílica gel como fase estacionária e hexano: acetato (7:3) como eluente, foi isolado o dímero proveniente do acoplamento oxidativo entre duas moléculas de zingerona (1), intitulado de composto N-4 (20) (4,0 mg), FIGURA 4.2. A formação do dímero, composto N-4 (20'), mostrado na FIGURA 4.2 foi confirmada por inserção direta em espectrômetro de massas de alta resolução e por ressonância de hidrogênio como mostrado a seguir.

Há uma variedade de produtos naturais que são produzidos pelo acoplamento de dois ou mais sistemas fenólicos por meio de reações radicalares (DEWICK, 2009; ALJAWISH et al, 2014). Dentre as possibilidades de acoplamento entre os radicais derivados da zingerona (1), de acordo com o valor da massa do íon molecular m/z 409,1648 $[M+Na]^+$, no modo positivo, FIGURA 4.4 e do íon m/z 385,1700 $[M-H]^-$, no

modo negativo, FIGURA 4.5, seria possível obter os dímeros (**20**) ou (**20'**), FIGURA 4.3. O dímero (**20**) ocorreria do acoplamento C-C', quando se tem a formação da ligação entre carbonos (C-C') em posição *orto* em relação ao sistema fenólico original, a zingerona (**1**). O dímero (**20'**) seria formado a partir do acoplamento do tipo C-O, em que há formação de ligação entre carbono-oxigênio, entre o radical em que o elétron desemparelhado está no átomo de oxigênio com outro radical cujo elétron está na posição *orto* em relação ao composto fenólico de origem, FIGURA 4.3.

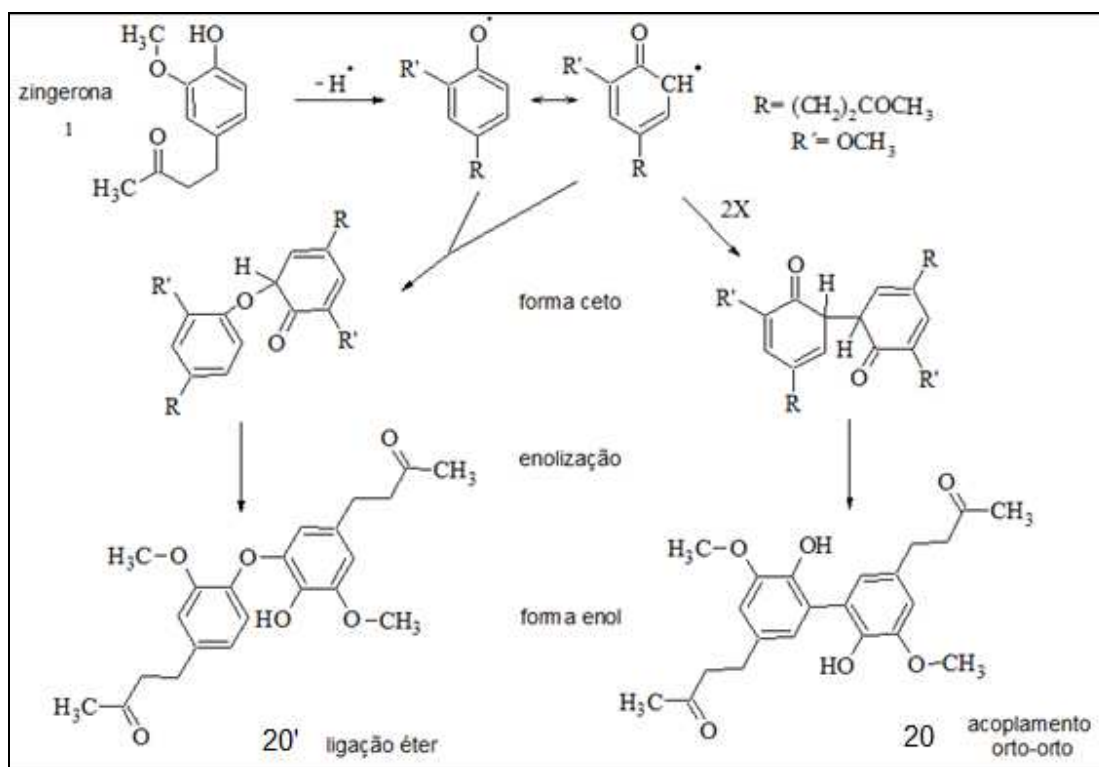


FIGURA 4.3 – Tipos de acoplamentos oxidativos aromáticos possíveis para a formação do dímero da zingerona (**1**).

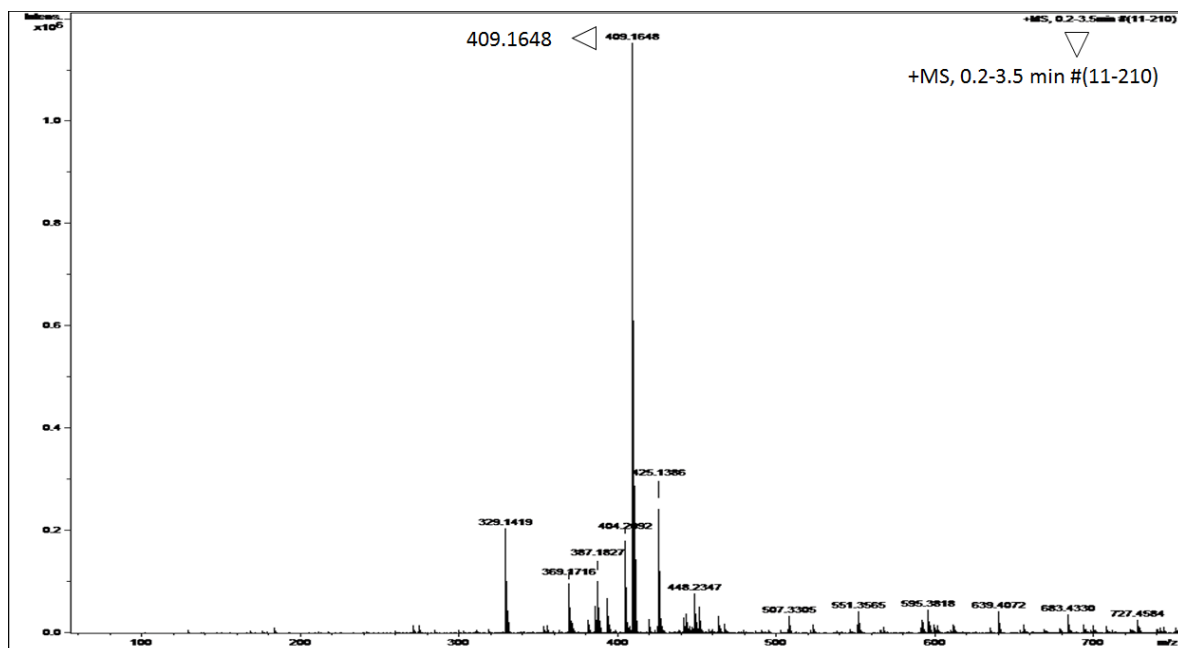


FIGURA 4.4 – Espectro da inserção direta, no modo positivo, do produto de biotransformação da zingerona N-4 (**20**), no espectrômetro de massas de alta resolução.

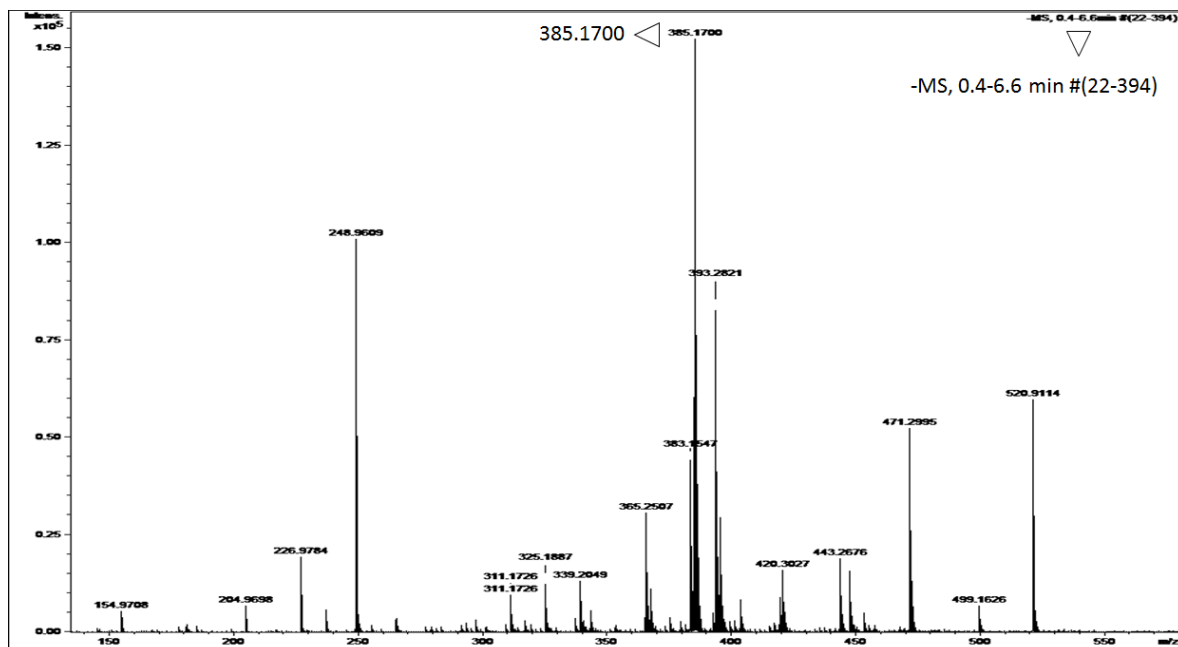


FIGURA 4.5 – Espectro da inserção direta, no modo negativo, do produto de biotransformação da zingerona N-4 (**20**), no espectrômetro de massas de alta resolução.

A análise do espectro de RMN de ^1H , mostrado na FIGURA 4.6, revelou um conjunto de sinais, sendo dois dubletos na região de hidrogênios aromáticos, cada um integrando para dois hidrogênios e com padrão de acoplamento *meta* ($J= 4$ Hz), indicando anéis aromáticos tetrassubstituídos. Na região mais blindada, FIGURA 4.6, a presença de um singlete característico de grupamento metoxila, com deslocamento de 3,92 ppm, teve a integração para seis hidrogênios, tendo-se assim, uma proporção de 1:3 em relação a cada hidrogênio aromático. Também foi possível visualizar um tripleto em 2,16 ppm, referente às metilas, sendo que o sinal integra para seis e os hidrogênios metilênicos com deslocamento em 2,78 e 2,88 ppm que integram para quatro cada um. Devido à característica do espectro de hidrogênio indicar simetria molecular, o mais provável é que o dímero formado tenha sido através de um acoplamento do tipo *orto-orto*, como representado na estrutura (20) da FIGURA 4.6 e discutido na FIGURA 4.3.

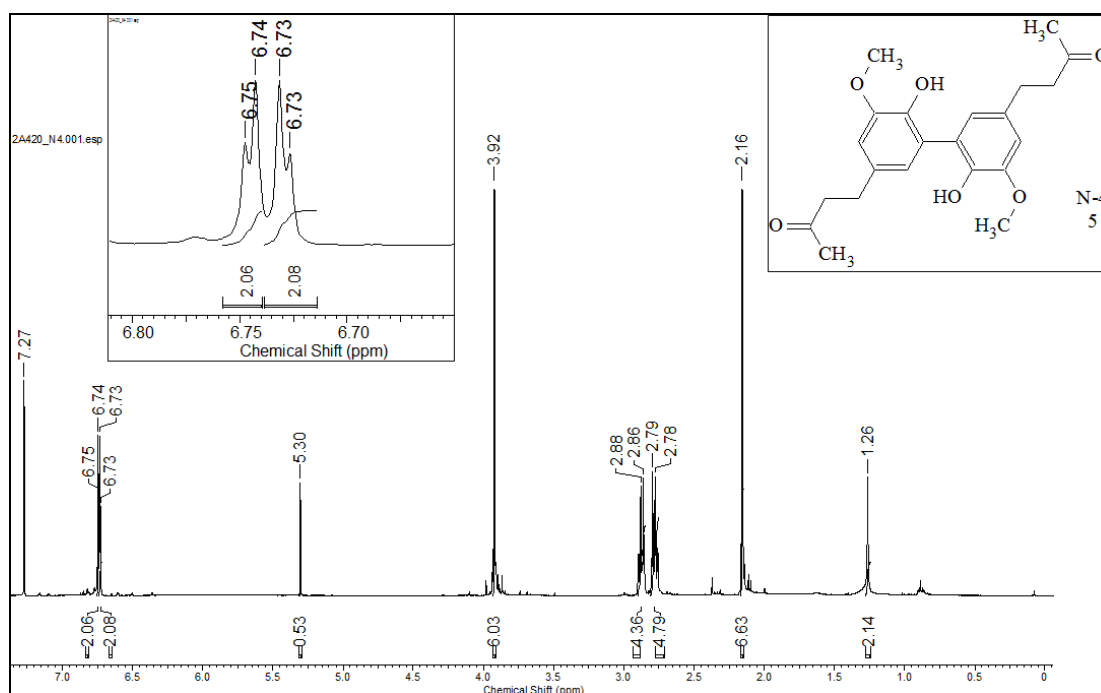


FIGURA 4.6 – Espectro de RMN de ^1H (400 MHz) em clorofórmio-d do produto de biotransformação intitulado N-4 (20).

O produto de biotransformação N-4 (20) foi analisado por inserção direta no equipamento com fonte de ionização por *eletronspray* (ESI) e analisador de massas do tipo *ion trap* no modo negativo, o sistema cromatográfico 5 descrito nos materiais e métodos. O experimento de *full scan* mostrou o íon m/z 385 como aquele de maior massa. O espectro de íons produtos, por (-) ESI-MS/MS, foi obtido mostrando o padrão

de fragmentação contido na FIGURA 4.7-A. Esse padrão de fragmentação sugere uma perda de radical metil (15 Da) formando o íon m/z 370, este por sua vez pode ser estabilizado por várias estruturas de ressonância. A perda de um ânion radicalar, com massa de 43 Da, leva a formação do íon m/z 327, como se pode ver na proposta de fragmentação da FIGURA 4.7-B. Pelo resultado obtido, foi possível confirmar o reconhecimento das enzimas do fungo frente a zingerona (1), mas ainda sobrava muito material a ser consumido. Uma padronização dos experimentos de biotransformação foi realizada e ensaios de concentração inibitória foram feitos. Para todos os fungos e substâncias ensaiadas, a concentração de $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ não foi tóxica sendo aquela padronizada para os experimentos de biotransformação.

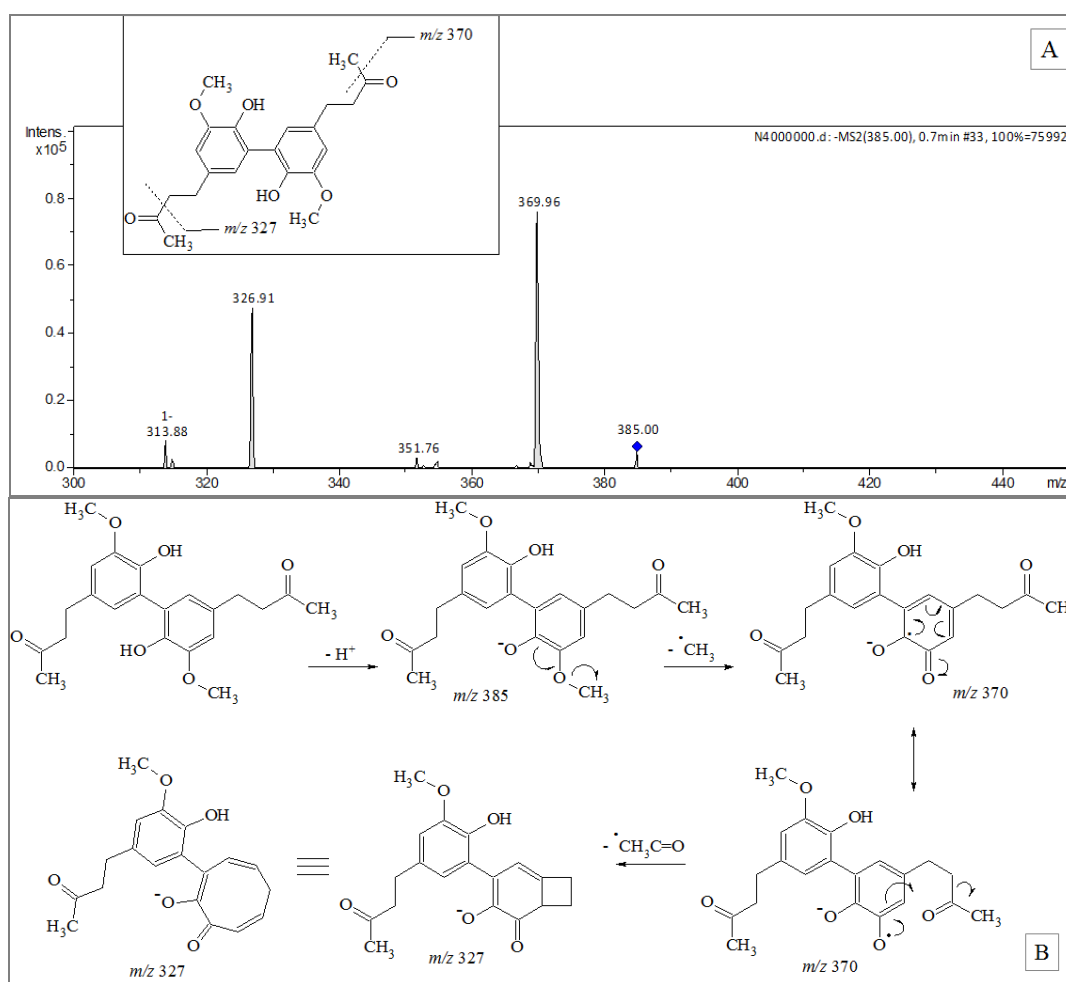


FIGURA 4.7 – Espectro de íons produtos por (-) ESI-MS/MS (A) do dímero da zingerona (20) intitulado N-4 e uma proposta de fragmentação (B).

4.1.2 – Estudo do extrato em acetato de acetila (Ac) da biotransformação da zingerona (1) marcada ou não com deutério

Uma vez que foi possível confirmar o reconhecimento das enzimas do fungo frente a zingerona (1), novos experimentos de biotransformação foram realizados em concentração padronizada de 100 µg/mL, bem como a biotransformação da zingerona marcada com deutério (1'), obtida pós-reação mostrada no esquema da FIGURA 4.8. O caráter ácido dos hidrogênios do grupo da metila e dos hidrogênios metilênicos que estão alfa à carbonila, (H-4) e (H-2), da molécula de zingerona (1), FIGURA 4.8 (esquema reacional), torna possível sua abstração pelo uso de uma base e na presença de água deuterada (D₂O) no meio reacional, houve a troca dos hidrogênios por deutério.

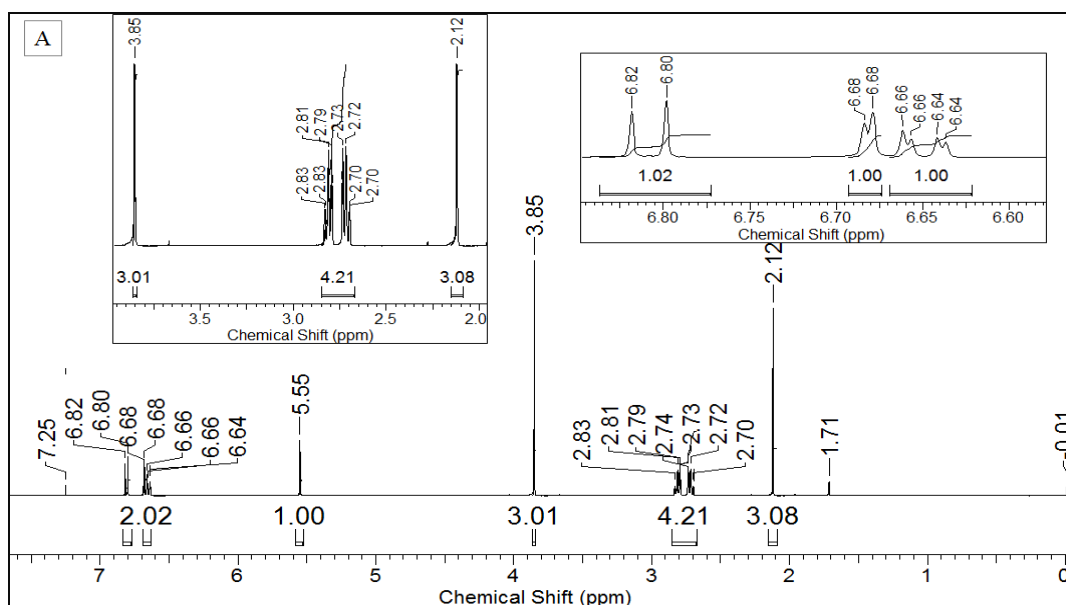
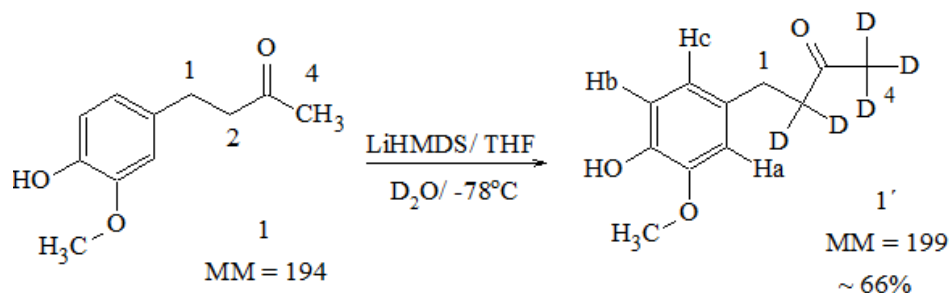


FIGURA 4.8 – Espectro de RMN ¹H da zingerona (1) (A) e acima esquema reacional para se obter a zingerona marcada isotopicamente (1').

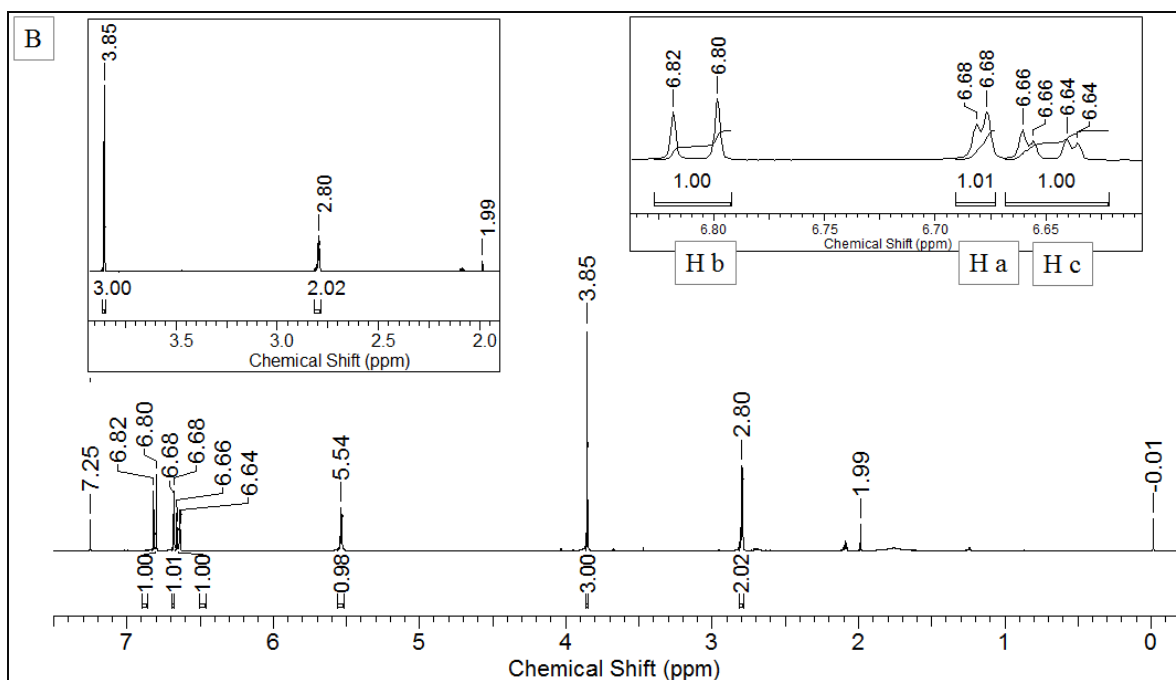


FIGURA 4.9 – Espectro de RMN ^1H da zingerona isotopicamente marcada ($1'$).

A escolha de uma base forte, como a bis(trimetilsilil)amida de lítio (LiHMDS), e em excesso, justificou-se pela possível competição que poderia haver para abstrair o hidrogênio da hidroxila, formando o ânion fenolato, e os hidrogênios da metila. Por se tratar de uma base estericamente impedida, era de se esperar apenas a troca dos hidrogênios H-4. Uma vez que a reação foi conduzida por toda noite (*overnight*), os hidrogênios da posição H-2 também foram abstraídos pelo excesso de LiHMDS no meio, obtendo-se assim a marcação da zingerona com cinco deutérios ($1'$), (esquema reacional – FIGURA 4.8). A comparação dos espectros de RMN de ^1H entre a zingerona (1), na FIGURA 4.8 e do produto de marcação isotópica ($1'$), na FIGURA 4.9, mostrou que dentre os sinais na região dos prótons ligados a carbono sp^3 , foi possível visualizar apenas o valor de δ_{H} 2,80 (H-1) integrando para dois hidrogênios, indicando a troca por deutério do H-2 e H-4. Os demais sinais na região de aromático δ_{H} 6,81 (d, $J= 8,06$ Hz, Hb- Ar), 6,68 (d, $J= 1,88$ Hz, Ha- Ar) e 6,65 (dd, $J= 1,88$ e $J= 8,06$ Hz, Hc- Ar), o singlete em δ_{H} 3,85 integrando para três hidrogênios, típico de grupamento metoxila, bem como o sinal da hidroxila em δ_{H} 5,54, permaneceram inalterados, em deslocamento químico e valor de integração, indicando que não houve outra modificação da molécula de zingerona (1), além da deuteração, sendo possível obter os

hidrogênios H-2 e H-4 marcados; esse resultado também foi confirmado pelo estudo por espectrometria de massas.

A análise por GC-MS revelou os cromatogramas mostrados na FIGURA 4.10-A e 4.10- B, para a zingerona (**1**) e zingerona-5 D (**1'**), respectivamente, com o pico base m/z 137, associado com o cátion 4'-hidroxi-3'- metoxibenzila. Também foi observado o íon molecular m/z 199 da zingerona- 5 D (**1'**), bem como o pico m/z 153, FIGURA 4.10- B, fragmento isotopicamente marcado com deutério que vem da quebra da ligação alfa carbonila. Este fragmento tem o valor de m/z 151 para zingerona (**1**) sem marcação, FIGURA 4.10-A.

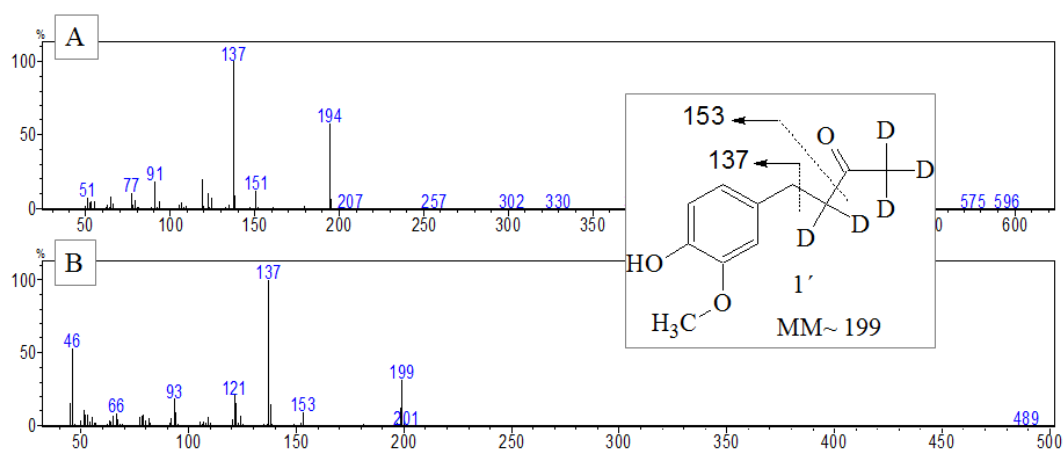


FIGURA 4.10 – Em (A), espectro de massas da zingerona (**1**) e em (B), da zingerona- 5 D (**1'**).

O espectro de massas por inserção direta da zingerona (**1**) e da zingerona-5 D (**1'**) foi obtido, com seu padrão de fragmentação mostrado na FIGURA 4.11, utilizando-se o (-) ESI-MS/MS, foi possível evidenciar a perda de um radical metil (15 Da) originando o íon m/z 178 (A) para zingerona (**1**) e o íon m/z 183 (B) para a zingerona-5 D (**1'**). Ao se obter o espectro de íons produtos para a zingerona (**1**) (A) a entrada para o valor de m/z 193 $[M-H]^-$ no *software* foi colocada erroneamente como 194 que na verdade se trata do valor da massa molecular da molécula.

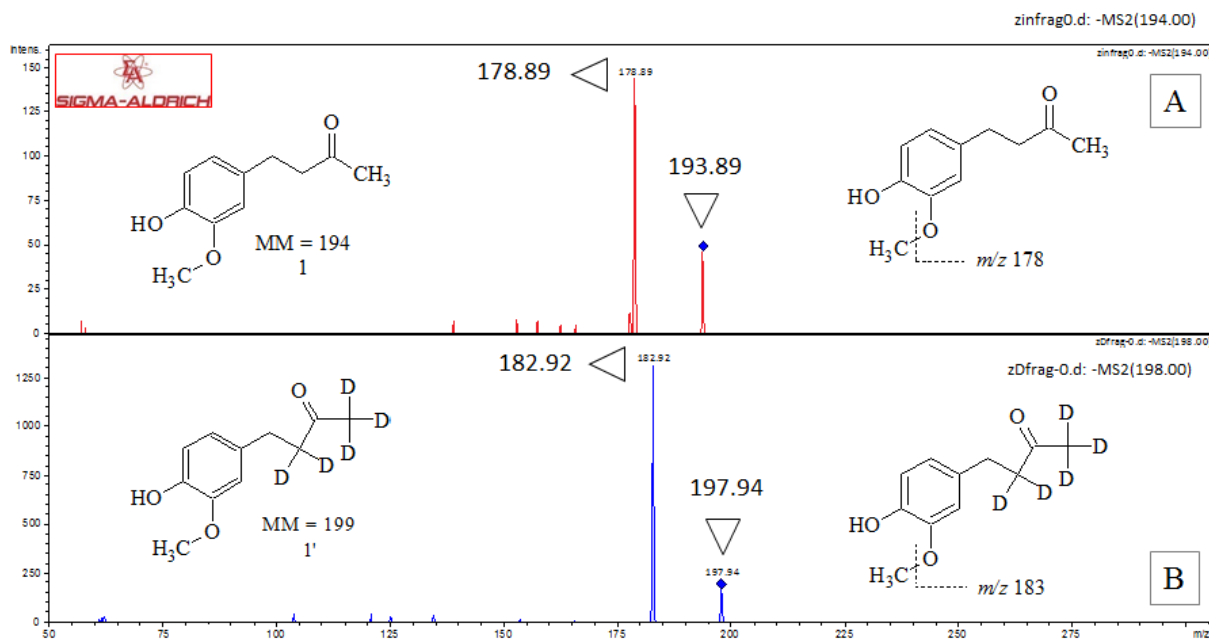


FIGURA 4.11 – (-) ESI-MS/MS: Espectro de fragmentação da zingerona (**1**) e da zingerona-5 D (**1'**).

O processo de biotransformação tanto da zingerona (**1**) como da zingerona-5 D (**1'**) foi realizado à concentração de 100 µg/ mL, como padronizado e descrito anteriormente nos materiais e métodos, empregando como meio de cultura líquido o B.D. (Batata-Dextrose) estéril, sendo acompanhado por 10 dias. Usou-se o controle (A) de produção dos metabólitos do fungo, sem a presença da zingerona (**1**) isotopicamente marcada ou não; e o controle (B) da possível degradação do substrato nas mesmas condições de trabalho. Após incubação com o fungo, realizaram-se as análises por HPLC da extração acetato de etila (Ac) do sobrenadante, o meio de cultura, tanto dos produtos de biotransformação, como do controle (A), de produção de metabólitos, e controle (B) da possível degradação do substrato.

Os métodos cromatográficos, desenvolvidos para uma boa separação das bandas que estiveram correlacionadas, principalmente com os produtos de biotransformação, foram desenvolvidos em modo reverso em coluna da Agilent, 5 µm, 150 x 4,6 mm, Eclipse XDB-C18. Primeiramente, se tentou trabalhar com sistema isocrático utilizando metanol ou acetonitrila (solvente B) e água (solvente A) como fase móvel, sendo que não se obteve um bom resultado. A eluição utilizando sistemas de solventes em

gradiente mostrou mais efetiva e a TABELA 4.1, resume as principais condições cromatográficas afim se obter maior seletividade na separação.

Para essas condições de análises, foi utilizado o sistema cromatográfico número 1, descrito nos materiais e métodos, e escolhido o comprimento de onda de 220 nm e de 280 nm, baseado em dados da literatura, e principalmente, em resultados que já haviam sido obtidos previamente, em análises por HPLC-SPE, para a biotransformação do 6-gingerol (**2**). Já que o equipamento de HPLC-SPE, o sistema cromatográfico 6 descrito nos materiais e métodos, era equipado com detector de arranjo de diodos com comprimento de onda variado. O comprimento de onda de 220 nm foi o melhor para visualizar a absorção tanto do padrão da zingerona (**1**), como das outras bandas, seja da formação de produtos de biotransformação ou dos próprios metabólitos do fungo como mostra a FIGURA 4.12, a seguir, que utilizou a condição cromatográfica de número 4 da TABELA 4.1.

TABELA 4.1 – Condições cromatográficas avaliadas para os extratos Ac das amostras do experimento de biotransformação (Continua).

Análise	Condição Cromatográfica
1	Isocrático em 10% de B por 5 minutos; 10% - 37% de B em 2 minutos; isocrático 37% de B por 28 minutos; 37% - 100% em 2 minutos; isocrático em 100% de B por 10 minutos; 100% - 10% de B em 2 minutos; isocrático em 10% por 20 minutos (Total de 68 minutos)
2	Isocrático em 10% de B por 5 minutos; 10% - 37% de B em 2 minutos; 37% - 100% de B por 38 minutos ($\Delta\% B= 1,6$); isocrático em 100% de B por 10 minutos, 100% - 10% de B em 2 minutos; isocrático em 10% por 20 minutos (Total de 77 minutos)
3	10% - 37% de B em 3 minutos; isocrático em 37% por 7 minutos; 37% - 55% de B em 2 minutos; 55- 100% de B em 10 minutos ($\Delta\% B= 4,5$); 100% de B por 10 minutos, 100% - 10% de B em 2 minutos; isocrático em 10% por 19 minutos (Total de 55 minutos)

(Continua)

4 10% - 37% de B em 3 minutos; isocrático em 37% por 7 minutos; 37% - 55% de B em 2 minutos; 55 - 100% de B em 10 minutos ($\Delta\%$ B= 4,5); isocrático em 100% de B por 12 minutos; 100% - 10% de B em 2 minutos; isocrático em 10% por 20 minutos (Total de 58 minutos).

→ Todas as análises foram realizadas em coluna da Agilent, 5 μ m, 150 x 4,6 mm, Eclipse XDB-C18, sendo a fase móvel constituída do solvente B (metanol ou acetonitrila) e solvente A (água), vazão 1 mL/min e volume injeção 20 μ L.

A sobreposição tanto para a amostra, produtos de biotransformação, quanto para os controles (A) e (B) do sexto dia de experimento, revelou bandas até no máximo 23 minutos da análise. A extração em acetato de etila (Ac) dos produtos de biotransformação, em azul, FIGURA 4.12, mostrou bandas majoritárias com o tempo de retenção de aproximadamente 9,0 e 16,0 minutos. Em aproximadamente 6,0 minutos aparece uma banda tanto no controle (A) de produção de metabólitos, cor verde, quanto na amostra, cor azul. O padrão da zingerona (**1**), em vermelho, tem o tempo de retenção de aproximadamente 7,0 minutos; não existe esta banda característica no cromatograma dos produtos de biotransformação, em azul, evidenciando que o fungo utiliza a zingerona (**1**) como substrato, sendo consumida praticamente em sua totalidade com seis dias de biotransformação, FIGURA 4.12. O controle B, da possível degradação do substrato, foi acompanhado por análise em GC-MS e mostrando que ele permaneceu inalterado durante todos os 10 dias do experimento de biotransformação.

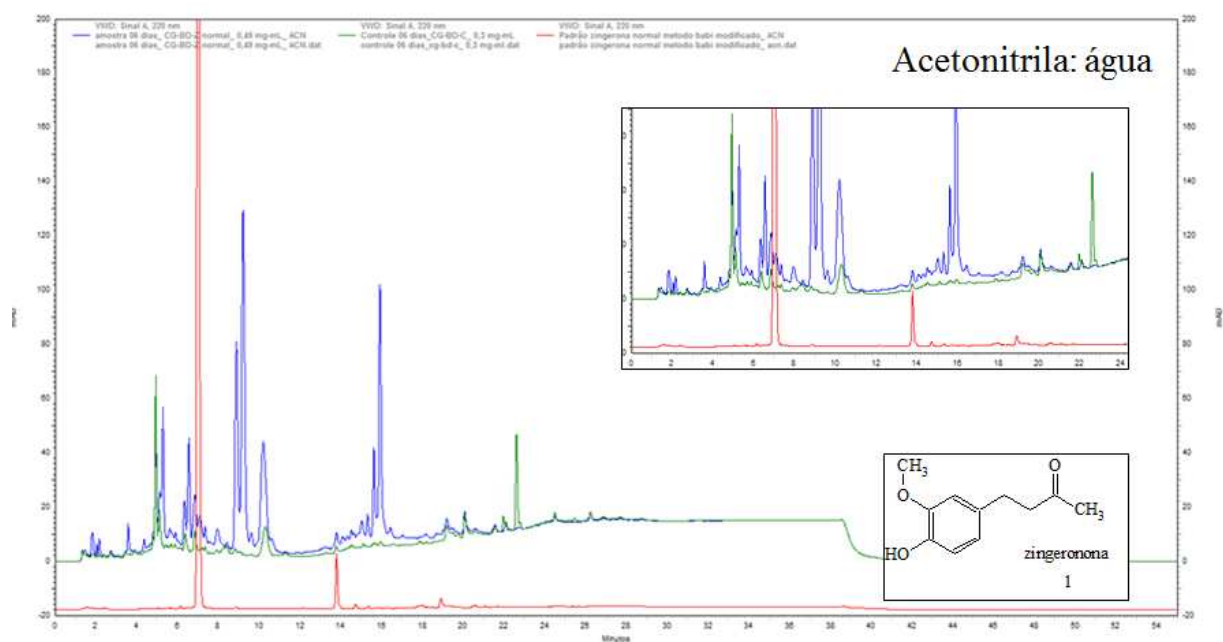


FIGURA 4.12 – Sobreposição dos cromatogramas dos produtos de biotransformação (em azul) depois de seis dias. Em verde, produção de metabólitos do fungo. Em vermelho padrão da zingerona (**1**). Condição cromatógrafica 4 da TABELA 4.1.

A FIGURA 4.13 traz a análise da sobreposição dos cromatogramas para o extrato acetato de etila (Ac) dos produtos de biotransformação da zingerona (**1**) no sexto dia, com o cromatograma do produto de biotransformação N-4 (**20**), depois de quinze dias, e isolado por cromatografia em coluna do “teste de citotoxicidade”. Os cromatogramas foram obtidos utilizando o gradiente metanol: água e mostrou que das bandas de absorção dos produtos de biotransformação no sexto dia de experimento, cor verde, com o cromatograma do produto de biotransformação N-4 (**20**), cor azul, há uma banda com mesmo tempo de retenção, em torno de 20 minutos, possivelmente confirmando a formação do dímero da zingerona (**1**) no novo experimento padronizado a 100 µg/mL, FIGURA 4.13.

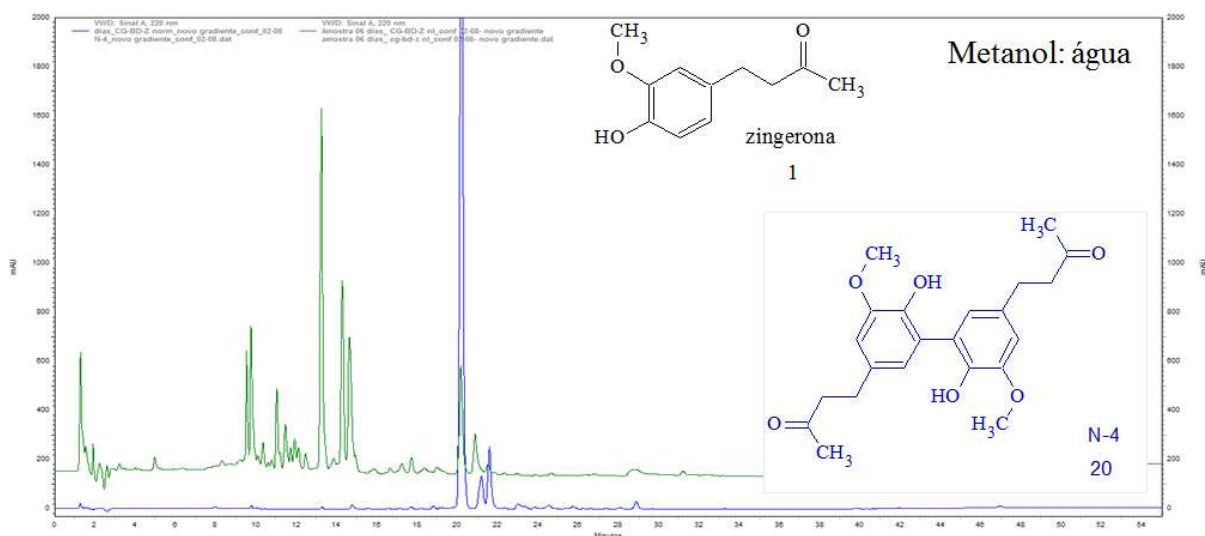


FIGURA 4.13 – Sobreposição do cromatograma do extrato Ac (AcOEt) dos produtos de biotransformação (verde), depois de seis dias, e do produto de biotransformação N-4 (**20**), depois de 15 dias, em azul. Condição cromatográfica 3 da TABELA 4.1

A técnica por LC-MS foi selecionada, com o uso do equipamento com fonte de ionização por *eletronspray* (ESI) e analisador de massas do tipo *ion trap*, o sistema cromatográfico 5 (LC Shimadzu® e espectrômetro Brucker® Esquire 6000) descrito nos materiais e métodos. Para as análises das amostras dos dez dias do experimento de biotransformação da zingerona (**1**), FIGURA 4.14, a coluna da Agilent, 5 μm , 150 x 4,6 mm, Eclipse XDB-C18 foi utilizada.

A condição para a corrida cromatográfica foi o Método 2, descrito nos materiais e métodos, utilizando fase móvel constituída de acetonitrila e solução de ácido fórmico a 0,1%, a fim de melhorar o processo de ionização. Dentre os dez dias do experimento, foi obtido o *full scan* ou o cromatograma do pico base (*BCP*) do 3°, 6°, 8° e 10° dia, no modo negativo, como é visto na FIGURA 4.14. Foi possível observar uma concentração de bandas entre 3,2 a 12,5 minutos, sendo que no 8° e 10° dia há mais bandas em torno de 19,5 min a 22,5 min. Por volta de 10 minutos, há uma banda o qual se encontrou o íon m/z 385 $[\text{M-H}]^-$ desde o 3° dia de biotransformação como foi realça do na FIGURA 4.14.

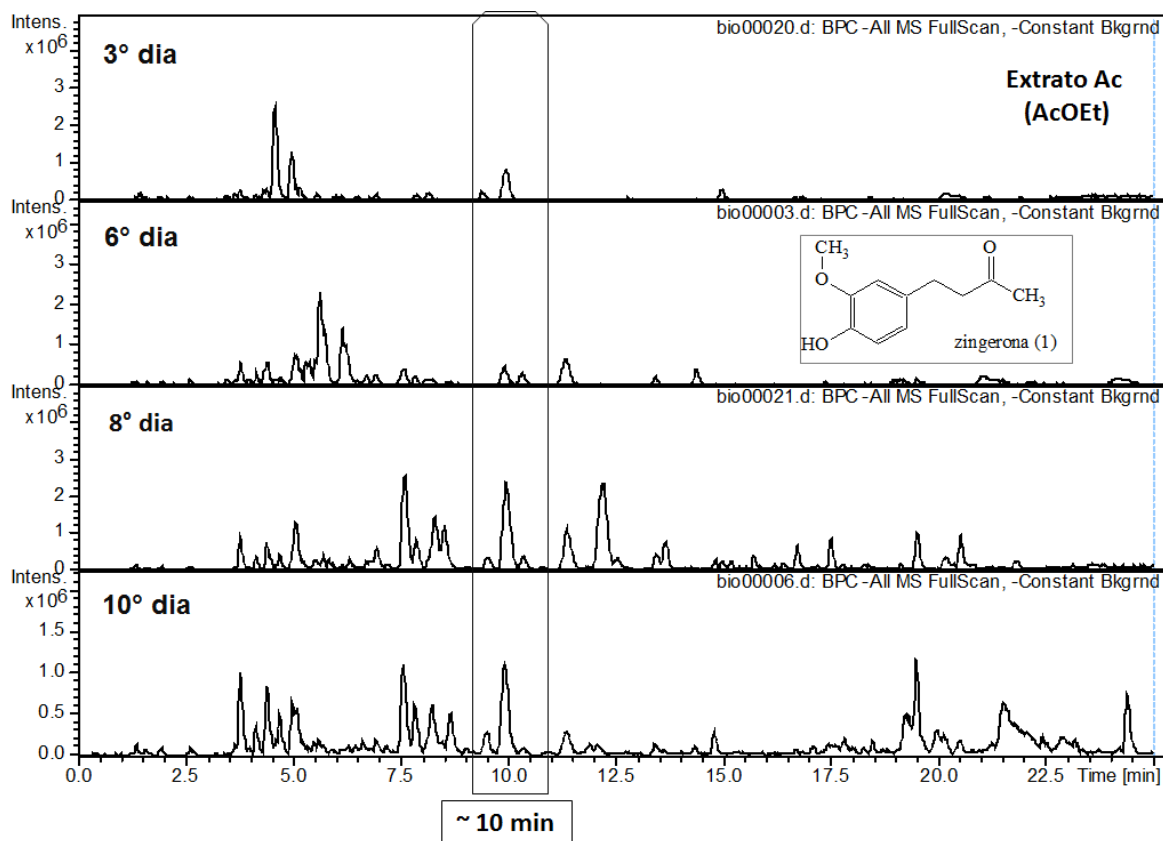


FIGURA 4.14 – (-) ESI-MS: Cromatograma do pico base (*BPC*) do extrato Ac (AcOEt) dos produtos de biotransformação no 3^o, 6^o, 8^o e 10^o dia.

A banda em torno de 10 minutos apresentou o íon m/z 385 $[M-H]^-$ com o mesmo padrão de fragmentação que ocorre para o composto N-4 (**20**), FIGURA 4.15-C, que foi isolado por cromatografia em coluna de bancada do “teste de citotoxicidade” mencionado no início do capítulo. Assim como para a amostra N-4 (**20**) analisada por inserção direta no equipamento *ion trap*, os fragmentos obtidos por LC-MS no experimento de auto-MS² para os extratos Ac (AcOEt) da biotransformação da zingerona (**1**), padronizada à 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, apresentou para o íon m/z 385 $[M-H]^-$, a perda de um radical metil (15 Da), formando o fragmento m/z 370, e a perda de um fragmento de 43 Da, formando o íon m/z 327, como pode ser visto na FIGURA 4.15-B. Desta forma, a proposta de fragmentação mostrada na FIGURA 4.7 pode explicar os dados obtidos na análise por LC-ESI-ITMS/MS para o íon m/z 385 $[M-H]^-$. Deste experimento de biotransformação e de sua análise por espectrometria de massas foi possível, mais uma vez, confirmar a atuação de polifeniloxidasas para se ter o dímero da zingerona (**1**).

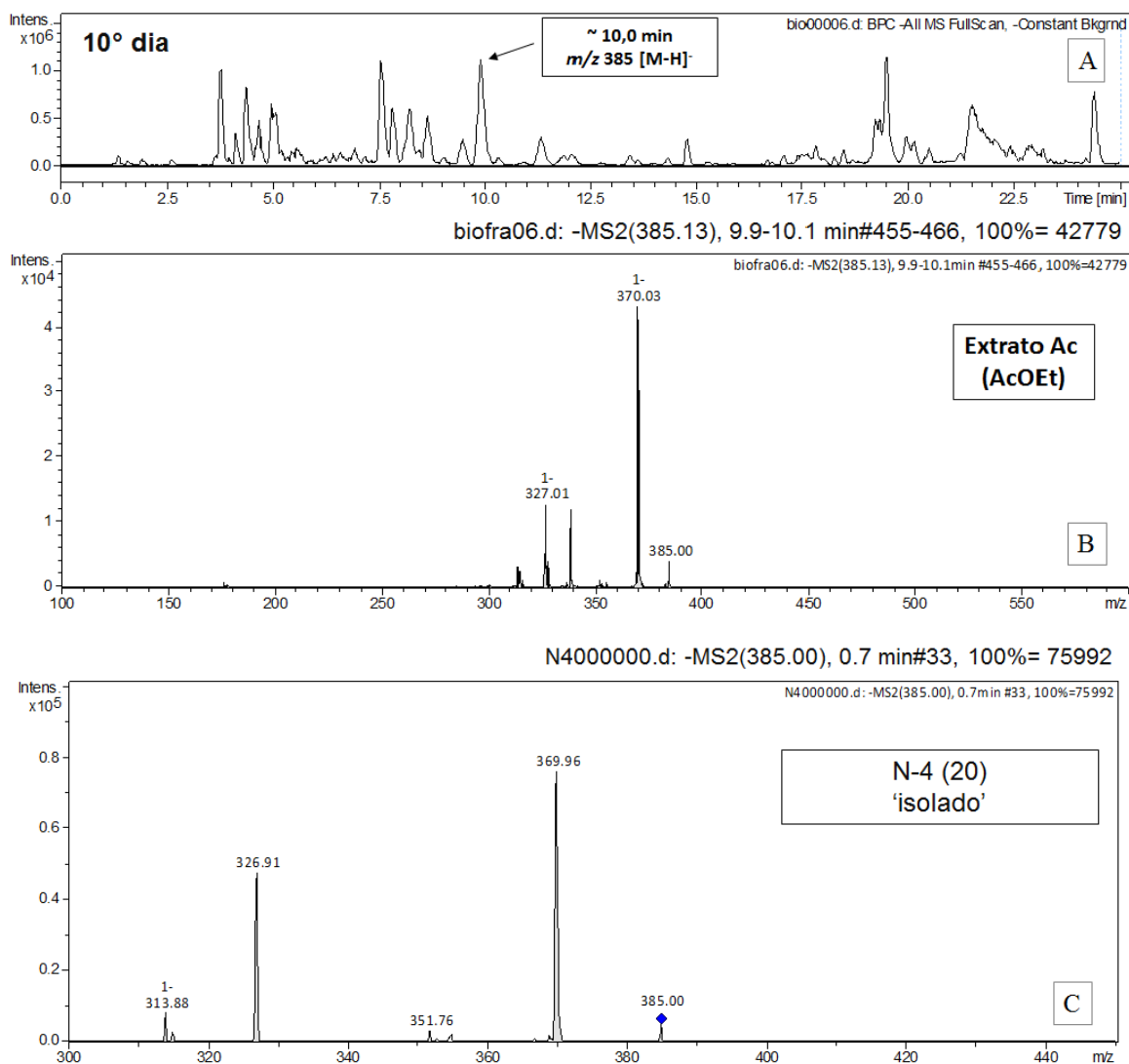


FIGURA 4.15 – (A) Cromatograma do pico base (BCP) do extrato Ac (AcOEt) do 10º dia e em (B) fragmentos do íon m/z 385; (C) (-) ESI-MS/MS: Fragmentos por inserção direta do composto N-4 (20).

Os extratos Ac (AcOEt) dos produtos de biotransformação da zingerona (1) do décimo dia, foram analisados por LC-ESI-ITMS no modo positivo, sendo que o cromatograma do íon extraído (EIC) para o m/z 387 é mostrado em azul na FIGURA 4.16-A. Já que não foi possível obter os fragmentos no experimento de auto-MS², provavelmente sendo necessário otimizar os parâmetros do equipamento, os pontos em vermelho, mostrados na FIGURA 4.16-A, representa o cromatograma do íon extraído (EIC) por experimento de ESI-MS/MS, sendo que na FIGURA 4.16-B, foi possível ver o padrão de fragmentação para o íon m/z 387,29 [M+H]⁺ com tempo de retenção de 9,5

minutos. O espectro de MS², mostrou fragmentos indicando a perda de uma molécula de água (18 Da), levando ao íon m/z 369,07, bem como a perda neutra de acetona (58 Da), levando o íon m/z 329,07 (FIGURA 4.16); uma proposta de fragmentação está representada na FIGURA 4.17, a seguir, e o estudo por LC-MS, no modo positivo, mais uma vez confirma a formação do dímero da zingerona (**1**) por reações de acoplamento oxidativo aromático.

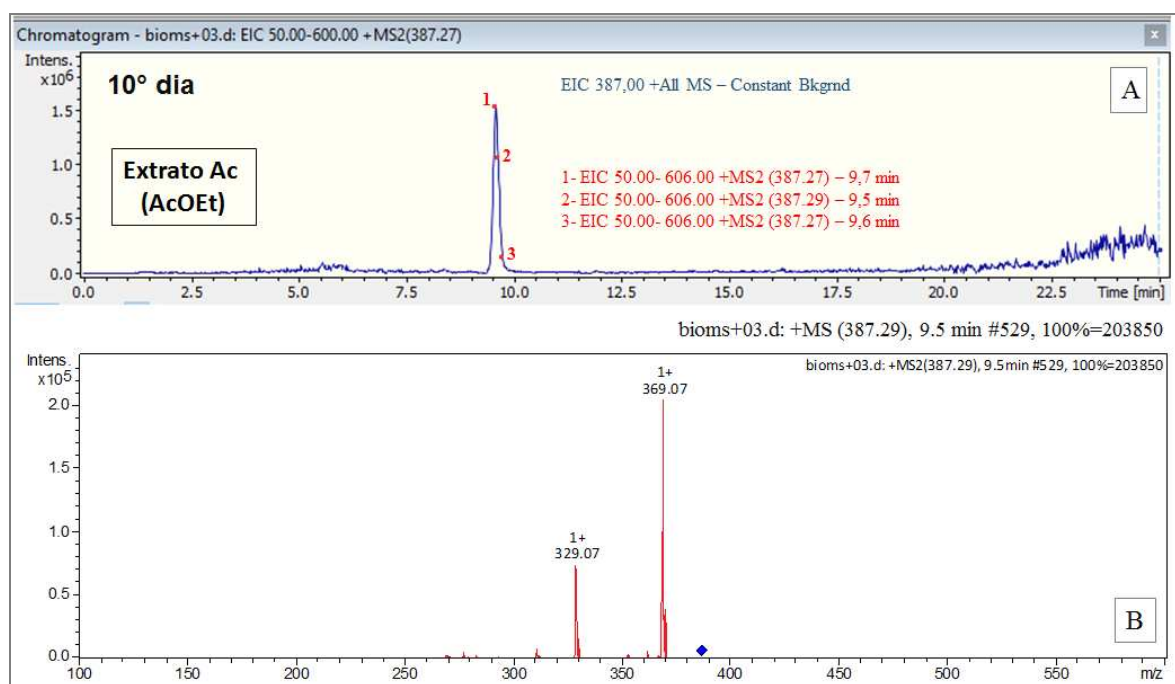


FIGURA 4.16 – Em (A), na cor azul, cromatograma do íon extraído (*EIC*) (ESI-MS) para o m/z 387. Em vermelho *EIC* (ESI-MS/MS) para o íon m/z 387 em cada ponto. Em (B), fragmentação MS² do íon m/z 387,29 a 9,5 minutos.

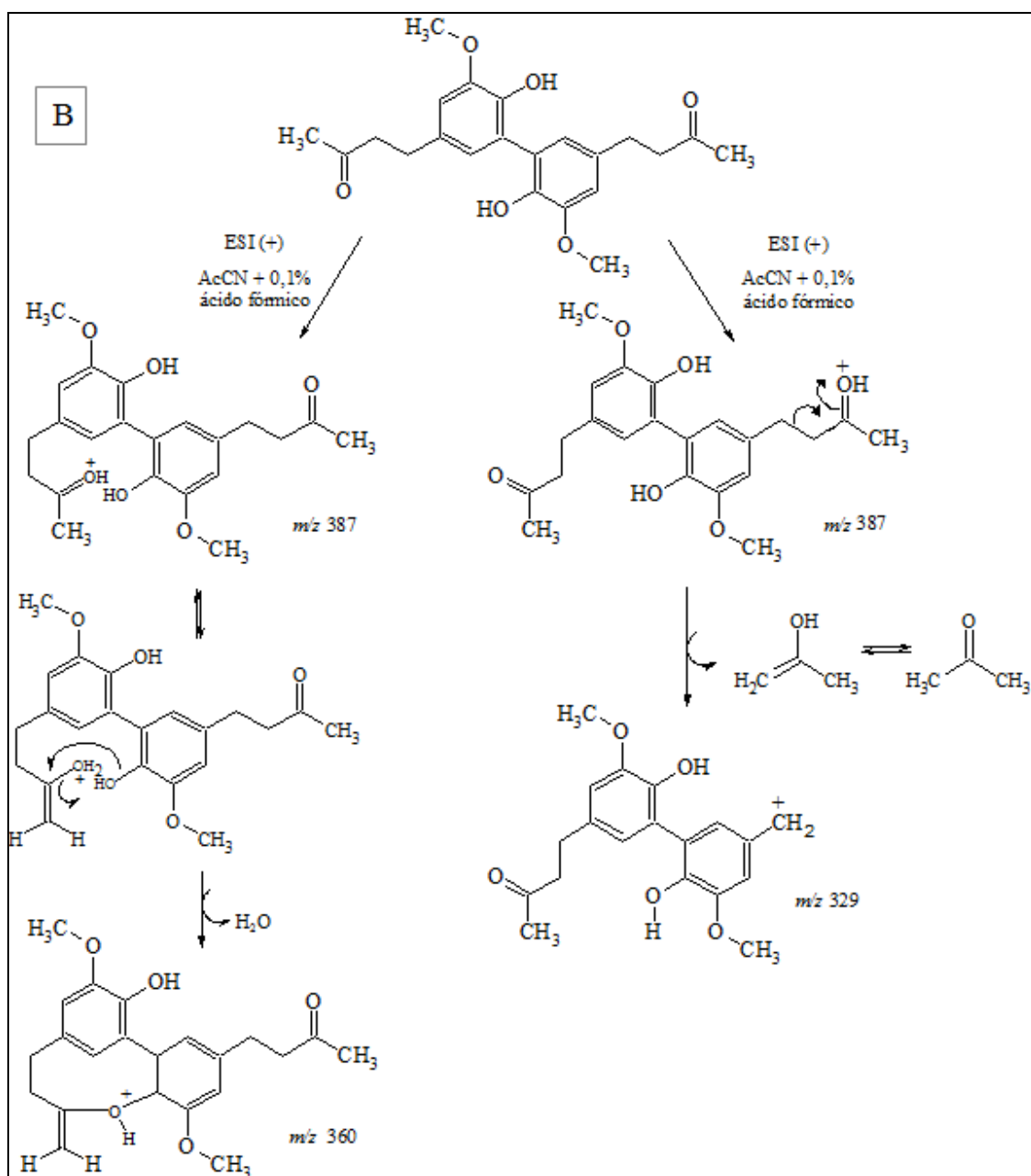


FIGURA 4.17 – Uma proposta de fragmentação para o íon m/z 387.

Na FIGURA 4.18, é possível ver o *full scan* ou cromatograma do pico base (BCP), no modo negativo, do extrato Ac (AcOEt) do 1°, 6° e 10 ° dia do controle (A), os metabólitos produzidos pelo fungo no meio BD (Batata-Dextrose) sem a presença da zingerona (1). A primeira observação é que a banda relacionada com o dímero da zingerona (1), que aparecerá em torno de 10 min no extrato Ac (AcOEt), dos produtos de biotransformação, não é visto nos cromatogramas do controle (A) de produção de

metabólitos. Pode haver uma relação entre as bandas que foram visualizadas no 8° e 10° dia de biotransformação em torno de 19,5 min a 22,5 min com o que o fungo produz como metabólitos, aparecendo bandas nesta faixa de tempo de retenção no controle (A).

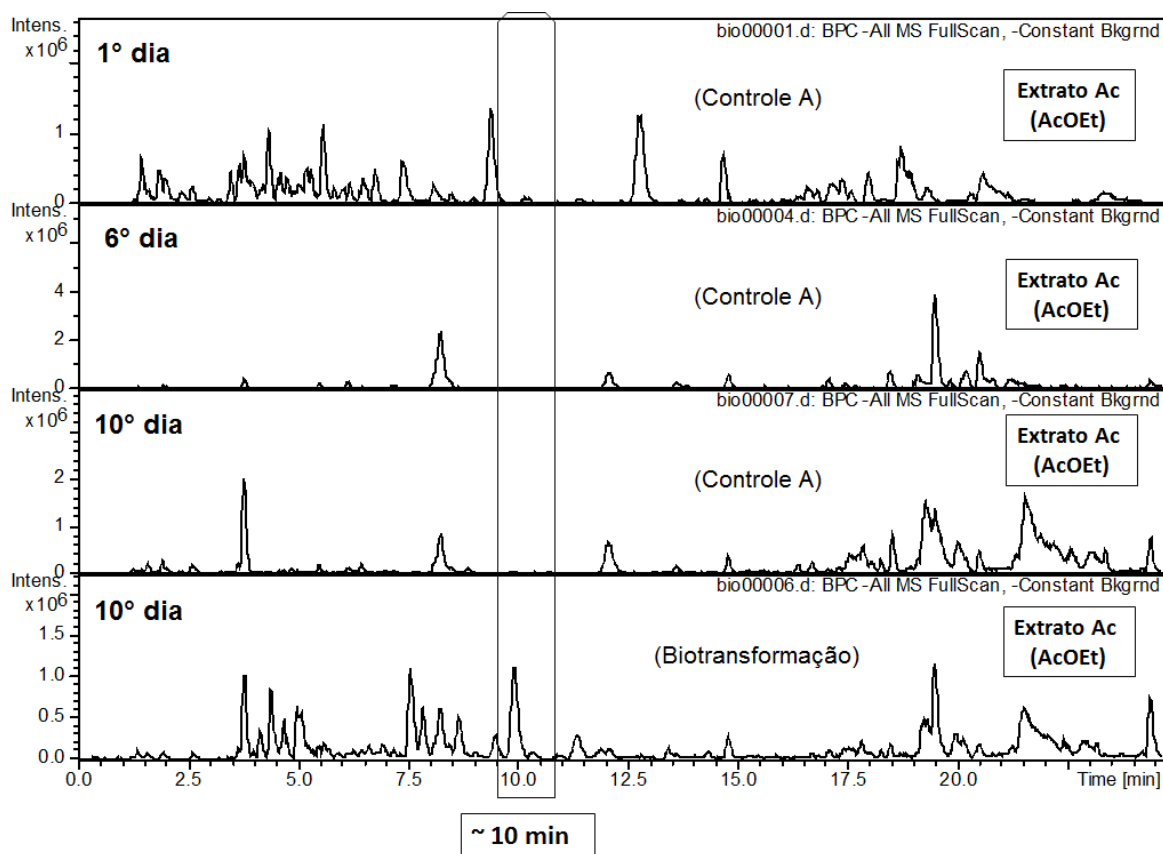


FIGURA 4.18 – (-) ESI-MS: Cromatograma do pico base do extrato Ac (AcOEt) dos controles (A) do 1°, 6° e 10° dia e dos produtos de biotransformação do 10° dia.

A zingerona-5 D (**1'**) foi fornecida ao fungo *C. gloesporioides* na concentração de 100 µg/ mL e a análise do extrato Ac (AcOEt) da biotransformação foi feita no LC-MS *ion trap*, no modo negativo, sistema cromatográfico 5 dos materiais e métodos. A FIGURA 4.19 traz o *full scan*, ou o cromatograma de pico base (BPC), realçando a banda em torno de 10 minutos relacionada com o produto de acoplamento oxidativo aromático entre duas moléculas de zingerona-5 D (**1'**). Diante dos resultados obtidos, apesar do produto (**1'**), que veio da reação de marcação da zingerona (**1**) com deutério, ter sido purificado, foi utilizada como técnica a cromatografia em coluna de bancada. Mesmo com a indicação por dados espectroscópicos e de massas, de que houve a troca de

cinco hidrogênios da molécula de zingerona (**1**), a banda característica em torno de 10 minutos, que faz referência ao íon m/z relacionado com o dímero, produto da biotransformação, mostrou que parece ter ocorrido a formação de isótopos com peso molecular menor, parecendo variar entre zingerona-1 D a zingerona- 5 D ao se obter o dímero. O que pode ter ocorrido, é a troca por átomos de hidrogênio no momento em que o substrato isotopicamente marcado (**1'**) foi utilizado pelas enzimas do fungo, ou então, o que também é provável, é de que o isolamento em coluna de bancada associado aos equipamentos de análises não tenha sido eficiente para dizer com exatidão quantos átomos de hidrogênio foram exatamente trocados.

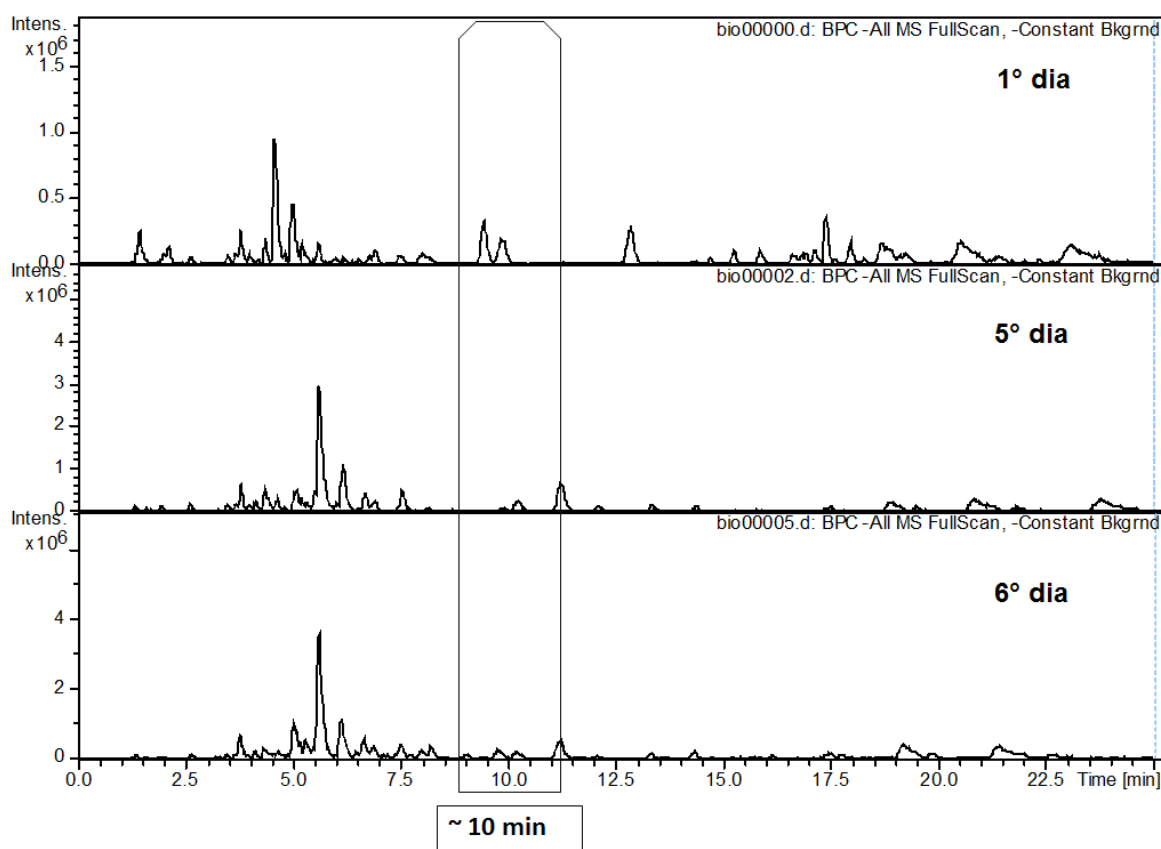


FIGURA 4.19 – (-) ESI-MS: Cromatograma de pico base (BCP) do extrato Ac (AcOEt) do 1°, 5° e 6° dia da biotransformação da zingerona- 5 D (**1'**).

Na FIGURA 4.20, há uma comparação entre o espectro de fragmentação do experimento de auto-MS², referente ao dímero da zingerona (**20**) e o íon m/z referente ao dímero da zingerona marcado com deutério (**20 - 1 a 10D**), mostrando os valores dos fragmentos isotopicamente marcado. O estudo de massas deste experimento de

biotransformação da zingerona marcada com deutério (**1**'), permitiu confirmar o reconhecimento do *pool* enzimático do fungo *C. gloesporioides*, bem como a provável presença de polifenoloxidasas que fazem o acoplamento oxidativo aromático entre as moléculas da zingerona (**1**).

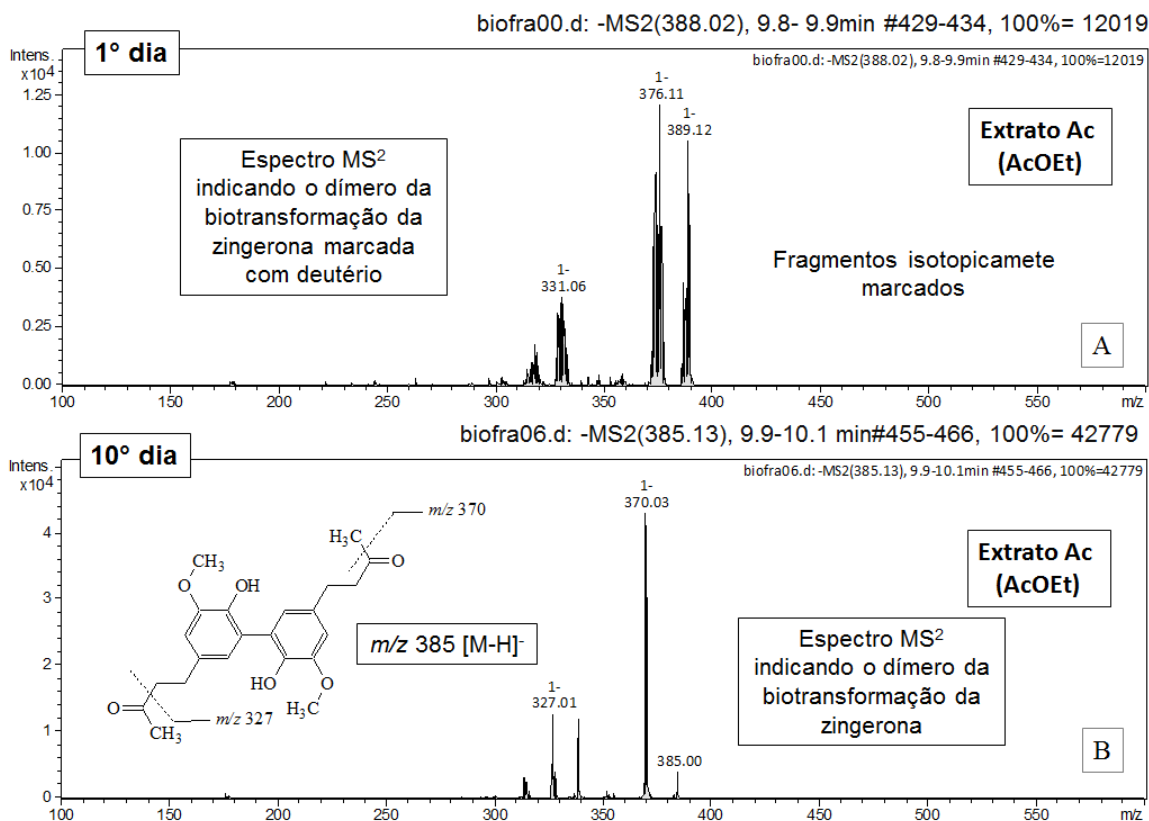


FIGURA 4.20 – (-) ESI-MS/ MS – Em (A) os fragmentos isotopicamente marcados e em (B) os fragmentos do dímero da zingerona (**1**) sem marcação.

4.2 – Biotransformação do 6-gingerol (2) por *Colletotrichum gloesporioides*

O policetídeo aromático, 6-gingerol (2), FIGURA 4.21, foi submetido ao processo de biotransformação em meio de cultura líquido estéril B.D. (Batata-Dextrose), pelo fungo *Colletotrichum gloesporioides* à concentração de 100 µg/ mL, sendo que o processo foi acompanhado por 10 dias, tendo-se o controle (A) de produção dos metabólitos produzidos pelo fungo, sem a presença do 6-gingerol (2) e o controle (B) da possível degradação dessa substância nas mesmas condições de trabalho. O extrato em acetato de etila (Ac) foi estudado por técnicas de HPLC, LC-SPE-RMN e LC-MS.

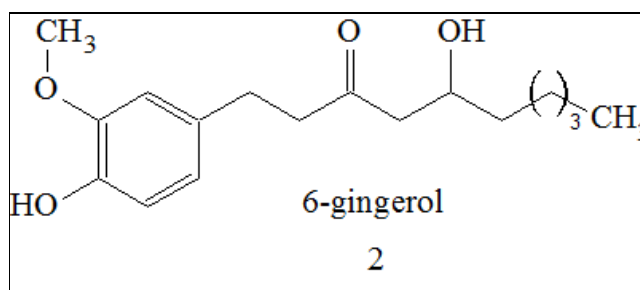


FIGURA 4.21 – O composto 6-gingerol (2) foi biotransformado por *C.gloesporioides*.

4.2.1 – Estudo do extrato em acetato de etila (Ac) da biotransformação de 6-gingerol (2) marcado ou não com deutério

O sistema cromatográfico 1, descrito nos materiais e métodos, foi utilizado para as análises em HPLC da extração acetato de etila (Ac) do sobrenadante, o meio de cultura, tanto dos produtos de biotransformação, como do controle A, de produção de metabólitos, e o controle B da possível degradação do 6-gingerol (2), foram realizadas e comparadas. A coluna da Agilent, 5 µm, 150 x 4,6 mm, Eclipse XDB-C18 foi utilizada e a melhor condição para a corrida cromatográfica para este experimento foi de 5,0 minutos em modo isocrático, 10 % de metanol (solvente B) e água (solvente A), depois gradiente de 20 minutos saindo de 10% até 100% de metanol (solvente B) ($\Delta\%B$ 4,5%) e mais 20 min de metanol (solvente B) a 100%, após isso retorna ao condicionamento da coluna por 20 min a 10% de metanol (solvente B).

Pela análise mostrada a seguir, fazendo uso do HPLC-SPE, o sistema cromatográfico 6, descrito nos materiais e métodos, que é acoplado ao detector de

arranjo de diodo (DAD), houve reprodução do perfil cromatográfico, obtido no sistema 1, e pelo gráfico de DAD-2D, escolheu-se o comprimento de onda de 220 nm para as análises. Já que foi o melhor comprimento de onda para se observar a absorção tanto do padrão de 6-gingerol (**2**), isolado do gengibre, como das outras bandas, seja da formação de produtos de biotransformação ou dos próprios metabólitos do fungo, FIGURA 4.22.

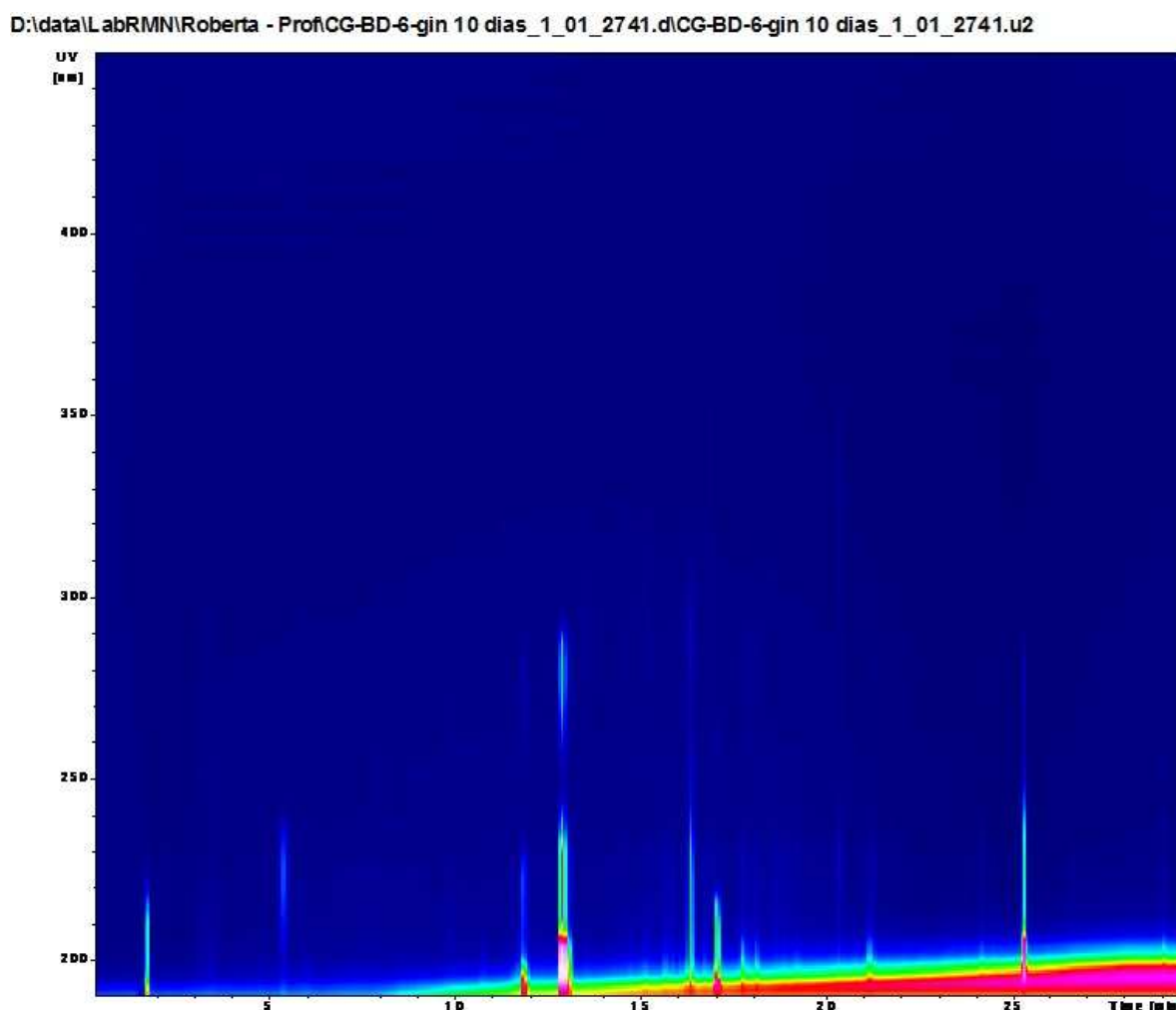


FIGURA 4.22 – Gráfico de DAD-2D para o cromatograma do extrato acetato de etila (Ac) dos produtos de biotransformação do 10º dia do 6-gingerol (**2**).

Nessas condições de trabalho, a FIGURA 4.23 mostra o perfil cromatográfico das bandas bem resolvidas e passíveis de serem aprisionadas por LC-UV-SPE. Da sobreposição tanto para a amostra, produtos de biotransformação, quanto para os controles (A) e (B) do décimo dia de experimento, observaram-se bandas até no

máximo 35 minutos da análise. A extração Ac (AcOEt) dos produtos de biotransformação, em azul, mostrou bandas majoritárias com o tempo de retenção de aproximadamente 12,5 e 16,3 minutos, FIGURA 4.23. Também há outra banda de interesse, com o tempo de retenção de aproximadamente 11,0 minutos que aparece tanto no controle (A) de produção de metabólitos, cor verde, quanto na amostra de biotransformação, cor azul. O 6-gingerol (2), presente no controle (B) de degradação, em vermelho, tem o tempo de retenção de aproximadamente 21,5 minutos assim como o padrão, obtido do isolamento a partir do gengibre, cor verde palha na FIGURA 4.23.

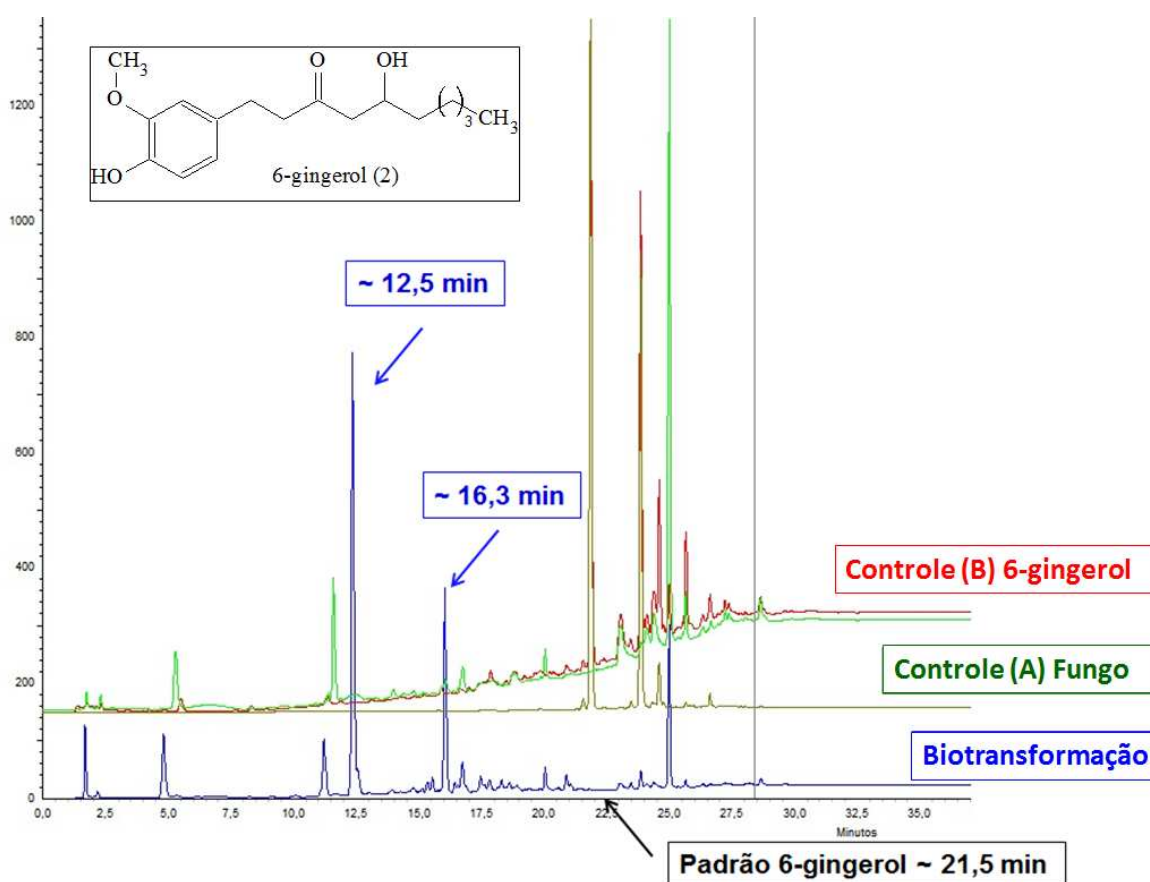


FIGURA 4.23 – Sobreposição dos cromatogramas dos produtos de biotransformação em azul. Em verde, produção de metabólitos do fungo *C. gloesporioides*. Em vermelho e verde palha, controle de degradação e padrão do 6-gingerol (2).

No conjunto de bandas do cromatograma relacionado aos produtos de biotransformação do décimo dia, em azul na FIGURA 4.23, e também representado na FIGURA 4.24, não há a banda característica do 6-gingerol (2) em torno de 21,5 minutos, indicando seu consumo total pelo fungo. Além do mais, o controle de

degradação (B), em vermelho, mostrou a banda característica do 6-gingerol (2) até o décimo dia do experimento, evidenciando-se que não ocorreu degradação da substância; em verde na FIGURA 4.23 pode-se ver as bandas de absorção referente aos metabólitos produzidos pelo fungo no meio de cultura utilizado (Batata-Dextrose).

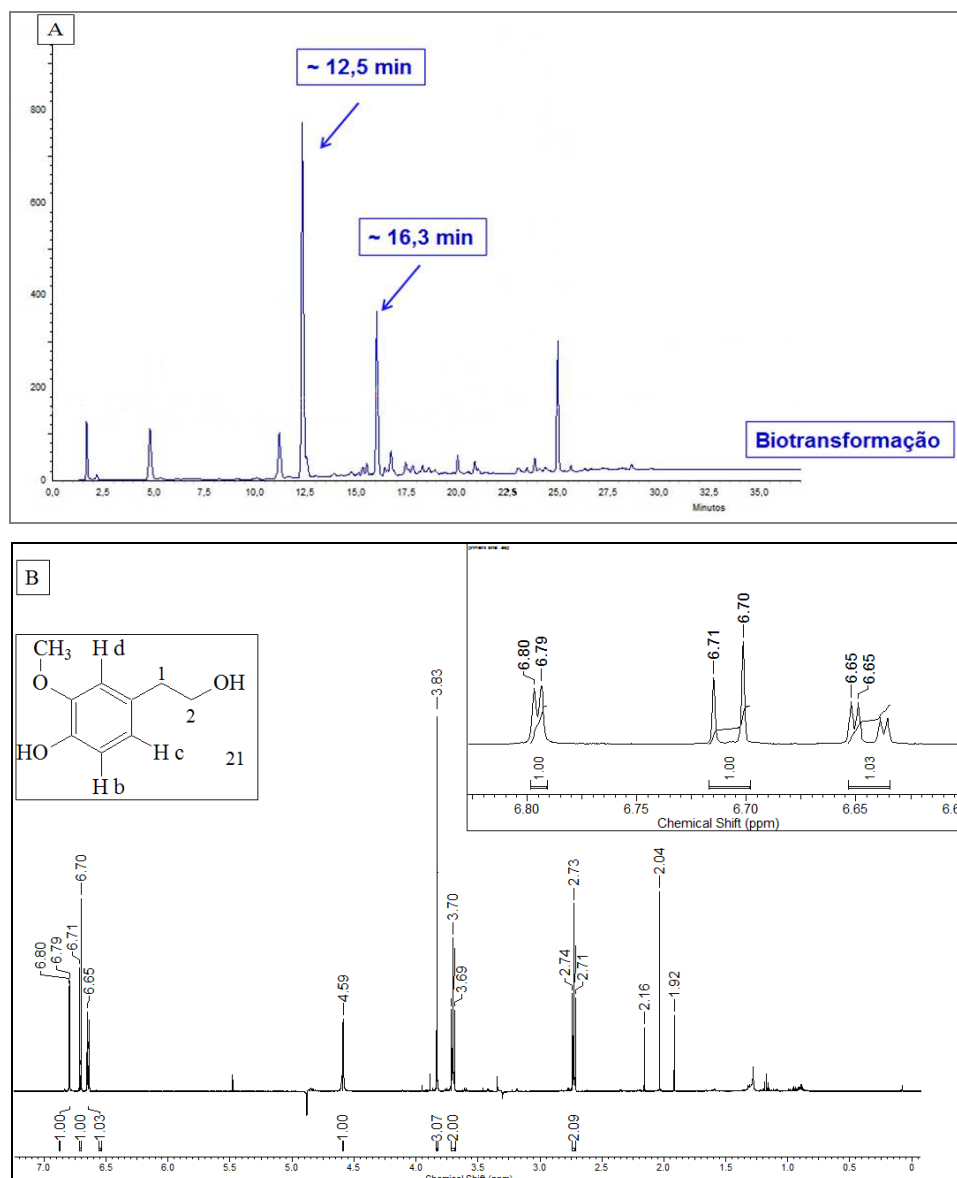


FIGURA 4.24 – Espectro de RMN H¹ (600 MHz) em MeOH-d₄ (B) do primeiro sinal do cromatograma com o tempo de retenção em torno de 12,5 minutos (A).

Diante desses resultados e dessas condições de trabalho, a amostra referente ao extrato acetato de etila (Ac) dos produtos de biotransformação do décimo dia, foi submetida a análise utilizando-se da técnica LC-UV-SPE-RMN, o sistema

cromatográfico 6, sendo aprisionadas as bandas com o tempo de retenção de 12,5 e 16,3 minutos. O espectro de RMN ^1H (600 MHz) da primeira banda (12,5 min), está representado na FIGURA 4.24-B.

Nesse espectro de RMN ^1H , foi possível observar sinais na região de anel aromático, todos integrando para um hidrogênio cada, um o duplete em 6,79 ppm com padrão de acoplamento *meta* ($J = 2$ Hz), um duplete em 6,70 ppm com padrão de acoplamento *orto* ($J = 8$ Hz) e o duplo duplete em 6,65 ppm com acoplamento *orto* ($J = 8$ Hz) e *meta* ($J = 2$ Hz). Este conjunto de sinais caracteriza o anel aromático trissubstituído como mostrado na estrutura representada na FIGURA 4.24-B e FIGURA 4.25. Nas regiões mais blindadas do espectro, foi possível observar o singleto em 3,83 ppm, com integração para três hidrogênios, característico do grupamento metoxila. Também foi possível observar os dois tripletos em 3,70 e 2,72 ppm com integração para dois hidrogênios, referente aos grupos metilenos (1) e (2) da estrutura proposta, FIGURA 4.25.

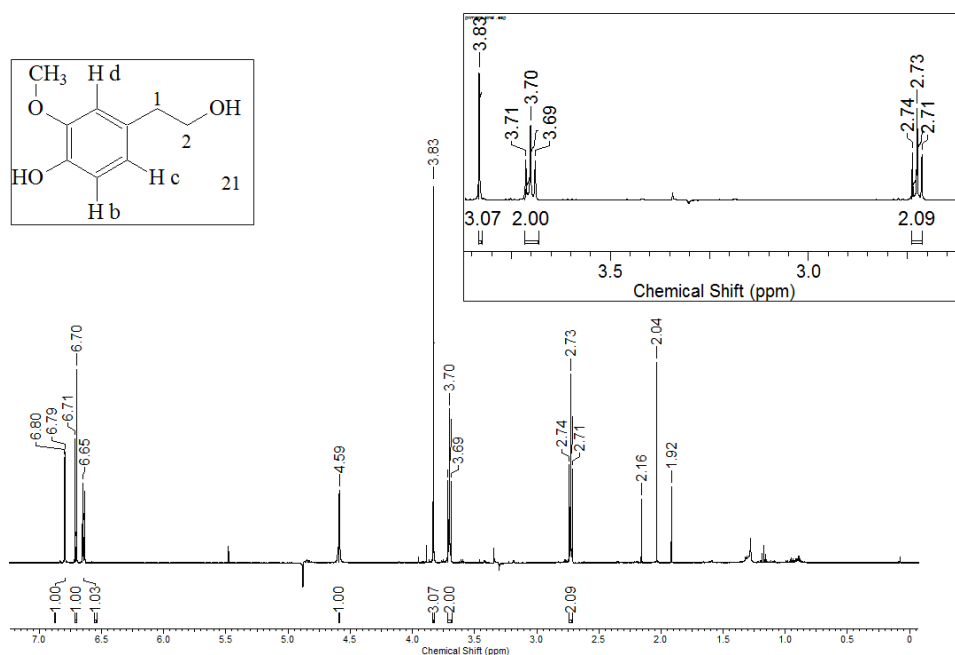


FIGURA 4.25 – Ampliação da região mais blindada do espectro de RMN H^1 (600 MHz) em MeOH-d_4 do primeiro sinal do cromatograma com o tempo de retenção em torno de 12,5 minutos.

O padrão estrutural do álcool (**21**), foi proposto baseando-se nos dados de ressonância e na análise por inserção direta, utilizando o espectrômetro de massas triplo quadrupolo da AppliedBiosystems[®] (API 2000) do sistema cromatográfico 4

descrito nos materiais e métodos. O modo de aquisição por (-) ESI-MS do álcool (**21**) mostrou que a molécula desprotonada apresentou m/z 167. A segunda banda do cromatograma, com tempo de retenção de aproximadamente 16,3 min, FIGURA 4.24, também foi aprisionada em cartuchos de SPE e o espectro de RMN ^1H representado abaixo, FIGURA 4.26, que mostrou um conjunto de sinais dentre os quais, na região de hidrogênios aromáticos, há dois dubletos, cada um integrando para um hidrogênio e com padrão de acoplamento *meta* ($J = 2$), indicando um anel tetrassubstituído.

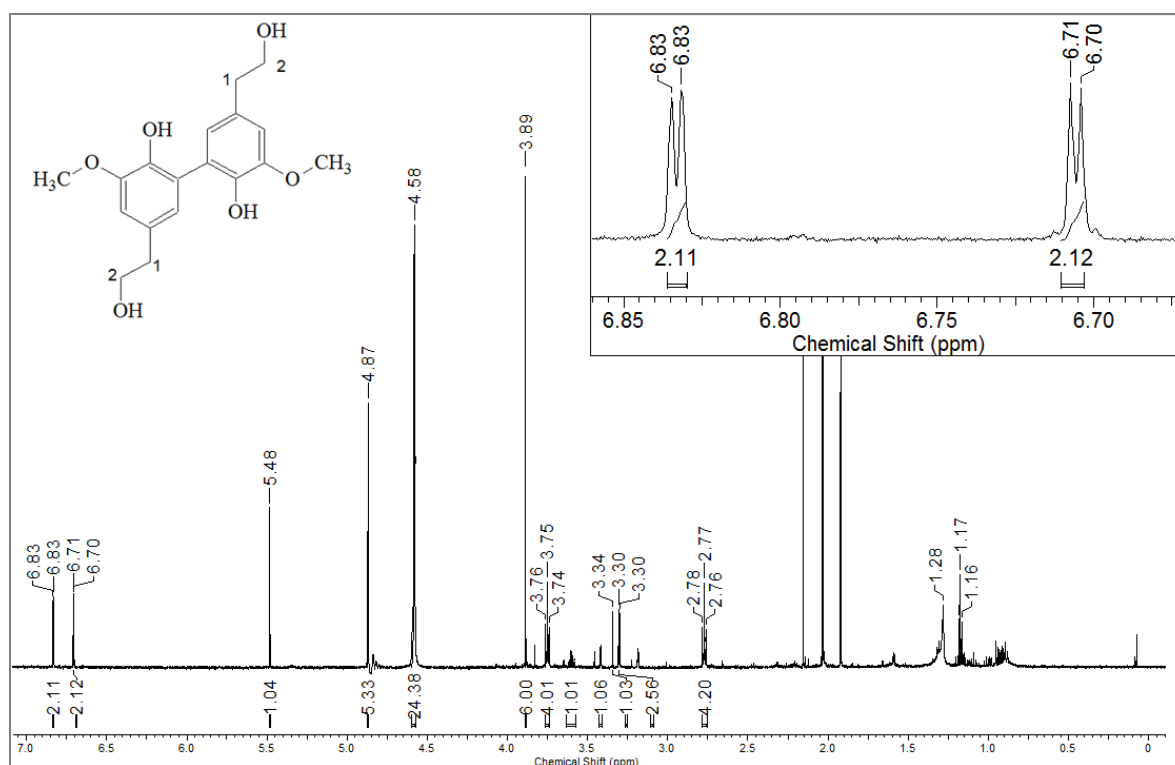


FIGURA 4.26 – Espectro de RMN ^1H (600 MHz) em MeOH-d₄ (B) do segundo sinal do cromatograma com o tempo de retenção em torno de 16,3 minutos.

A ampliação do espectro de RMN ^1H para as regiões mais blindadas, FIGURA 4.27, mostrou a presença de um singlete característico de grupamento metoxila com deslocamento de 3,89 ppm e a integração para seis hidrogênios, ou seja, relação de 1:6 para cada hidrogênio na região de aromático. Também foi possível visualizar dois tripletos em 3,75 e 2,77 ppm com proporção de 1:4 em relação a cada hidrogênio na região de aromático, dessa forma cada triplete integrou para quatro hidrogênios metilênicos. Os dados de RMN de ^1H associados à análise por injeção direta no (-) ESI-

MS conduziu à proposta da estrutura representada na FIGURA 4.26 e FIGURA 4.27, com a MM= 334, já que o íon $[M-H]^-$ teve o valor de m/z 333. Este tipo de composto observado, indicando ser o dímero do álcool (**21**), pode ser formado pela ação de polifenoloxidasas como lacases ou tirosinases, FIGURA 4.27.

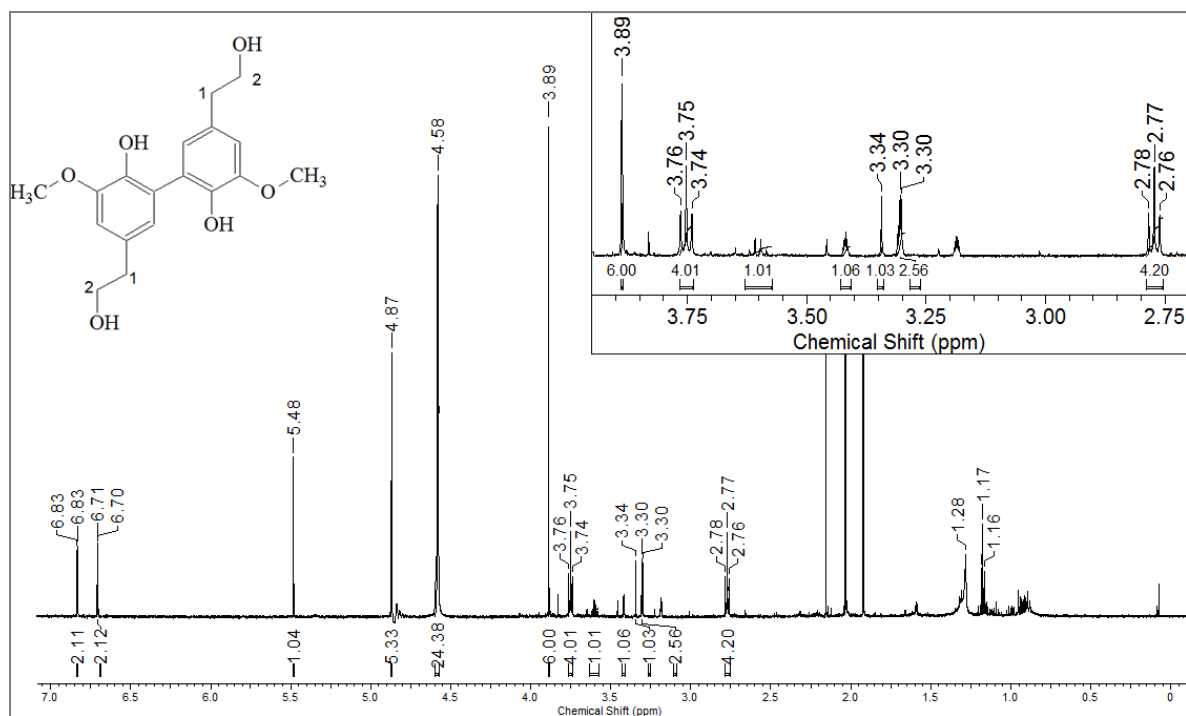


FIGURA 4.27 – Ampliação do espectro de RMN ^1H (600 MHz) em MeOD do segundo sinal do cromatograma com o tempo de retenção em torno de 16,3 minutos.

Muitos produtos naturais são produzidos pelo acoplamento de dois ou mais sistemas fenólicos por meio de reações radiculares (DEWICK, 2009; ALJAWISH *et al*, 2014), como já discutido no capítulo anterior. Dentre as possibilidades de acoplamento oxidativo aromático do álcool (**21**), FIGURA 4.28, poderia ser formado um dos dois isômeros representados a seguir. Entretanto, devido à característica do RMN de ^1H indicando simetria molecular, o mais provável é que o dímero formado tenha sido através de um acoplamento do tipo *orto-orto*, como representado na estrutura (**B**) – (**22**) da FIGURA 4.28.

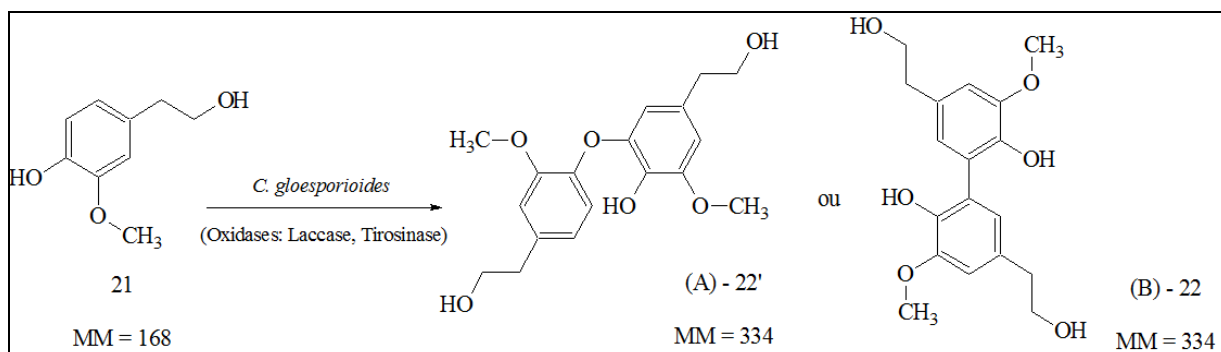


FIGURA 4.28 – O fungo *C.gloesporioides* apresenta polifenoloxidasas como laccases ou tirosinases que promovem reações de acoplamento oxidativo aromático.

Um experimento de íons produtos (MS/MS) foi realizado tanto para o monômero **21** cuja molécula desprotonada tem valor de m/z 167 $[M-H]^-$, como para o seu dímero **22** apresentando o m/z 333 $[M-H]^-$, FIGURA 4.29. No primeiro, o fragmento formado com valor de m/z 93 mostrou ser mais intenso, e para o segundo foi o íon m/z 215, FIGURAS 4.29 e 4.30, respectivamente. Uma análise por SRM (*Slected Reaction Monitoring*) foi realizada utilizando as transições m/z 167 \rightarrow 93 e m/z 333 \rightarrow 215, afim de avaliar a presença desses compostos nas amostras dos dez dias do processo de biotransformação, bem como para o controle, seja da produção de metabólitos do fungo (controle A), quanto para o controle da possível degradação do 6-gingerol (**2**) (controle B), FIGURA 4.31.

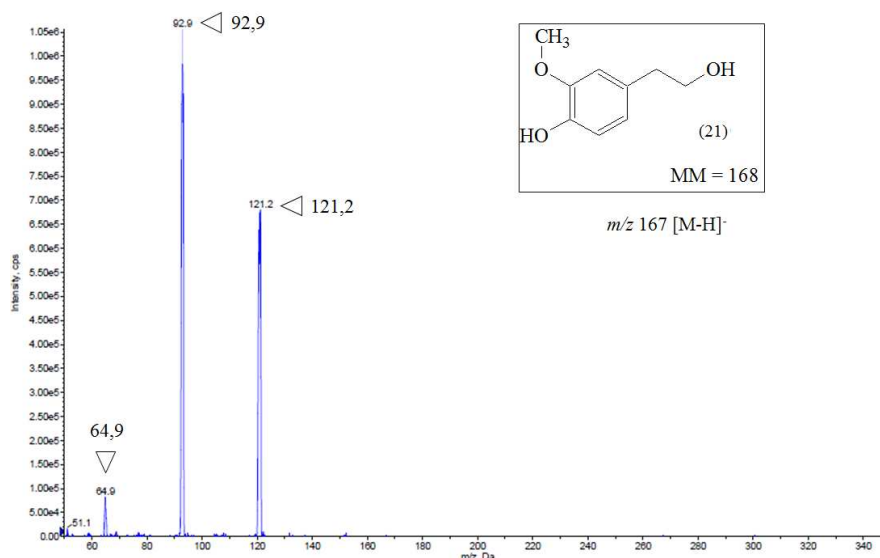


FIGURA 4.29 – Experimento de *íons produtos*, no modo negativo, para o álcool (**21**), o íon m/z 167 $[M-H]^-$ mostrou o fragmento m/z 93 como o mais intenso.

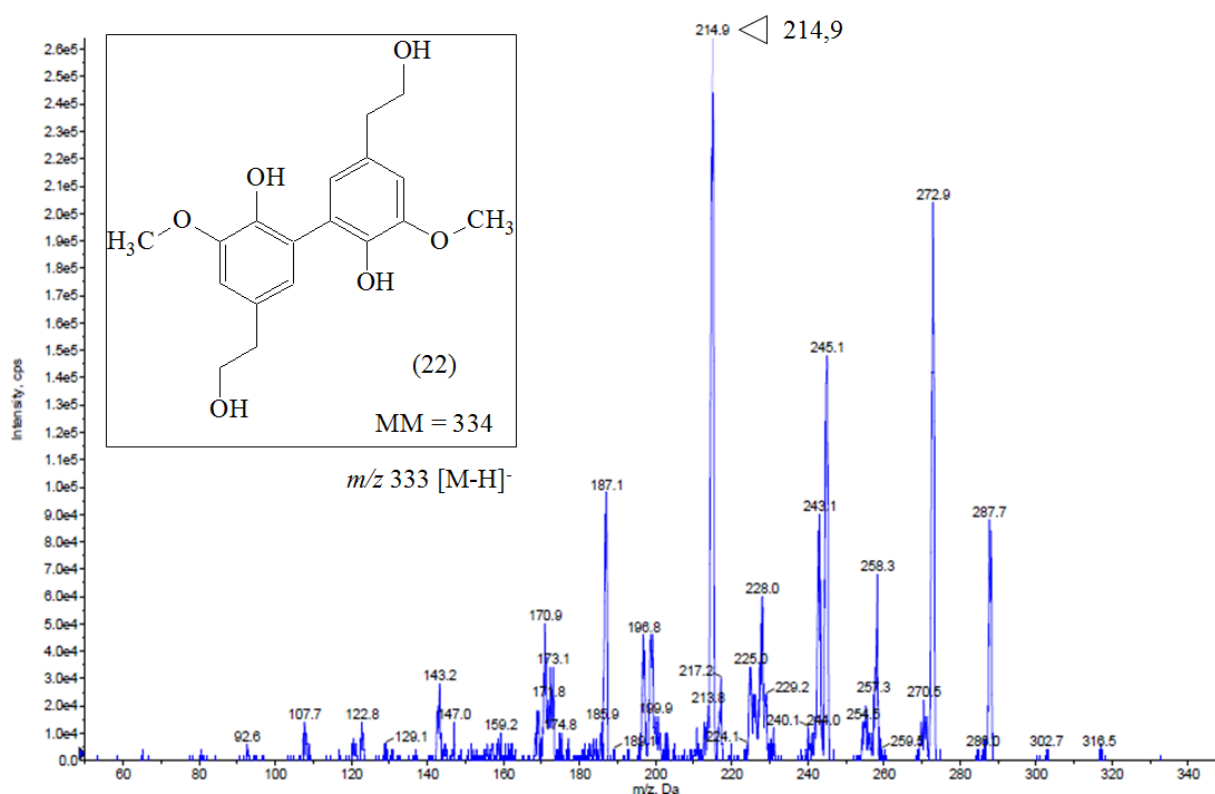


FIGURA 4.30 – Experimento de íons produtos para o m/z 333 $[M-H]^-$ relacionado com o dímero do álcool (21), o fragmento m/z 215 foi o mais intenso.

O experimento de SRM de sete pontos dos dez dias de biotransformação, mostrou que o monômero m/z 167 $[M-H]^-$ (vermelho) está presente em maior intensidade de sinal, em relação ao seu dímero m/z 333 $[M-H]^-$ (azul), nos primeiros dias da biotransformação. Este por sua vez, passa a ter maior intensidade de sinal que o monômero até o décimo dia da biotransformação, FIGURA 4.30. Do experimento de SRM realizado, utilizando as transições m/z 167 \rightarrow 93 e m/z 333 \rightarrow 215 para os controles da produção de metabólitos, o controle A, em sete pontos (1º, 2º, 3º, 5º, 6º e 10º dia) do experimento, não foi observado os sinais característicos. Isso confirma que os dados obtidos se tratam de produtos de transformação química, provavelmente induzida pelas enzimas do fungo *Colletotrichum gloeosporioides*.

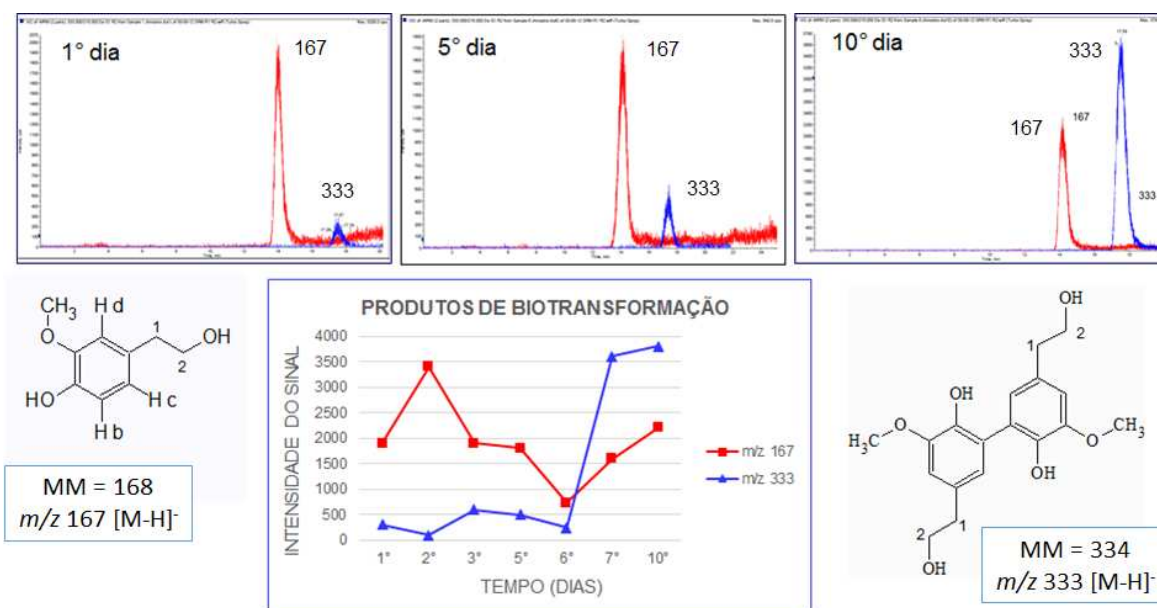


FIGURA 4.31 – Análise por SRM das transições m/z 167 \rightarrow 93 e m/z 333 \rightarrow 215 de sete pontos do experimento de biotransformação.

Outro experimento de aquisição realizado, foi o monitoramento de íons selecionados, para abordar a discussão referente aos demais produtos que talvez poderia se formar pela reação de acoplamento oxidativo aromático, como o dímero do próprio 6-gingerol (**2**) (MM= 586). Devido à proximidade do álcool (**21**), cuja molécula desprotonada apresentou o íon m/z 167 $[M-H]^-$, com um metabólito produzido pelo próprio fungo *C. gloesporioides* no meio de cultura B.D. (Batata Dextrose), o tirosol (**23**) (MM= 138), FIGURA 4.31, como descreve o trabalho de BUNGIHAN *et al* 2013, o seu íon selecionado também foi explorado, bem como seu dímero (MM = 274). Outro derivado foi o hidroxitirosol (**24**) (MM= 154) FIGURA 4.32 e o seu dímero (MM = 306,3). Na TABELA 4.2 estão apresentadas as massas moleculares e os possíveis íons selecionados que foram explorados no LC-MS - Triplo Quadrupolo.

TABELA 4.2 – Análise de íons selecionados por ESI-MS Triplo Quadrupolo.

Composto	MM (g/mol)	[M-H] ⁻
6-gingerol (2)	294,0	293
Dímero do 6-gingerol	586,8	586
Cadeia lateral	132,2	131
Álcool (21)	168,2	167
Dímero de (21)	334,4	333
Tirosol (23)	138,2	137
Dímero do tirosol	274,3	273
Hidroxitirosol (24)	154,0	153
Dímero do hidroxitirosol	306,3	305

Essa análise se fez necessária porque poderia haver a possibilidade de o álcool (**21**) [M-H]⁻ = 167, presente nas amostras de biotransformação, ter vindo de um processo de eliciação e o tirosol ser o metabólito convertido neste álcool como mostra a FIGURA 4.32-A). A outra possibilidade é que o fungo realmente utiliza a cadeia lateral do 6-gingerol (**2**) como fonte de carbono promovendo uma Baeyer Villiger seguida de hidrólise para formar o álcool (**21**) que posteriormente sofre o acoplamento oxidativo aromático (FIGURA 4.32-B). Os dados desta análise foram obtidos e processados, entretanto a interferência de contaminantes na coluna devido à sobrecarga de concentração de amostras bem como problemas com o equipamento de LC-MS Triplo Quadrupolo não levou a resultados conclusivos.

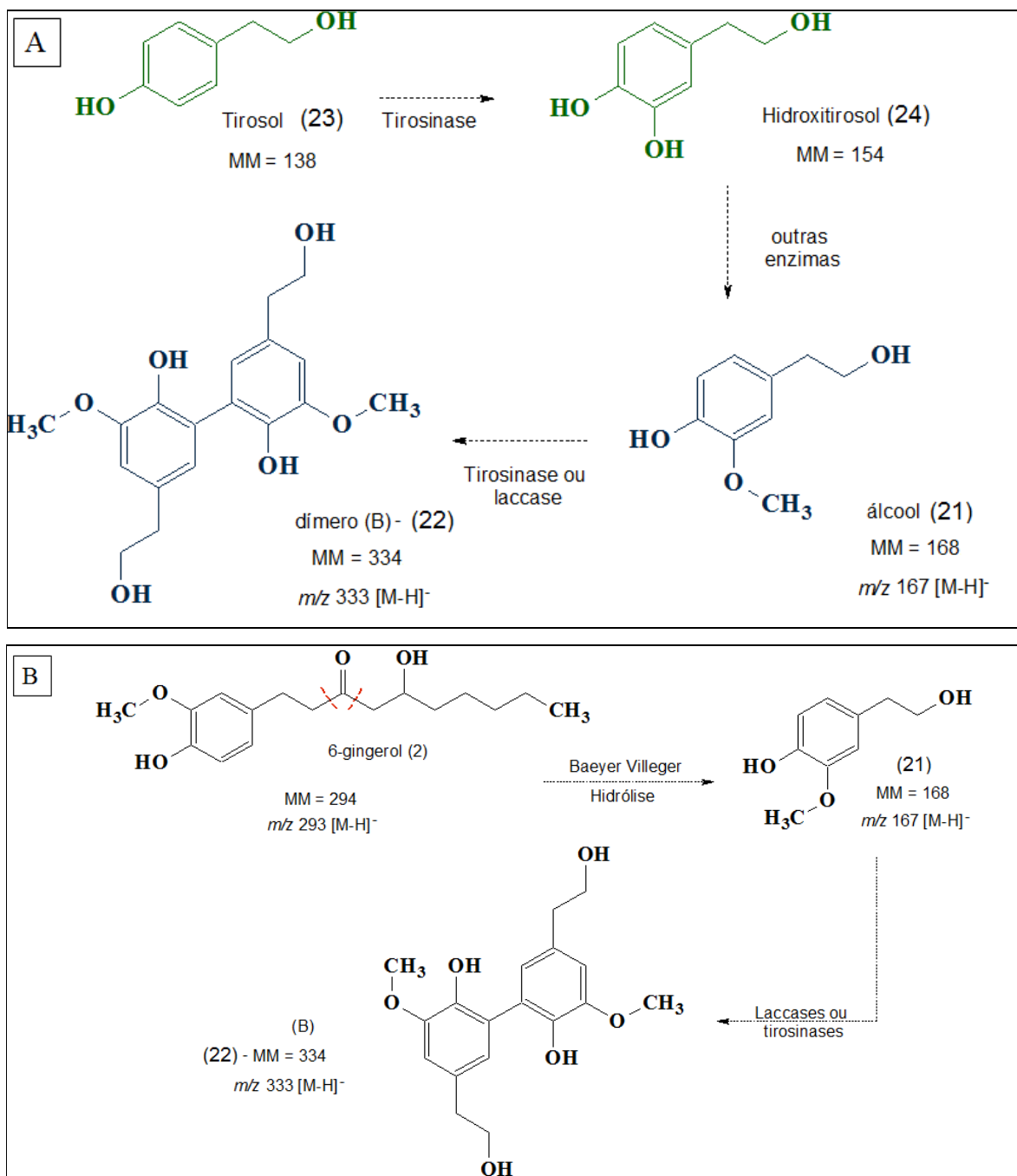


FIGURA 4.32 – Possíveis origens do álcool (21) m/z 167 [M-H]⁻ e do seu dímero m/z 333 [M-H]⁻.

Os experimentos de biotransformação do 6-gingerol (2), foram iniciados com a colaboração da Dra. Mônica Tallarico Pupo, mas a sequência adaptada às condições da incubadora com agitação e controle de temperatura disponível para trabalho no

laboratório de Produtos Naturais (PN) - UFSCar. Essa incubadora possibilita apenas o uso de um número maior de frascos com menor capacidade, sendo de 250 mL em relação àquela incubadora dos experimentos realizados em Ribeirão Preto, que permite o uso de frascos de 500 mL de capacidade, utilizando-se 100 mL de meio de cultura estéril. Os novos experimentos em maior escala se trataram de oito *Erlenmeyers* de 250 mL com 50 mL de meio cada, escolhendo extraí-los todos no décimo dia. O experimento foi feito por duas vezes sendo que aquele cuja massa do extrato acetato de etila já seco foi de 15,0 mg foi chamado de Bio P-23 e com a massa de 14,0 mg, Bio P-24. A análise por HPLC do extrato em acetato de etila apresentou o mesmo perfil do cromatograma nas condições anteriores, em Ribeirão Preto. A tentativa de isolamento por cromatografia em coluna de Bio P-23 mostrou-se ineficiente por causa da presença do ftalato, sendo necessário melhorar o trabalho de separação.

Na verdade, outra forma de análise do experimento de biotransformação do 6-gingerol (**2**) feito em maior escala (Bio P-24) foi realizado. Novamente a técnica de LC-MS foi escolhida com o uso do equipamento com fonte de ionização por *eletronspray* (ESI) e analisador de massas do tipo *Ion Trap*. Utilizou-se uma coluna da Agilent, 5 µm, 150 x 4,6 mm, Eclipse XDB-C18 e outra condição para a corrida cromatográfica sendo a acetonitrila e água, com ácido fórmico a 0,1%, como fase móvel para melhorar a ionização. O método teve início em modo isocrático permanecendo por 5,0 minutos (10% acetonitrila: água), depois gradiente de 20 minutos saindo de 10% até 100% acetonitrila e mais 20 min de acetonitrila 100%, após isso retornou ao condicionamento da coluna por 20 min a 10% acetonitrila: água. A análise por (-) ESI-MS do décimo dia de biotransformação, do experimento Bio-P24, mostrou que os picos se concentraram entre 10 a 17 minutos, FIGURA 4.33-A e B, o que não acontece com os sinais no controle (A) da produção de metabólitos do fungo, 4.33-C, novamente evidenciando a formação de produtos de biocatálise.

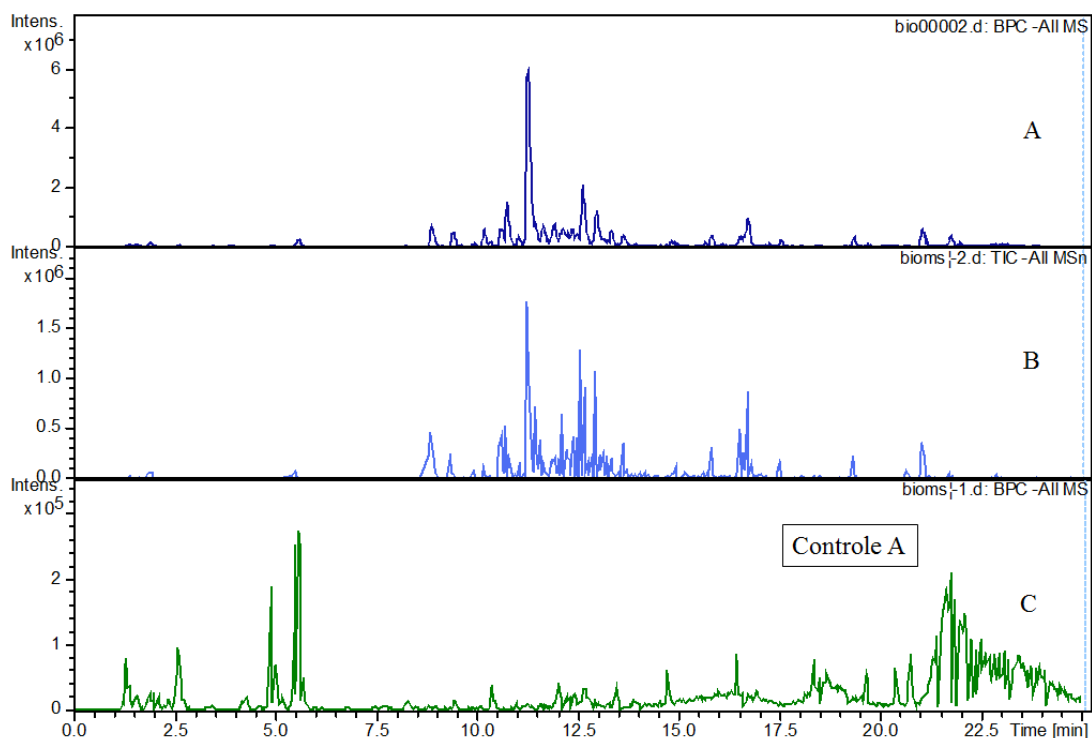


FIGURA 4.33 – Análise por LC-MS *Ion Trap*, em (A) e (B), (-) ESI-MS e (-) ESI-MS/MS do extrato Ac dos produtos de biotransformação; em (C) (-) ESI-MS do extrato Ac do controle Controle A (metabólitos do fungo).

A análise do décimo dia de biotransformação por LC-MS *ion trap* no modo negativo mostrou um pico com o tempo de retenção em 11,2 minutos, FIGURA 4.34, que apresentou o valor de m/z 333 $[M-H]^-$ com um padrão de fragmentação como representado na FIGURA 4.34-B, em que ocorre uma perda de um radical metil (15 Da) formando o íon m/z 318, este por sua vez, pode ser estabilizado por várias estruturas de ressonância, como representado na FIGURA 4.34-C. A perda de um radical $\cdot CH_2OH$ (31 Da) leva a formação do íon m/z 287 como se pode ver na proposta de fragmentação da FIGURA 4.34-C.

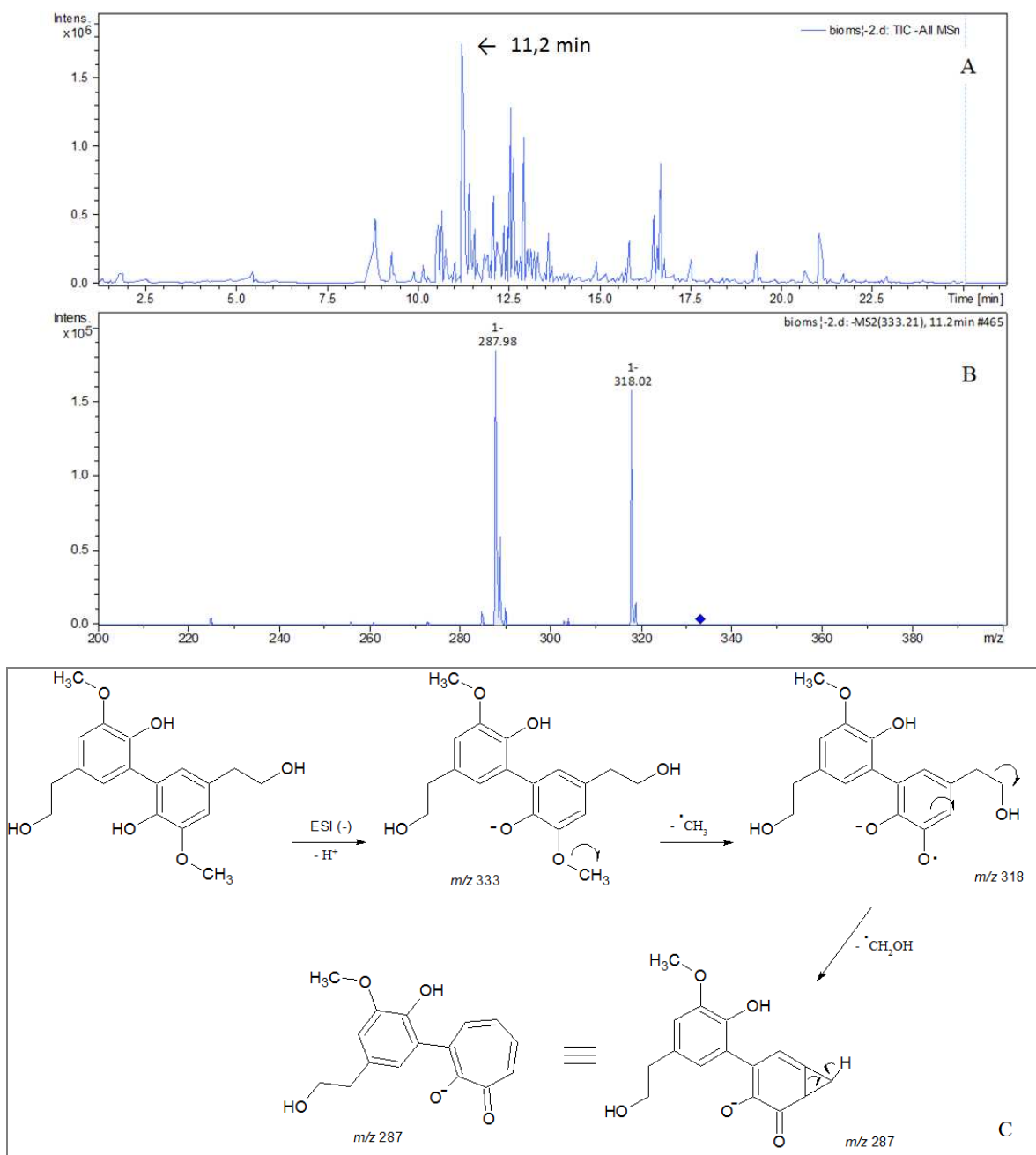


FIGURA 4.34 – Análise por LC-MS *Ion Trap*, ESI-MS/MS no modo negativo do extrato Ac da biotransformação do 6-gingerol mostrando o padrão de fragmentação para m/z 333,21 em 11,2 minutos.

A análise por LC-MS *ion trap* no modo positivo mostrou que o produto de biotransformação majoritário apresentou o valor de m/z 335 $[M+H]^+$ em 11,3 minutos como se pode ver na FIGURA 4.35 e 4.36. O espectro por (+) ESI-MS/MS do íon 335

revelou fragmentos indicando a perda de duas moléculas de água (18 Da) levando aos íons m/z 317 e m/z 299; bem como a perda de duas moléculas de metanol (32 Da) levando aos íons m/z 267 e m/z 234 FIGURA 4.35-C; uma proposta de fragmentação está representada na FIGURA 4.36.

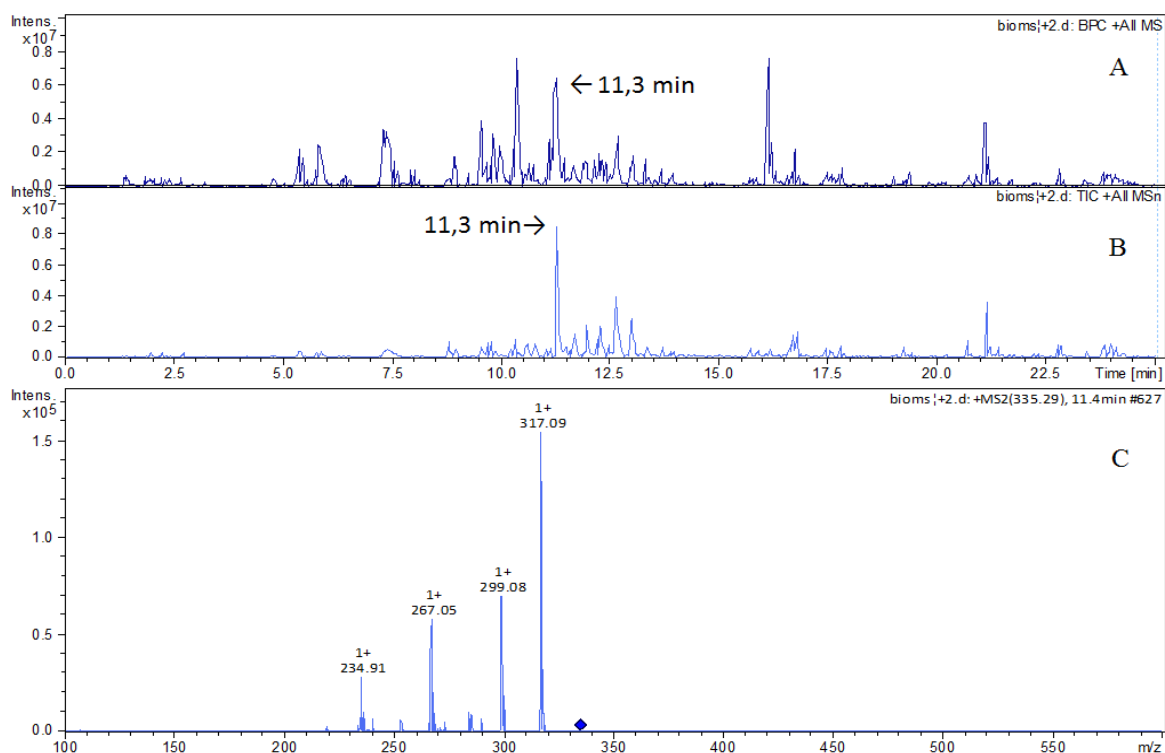


FIGURA 4.35 – Análise por LC-MS, em (A) e (B), (+) ESI-MS e (+) ESI-MS/MS do extrato Ac dos produtos de biotransformação do 6-gingerol no décimo dia de experimento; em (C) espectro de fragmentação MS² do íon m/z 335 $[M+H]^+$,

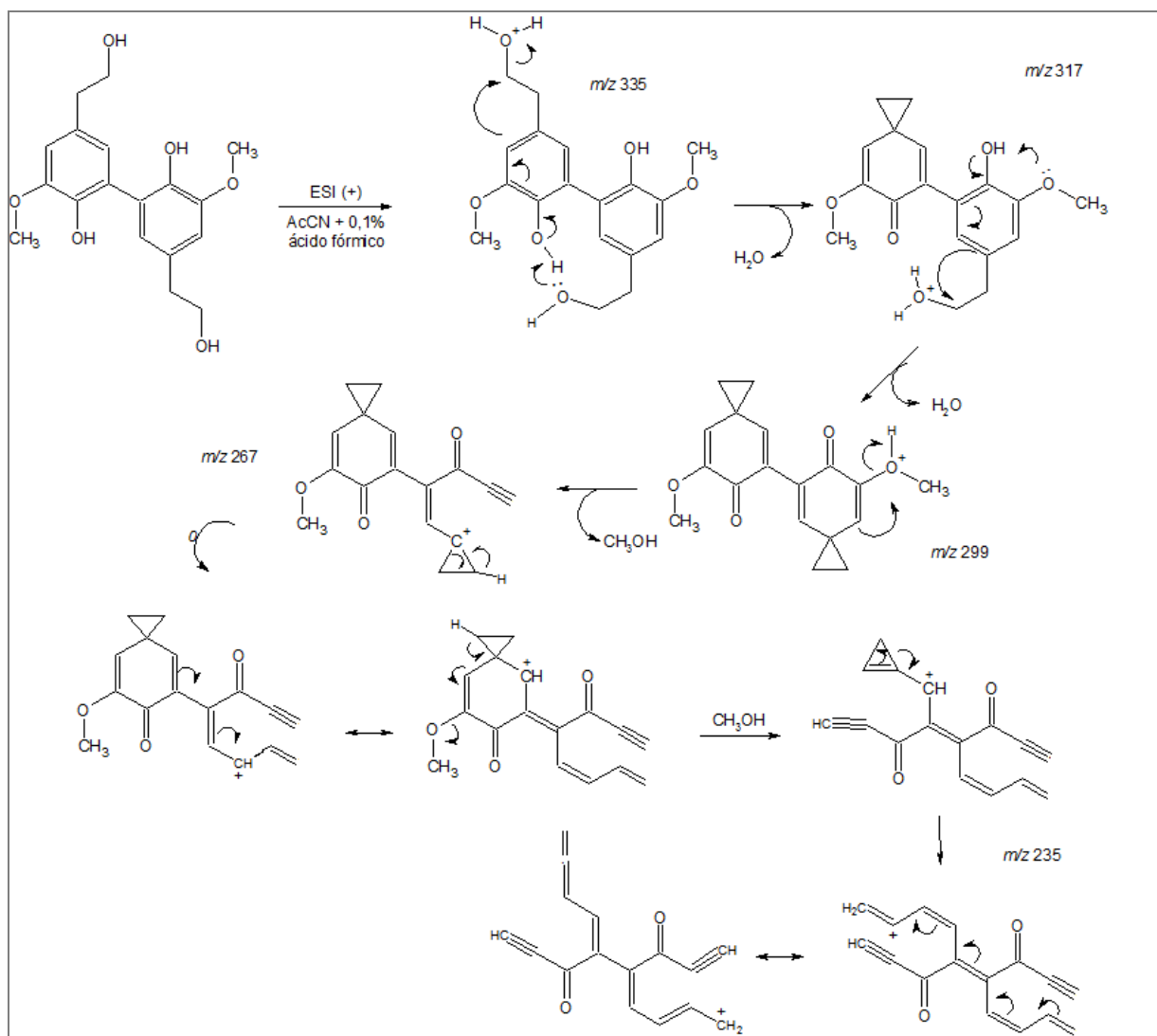


FIGURA 4.36 – Proposta de fragmentação o íon m/z 335 $[M+H]^+$.

Os resultados obtidos pelas técnicas de LC-SPE-NMR e LC-MS triplo quadrupolo ou ion trap confirmaram a formação de produtos de biotransformação pela ação de polifenoloxidasas do fungo *C. gloesporioides*. Entretanto outra forma de melhor interpretar e comprovar a biotransformação do 6-gingerol (**2**), provavelmente através de uma reação Baeyer Villiger seguida de hidrólise para depois haver a atuação de polifenoloxidasas, foi a marcação do 6-gingerol (**2**) com deutério, sendo que o produto desta reação foi confirmado por RMN ^1H e (-) ESI-MS/MS. O caráter ácido dos hidrogênios metilênicos alfa à carbonila (H-4) e (H-2) da molécula de 6-gingerol (**2**) torna possível sua abstração pelo uso de uma base (KOH), que na presença de água deuterada (D_2O) no meio reacional promove a troca dos hidrogênios por deutério

(Esquema reacional – FIGURA 4.37). Da comparação do espectro de RMN de ^1H do produto reacional, FIGURA 4.38, com o espectro de RMN ^1H do 6-gingerol (**2**), FIGURA 4.37, foi possível ver a diminuição da intensidade dos sinais dos hidrogênios em H-2 e H-4 permanecendo o valor da integral para dois hidrogênios em δ_{H} 2,81 provavelmente dos hidrogênios metilênicos em H-1. Os demais sinais permanecem inalterados em deslocamento e valor de integração indicando que não houve a degradação da molécula de 6-gingerol (**2**) e que foi possível obter a marcação dos hidrogênios H-2 e H-4 como foi comprovado pelo estudo de (-) ESI-MS/MS, FIGURA 4.39.

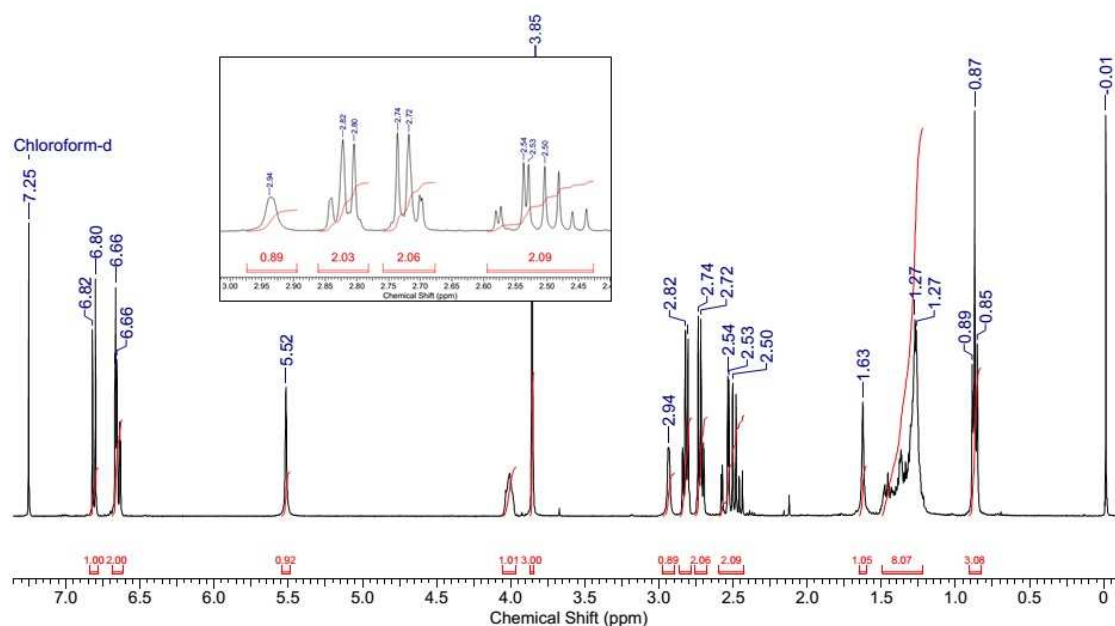
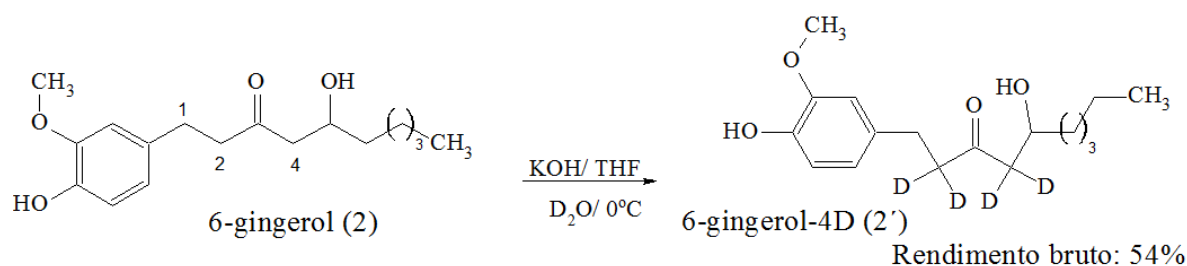


FIGURA 4.37 – Esquema da reação de marcação isotópica do 6-gingerol (**2**) e seu espectro de RMN de ^1H .

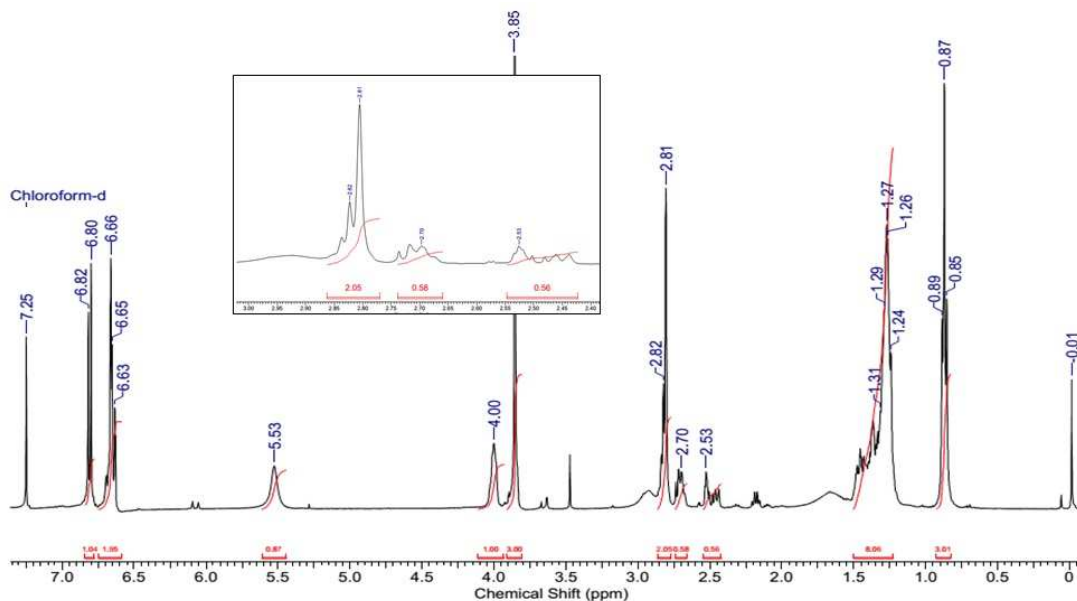


FIGURA 4.38 – Espectro de RMN de ^1H depois da reação de marcação isotópica.

Na FIGURA 4.39, o espectro de massas por inserção direta com o ion trap como analisador de massas e operando no modo negativo para o produto reacional da marcação com deutério do 6-gingerol (**2**) foi possível evidenciar a troca dos hidrogênios H-2 e H-4, já que o valor de m/z $[\text{M}-\text{H}]^-$ varia entre 293 a 297. O sinal com maior intensidade mostrou o m/z 296 $[\text{M}-\text{H}]^-$ referente à molécula do 6-gingerol (**2**) com três hidrogênios deuterados, FIGURA 4.39. O espectro de fragmentação MS^2 a partir do íon precursor m/z 296 mostrou o íon m/z 196 provavelmente devido à perda neutra de hexanal (100U) que resulta a partir da quebra de $\text{C}_4 - \text{C}_5$; o pico m/z 99 foi formado pela quebra dessa mesma ligação $\text{C}_4 - \text{C}_5$ com transferência de um átomo de hidrogênio e perda neutra de 196 U (4-4-hidroxi-3-metil-fenil)butan-2-ona, FIGURA 4.36-B. O íon produto m/z 181 indica a perda de um radical metil a partir do íon m/z 196 como se pode ver no espectro de fragmentação MS^3 do íon m/z 196, FIGURA 4.39-C.

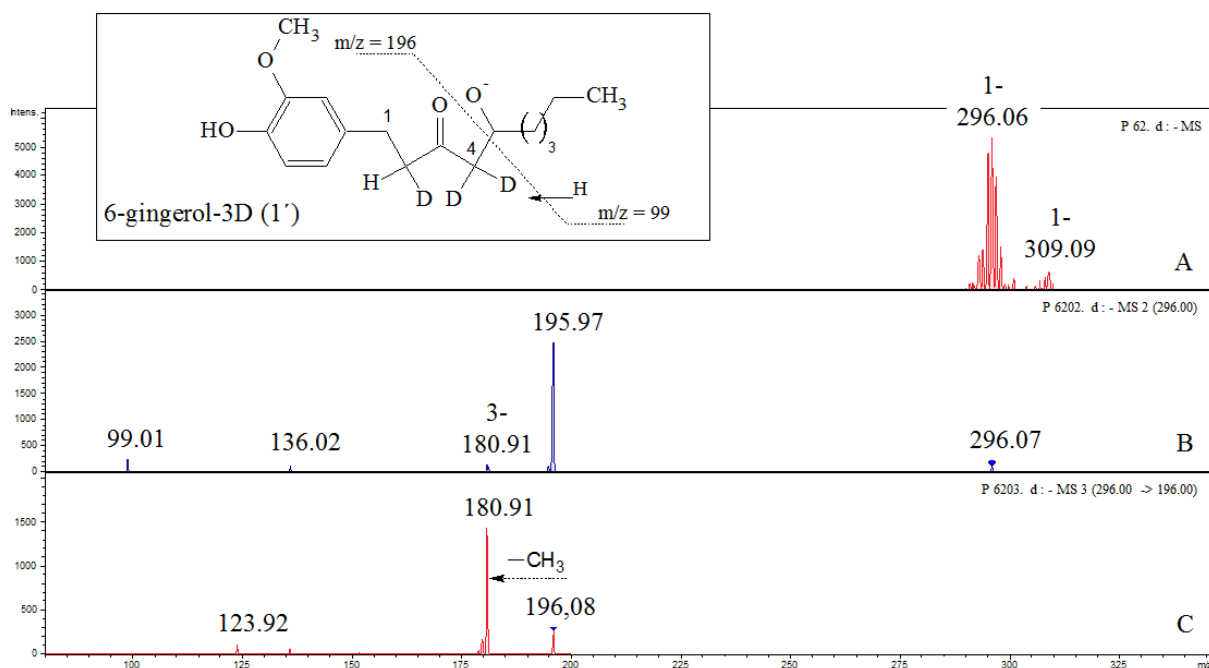


FIGURA 4.39 – Espectro por *inserção direta* do produto da reação de marcação do 6-gingerol com deutério (A), espectro MS² do íon m/z 296 (B), espectro MS³ do íon 196 (C).

O produto reacional marcado com deutério foi fornecido ao fungo *Colletotrichum gloesporioides* a fim de acompanhar a possível formação de produtos de biotransformação isotopicamente marcado, bem como confirmar que o fungo utiliza a cadeia lateral do 6-gingerol (**2**) como fonte de carbono. O processo de biotransformação foi realizado nas mesmas condições já mencionadas, sendo coletado um frasco de 250 mL no décimo dia do experimento sob agitação e temperatura controlada. A análise por (-) ESI-MS e (-) ESI-MS/MS da extração acetato de etila (Ac) do sobrenadante, o meio de cultura, tanto dos produtos de biotransformação em (A), como dos controles de produção dos metabólitos em (C) (controle A), e da possível degradação do 6-gingerol-3D em (D) (controle B), foram comparados como pode-se ver na FIGURA 4.40.

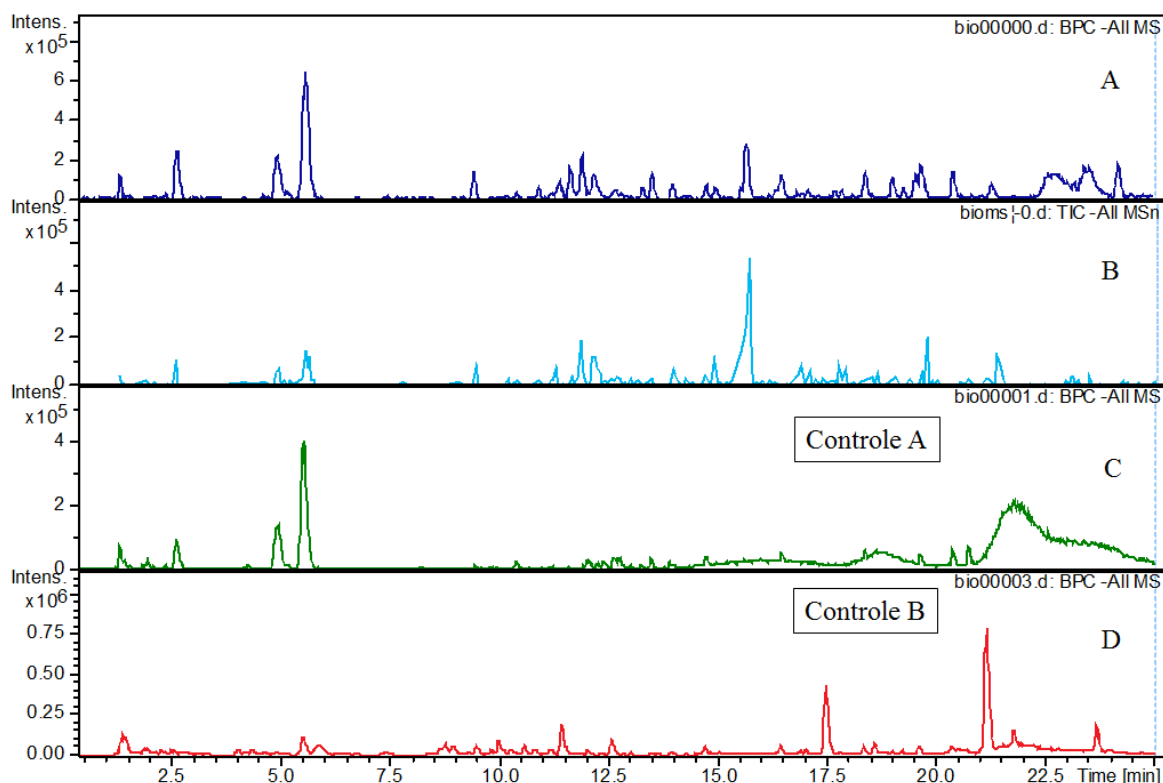


FIGURA 4.40 – Análise por LC-MS *Ion Trap*, em (A) e (B), (-) ESI-MS e (-) ESI-MS/MS do extrato Ac dos produtos de biotransformação; em (C) (-) ESI-MS do extrato Ac do controle Controle A (metabólitos do fungo); em (D) controle da possível degradação do 6gingerol- 3D (ControleB).

Para o controle de degradação do 6-gingerol-3D (**2'**) (controle B), FIGURA 4.40-D, foi possível visualizar um pico em 17,5 min com um valor de m/z 296 $[M-H]^-$, como era de se esperar, e com padrão de fragmentação como mostrado na FIGURA 4.39, indicando que não houve degradação do substrato fornecido ao fungo. A análise por LC-MS *ion trap* no modo positivo também foi realizada para o controle (B) e em (+) ESI-MS o íon protonado do 6-gingerol-3D (**2'**) não foi observado, sendo que o íon m/z 280,17 $[M+H-H_2O]^+$ foi detectado como pico mais abundante, FIGURA 4.41-A e B, devido ao grupo ceto (sítio de protonação) e ao grupo hidroxí (perda de água) na cadeia alquílica (6-gingerol-3D (**2'**)). O íon m/z 280 $[M+H-H_2O]^+$ na FIGURA 4.42-C foi formado pela perda neutra de fragmento alquílica e um rearranjo levando ao íon m/z 179 predominante FIGURA 4.41-B.

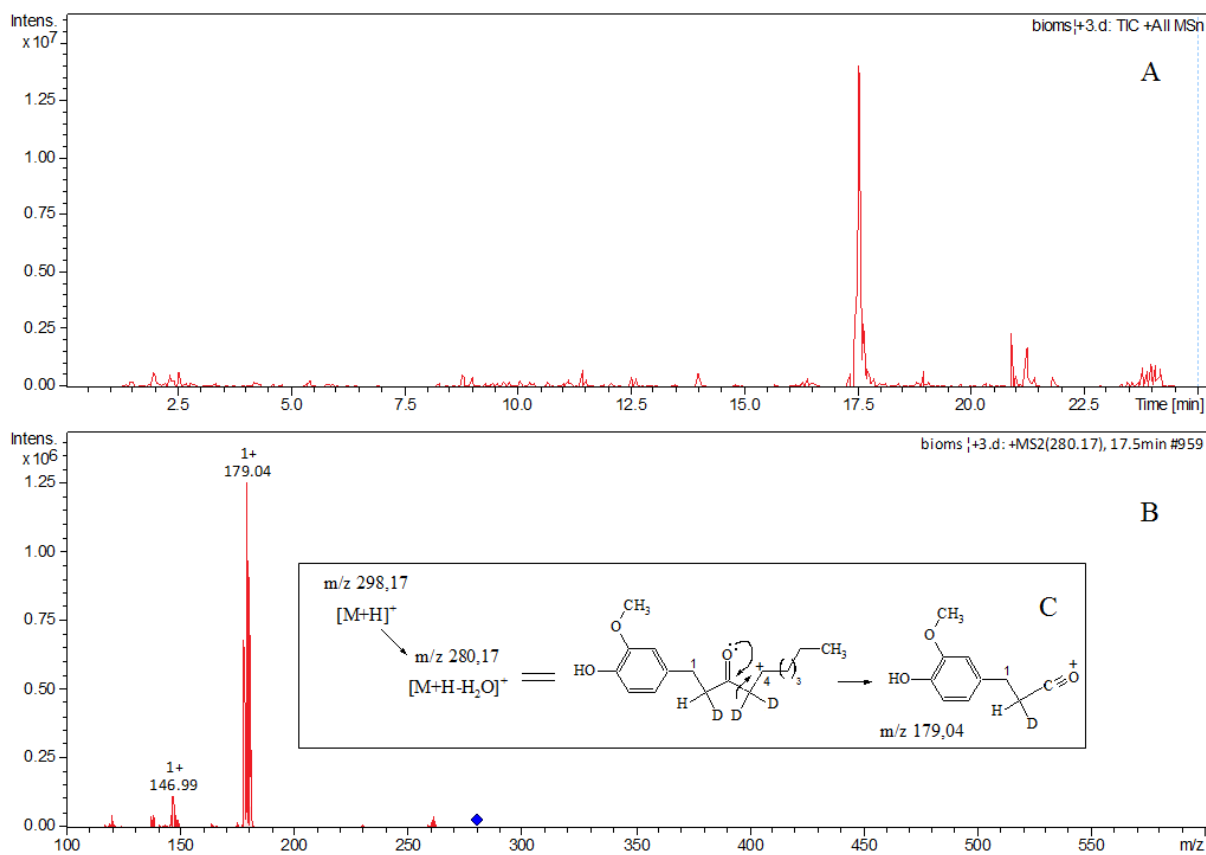


FIGURA 4.41 – Análise por LC-MS *Ion Trap* no modo positivo do 6-gingerol-3D (2') mostrando o pico mais intenso m/z 179,04 (B).

Na FIGURA 4.40-A e B da página anterior, bem como na FIGURA 4.42, os picos que aparecem até 5 minutos provavelmente se referem aos metabólitos produzidos pelo fungo já que também podem ser vistos no controle (A), FIGURA 37-C, página anterior. O pico mais intenso em 15,7 minutos, como se pode ver na FIGURA 4.42-A, está relacionado ao produto de biotransformação majoritário do 6-gingerol-3D (2') visto pelo padrão de fragmentação e valores dos íons m/z , FIGURA 4.42-B.

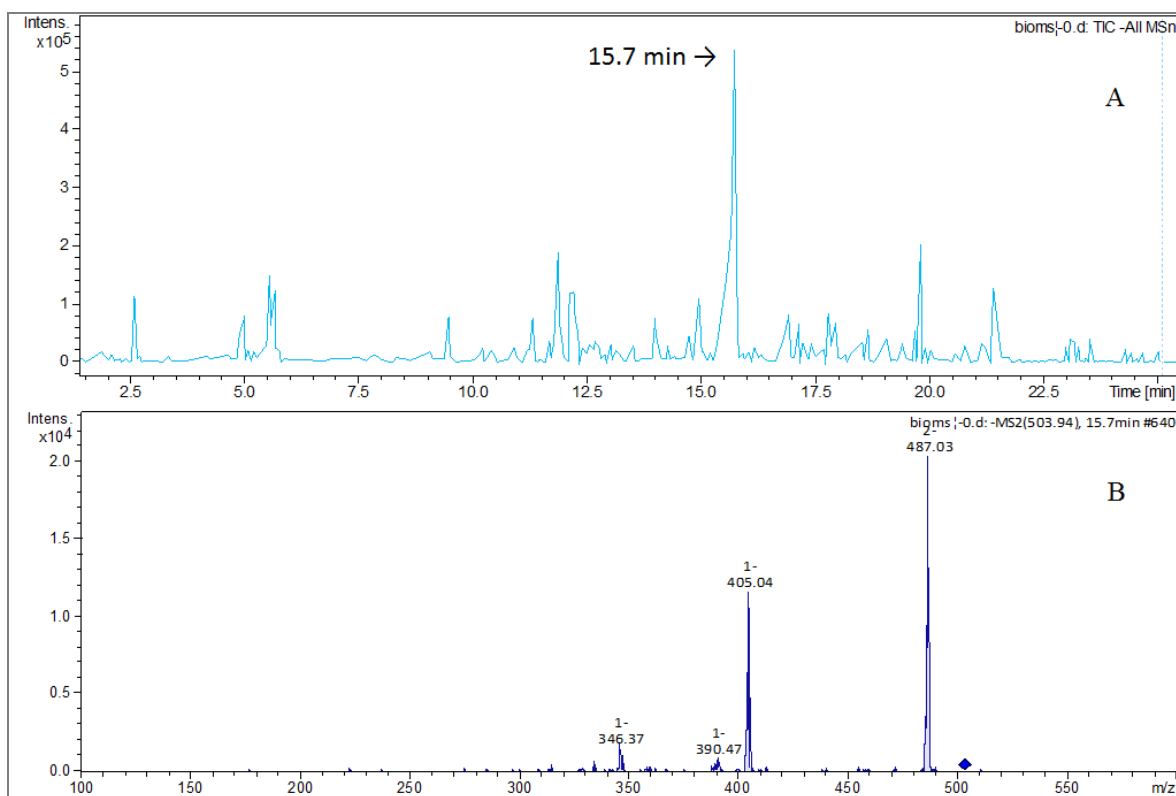


FIGURA 4.42 – Análise por LC-MS, (-) ESI-MS/MS do extrato Ac da biotransformação do 6-gingerol-3D (**2'**) mostrando o padrão de fragmentação para m/z 503 em 15,7 minutos.

Na FIGURA 4.42-B os fragmentos gerados para m/z 503 $[M-H]^-$ provavelmente indica a formação de um trímero a partir do álcool que se forma após o consumo da cadeia lateral do 6-gingerol isotopicamente marcado (**2'**). Na FIGURA 4.43 pode-se ver a provável via de biossíntese para este produto de biotransformação e os resultados obtidos corroboraram para a conclusão de que, há ação de enzimas do fungo *C. gloesporioides* que degradam a molécula de 6-gingerol (**2**) ou 6-gingerol (3-D) (**2'**) utilizando a cadeia lateral como fonte de carbono. O álcool que é gerado (**18**) ou (**18'**) sofre acoplamento aromático oxidativo formando dímeros e/ou trímeros de acordo com a cinética de reação das enzimas como lacases ou tirosinases.

4.3 – Biotransformação do metil-6-gingerol (3) e 6-shogaol (4) por *Colletotrichum gloesporioides*

4.3.1 – Biotransformação do metil-6-gingerol (3)

O metil-6- gingerol (3) obtido por derivatização química a partir do 6-gingerol (2), FIGURA 4.44, foi outro substrato fornecido ao fungo *C. gloesporioides*, a fim de avaliar a resposta do *pool* enzimático frente à uma estrutura molecular sem a hidroxila no anel aromático, mas mantendo a cadeia lateral que poderia sofrer reação de Baeyer Vileger seguida de hidrólise, como ocorreu com o 6-gingerol (2). Uma vez que o 6-gingerol (2) é um composto fenólico, na presença de carbonato de potássio, utilizado como base fraca, foi possível obter o fenóxido de potássio que reagiu com o iodeto de metila para fornecer o éter metil-6-gingerol (3) correspondente, com aproximadamente 80% rendimento, FIGURA 4.44 (KÜRTI e CZAKÓ, 2005).

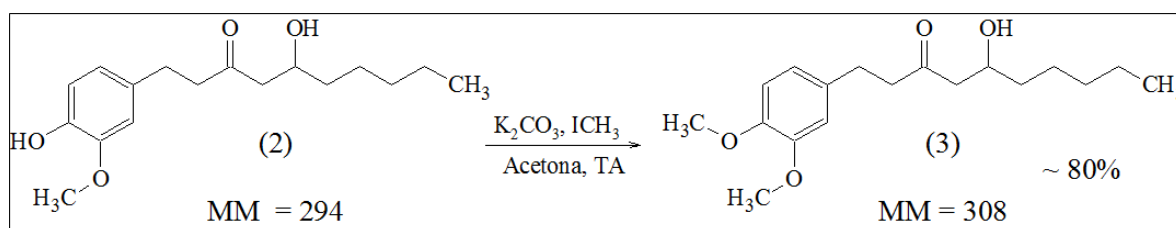


FIGURA 4.44 – Esquema reacional para se obter o derivado metil-6-gingerol (3).

A reação foi acompanhada por cromatografia em camada fina (CCD) e análise por GC-MS até que se observasse o máximo do consumo do material de partida, o produto reacional foi purificado em coluna cromatográfica, utilizando sílica *flash* como fase estacionária, a mistura de hexano: acetato 30% como fase móvel e eluída sob pressão. Na FIGURA 4.45, pode-se ver a análise por GC-MS do produto da reação após purificação em coluna; sabe-se que em compostos relacionados com o gingerol que contém grupos β -hidroxi-cetonas, como ocorre com o metil-6-gingerol (3), há a degradação térmica formando aldeídos alifáticos e metil-zingerona (26), FIGURA 4.45, bem como a desidratação para metil-6-shogaol (27) correspondente sob condições da cromatografia gasosa (JOLAD et al, 2004). Por este motivo, pôde-se ver no espectro do

GC-MS da FIGURA 4.45 a presença de 3 picos, um em 17,8 minutos (A) com valor de m/z 208 $[M]^+$, correspondendo a degradação térmica do metil-6-gingerol (**3**) formando a metil-zingerona (**26**) detectada; outro pico em 27,0 minutos (B) fez referência à desidratação com valor de m/z 290 $[M]^+$; e em 28,0 minutos (C) o pico a m/z 308 $[M]^+$ relacionado com o composto de origem metil-6-gingerol (**3**).

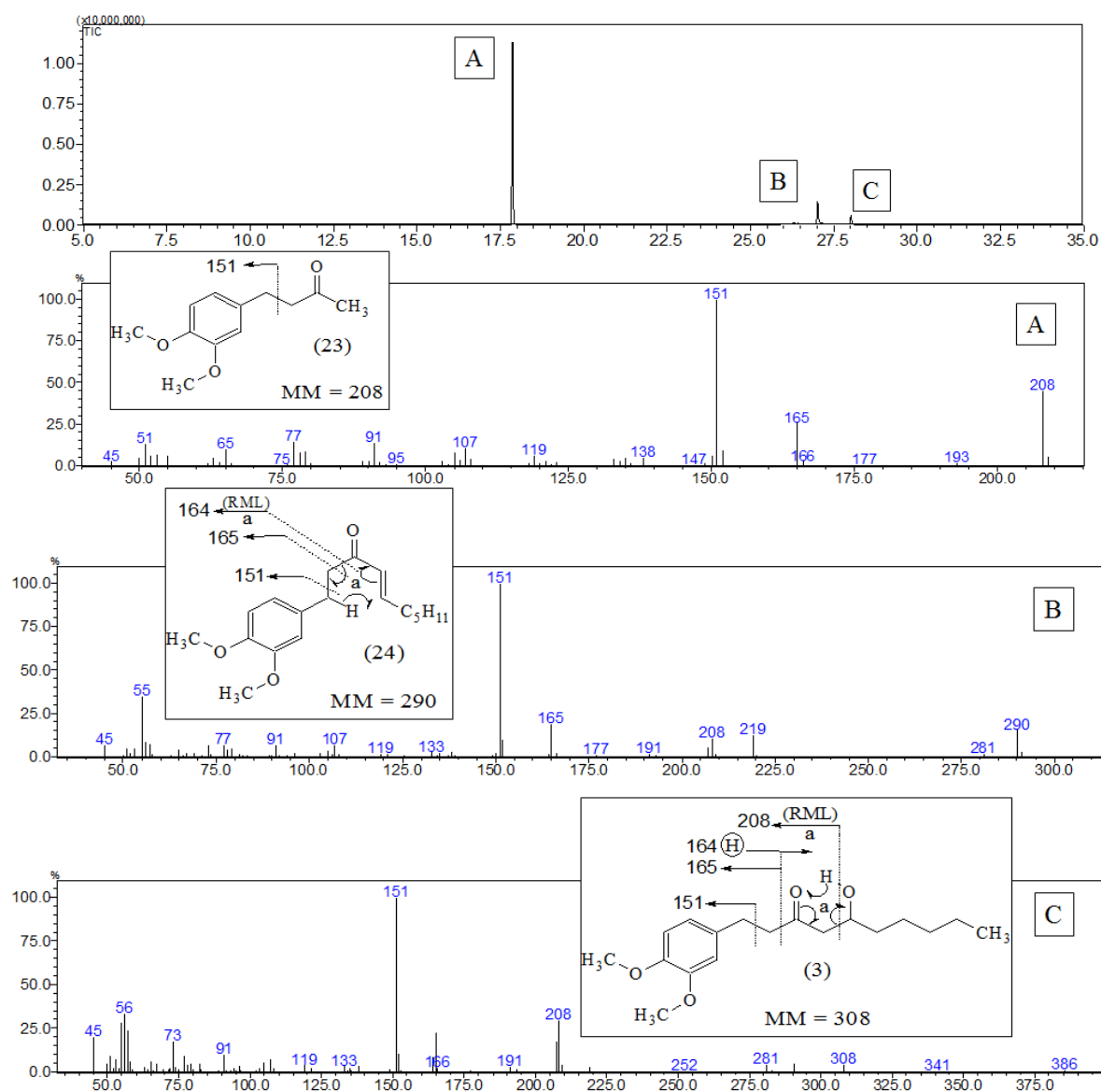


FIGURA 4.45 – Análise por CG-EM do derivado metil-6-gingerol (**3**), em (A) produto da degradação térmica, a metil-zingerona (**26**); em (B) desidratação formando o metil-6-shogaol (**27**); em (C) 4-metil-6-gingerol (**3**). (RML)= Rearranjo de MacLafferty

O espectro de RMN de ^1H do produto reacional, pós purificação em coluna, mostra dois singletos em δ 3,84 e δ 3,82, característicos de grupos metoxilas, cuja integral mostrou ser para seis hidrogênios, indicando a metilação do grupamento hidroxila, FIGURA 4.46. Os demais sinais de hidrogênios ligados a metila, aos grupos metínicos e metilênicos, bem como os sinais de hidrogênios aromáticos, apresentaram grande semelhança seja no deslocamento ou no valor da integral em relação ao espectro de RMN H^1 do 6-gingerol (**2**), FIGURA 4.46.

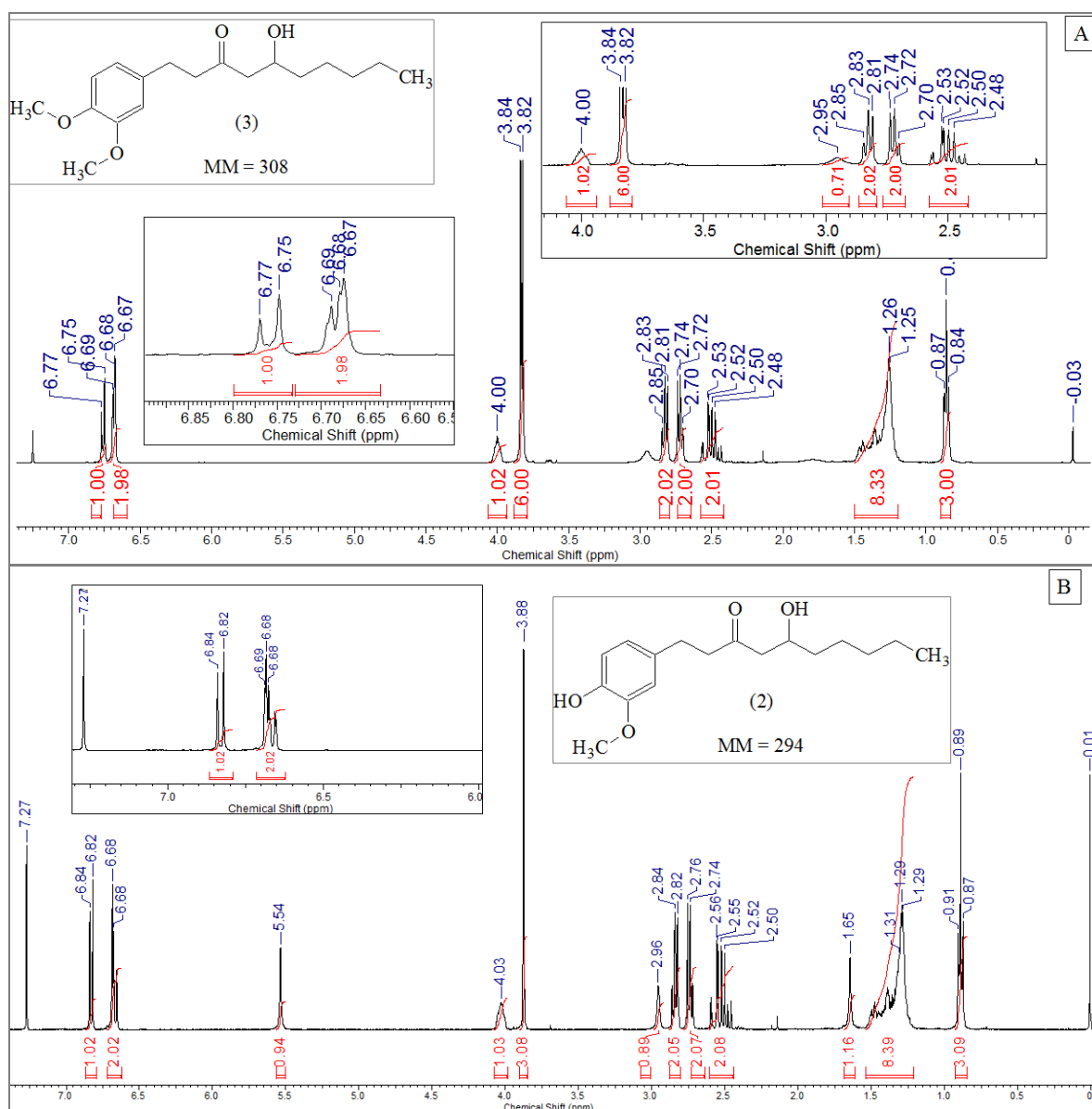


FIGURA 4.46 – Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3) do derivado metil-6-gingerol (**3**) (A) comparado ao espectro do 6-gingerol (**2**), em (B).

O produto da reação para se obter o derivado metil-éter (**3**) foi analisado por LC-MS *ion trap* no modo positivo, sendo que o cromatograma do pico base, do inglês *BPC*, está representado FIGURA 4.47. No estudo por (+) ESI-MS, o íon molecular protonado m/z 309 $[M+H]^+$ para o metil-6-gingerol (**3**) não foi observado, FIGURA 4.47-B, sendo que o íon (A) com m/z 291 $[M+H-H_2O]^+$ foi detectado como pico mais abundante devido ao grupo ceto (sítio de protonação) e ao grupo hidroxí (perda de água) na cadeia alquílica de metil-6-gingerol (**3**) (JIANG et al 2005). Também foi possível visualizar o íon do aduto de sódio de (**3**) m/z 331 $[M+Na]^+$, FIGURA 4.47-B. A fragmentação por (+) ESI-MS/MS, do íon (A) com m/z 291 $[M+H-H_2O]^+$ mostrou a perda neutra do grupamento alquila e um rearranjo que levou a formação de um íon (B) m/z 191 predominante, FIGURA 4.47-C. Também foi possível observar os fragmentos com valor de m/z 176 indicando perda radical de metila a partir do íon m/z 191 (B) bem como a perda de metila e hidreto tendo-se o fragmento m/z 160, como pode-se ver no espectro MS^2 da FIGURA 4.47-C e na proposta de fragmentação da FIGURA 4.48.

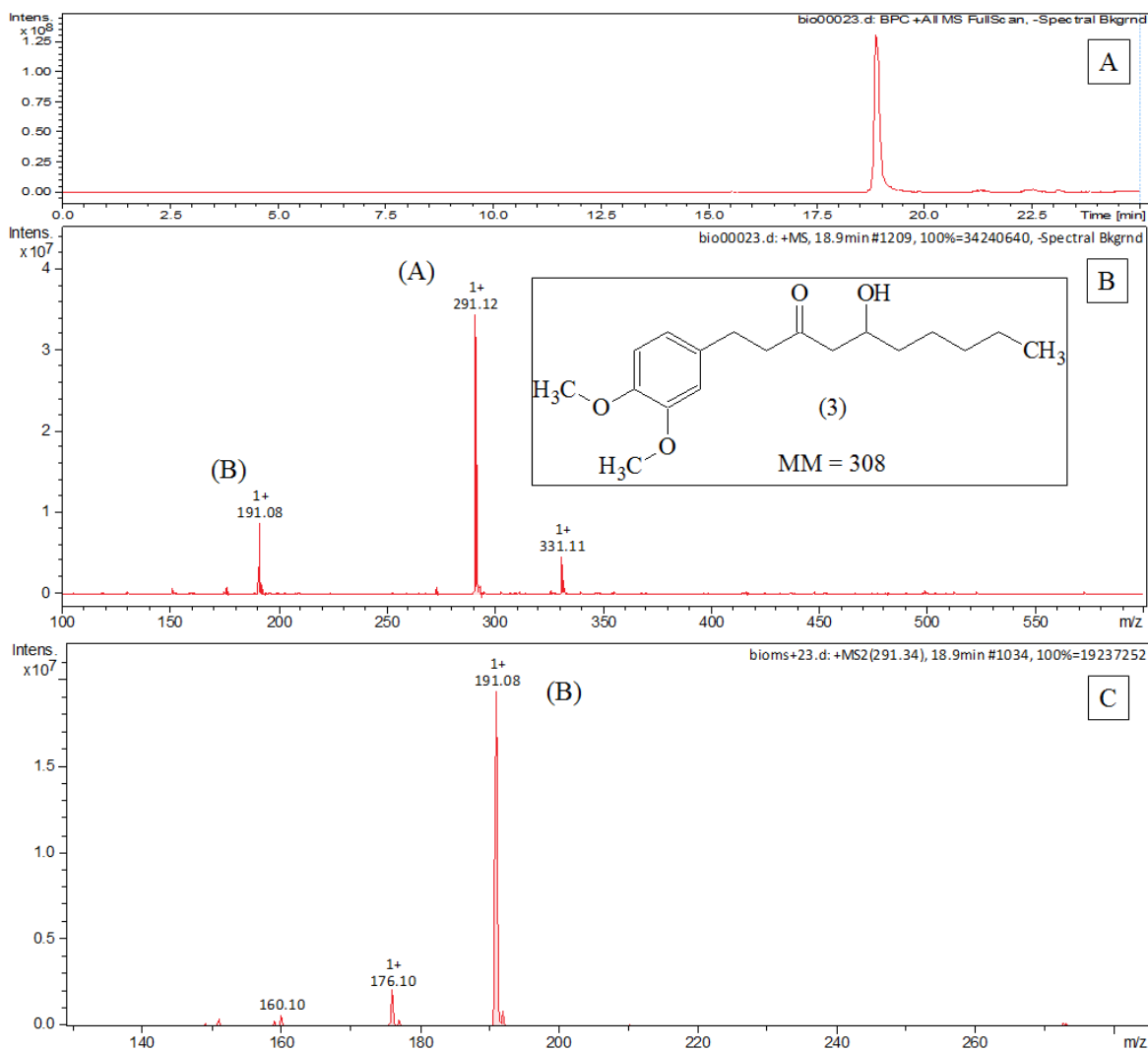


FIGURA 4.47 – Análise por LC-MS: Em (A) Cromatograma do pico base (BPC) no modo positivo, em (B) (+) ESI-MS e em (C) (+) ESI-MS/MS do metil-6-gingerol (3).

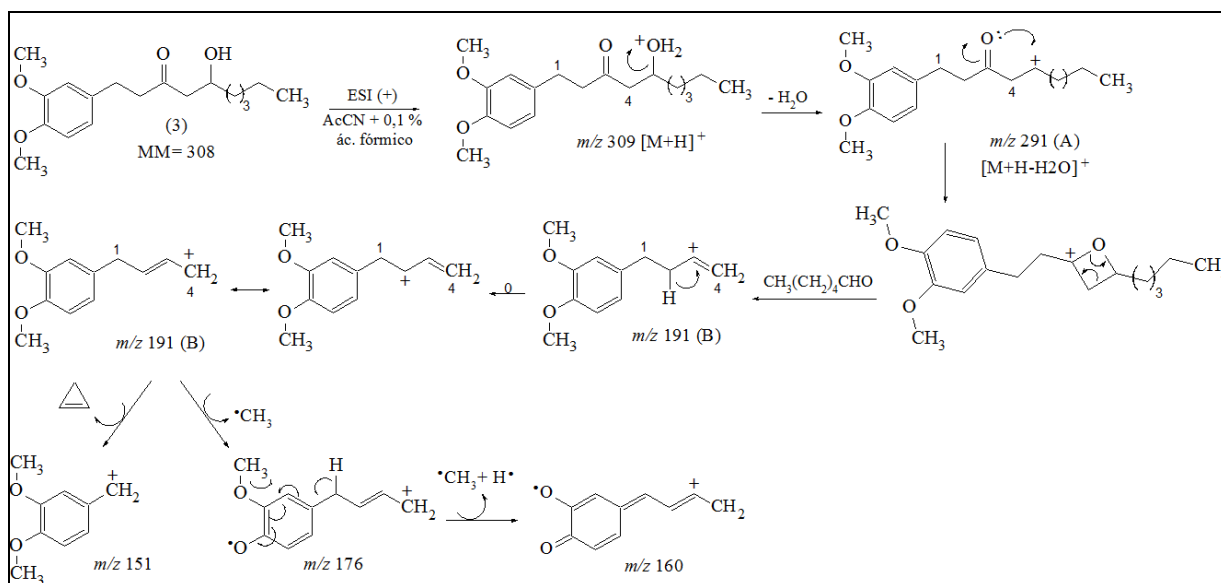


FIGURA 4.48 – Proposta de fragmentação por (+) ESI-MS/MS para o metil-6-gingerol (3).

O composto metil-6-gingerol (3) foi fornecido ao fungo e o extrato acetato de etila (AcOEt) (Ac) do sobrenadante, meio de cultura, do experimento de biotransformação no quinto e décimo dia, foram analisados por HPLC e comparados com o controle (B) de produção de metabólitos e com o padrão de metil-6-gingerol (3). A coluna da Agilent 5 μm , 150 x 4,6 mm, Eclipse XDB-C18 foi utilizada, bem como o gradiente metanol: água, já mencionado nos capítulos anteriores, foi escolhido como fase móvel e o comprimento de onda de 220 nm. Na FIGURA 4.49, pelo perfil cromatográfico, pode-se ver que desde o quinto dia do experimento de biotransformação parecia haver o consumo do metil-6-gingerol (3) cujo tempo de retenção foi de 22,5 min, como mostra o cromatograma em vermelho. Em azul, está o cromatograma dos possíveis produtos de biotransformação e pôde-se ver bandas majoritárias em torno de 5, 12, 13 e 16 minutos. Em verde, trata-se do perfil do cromatograma do controle (B) dos metabólitos produzidos pelo fungo. No décimo dia do experimento, FIGURA 4.49, foi possível ver a banda majoritária em torno de 16 minutos.

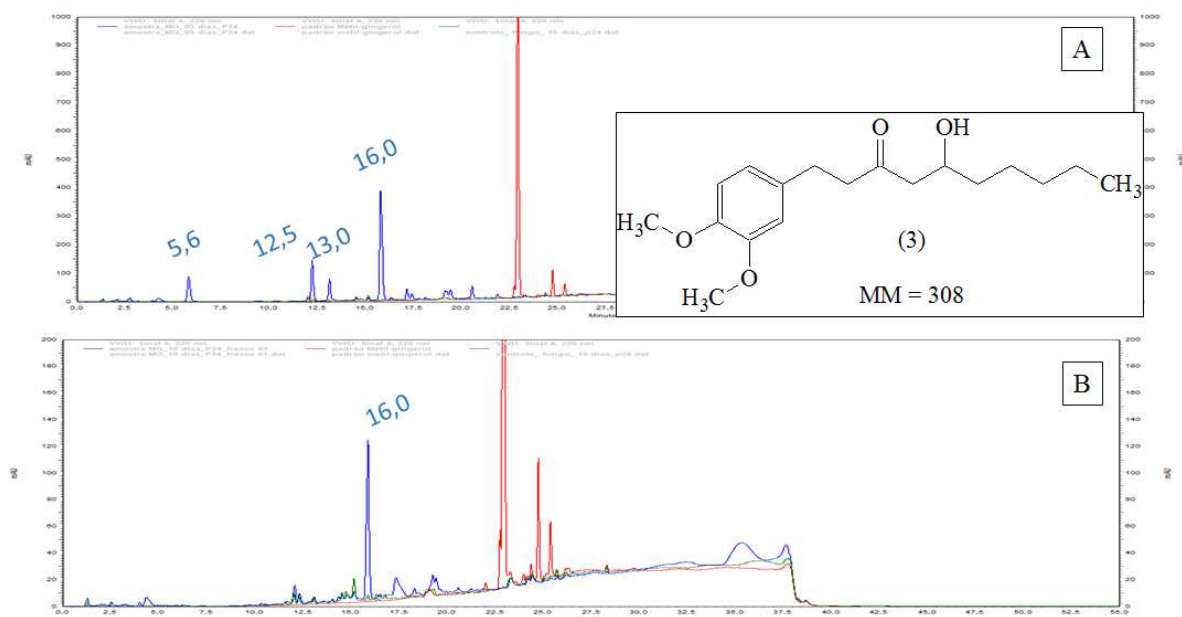
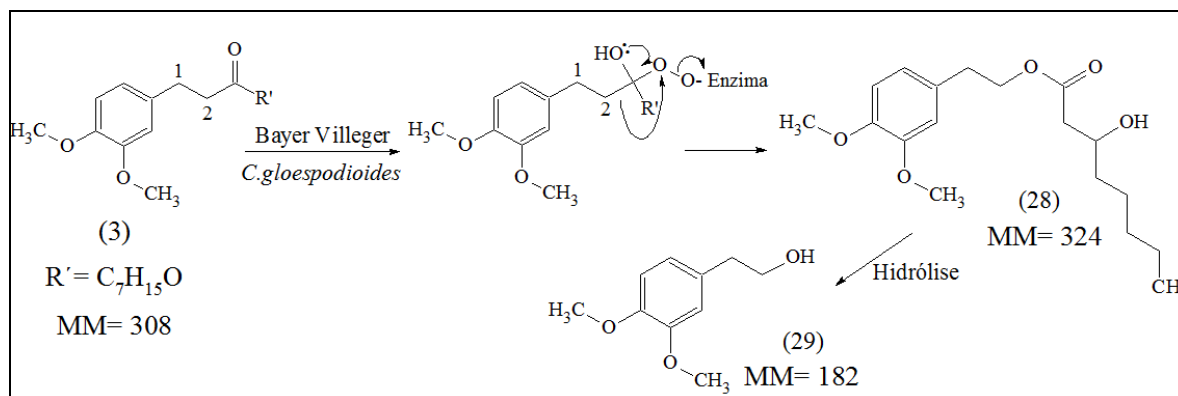


FIGURA 4.49 – Sobreposição dos cromatogramas dos extratos Ac (AcOEt), em azul, experimento de biotransformação do metil-6-gingerol (**3**), em verde, controle (B) e em vermelho padrão da substância (**3**). Em (A) o quinto dia e em (B), décimo dia de biotransformação.

O uso do GC-MS como ferramenta de análise, afim de caracterizar os possíveis produtos de biotransformação, torna-se limitada ao se deparar com a labilidade térmica dos compostos, especialmente do metil-6-gingerol (**3**) empregado como substrato, tornando inclusive difícil acompanhar sua possível degradação no decorrer do experimento. No entanto, a análise do extrato Ac (AcOEt) do quinto dia de biotransformação por GC-MS mostrou dados relevantes. No caso do *pool* enzimático de *C. gloesporioides* metabolizar o derivado metil-éter (**3**), (ESQUEMA 4.2), por reação de Baeyer Vileger, seguida de uma provável hidrólise, como foi comprovado nos experimentos de biotransformação do 6-gingerol (**2**) inclusive marcado isotopicamente, bem como experimentos de LC-RMN e massas de alta resolução, era de se esperar que um dos produtos de biotransformação fosse o éster (**28**) do ESQUEMA 4.2, com peso molecular de 324 Da e/ou a formação do álcool (**29**) com peso molecular de 182 Da se a reação de hidrólise do éster ocorresse, como mostra o ESQUEMA 4.2 (KÜRTI e CZAKÓ, 2005).

ESQUEMA 4.2 – Possível reação de Bayer Villeger seguida de hidrólise promovida por *C.gloesporioides* em metil-6-gingerol (**3**) (KÜRTI e CZAKÓ, 2005).



Na FIGURA 4.50, na análise por GC-MS do extrato Ac (AcOEt) do quinto dia de biotransformação, foi possível visualizar um pico com maior intensidade em torno de 16,0 minutos a m/z 182 $[\text{M}]^+$ e pico base m/z 151, FIGURA 4.50-B, característicos do álcool (**29**) do ESQUEMA 4.2, indicando uma metabolização do metil-6-gingerol (**3**) pela reação de Baeyer Villeger seguida de hidrólise, de acordo com os resultados da biotransformação do 6-gingerol (**2**) pelo *C. gloesporioides*.

Os picos em 17,8 e 27,0 minutos que foram evidenciados na FIGURA 4.50-A, além de terem o mesmo tempo de retenção, também apresentaram, respectivamente, m/z 208 $[\text{M}]^+$ e m/z 290 $[\text{M}]^+$, com pico base m/z 151, mostrando sinais característicos da degradação térmica e desidratação do metil-6-gingerol (**3**) na cromatografia gasosa, provavelmente indicando a sobra do substrato em questão. Em 14,0 minutos o pico a m/z 138 $[\text{M}]^+$ e pico base m/z 107, FIGURA 4.50-A, faz menção ao metabólito tirosol (**23**) produzido pelo fungo *C. gloesporioides* nas condições de trabalho do experimento, utilizando meio BD (batata- dextrose) (BUNGIHAN, M.E. et al., 2013). Na FIGURA 4.51, pode-se ver a análise por GC-MS do padrão de tirosol (**23**) fornecido pela aluna de doutorado Luciana da Silva Amaral para efeito de comparação.

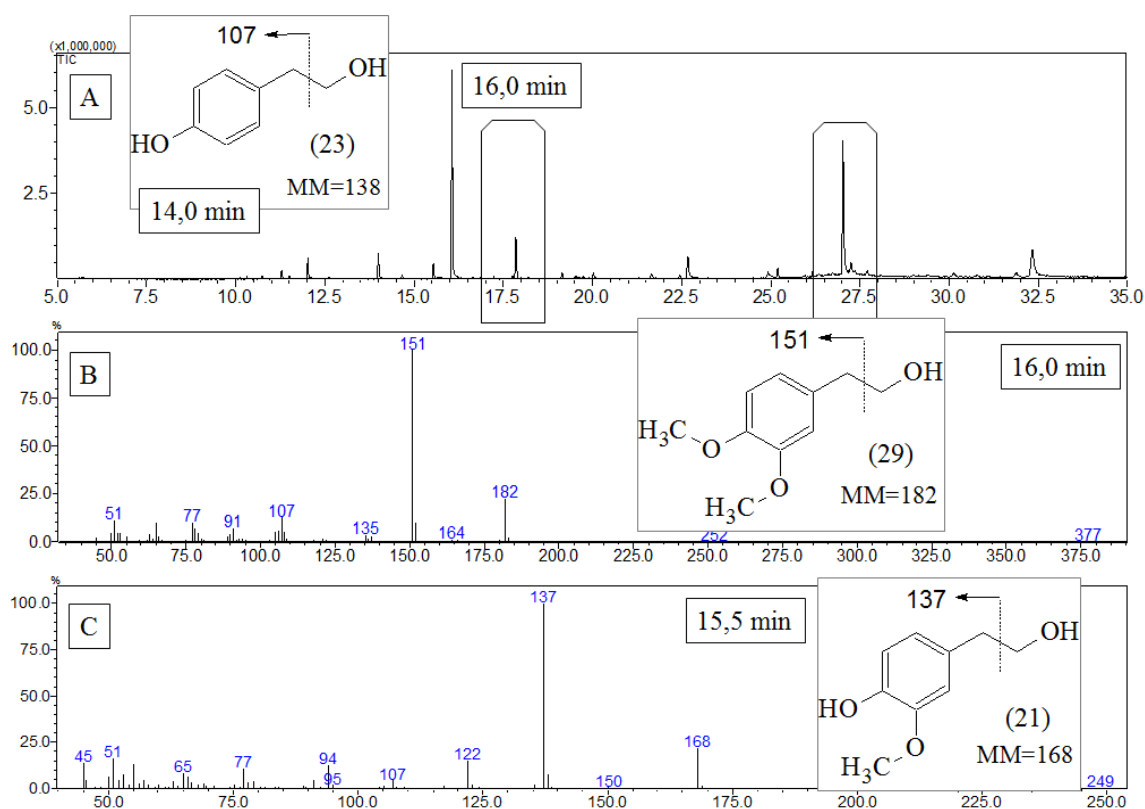


FIGURA 4.50 – Em (A), Análise por CG-EM do extrato Ac (AcOEt) do quinto dia de biotransformação do metil-6-gingerol (**3**). Em (B) e (C) fragmentos dos picos em 16,0 e 15,5 minutos.

No tempo de 15,5 minutos foi possível observar um pico de baixíssima intensidade a m/z 168 $[M]^+$ e pico base m/z 137, que está relacionado com o álcool (**20**) que é formado da reação de Baeyer Vileger seguida de hidrólise que ocorre com o 6-gingerol (**2**). Pela baixa intensidade do sinal, é mais provável que 6-gingerol (**2**) poderia estar presente durante a realização da biotransformação do metil-6-gingerol (**3**), provavelmente pela ineficiência no momento da purificação em coluna cromatográfica do produto da reação para se obter o metil-eter (**3**). Outra explicação possível, pelos resultados posteriormente apresentados, do trabalho da biotransformação de 6-shogaol (**4**), é que álcool (**20**) poderia ser um produto de biotransformação, depois de uma reação de desmetilação do metil-gingerol (**3**), seguida da reação de Bayer Vileger e hidrólise, tendo assim o álcool (**20**).

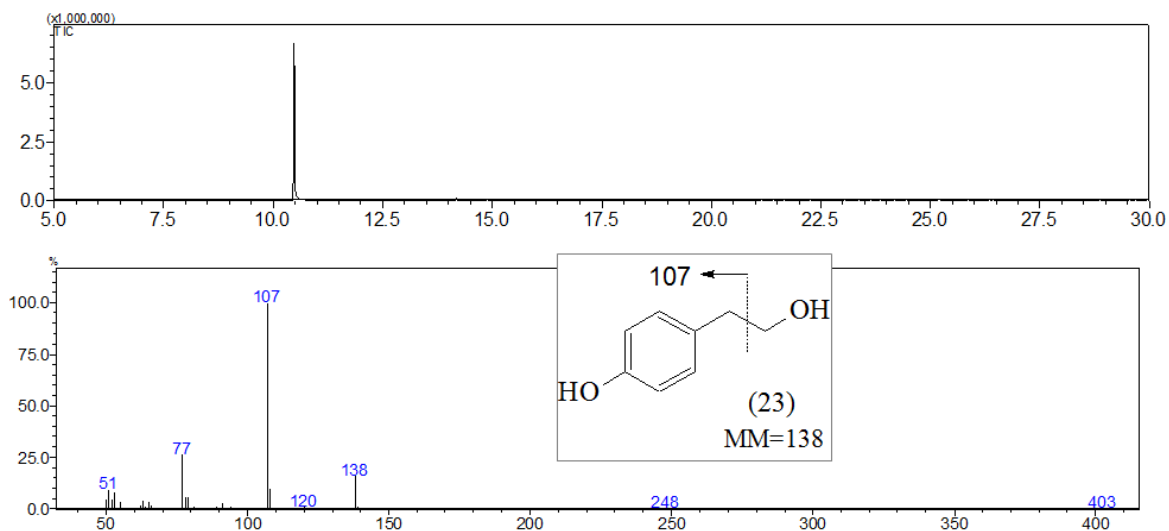


FIGURA 4.51 – Análise por GC-MS do tirosol (**23**), padrão da substância fornecida pela aluna de doutorado Luciana da Silva Amaral.

O espectro de RMN ^1H em CDCl_3 do extrato Ac (AcOEt) contendo a mistura dos produtos de biotransformação do metil-6-gingerol (**3**), também evidencia a provável presença do álcool (**29**) do ESQUEMA 4.2. Ao se comparar com o espectro em MeOH-d_4 do álcool (**20**), FIGURA 4.52-B, que é formado da biotransformação do 6-gingerol (**2**), metabólito que por sua vez foi aprisionado em cartuchos de SPE no sistema de análise por LC-RMN, foi possível observar a presença dos dois tripletos em 3,70 ppm e em 2,72 ppm referente aos grupos metílenos (1) e (2) da estrutura (**20**), FIGURA 4.52-B. Esses sinais também podem ser assinalados no espectro de RMN ^1H da amostra de biotransformação do metil-6-gingerol (**3**) sendo que o COSY deixa bem evidente a forte correlação entre os hidrogênios das posições (1) e (2) da estrutura do álcool (**29**) como pode-se ver na FIGURA 4.53.

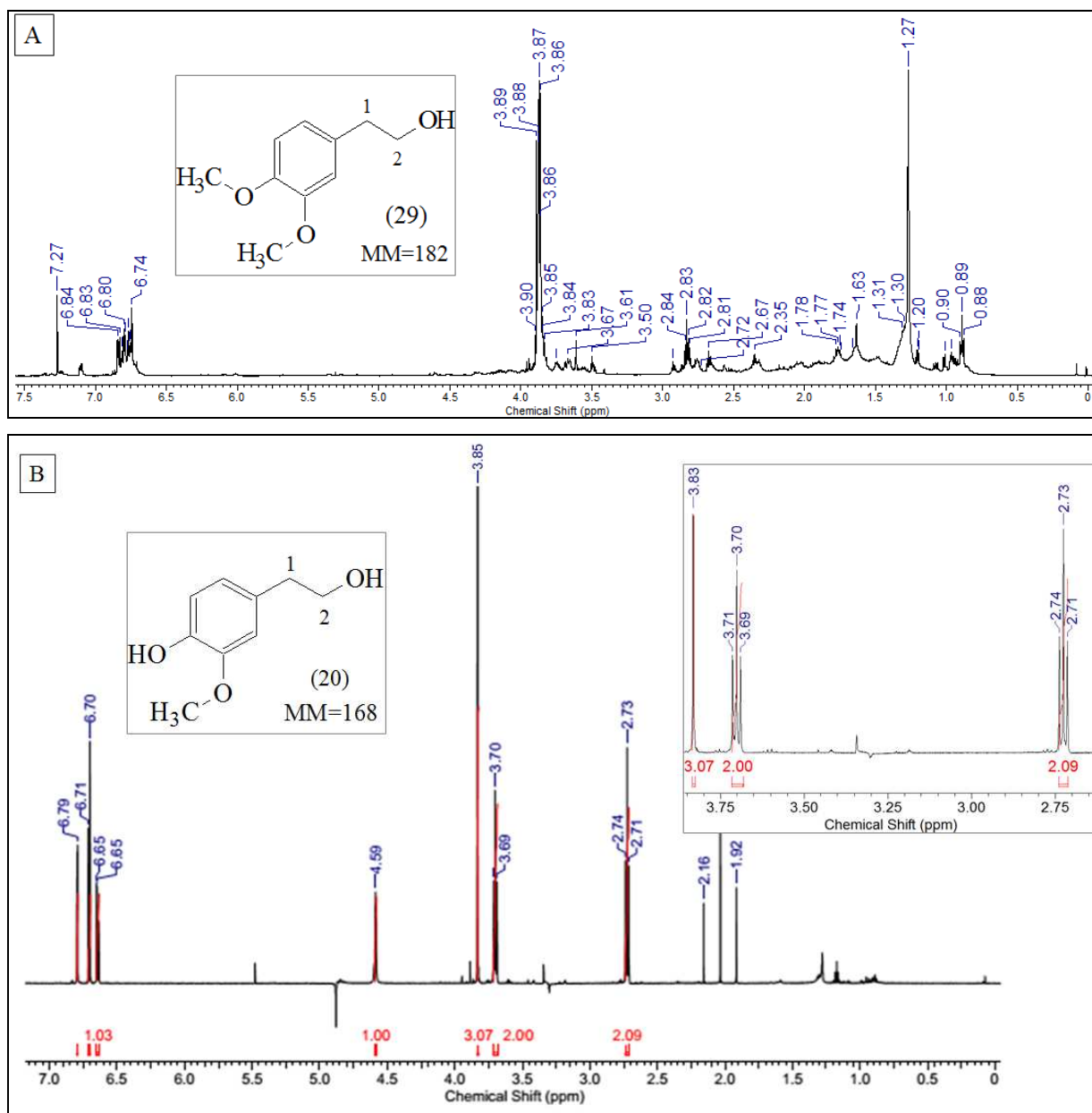


FIGURA 4.52 – Em (A), espectro de RMN ^1H (600 MHz) em CDCl_3 do extrato Ac (AcOEt) do experimento de biotransformação do metil-6-gingerol (**3**), e em (B), espectro em MeOH-d_4 (B) do álcool (**20**).

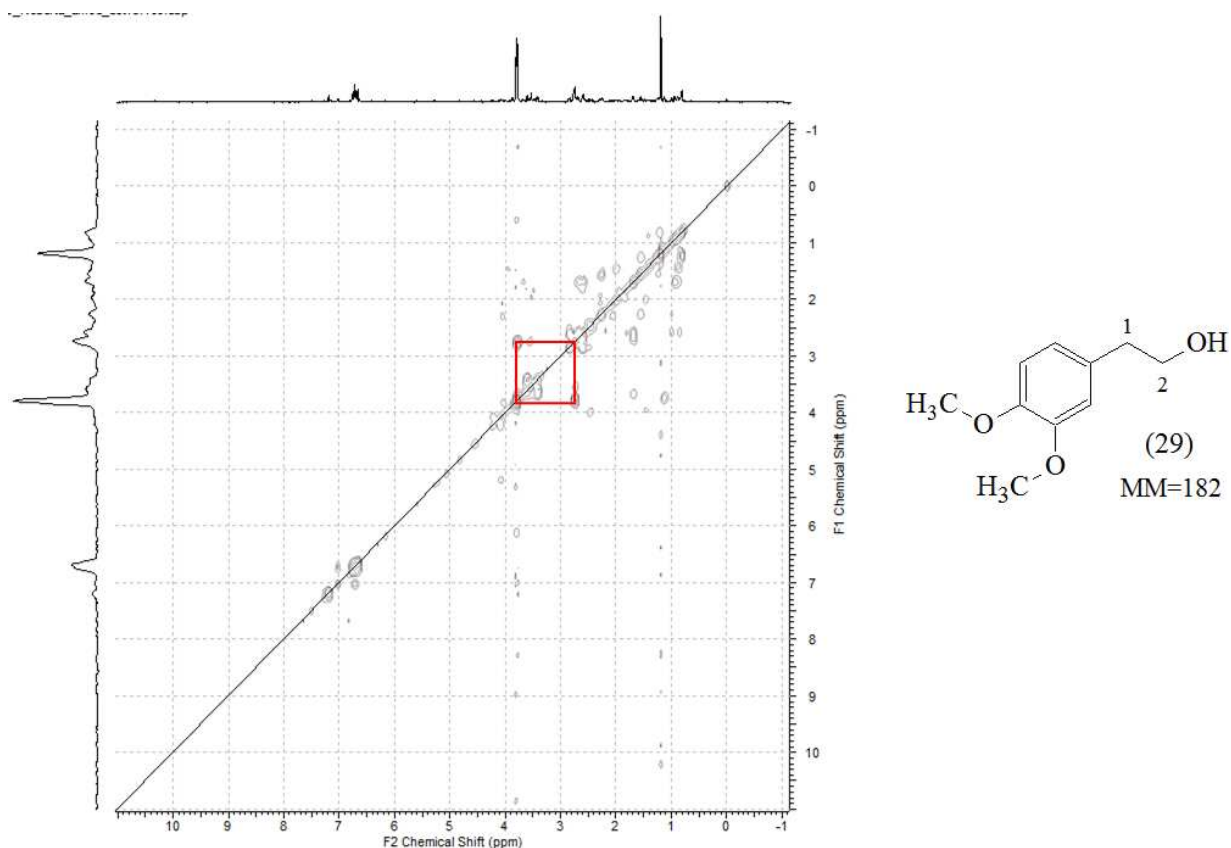


FIGURA 4.53 – Espectro de COSY (CDCl_3 , 600 MHz) do extrato Ac (AcOEt) do experimento de biotransformação do metil-6-gingerol (**3**) evidenciando as correlações dos hidrogênios das posições (1) e (2) do álcool (**29**).

No trabalho de JIANG et al (2005), a identificação de compostos relacionados com o gingerol a partir de extratos brutos do gengibre utilizando a técnica LC/ESI-MS/MS foi alcançada com sucesso, uma vez que tais tipos de compostos que contêm uma cadeia lateral relativamente longa não são facilmente detectados por GC-MS, seja por sua baixa volatilidade ou principalmente pela labilidade térmica. Diante disso, a análise por LC-MS *ion trap*, no modo positivo, do experimento de biotransformação foi realizada, a coluna Agilent, Eclipse XDB-C18 foi utilizada e a acetonitrila e água, com ácido fórmico a 0,1%, como fase móvel para melhorar a ionização. Na FIGURA 4.54 pode-se ver os cromatogramas do pico base (BCP) nas mesmas condições de trabalho tanto para o experimento de biotransformação, no ‘quinto’ e no ‘décimo’ dia, quanto do controle (B) de produção dos metabólitos do fungo no décimo dia, mostrando picos que aparecem apenas no experimento de biotransformação e que não ocorre no controle (B). Devido a

mistura accidental de parte das amostras de biotransformação, o espectro de massas com maior intensidade de picos, sendo aquele que seria o 'quinto' dia de biotransformação, foi escolhido para mostrar os detalhes das fragmentações no estudo por (+) ESI-MS/MS.

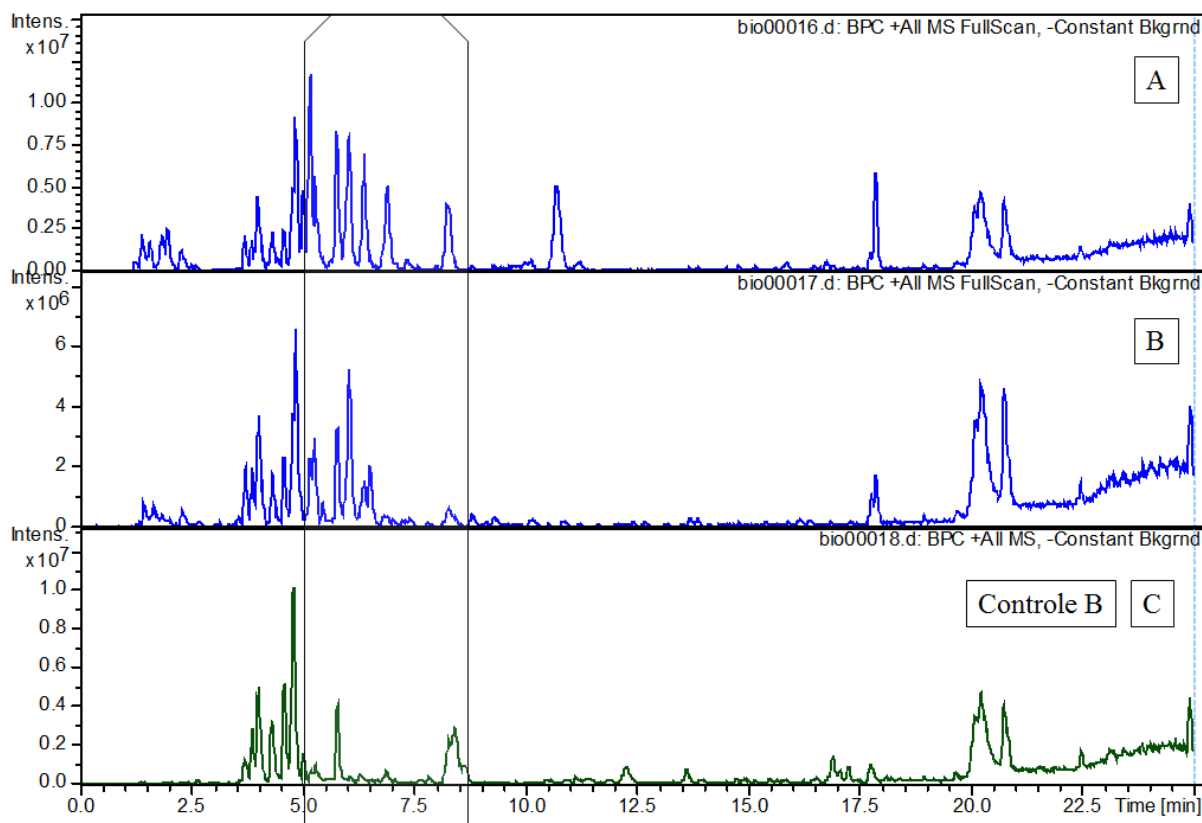


FIGURA 4.54 - Cromatograma do Pico Base (BCP) para as amostras do experimento de biotransformação no 'quinto' (A) e 'décimo' (B) dias, que foram misturadas; em (C) comparação com o controle (B).

Na TABELA 4.2 estão descritos alguns dos valores do íon molecular, bem como seus fragmentos com a abundância relativa, para cada tempo de retenção dos picos em torno de 5 a 7 min que foram evidenciados na FIGURA 4.54 e que foram característicos do processo de biotransformação do metil-6-gingerol (**3**) pelo fungo *C. gloesporioides*.

TABELA 4.2 – Valores de m/z $[M+H]^+$ e de seus fragmentos com abundância relativa para cada pico entre 5 a 7 min

Tempo (min)	m/z $[M+H]^+$	Fragmentos Abundância relativa (%)							
6.4	325	307 (10%)	289 (71%)	-	-	191 (100%)	-	-	133 (6%)
6.3	327	309 (25%)	291 (59%)	273 (20%)	221 (7%)	191 (100%)	-	177 (34%)	151 (11%)
6.0	327	309 (46%)	291 (100%)	273 (48%)	221 (16%)	191 (11%)	-	177 (83%)	151 (19%)
5.9	327	309 (43%)	291 (100%)	273 (26%)	217 (12%)	191 (7%)	189 (3%)	177 (49%)	151 (10%)
5.8	327	309 (77%)	291 (100%)	273 (67%)	217 (28%)	191 (9%)	189 (8%)	177 (30%)	151 (24%)

De acordo com o valor do íon molecular e dos fragmentos formados, é possível afirmar que o fungo *C.gloesporioides* promoveu reações de hidroxilação bem como de redução da carbonila do metil-6-gingerol (**3**) para chegar às estruturas com peso molecular como os exemplos de (**30**) e (**31**) representadas na FIGURA 4.55. O padrão de fragmentação e a estabilidade destes fragmentos pode levar a propostas mais prováveis destes produtos de biotransformação do metil-6-gingerol (**3**), FIGURA 4.55.

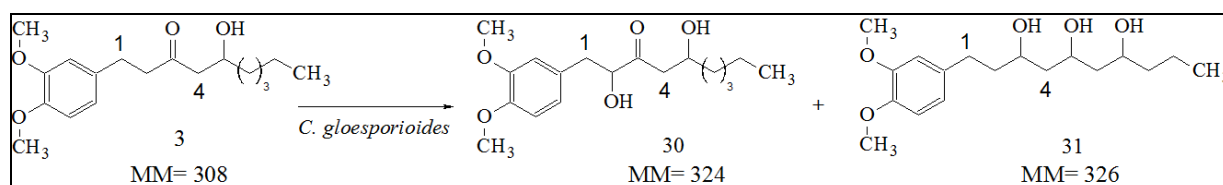


FIGURA 4.55 – Reações de hidroxilação e de redução da carbonila de metil-6-gingerol (**3**) por *C.gloesporioides*.

O espectro MS^2 para o íon m/z 325 $[M+H]^+$ com tempo de retenção de 6,4 min é mostrado na FIGURA 4.56. Com este padrão de fragmentação, o valor do íon molecular 325 Da, provavelmente se refere à adição de grupamento hidroxila alfa à carbonila, na posição do carbono (2) do derivado metil-6-gingerol (**3**), podendo-se ter uma estrutura representada em (**30**) (FIGURA 4.55), o que mostra uma regioseletividade pelo *pool*

enzimático de *C.gloesporioides*; uma proposta de fragmentação para o íon m/z 325 $[M+H]^+$ pode ser vista na FIGURA 4.57.

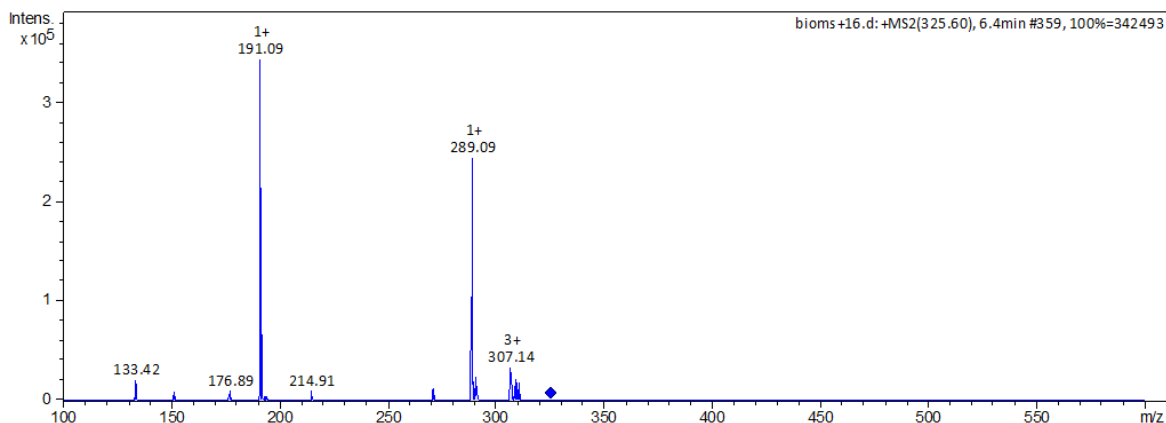


FIGURA 4.56 – Espectro MS^2 para o íon m/z 325 $[M+H]^+$ com tempo de retenção de 6,4 min.

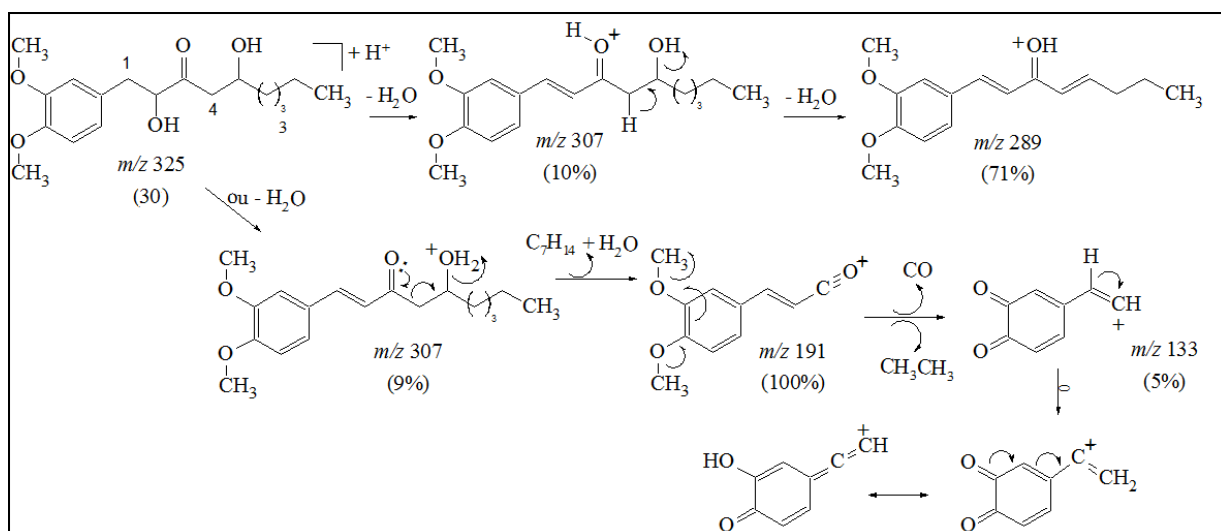


FIGURA 4.57 – Proposta de fragmentação para o íon m/z 325 $[M+H]^+$ com tempo de retenção de 6,4 min.

No cromatograma do pico base (*BCP*) há quatro picos entre 5,8 a 6,3 min com valor de m/z 327 $[M+H]^+$, provavelmente se referindo à adição de hidroxila e de redução da carbonila do composto metil-6-gingerol (**3**) fornecido como substrato para o *C. gloesporioides*, como ocorre no exemplo da estrutura (**31**) da FIGURA 4.55 da página anterior. De acordo com a estabilidade dos fragmentos, como foi listado na TABELA 4.2, é possível afirmar que dentre as diferentes sugestões para a estrutura química que

corresponde o íon m/z 327 $[M+H]^+$ alguma das mais prováveis são mostradas na proposta de fragmentação das FIGURAS 4.58 e 4.59, revelando a região e estereosseletividade do *pool* enzimático de *C. gloesporioides*. A proposta de fragmentação foi dada como pares de diastereoisômeros da mesma estrutura, o que justificaria os tempos de retenção diferentes, mas bem próximos, 6,0 e 6,3 min, como ocorreria para a estrutura **31** representada na FIGURA 4.59, em que a hidroxilação seria na posição do carbono (7) do composto metil-6-gingerol (**3**). Já para os diastereoisômeros formados com a provável adição do grupamento hidroxila na posição do carbono (8) de metil-6-gingerol (**3**), foram relacionados ao tempo de retenção de 5,8 e 5,9 min, de acordo com a proposta de fragmentação mostrada na FIGURA 4.60 justificaria a sugestão da estrutura em **32**.

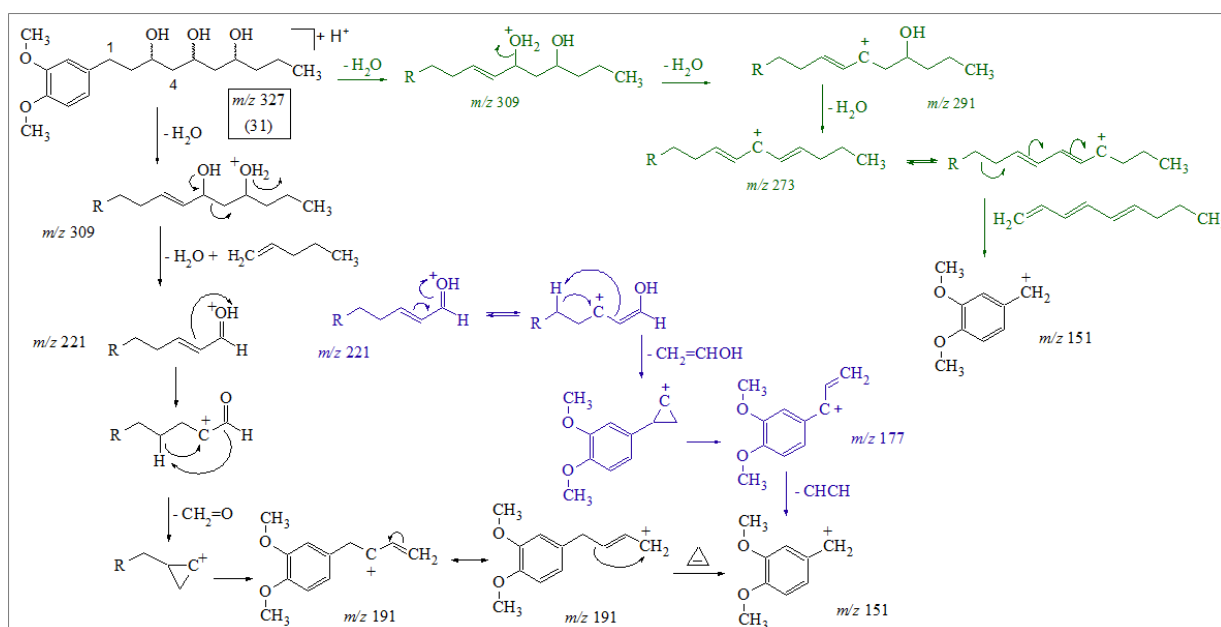


FIGURA 4.59 – Proposta de fragmentação para o íon m/z 327 $[M+H]^+$ com tempo de retenção de 6,0 e 6,3 min.

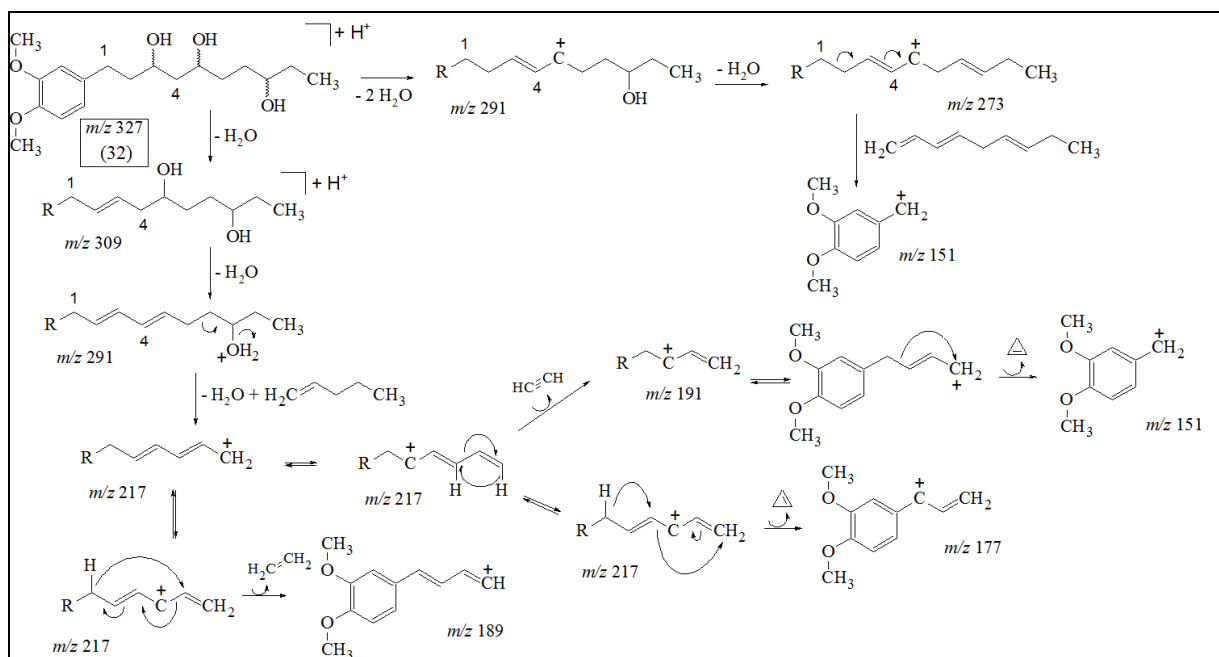


FIGURA 4.60 – Proposta de fragmentação para o íon m/z 327 $[M+H]^+$ com tempo de retenção de 5,8 e 5,9 min.

4.3.2 Biotransformação do 6-shogaol (4)

O 6-shogaol (4) que foi obtido pela reação de desidratação do 6-gingerol (2) em meio ácido, FIGURA 4.61 (SILVA, 2011), também foi fornecido ao fungo *C. gloesporioides*, a fim de avaliar como seria o reconhecimento do *pool* enzimático frente à ligação dupla na cadeia lateral da estrutura do modelo molecular. A reação foi acompanhada por cromatografia em camada fina (CCD) e GC-MS até que se observasse o máximo do consumo do material de partida, o produto reacional foi purificado em coluna cromatográfica utilizando sílica *flash* como fase estacionária e sob pressão, bem como hexano: acetato (3:1) como eluente.

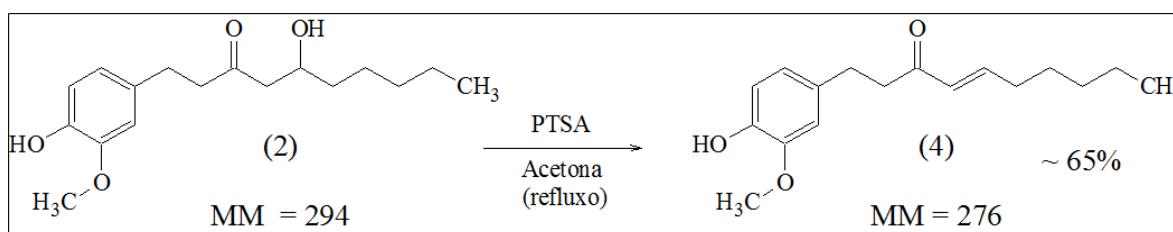


FIGURA 4.61 – Esquema reacional para se obter o 6-shogaol (4) (SILVA, 2011).

Na FIGURA 4.62-A, a análise por GC-MS do produto da reação, após purificação em coluna, mostrou um pico intenso em torno de 26,7 minutos no qual se encontrou o m/z 276 $[M]^+$ cuja fragmentação mostrou o pico base m/z 137. Como descreve o trabalho de JOLAD et al, 2004 esse pico base m/z 137 está relacionado ao grupamento 4-hidroxi-3-metoxibenzil (FIGURA 4.62- B e C). Um pico que também esteve presente foi o m/z 150, que se trata de um produto de rearranjo de McLafferty (MLR), além do mais, outra característica observada foi o fragmento chave a m/z 205, resultante da quebra da ligação em C5/C6, que se destaca no espectro de GC-MS do 6-shogaol (**4**), como mostra a FIGURA 4.62-B bem como a FIGURA 4.62-C, que traz uma proposta para essas principais fragmentações de 6-shogaol (**4**), como apontou o trabalho de JOLAD et al (2004), confirmando a estrutura do produto reacional desejado. Uma nova proposta de fragmentação foi feita para justificar os picos que aparecem nos dados obtidos pela análise por GC-MS do produto reacional, o 6-shogaol (**4**), como pode-se ver na FIGURA 4.63.

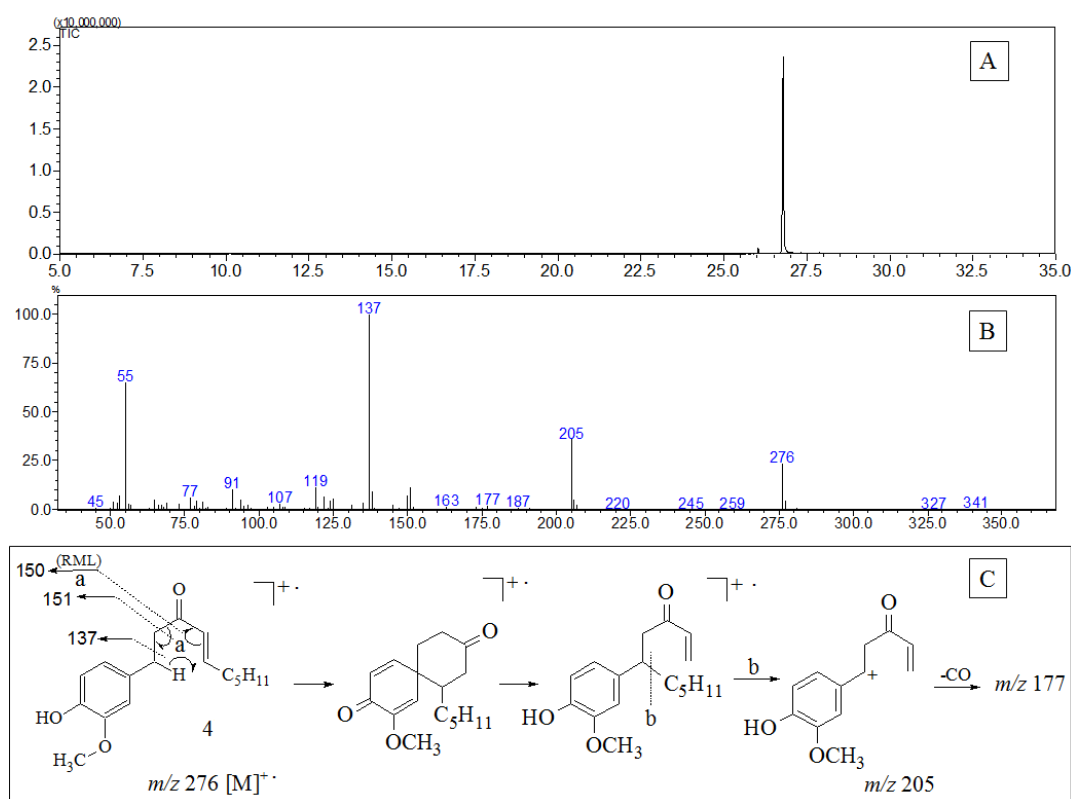


FIGURA 4.62 – Em (A) e (B), análise por GC-MS do produto reacional para obtenção de 6-shogaol (**4**) e proposta das principais fragmentações em (C) (adaptado de JOLAD et al, 2004).

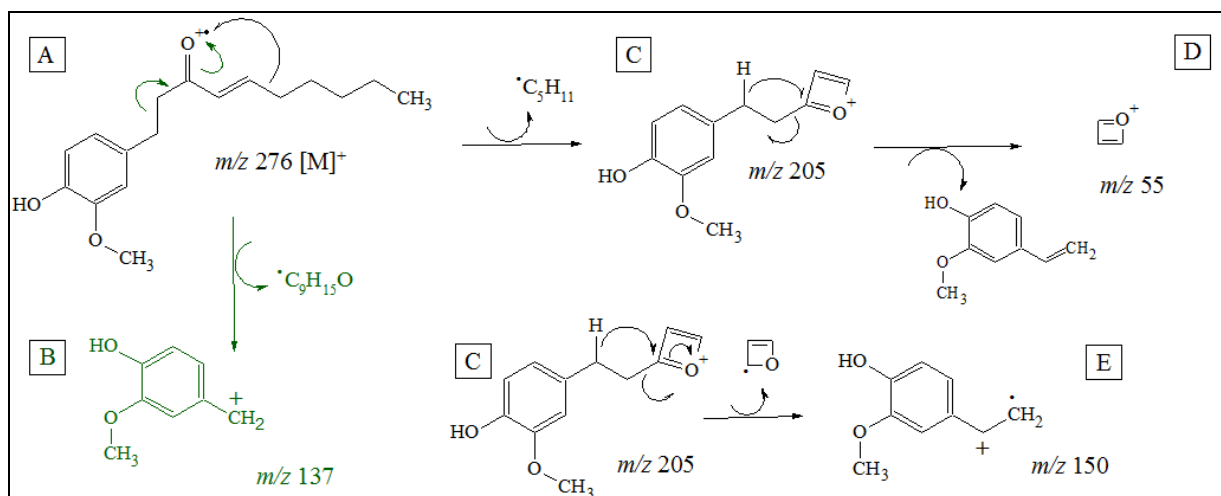


FIGURA 4.63 – Nova proposta de fragmentação para os íons do espectro de GC-MS do produto reacional, o 6-shogaol (4).

O espectro de RMN de 1H do produto reacional, pós purificação em coluna, evidencia a presença do composto de interesse, mostrando um duplo triplete em δ 6,09 com a área de integração para um, referente ao hidrogênio olefínico α -carbonílico (H-4) que acopla com H-5 ($J=16$ Hz) e com os hidrogênios em H-6 ($J= 2$ Hz), FIGURA 4.64-A. A constante de acoplamento de 16 Hz é característica de hidrogênios em configuração *trans*. Na região dos hidrogênios aromáticos há um conjunto de sinais (δ 6,6 - 6,8) integrando para quatro hidrogênios, dentre esses está o sinal do hidrogênio olefínico β -carbonílico (H-5) e os sinais do padrão típico do anel aromático 1,3,4-trissubstituído do 6-gingerol (2) como se pôde comparar com seu espectro de RMN 1H na FIGURA 4.64-B. Também foi possível visualizar o triplete em δ 0,89 integrando para três hidrogênios referente ao grupo metila da cadeia lateral (H-10), um conjunto de sinais entre δ 1,2 – 1,5 integrando para seis hidrogênio relacionados com os hidrogênios H-7, H-8 e H-9, outro em torno de δ 2,21 integrando para dois fazendo referência aos hidrogênios em H-6 e os sinais entre δ 2,9 – 2,8 integrando para quatro relacionados com H-1 e H-2, além do singlete intenso em δ 3,87 integrando para três característico de hidrogênios de metoxila ($-OCH_3$), FIGURA 4.64-A, (SILVA, 2011).

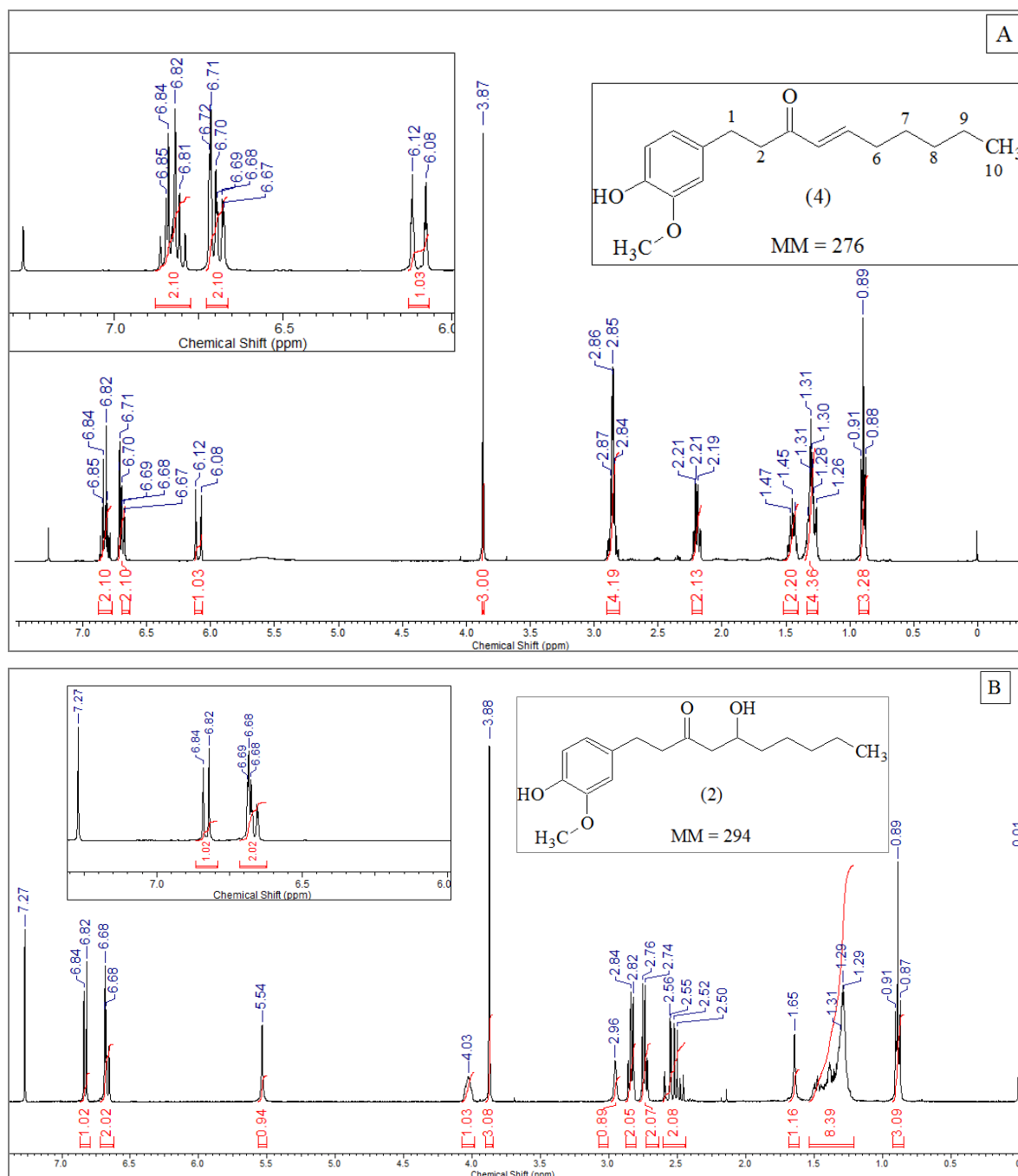


FIGURA 4-64 – Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3) do 6-shogaol (4) (A) comparado ao espectro do 6-gingerol (2), em (B).

O 6-shogaol (4), após ser purificado, também foi analisado por inserção direta no espectrômetro de massas equipado com analisador do tipo *ion trap* segundo o sistema cromatográfico 5, descrito nos materiais e métodos; trabalhando no modo negativo, a molécula desprotonada de 6-shogaol (4) foi observada a m/z 275 $[\text{M}-\text{H}]^-$. A

fragmentação deste íon, mostra um pico base com valor aproximado de m/z 139, devido à quebra da ligação C1-C2, FIGURA 4.65, a seguir. A ligação dupla em C4-C5 e a ausência da hidroxila no C-5, como ocorre com os compostos relacionados com o gingerol, evita que a fragmentação ocorra nessa posição, havendo assim a perda neutra de 136 u (2-metoxi-4-metileneciclohexa-2,5-dienona) devido à clivagem benzílica do 6-shogaol (4) (TAO et al, 2009). Também é possível observar um íon com valor de m/z 260 relacionado com a perda radicalar da metila do grupamento metoxila, FIGURA 4.65.

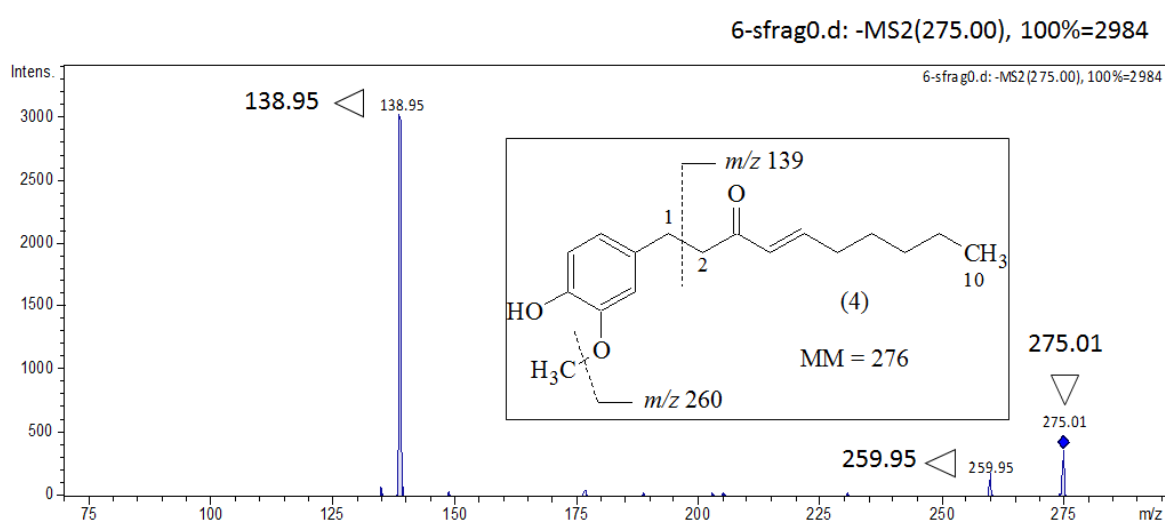


FIGURA 4.65 – Espectro MS² no modo negativo para o 6-shogaol (4).

O composto 6-shogaol (4) foi fornecido ao fungo e o extrato acetato de etila (Ac) do sobrenadante, meio de cultura, do experimento de biotransformação no quinto e décimo dia, foram analisados por HPLC, utilizando o sistema cromatográfico 1 descrito nos materiais e métodos, e os cromatogramas obtidos foram comparados com o controle (B) de produção de metabólitos e com o padrão de 6-shogaol (4). A coluna da Agilent 5 μ m, 150 x 4,6 mm, Eclipse XDB-C18 foi utilizada, bem como o gradiente metanol: água, já mencionado nos capítulos anteriores, foi escolhido como fase móvel e o comprimento de onda de 220 nm. Na FIGURA 4.66, pelo perfil cromatográfico, pode-se ver que desde o quinto dia do experimento de biotransformação parecia haver o consumo do 6-shogaol (4) cujo tempo de retenção foi de 21 min, como mostra o cromatograma em vermelho. Em azul, está o cromatograma dos possíveis produtos de biotransformação e pôde-se ver bandas majoritárias em torno de 5, 12, 13, 20 e 24 minutos. Em verde,

trata-se do perfil do cromatograma do controle (B) dos metabólitos produzidos pelo fungo. No décimo dia do experimento, FIGURA 4.66, ainda foi possível ver as bandas em 5, 12, 24 e em 20 minutos ela se torna mais intensa em relação as demais bandas ao se comparar entre os dias de biotransformação.

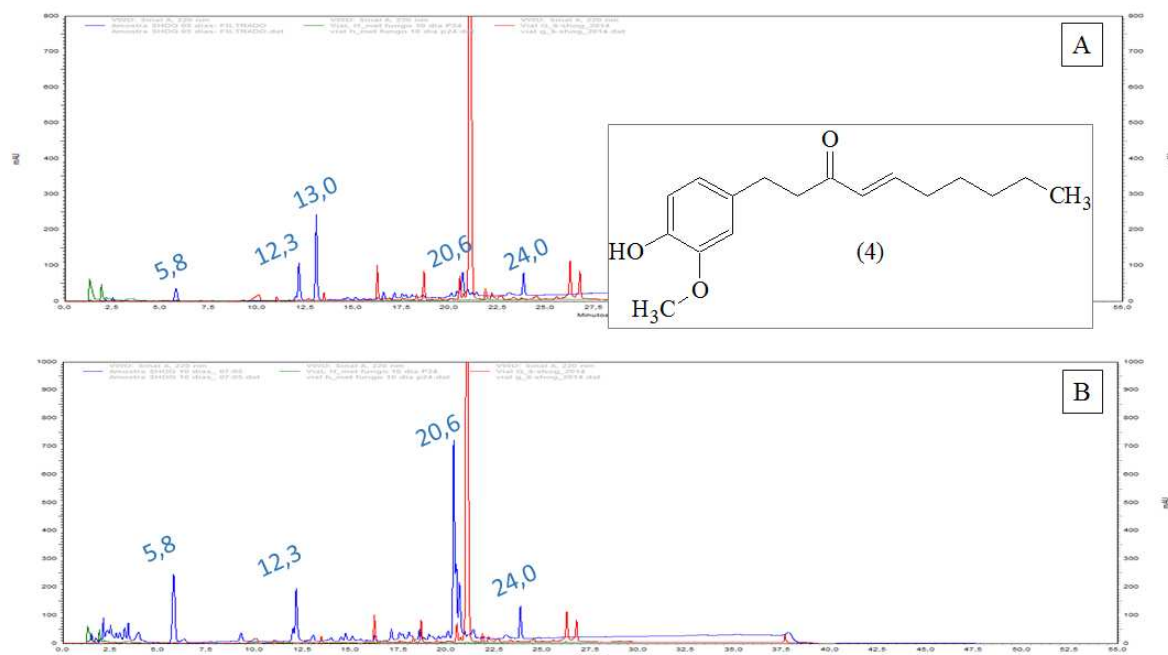
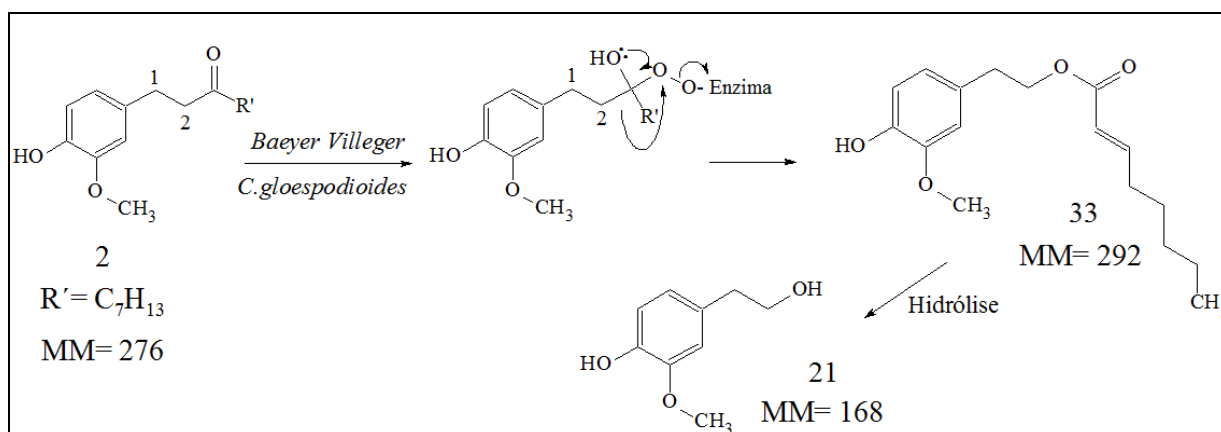


FIGURA 4.66 – Sobreposição dos cromatogramas dos extratos Ac (AcOEt), em azul, experimento de biotransformação do 6-shogaol (**4**), em verde, controle (B) e em vermelho padrão da substância (**4**). Em (A) o quinto dia e em (B), décimo dia de biotransformação.

Na literatura a reação de Baeyer Vileger para a transformação de cetonas a ésteres tolera a presença da cetona α , β insaturada, sendo que a oxidação com peroxiácidos, em reações convencionais, geralmente ocorre no grupo carbonílico e não na dupla ligação; a regioquímica da reação normalmente mostra o grupo arila com melhor atitude migratória (KÜRTI e CZAKÓ, 2005). Desta forma e seguindo o exemplo da biotransformação de 6-gingerol (**2**) por *C.gloesporioides*, descrita no capítulo 4.2, na metabolização de 6-shogaol (**4**) por enzimas do fungo que promovem a reação de Baeyer Vileger, seguida de uma provável hidrólise, era de se esperar que um dos produtos de biotransformação fosse o éster (**33**), com peso molecular de 292 Da e/ou a formação do álcool (**21**) com peso molecular de 168 Da, como mostra o ESQUEMA 4.3.

Os dados da análise por GC-MS do extrato Ac (AcOEt) do experimento de biotransformação, mostrou produtos majoritários que indicaram esse processo de reconhecimento do *pool* enzimático de *C. gloesporioides* frente ao 6-shogaol (**4**) como substrato, como se pode ver a seguir na FIGURA 4.67.

ESQUEMA 4.3 – Possível reação de Baeyer Villiger seguida de hidrólise promovida por *C.gloesporioides* em 6-shogaol (**4**) (KÜRTI e CZAKÓ, 2005).



Na análise por GC-MS do extrato Ac (AcOEt) do quinto dia de biotransformação, foi possível visualizar um pico com maior intensidade em relação aos demais, em torno de 15,5 minutos, no qual se encontrou o íon m/z 168 $[M]^+$ cuja fragmentação mostrou o pico base m/z 137, visto a seguir na FIGURA 4.67-A e B, característicos do álcool **21** do ESQUEMA 4.3, indicando uma metabolização do 6-shogaol (**4**) pela reação de Baeyer Villiger seguida de hidrólise. Este pico teve o mesmo tempo de retenção e padrão de fragmentação para o álcool **21** formado da biotransformação do 6-gingerol (**2**) como se pode ver na FIGURA 4.68. O espectro de GC-MS, FIGURA 4.67, ainda mostrou outro pico bem intenso em relação aos demais, em 29,2 minutos, no qual se encontrou o m/z 296 $[M]^+$ cuja fragmentação também mostrou o pico base m/z 137. Esse dado obtido, provavelmente indica outro produto de biotransformação do 6-shogaol (**4**), possivelmente envolvendo reações de reduções da ligação dupla e da carbonila do substrato, tendo-se assim, um produto de biocatálise, como o exemplo da estrutura (**34**) proposta na FIGURA 4.67-C. Dados da literatura, traz este composto como 6-gingerdiol, quando é isolado de *Zingiber officinale*, sendo os mesmos fragmentos formados

durante o impacto de elétrons no espectrômetro de massas, estando os valores de acordo com a literatura, [m/z 296 $[M]^+$, 278 (M-H₂O), 260 (M-2H₂O), 207, 190/189, 180, 175, 164/163, 151/150, 137 (pico base)], (JOLAD et al , 2004; KIKUZAKI et al 1992).

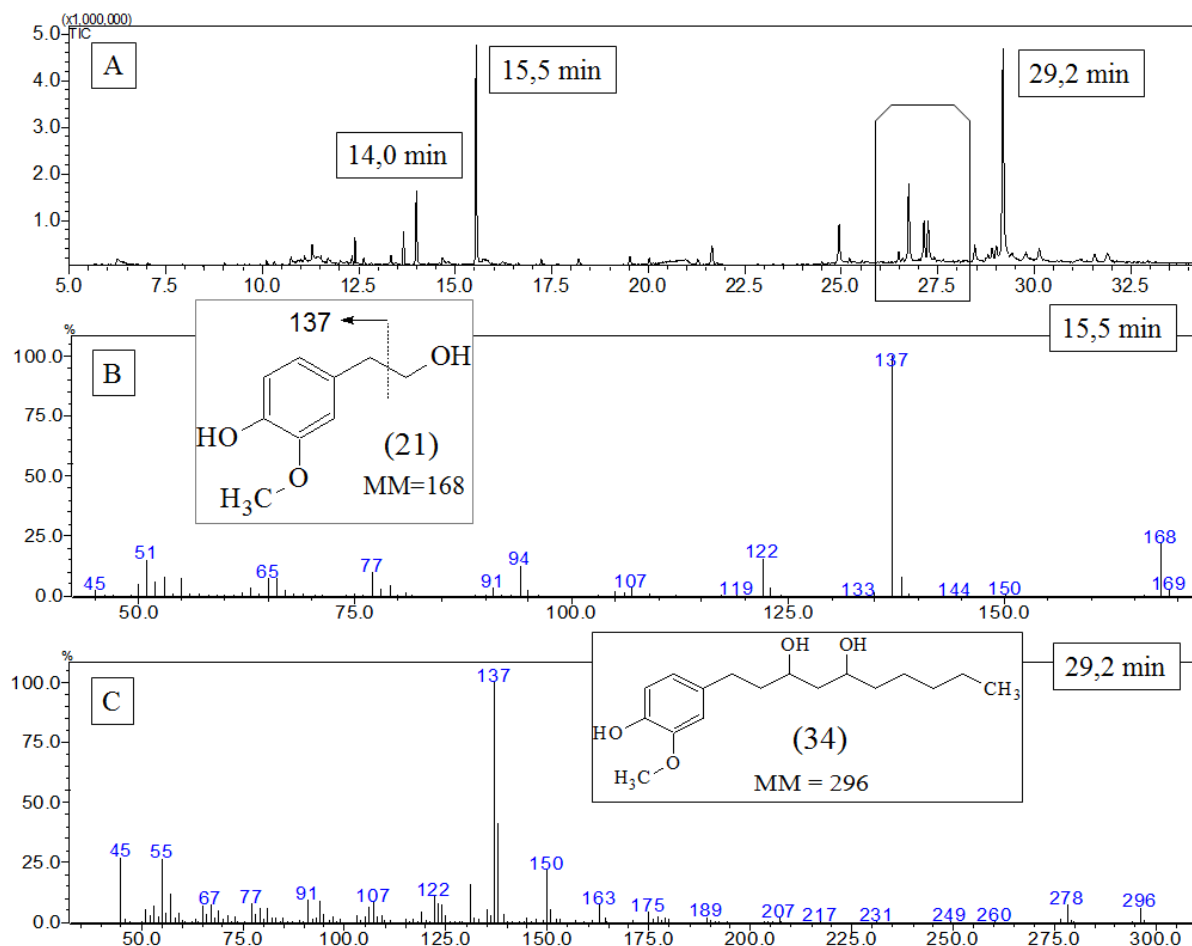


FIGURA 4.67 – Análise por GC-MS do extrato Ac (AcOEt) do quinto dia de biotransformação de 6-shogaol (4).

Apesar de todos os experimentos de biotransformação terem sido acompanhados com os controles de degradação do substrato (controle C), que se trata da extração acetato de etila (Ac) do sobrenadante, o meio de cultura, contendo apenas o 6-shogaol (4) e sem a inoculação do fungo. Esse controle foi coletado nos mesmos dias em que foram retirados os experimentos de biotransformação, neste caso, quinto e décimo dias. A análise deste controle (C) foi deixada para ser feita posteriormente, entretanto, o freezer que continha a maior parte dos extratos dos experimentos parou de funcionar, descongelando e contaminando todo material. A falta de um controle de degradação do

substrato pode gerar dúvidas ao afirmar o que realmente se trata de produto de metabolização. Entretanto, não é de se esperar a redução de carbonila numa possível degradação de 6-shogaol (**4**), já que não havia condições energeticamente suficientes na maneira em que foi conduzido o experimento do controle (C), em que o substrato diluído em DMSO era adicionado ao meio BD (batata-dextrose) na concentração final de 100 µg/ mL. Os frascos Erlenmeyers ficavam sob agitação, com controle de temperatura (30°C) e no escuro; o que se leva a concluir que o composto (**34**), FIGURA 4.67-C, se trata de um produto de biotransformação.

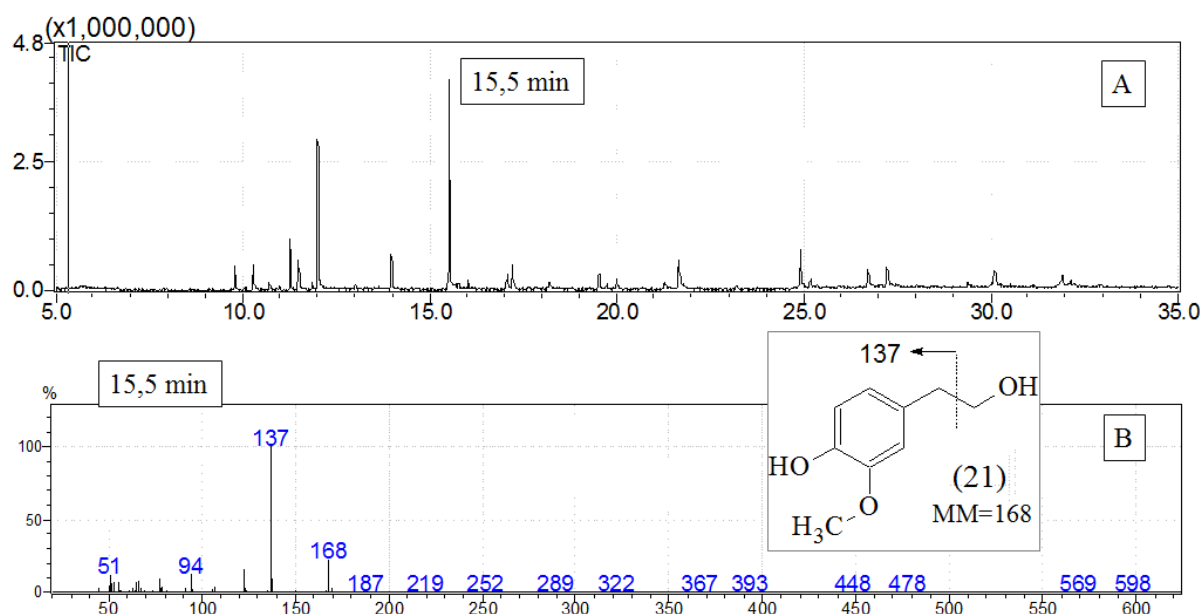


FIGURA 4.68 – Análise por GC-MS do extrato Ac (AcOEt) do décimo dia de biotransformação de 6-gingerol (**2**) por *Colletotrichum gloesporioides*.

Além dos produtos majoritários em 15,5 e 29,2 minutos, outro pico em 14,0 minutos, de menor intensidade, no qual se encontrou o íon m/z 138 $[M]^+$, cuja fragmentação mostrou o pico base m/z 107, FIGURA 4.67-A, faz menção ao metabólito tirosol (**23**) produzido pelo fungo *C. gloesporioides* nas condições de trabalho do experimento, utilizando meio BD (batata- dextrose) (BUNGIHAN et al, 2013). Em torno de 26,5 a 27,2 minutos, como foi destacado anteriormente na FIGURA 4.67-A, foram vistos picos que apresentaram o íon m/z 292 $[M]^+$, sendo que, o que aparece em 26,7 minutos, mostrou o pico base m/z 137, e ao que tudo indica, parece estar relacionados com o éster (**33**),

formado da reação de Baeyer Vileger pelo *pool* enzimático de *C.gloesporioides* sobre o 6-shogaol (**4**). O pico com tempo de retenção de 26,7 minutos que apresentou o íon m/z 292 $[M]^+$, ocorreu novamente no extrato Ac (AcOEt) após 10 dias de biotransformação, como pode ser visto na FIGURA 4.69-A e B.

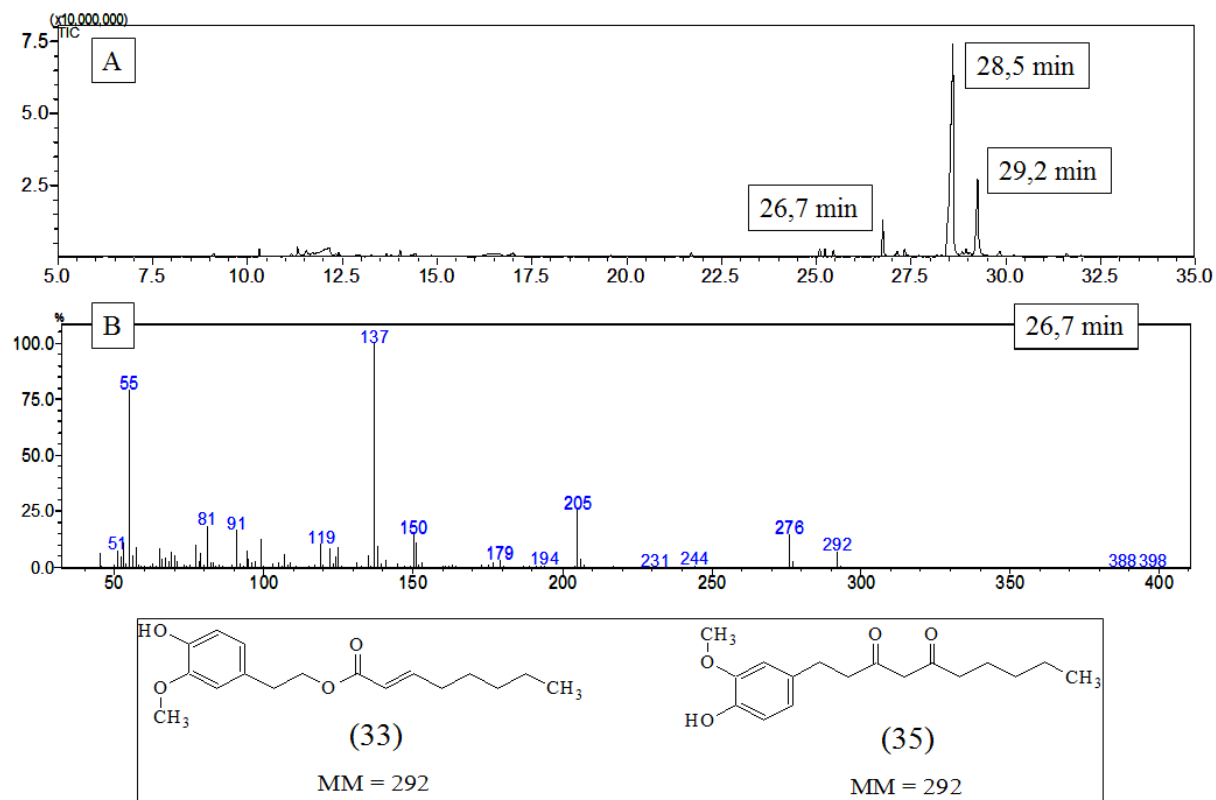


FIGURA 4.69 – Análise por GC-MS do extrato Ac (AcOEt) do décimo dia de biotransformação de 6-shogaol (**4**) evidenciando o pico em 26,7 minutos.

A FIGURA 4.70, traz uma proposta de fragmentação para o íon m/z 292 $[M]^+$ de acordo com os dados obtidos na análise por GC-MS considerando a proposta estrutural relacionada ao éster **33** formado da reação de Baeyer Vileger. Outra evidência, foi o íon molecular e os fragmentos no experimento de ESI-MS/MS no modo negativo, mostrados a seguir, que também levam à proposta da estrutura **33** representada na FIGURA 4.69. Uma possível proposta estrutural a ser descartada, foi a formação da 6-gingerdiona (**35**), FIGURA 4.69, como provável produto de biotransformação a partir de 6-shogaol (**4**), que envolveria reações de oxidação do substrato. Entretanto, o experimento de ESI-MS/MS no modo negativo, mostrado nas próximas páginas,

evidência que é mais aceitável que o íon m/z 292 $[M]^+$ da análise por GC-MS, provavelmente se trata do éster formado a partir da reação de Baeyer Vileger sobre o 6-shogaol (**4**).

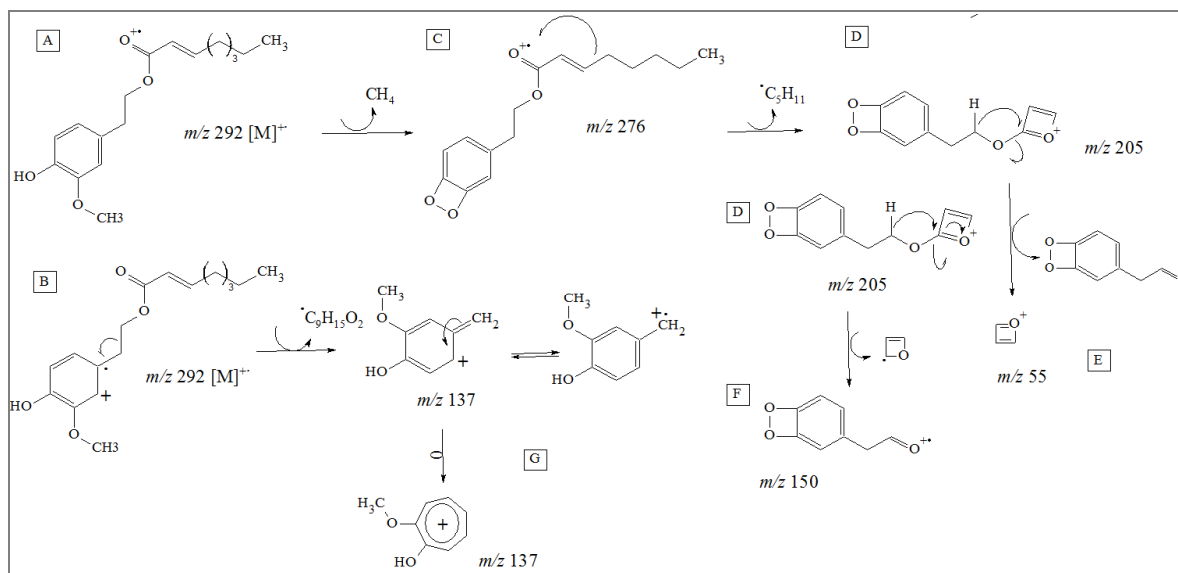


FIGURA 4.70 – Proposta de fragmentação para o íon m/z 292 $[M]^+$ que ocorre no pico com tempo de retenção em 26,7 minutos.

Da mesma forma como ocorreu na análise por GC-MS para o quinto dia de biotransformação, novamente no décimo dia, um pico em torno de 29,2 minutos, no qual se encontrou o íon m/z 296 $[M]^+$, cuja fragmentação mostrou o pico base m/z 137, foi visualizado, sendo que os dados da literatura confirmam que, pelo padrão de fragmentação, se trata do composto 6-gingerdiol (**34**), FIGURA 4.71-A (JOLAD et al, 2004; KIKUZAKI et al 1992). Outro pico com maior intensidade em relação aos demais, apareceu em torno de 28,5 minutos no qual o íon m/z 294 $[M]^+$ foi visualizado e sua fragmentação mostrou o pico base m/z 137 (FIGURA 4.71-A e B); apesar do padrão dos fragmentos formados serem o mesmo para 6-gingerol (**2**), o tempo de retenção não confere com tal composto, que é de 27,8 minutos, como pode ser visto na FIGURA 4.72. Além do mais, o 6-gingerol (**2**) quando analisado por GC-MS no equipamento e nas condições em que foram trabalhadas, há a degradação térmica formando aldeídos alifáticos e zingerona, bem como a desidratação para 6-shogaol (**4**) correspondente, como pode-se ver na FIGURA 4.72. Os picos referentes à essa reação retroaldólica, que apareceria em 17,2 minutos, mostrando o íon m/z 194 $[M]^+$, e a desidratação, que ocorreria em torno de 26,7 minutos, mostrando o íon m/z 276 $[M]^+$, não aparecem na

análise por GC-MS do extrato Ac (em aceta de etila) do décimo dia de biotransformação, FIGURA 4.71-A, novamente reiterando a ideia de que o pico em 28,5 minutos se trata da estrutura (36), a redução da ligação dupla do éster (33) advindo da reação de Baeyer Villegier.

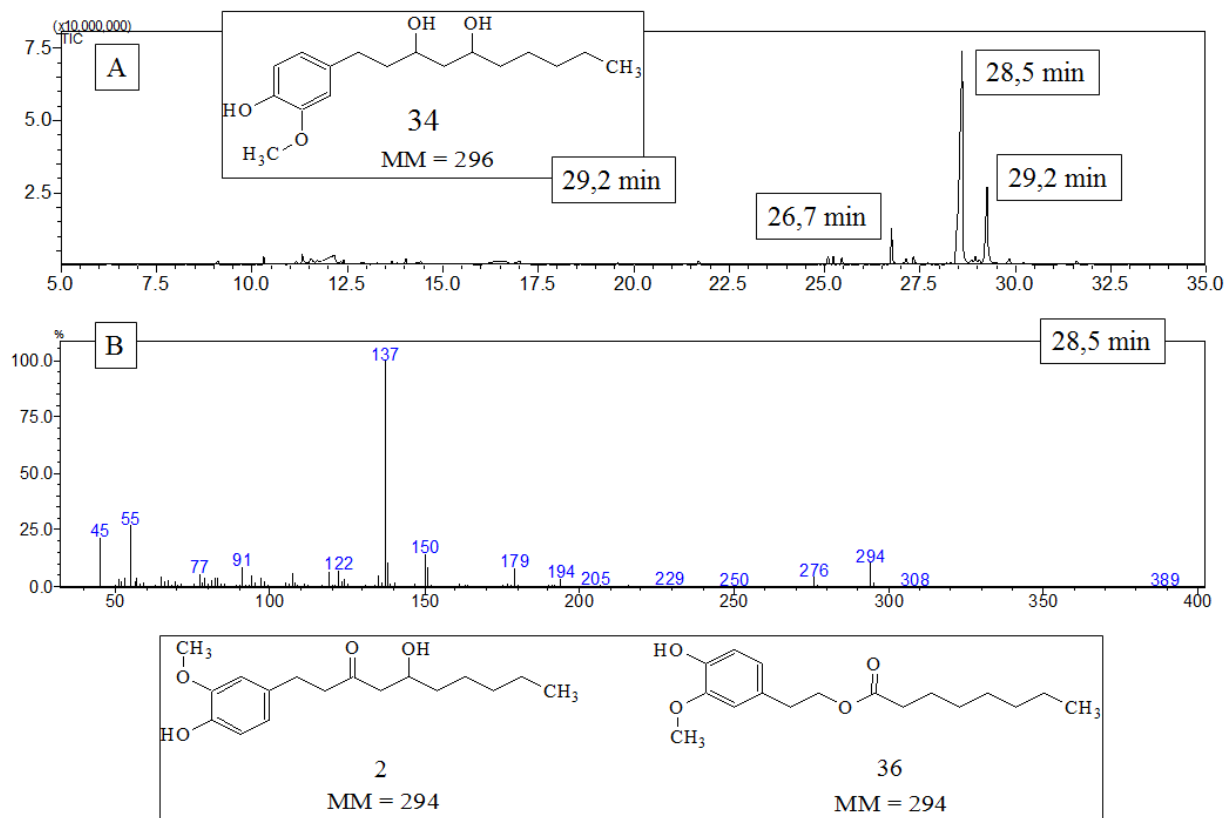


FIGURA 4.71 – Análise por GC-MS do extrato Ac (AcOEt) do décimo dia de biotransformação evidenciando os fragmentos do íon m/z 294 $[M]^+$.

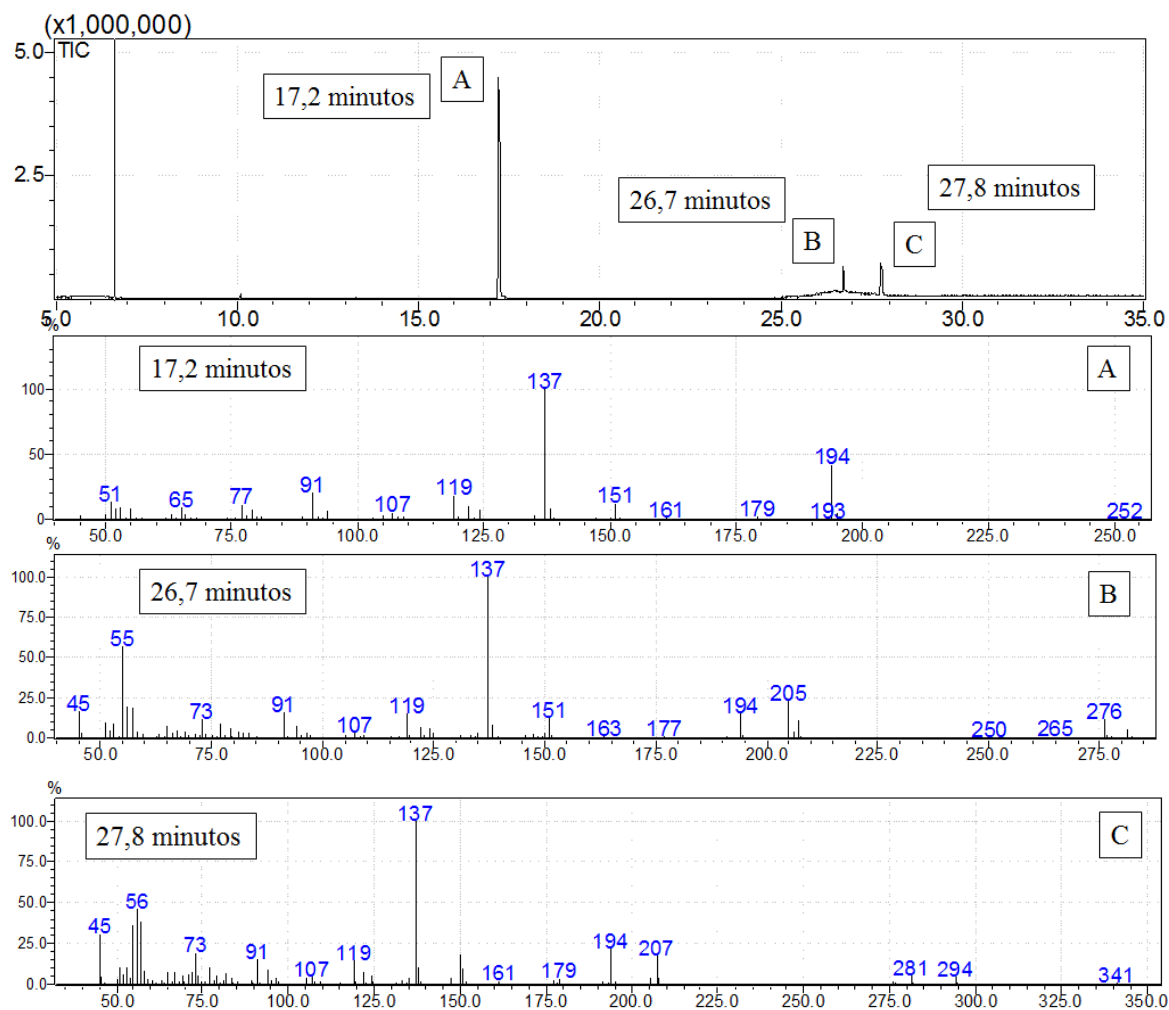


FIGURA 4.72 – Análise por GC-MS do composto 6-gingerol (2).

A análise por LC-MS *ion trap*, o sistema cromatográfico 5 descrito nos materiais e métodos, foi realizada tanto no modo negativo quanto no modo positivo para o experimento de biotransformação do 6-shogaol (4). A coluna da Agilent, Eclipse XDB-C18 foi utilizada e o método 2 das condições cromatográficas descrito nos materiais e métodos, a acetonitrila e água foi utilizada como fase móvel, com ácido fórmico a 0,1% v/v, para melhorar a ionização. Na FIGURA 4.73 e 4.74, pode-se ver o *full scan* tanto para o experimento de biotransformação, no quinto e no décimo dia, quanto do controle (B) de produção dos metabólitos do fungo no décimo dia, mostrando bandas que aparecem apenas no experimento de biotransformação e que não ocorrem no controle (B), especialmente no intervalo de 5 a 10 minutos.

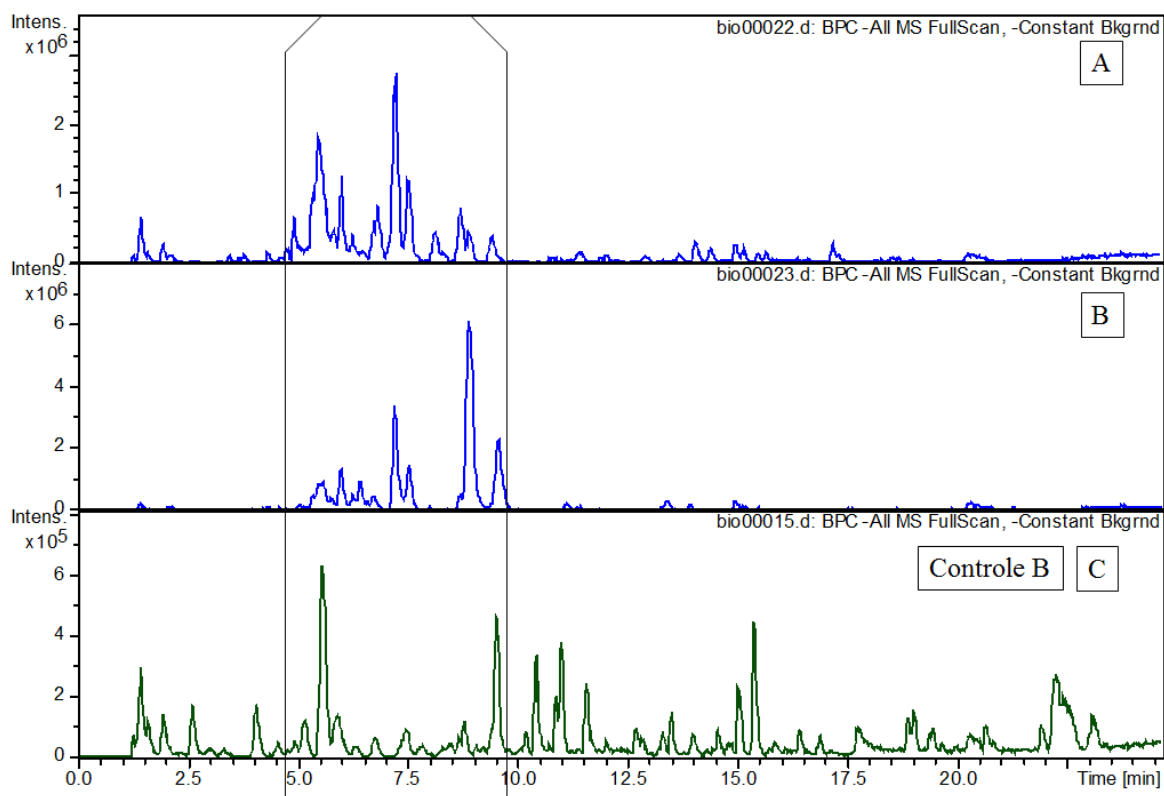


FIGURA 4.73 – Cromatograma do pico base (*BCP*), no modo negativo, do extrato Ac (AcOEt) da biotransformação do 6-shogaol (**4**), no quinto (A) e no décimo (B) dia; em (C) comparação com o controle (B).

Apesar das análises dessas amostras terem sido realizadas em dias diferentes, até mesmo para mudar o modo de ionização do negativo para o positivo, foi possível ver que existem bandas majoritárias em torno de 7,2 minutos que prevalecem no quinto dia, tanto no modo negativo quanto no positivo, e que no décimo dia de biotransformação surgem bandas mais intensas em torno 9,0 minutos, tanto no cromatograma de pico base (*BCP*) adquirido no modo negativo quanto para o modo positivo, FIGURA 4.73 e 4.74.

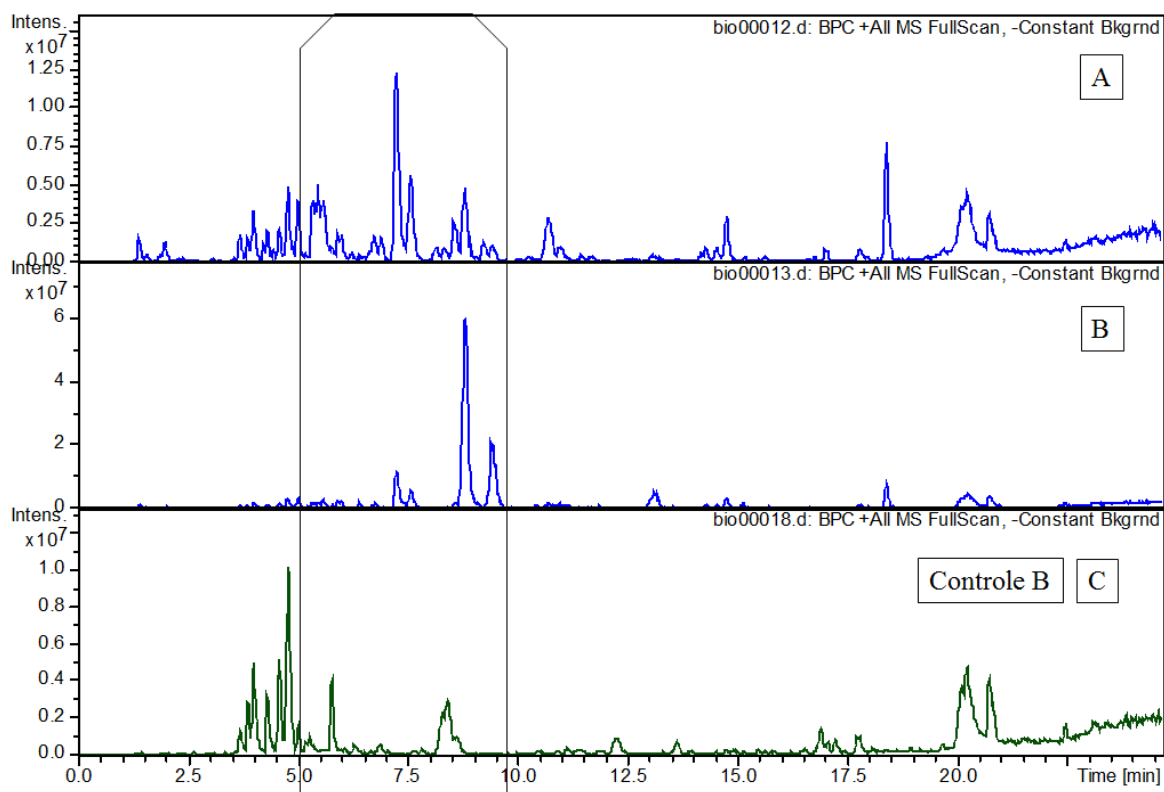


FIGURA 4.74 – Cromatograma do pico base (BCP), no modo positivo, do extrato Ac (AcOEt) do experimento de biotransformação do 6-shogaol (**4**) no quinto (A) e no décimo (B) dia; em (C) comparação com o controle (B).

Em relação à análise do quinto dia da biotransformação, no modo negativo, as bandas que apareceram em torno de 7,2 minutos, mais especificamente, no intervalo de 7,1 a 7,4 e de 7,5 a 7,7 minutos, tem valor de m/z 295 [M-H]⁻, como se pode ver pelo cromatograma de íon extraído (EIC) na FIGURA 4.75-B. O experimento por ESI-MS/MS (*ion trap*) deste íon m/z 295 [M-H]⁻ mostrou a coeluição de outro íon m/z 461 quando se obtém os fragmentos da banda no intervalo de 7,1 a 7,4 minutos, FIGURA 4.76-A. Entretanto, foi visto que o íon m/z 461 tem tempo de retenção diferente do íon de interesse o m/z 295 [M-H]⁻ quando se obtém o seu cromatograma de íon extraído (EIC), como mostra a FIGURA 4.76-B.

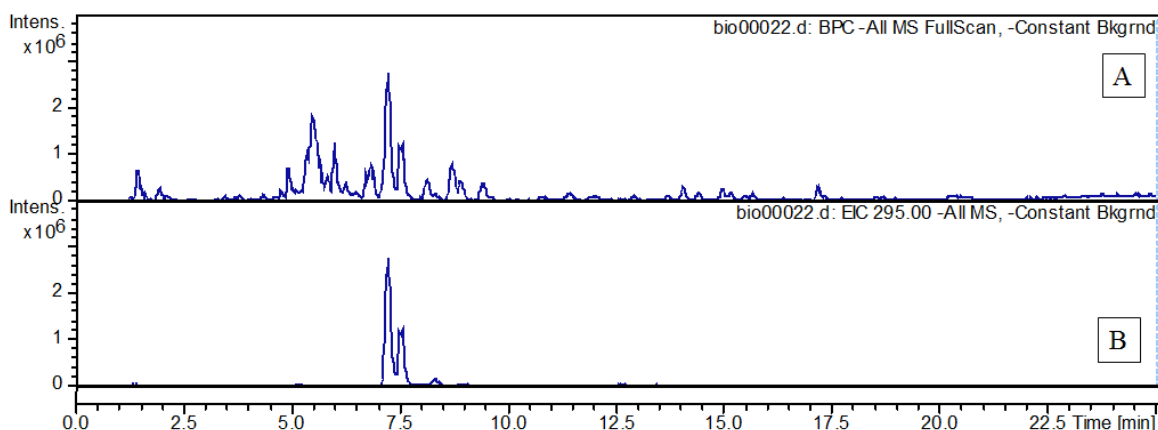


FIGURA 4.75 – (A) Cromatograma do pico base (*BCP*), no modo negativo, do quinto dia de biotransformação do 6-shogaol (**4**); (B) cromatograma de íon extraído (*EIC*) para íon m/z 295.

A quebra por ESI-MS/MS do íon m/z 295 $[M-H]^-$ gerou um fragmento predominante a m/z 280 como se pode ver nas FIGURAS 4.76-A e 4.76-C. O valor da massa da molécula desprotonada m/z 295 $[M-H]^-$ com o padrão de fragmentação apresentado, levou a propor a estrutura de 6-gingerdiol (**34**), como um produto de biotransformação. Os valores obtidos no experimento por ESI-MS/MS estão de acordo com dados da literatura, como descreveu TAO, 2007 em sua tese, na qual identifica o 6-gingerdiol (**34**) como produto de metabolização do 6-gingerol (**2**) por extrato microssomal de fígado de rato. Em sua tese e de acordo com o artigo publicado em 2009, TAO et al utilizou o equipamento Micromass Quattro II triplo quadrupolo e o espectro de íons produtos de m/z 295 $[M-H]^-$ mostrou o íon m/z 280 predominante, correspondendo ao ânion radical formado devido à quebra homolítica do grupo metoxi no anel fenólico da estrutura do 6-gingerdiol (**34**) FIGURA 4.76-A e 4.76-C.

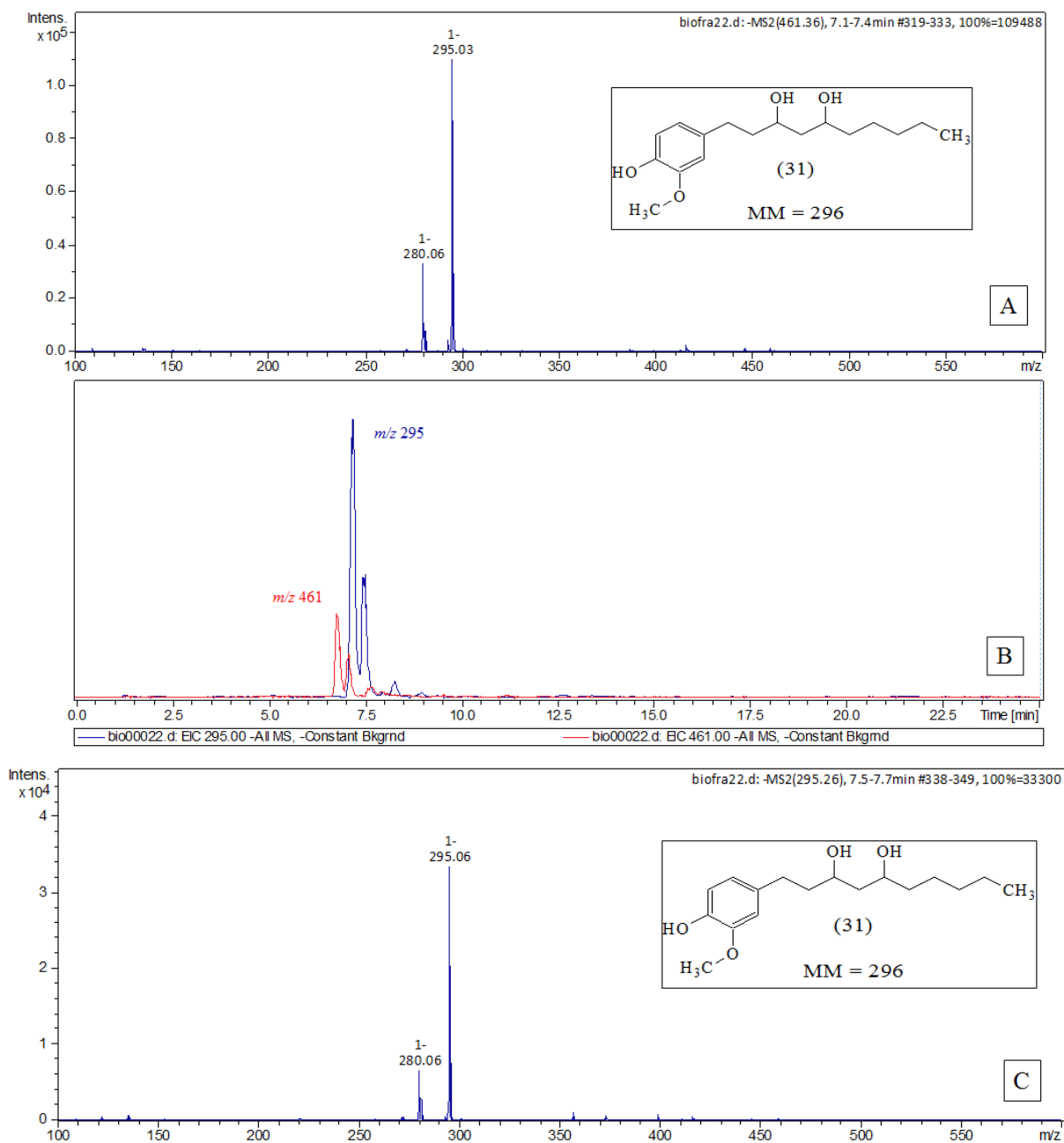


FIGURA 4.76 – (A) e (C) ESI-MS/MS para o íon m/z 295 $[M-H]^-$; (B) cromatograma de íon extraído (EIC) para os íons m/z 295 e m/z 461.

O resultado da análise por LC-MS (*ion trap*), no modo negativo, para a estrutura de 6-gingerdiol (**34**) também está de acordo com os dados da análise por GC-MS, que já havia mostrado um pico bem intenso, para o quinto dia de biotransformação, em 29,2 mim, em que foi encontrado o íon m/z 296 $[M]^+$ cuja fragmentação mostra o pico base

m/z 137, provavelmente indicando reações de redução da ligação dupla e da carbonila durante a biotransformação do 6-shogaol (**4**), tendo-se um produto de biocatálise como o exemplo da estrutura proposta em (**34**), FIGURA 4.76.

Ainda considerando a análise do quinto dia de biotransformação, a FIGURA 4.77-A traz novamente o *full scan* no modo positivo, sendo que as bandas que apareceram no intervalo de 7,1 a 7,7 minutos, apresentaram o valor de m/z 261 como se pode ver no cromatograma de íon extraído (*EIC*) para este íon, FIGURA 4.77-B. Ao ser obtido o *EIC* para o íon m/z 297 $[M+H]^+$, FIGURA 4.77-C, é possível ver que o íon m/z 261 provavelmente se trata da molécula protonada de 6-gingerdiol (**34**) desidratada, perdendo duas moléculas de água, m/z 261 $[M+H-2H_2O]^+$ (**37**). Como a partir do experimento de ESI-MS/MS não foi possível obter os fragmentos a partir do cromatograma de íon extrato (*EIC*) para o íon m/z 261 $[M+H-2H_2O]^+$, os dados por ESI-MS para este íon foram detalhados na FIGURA 4.78, que mostra os valores de m/z obtidos a partir das bandas no intervalo de 7,1 a 7,4 e no intervalo de 7,5 a 7,6 minutos.

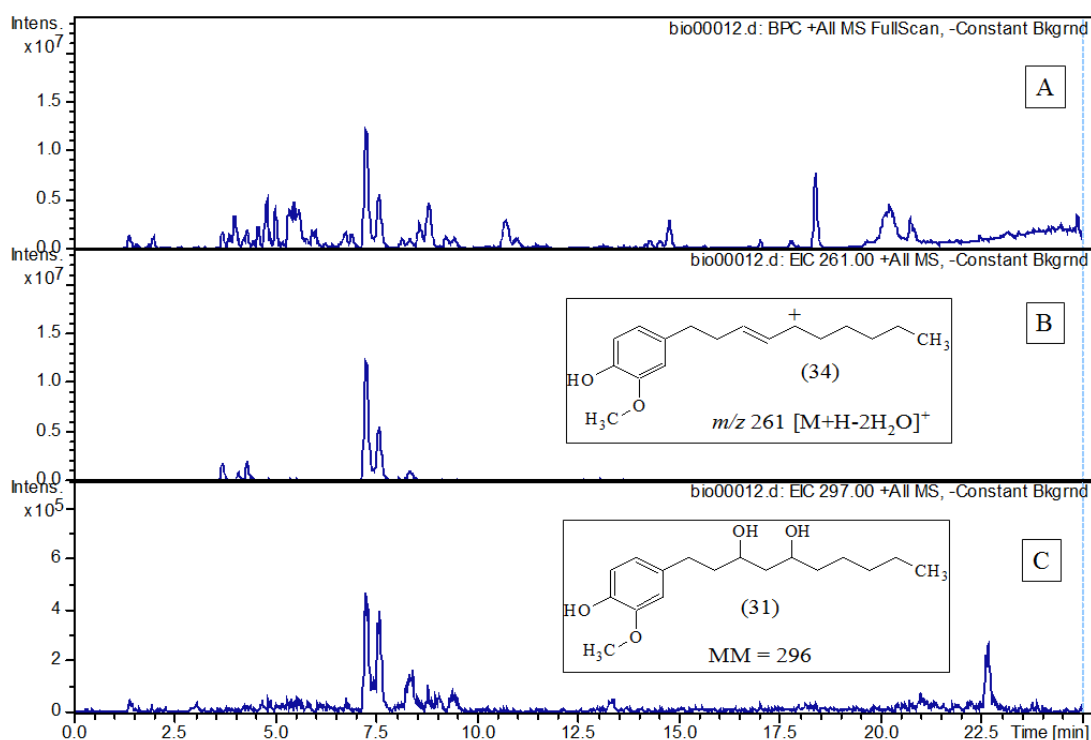


FIGURA 4.77 – (A) Cromatograma do pico base (*BPC*), no modo positivo, do quinto dia de biotransformação do 6-shogaol (**4**); (B) Cromatograma de íon extraído (*EIC*) para íon m/z 261 e para o íon m/z 297 (C).

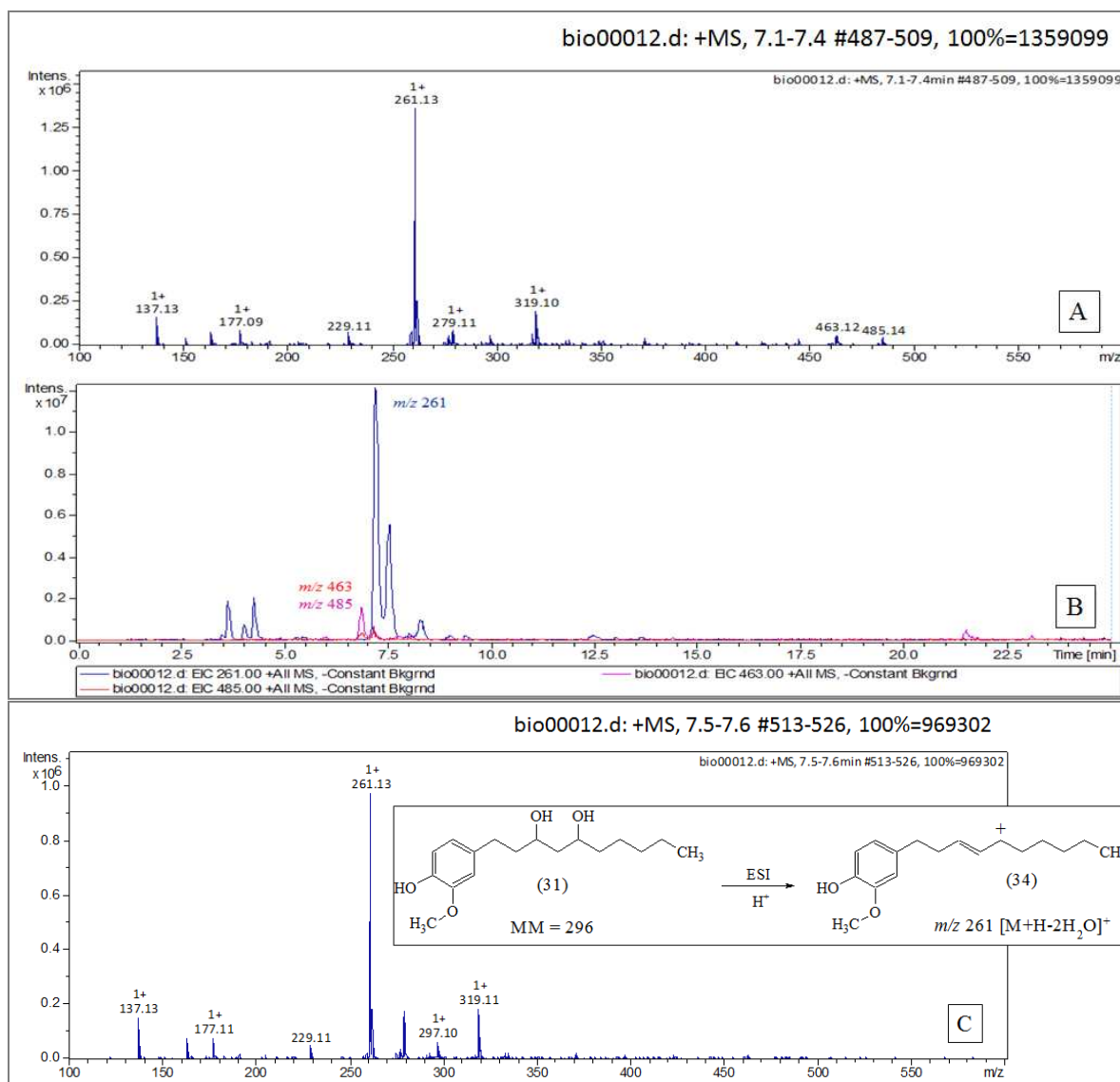
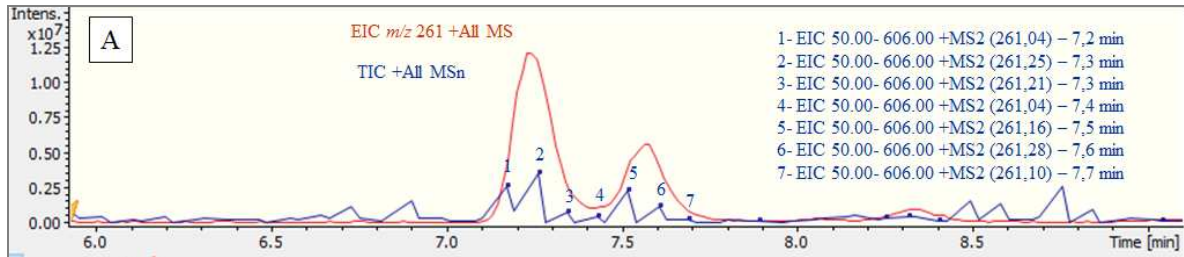


FIGURA 4.78 – ESI-MS para a banda no intervalo de 7,1 a 7,4 minutos (A) e para o intervalo de 7,5 a 7,6 minutos (C), (B) sobreposição do extrato de íon comum (EIC) para o íon m/z 261, para o íon m/z 463 e para o íon m/z 485.

Na FIGURA 4.78-A, pode-se ver que no intervalo entre 7,1 a 7,4 minutos há os íons m/z 463 e m/z 485 com retenção cromatográfica similar que o íon de interesse m/z 261, entretanto ao se obter e sobrepor o cromatograma de íon extraído (EIC) para cada um dos íons, é possível ver que o íon m/z 485 provavelmente se trata do aduto de sódio do íon m/z 463 e que tem tempo de retenção diferente do íon m/z 261 em estudo, FIGURA 4.76-B. Ainda na FIGURA 4.78-A também é possível ver os íons referentes à perda de molécula de água (m/z 279) e do aduto de sódio (m/z 319), considerando que a banda

nesse intervalo entre 7,1 a 7,4 minutos está de acordo com o composto 6-gingerdiol (**34**). Os demais valores de m/z mostrados na FIGURA 4.78-A para a banda deste intervalo de 7,1 a 7,4 minutos, provavelmente se tratam dos fragmentos de m/z 261 $[M+H-2H_2O]^+$ discutidos a seguir. Na FIGURA 4.78-B, foram evidenciados os valores dos íons m/z para o intervalo entre 7,5 a 7,6 minutos, indicando a presença do íon aduto de sódio (m/z 319), o íon referente à molécula de 6-gingerdiol (**34**) protonada (m/z 297 $[M+H]^+$), a perda de uma molécula de água (m/z 279) a partir do íon m/z 297, bem como o íon m/z 261 relacionado à perda de duas moléculas de água. Os demais valores de m/z provavelmente se tratam dos fragmentos do íon m/z 261 $[M+H-2H_2O]^+$.

Como as condições em que foram realizados os experimentos de ESI-MS/MS não foram as ideais para se obter os fragmentos a partir do cromatograma de íon extraído (*EIC*) para o íon m/z 261, a FIGURA 4.79-A, traz a sobreposição do cromatograma de íon extraído (*EIC*) para o íon m/z 261, a partir do tratamento por ESI-MS. O cromatograma de íons totais (*TIC*), realça os pontos de 1 a 7 que traz o cromatograma de íon extraído (*EIC*) para o íon m/z 261 em cada ponto no experimento de ESI-MS/MS. Na FIGURA 4.79-B, é possível ver o espectro por ESI-MS/MS, para o ponto 2, o íon 261,25 $[M+H-2H_2O]^+$ que teve o tempo de retenção de 7,3 minutos. Este padrão de fragmentação por ESI-MS/MS, no modo positivo, está de acordo com dados encontrados na literatura, como descreveu LV et al (2012) no estudo de biotransformação de 6-gingerol (**2**) para (3R,5S) e (3R,5S)-6-gingerdiol como principais metabólitos em linhagem de células de câncer de pulmão. No trabalho de LV et al (2012) o equipamento empregado era da Thermo Finnigan e também utilizava o *ion trap* como analisador de massas e a ionização por eletrospray (ESI), mostrando assim o mesmo padrão de fragmentação. Na FIGURA 4.80 pode-se ver o espectro obtido por LV et al (2012) para os padrões comerciais de (3R,5S) e (3S,5S)-6-gingerdiol. Esse resultado da análise por LC-MS (*ion trap*) no modo positivo que leva a propor a estrutura de 6-gingerdiol (**34**) como produto de biotransformação, novamente reitera os dados obtidos por GC-MS obtido anteriormente.



bioms+12.d: +MS2 (261.25), 7.3 min #407, 100%=264242

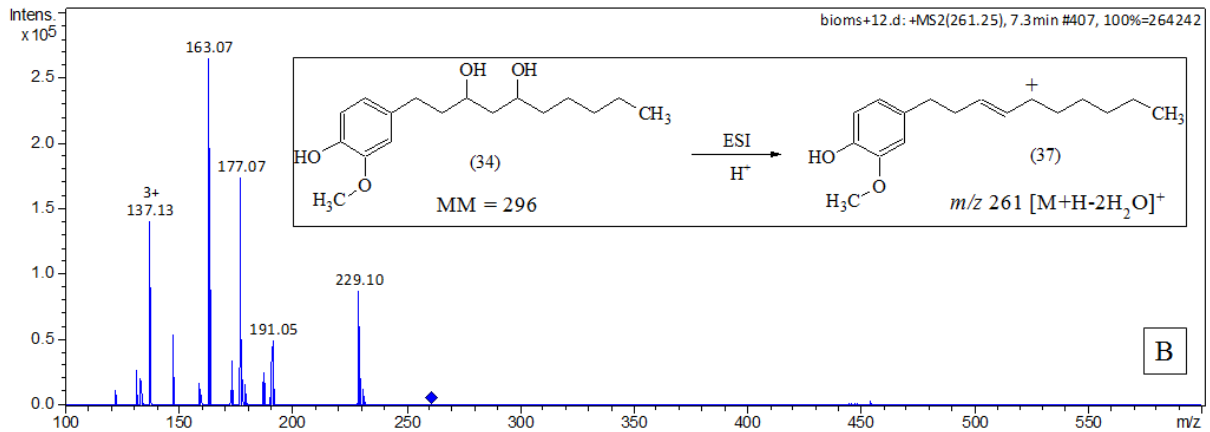


FIGURA 4.79 – (A) Sobreposição do EIC do íon m/z 261 com o TIC da amostra; (B) ESI-MS/MS para o íon m/z 261,25 em 7,3 minutos (C).

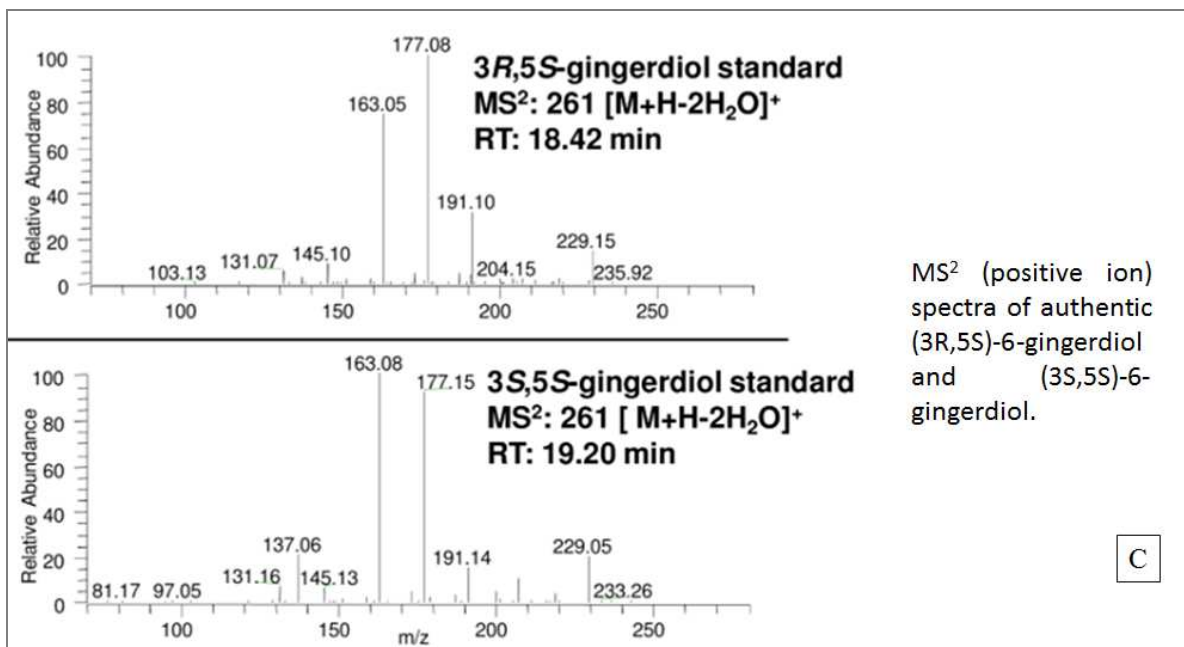


FIGURA 4.80 – Espectro MS² para padrões comerciais de (3R,5S) e (3S,5S)-6-gingerdiol (LV et al, 2012). RT (do inglês Retention Time, Tempo de Retenção).

Entretanto, desde o quinto dia de biotransformação é possível encontrar estas bandas, mas com menor intensidade em relação às demais que compõem a amostra do quinto dia, como se pode ver na FIGURA 4.81 ao se sobrepor o cromatograma do pico base (*BPC*) com o cromatograma de íon extraído (*EIC*) para o íon m/z 291 $[M-1]^-$ e para o íon m/z 293 $[M-1]^-$. De fato, foi a banda em que se encontrou o íon m/z 293 $[M-1]^-$ que se apresentou mais intensa no décimo dia de biotransformação em relação às demais que compõem esta amostra. O experimento de ESI-MS/MS para o íon m/z 291 $[M-1]^-$ mostrou a coeluição do íon m/z 329 quando se obtém os fragmentos da banda no intervalo de 8,6 a 8,8 minutos, FIGURA 4.81-A. No entanto, foi visto que o íon m/z 329 tem tempo de retenção diferente do íon de interesse, o m/z 291 $[M-1]^-$, quando se obtém o seu cromatograma de íon extraído (*EIC*), como mostra a FIGURA 4.81-B.

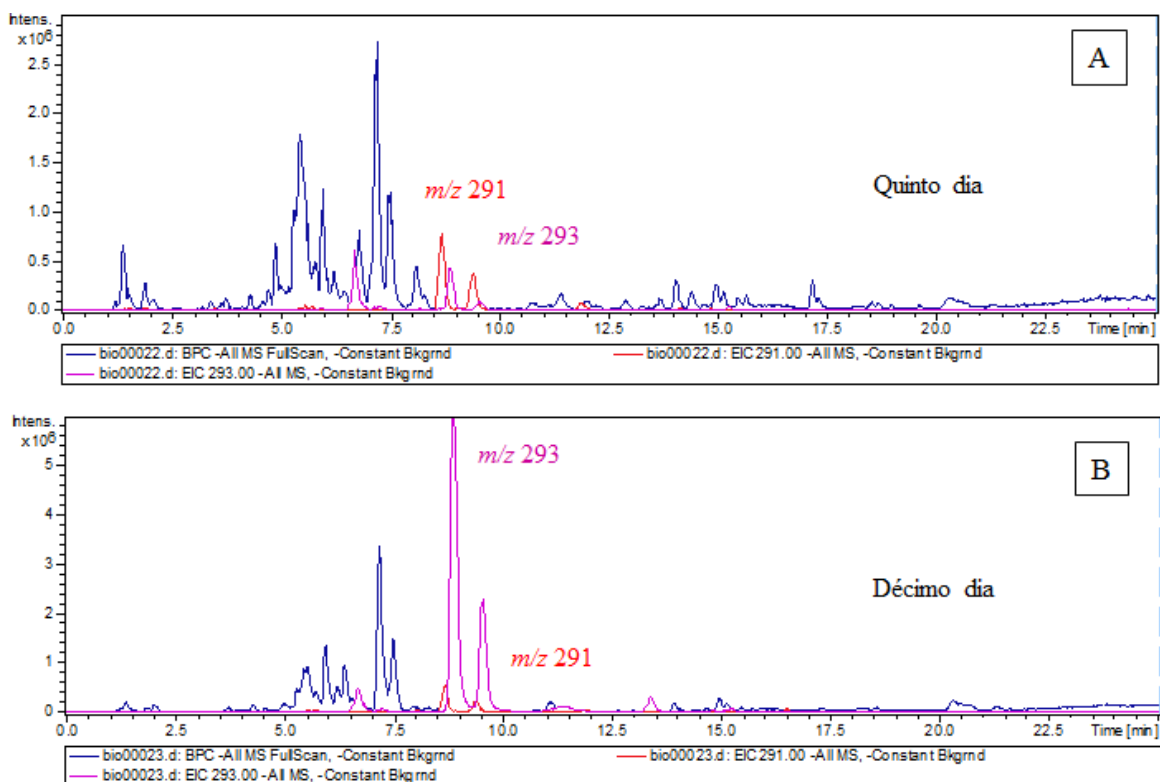


FIGURA 4.81 – Sobreposição do cromatograma do pico base (*BPC*) do quinto (A) e do décimo (B) dia de biotransformação, no modo negativo, com o cromatograma de íon extraído (*EIC*) para o íon m/z 291 $[M-1]^-$ (vermelho) e para o íon m/z 293 $[M-1]^-$.

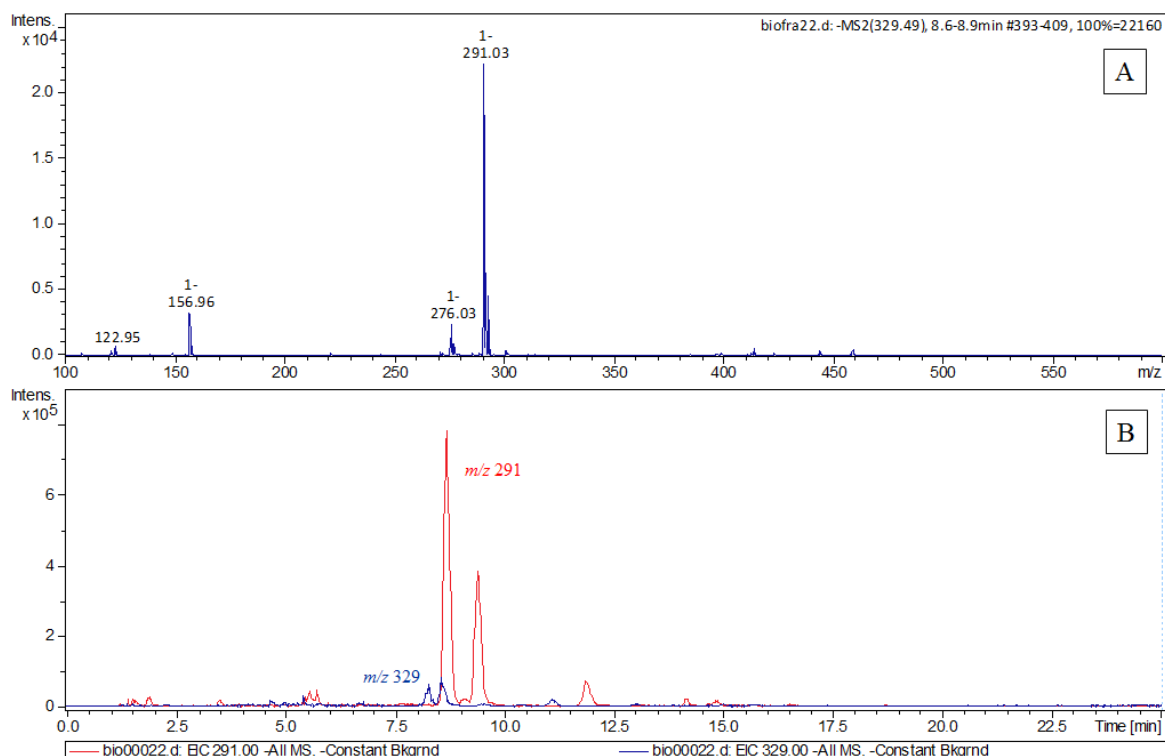


FIGURA 4.82 – ESI-MS/MS para o íon m/z 291 (A); (B) sobreposição do extrato de íon comum (EIC) para o íon m/z 291, e para o íon m/z 329.

O experimento de ESI-MS/MS para o íon m/z 291 $[M-1]^-$ que também se mostrou presente na banda com o intervalo de 9,2 a 9,6 minutos apresentou os fragmentos exibidos na FIGURA 4.83-A. O valor do íon molecular e o padrão de fragmentação mostrado para este íon m/z 291 $[M-1]^-$, está de acordo com a estrutura do éster **33**, obtida pela ação das enzimas que promoveram a reação de Baeyer Villiger sobre a cadeia lateral da estrutura do 6-shogaol (**4**). Esse resultado reitera os dados obtidos através da análise por GC-MS já discutidos. Na FIGURA 4.83-B, encontramos uma proposta para os fragmentos obtidos no experimento por ESI-MS/MS, para a molécula do éster **33**. Os cálculos de estabilidade para a estrutura molecular representada em (A) deverão ser realizados para comprovar a via de fragmentação proposta, FIGURA 4.83-B.

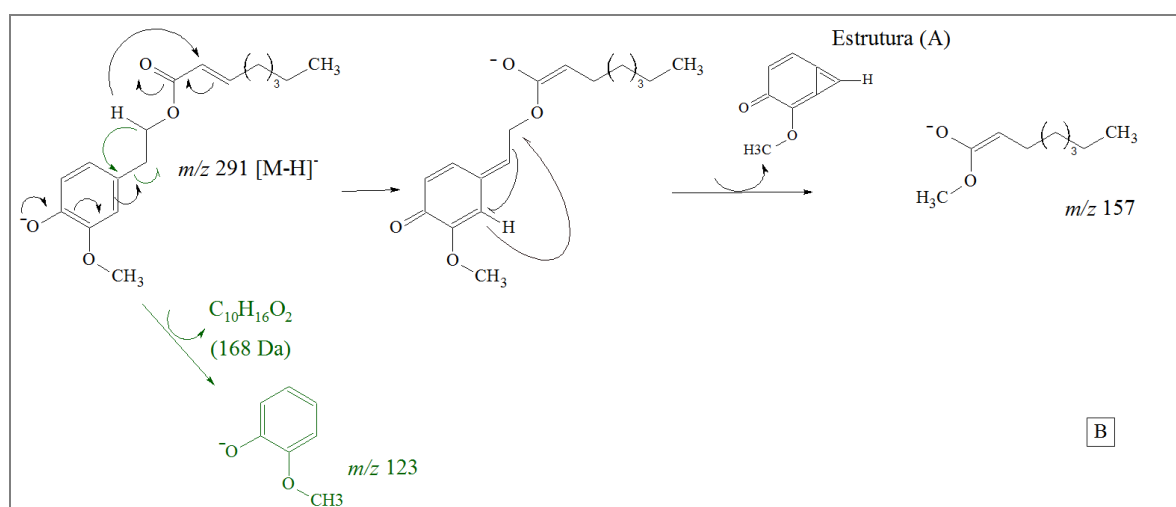
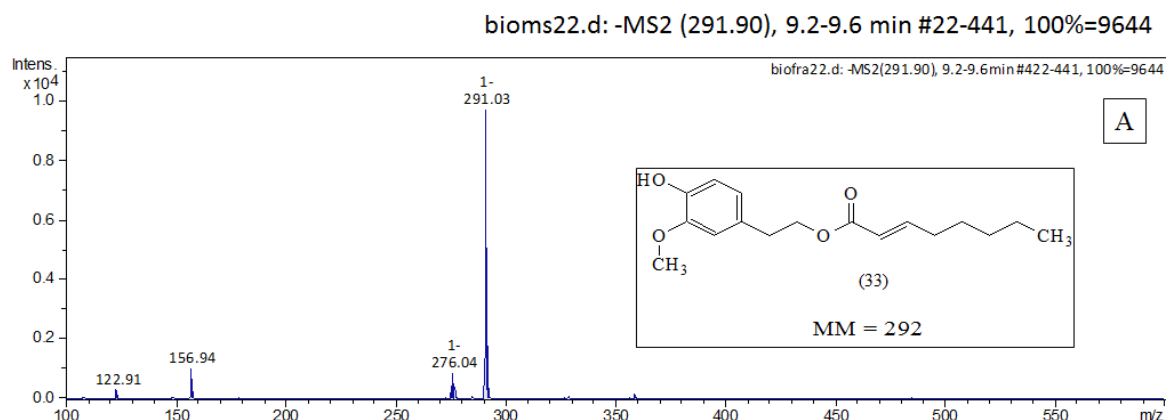


FIGURA 4.83 – (A) ESI-MS/MS para o íon m/z 291 $[M-1]^-$ no intervalo de 9,2 a 9,6 minutos e em (B) uma proposta de fragmentação para a provável estrutura do éster **(33)** obtida por reação de Baeyer Vileger.

Outra proposta para o íon m/z 291, seria reação de oxidação promovida pelas enzimas do fungo *C. gloesporioides* sobre 6-shogaol (**4**), levando a formação de 6-gingerdiona (**34**), como discutido anteriormente. Entretanto, no trabalho de TAO et al., 2009, em que utiliza um equipamento da Micromass Quattro II- Triplo quadrupolo, traz o estudo de *fingerprinting* para suplementos dietéticos contendo gengibre com objetivo de detecção seletiva de compostos relacionados ao gingerol como a 6-gingerdiona (**34**). O experimento de íons produtos, com colisão de dissociação induzida, da molécula de 6-gingerdiona (**34**) desprotonada, trabalhando com a constante de perda neutra de 136 u, mostrou que seu padrão de fragmentação se assemelha mais aos shogaóis, havendo quebra benzílica característica, formando o íon m/z 155 como pico base, como mostra a

FIGURA 4-84. Todavia, este não foi o padrão de fragmentação encontrado para o íon m/z 291 no experimento de ESI-MS/MS como já foi mostrado na FIGURA 4.83 e ao que tudo indica se trata do éster formado a partir da reação de Baeyer Vileger sobre o 6-shogaol (4).

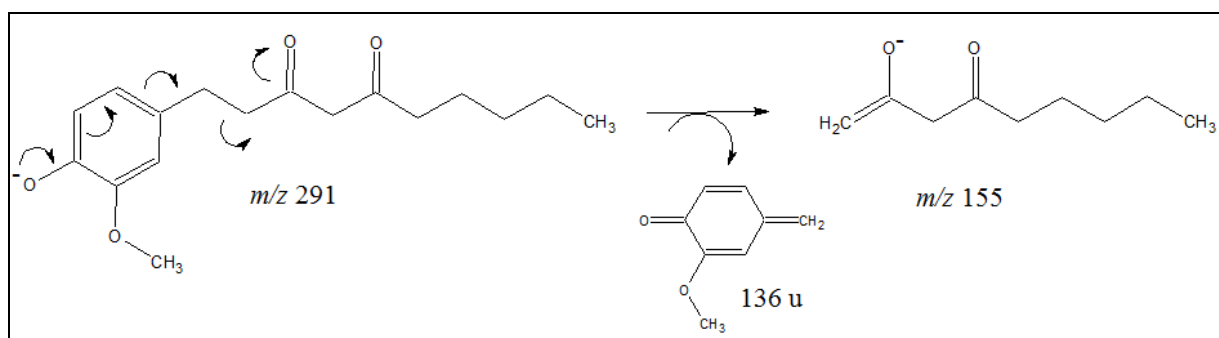


FIGURA 4.84 – Proposta de fragmentação para o íon m/z 291, segundo o trabalho TAO *et al* 2009, formando o pico base m/z 155, caso a 6-gingerdiona (32) fosse um produto de biotransformação do 6-shogaol (4).

4.4 – Reações de semi-síntese

4.4.1 – Obtenção da nova série de éteres de oxima

A metodologia para as reações de semi-síntese, proposta para a obtenção dos novos análogos de éteres de oxima, está ilustrada na FIGURA 4.83. A zingerona (1), produto comercial, foi utilizada como material de partida, sendo submetida à reação de O-alkilação, com o respectivo haleto de alquila, obtendo-se o intermediário sem a hidroxila fenólica (B) (Etapa 1). Seguiu-se com a adição do cloridrato de hidroxilamina em meio básico, gerando o intermediário-chave oxímico (C) (Etapa 2). Este por sua vez, foi submetido à reação com haletos de arila previamente funcionalizados, em meio básico, obtendo-se a nova série dos análogos éteres de oxima (D) (Série A) desejados, FIGURA 4.84.

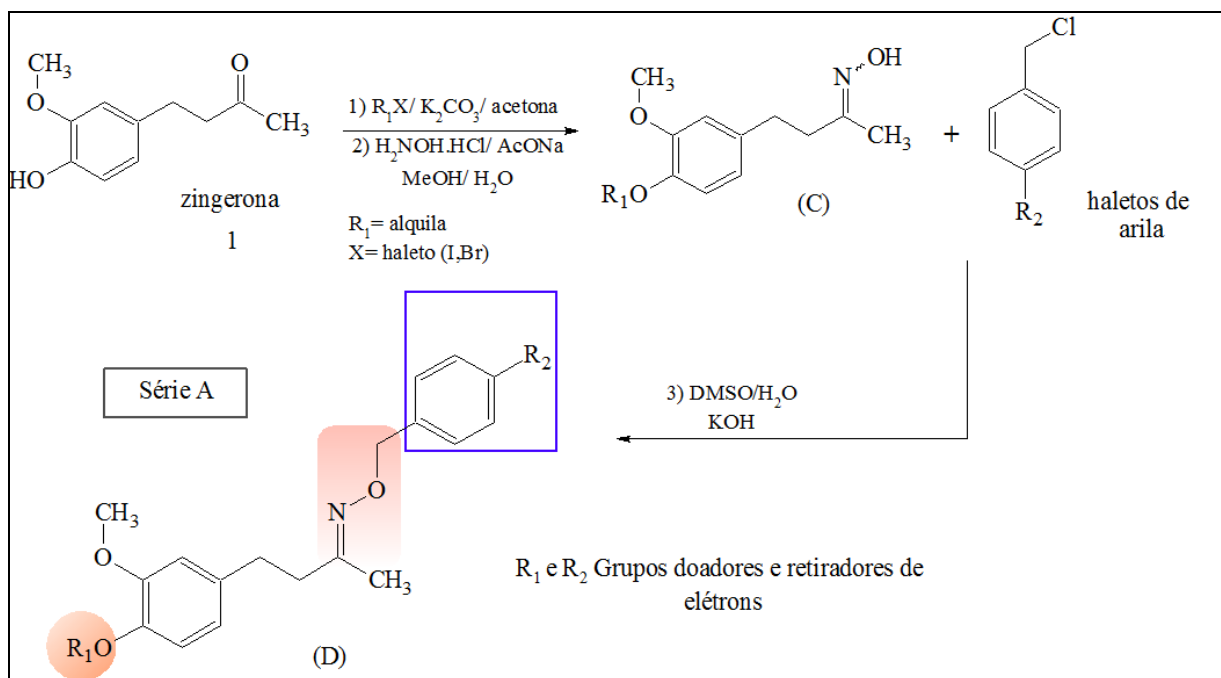


FIGURA 4.84 – Proposta da rota de semi-síntese para a obtenção da nova **Série A** de éteres de oxima (**D**).

A – Reação de O-alkilação da zingerona (1) e obtenção do sililéter (P-55)

A.1 - Obtenção do 4-metilzingerona (P-19)

A zingerona (1) foi convertida em seu derivado metilado, o 4-metilzingerona (**P-19**), utilizando carbonato de potássio (K_2CO_3) e iodeto de metila à temperatura ambiente, sendo que o rendimento da reação foi de 80% (BEZERRA-NETO, 2006, adaptado, apud SILVA, 2010). A zingerona (1) por se tratar de um composto fenólico, na presença de carbonato de potássio (K_2CO_3), atuando como base fraca, foi possível obter o fenóxido de potássio que reagiu com o iodeto de metila, fornecendo o éter 4-metilzingerona (**P-19**) correspondente. A análise por GC-MS mostrou um pico em torno de 25 minutos em que se encontra o íon m/z 208 [M^+] e o pico base característico, o m/z 151.

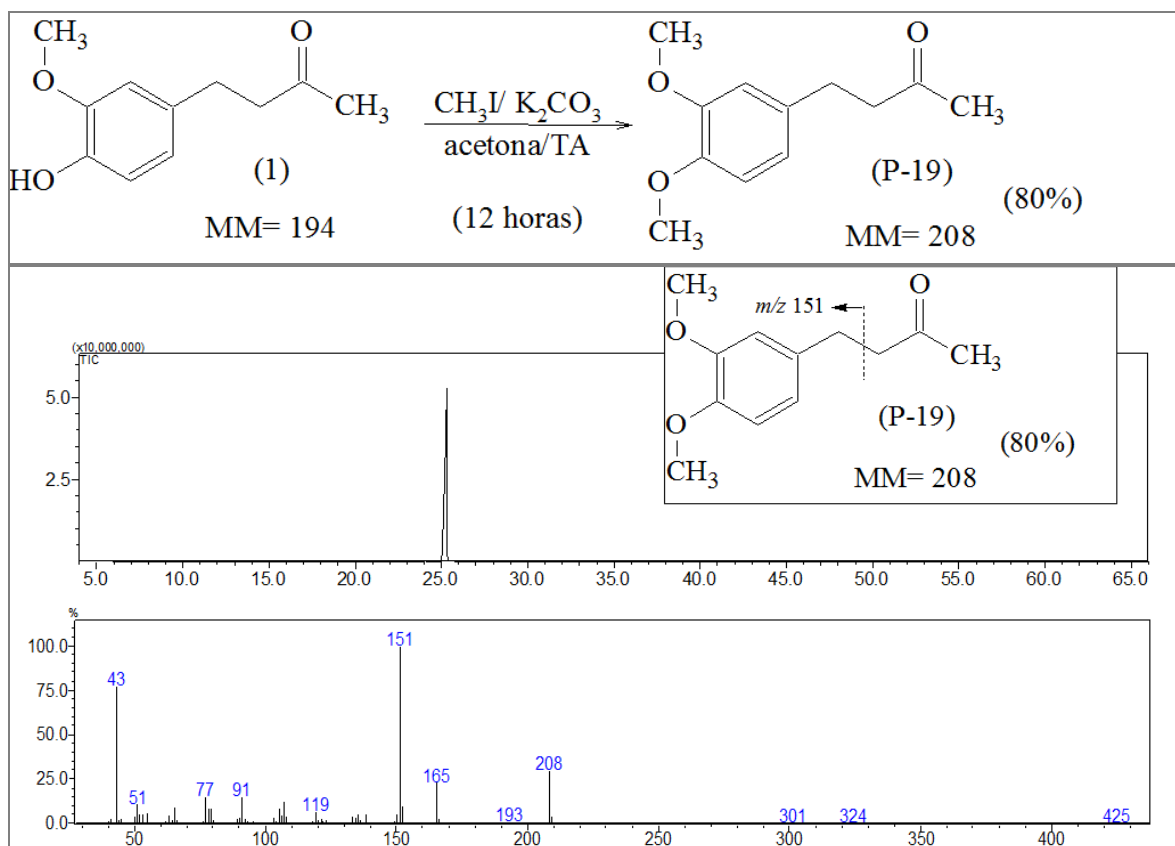


FIGURA 4.85 – Reação para obtenção e análise por CG-MS para o composto 3,4-dimetoxi-zingerona (P-19).

A.2 - Obtenção do 4-etilzingerona (P- 56)

A zingerona (1) foi convertida no derivado 4-etilzingerona (P-56), utilizando também o carbonato de potássio (K₂CO₃) como base fraca, mas o brometo de etila como agente alquilante. A reação seguiu à temperatura ambiente tendo o rendimento de 63% (BEZERRA-NETO, 2006, adaptado, apud SILVA, 2010). A análise do espectro de RMN ¹H mostrou que o produto reacional foi alcançado, sendo que se evidenciou o sinal em 1,45 ppm, cuja área sob tripleto foi de 3, indicando o H-8' da estrutura P-56 na FIGURA 4.86. Além do mais, o sinal em 4,07 ppm cuja área sob o quarteto foi de 2, indicou o H-7' da estrutura, mostrando que a hidroxila fenólica do material de partida foi alquilada.

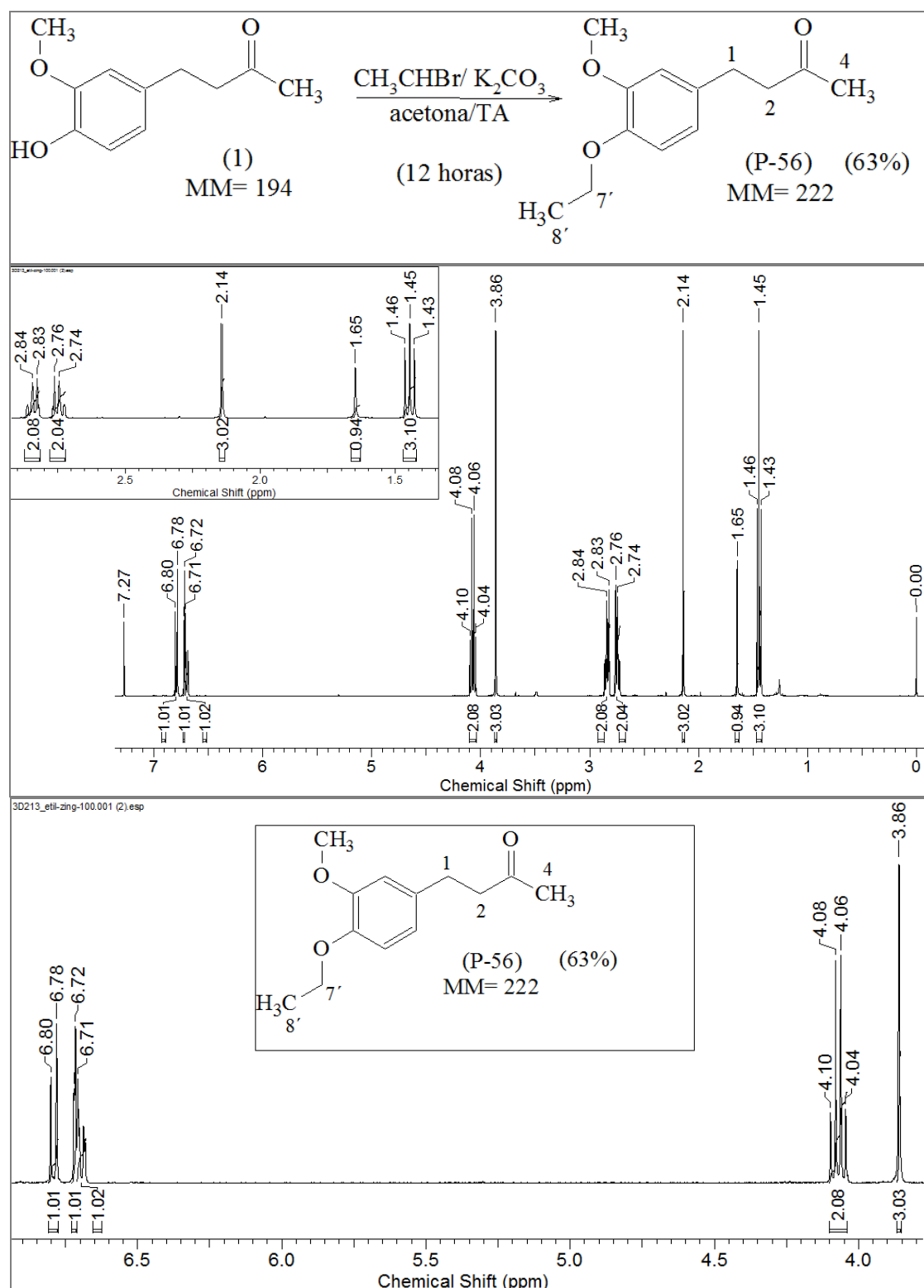
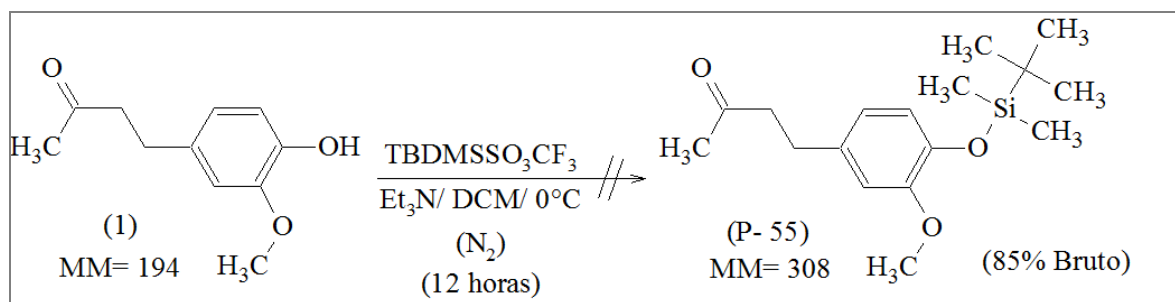


FIGURA 4.86 – Reação para a obtenção do composto 4-etilingerona (**P56**) e espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 400 MHz).

Os demais sinais característicos da estrutura também foram vistos no espectro de RMN ^1H , como o singleto em 2,14 ppm integrando para 3 hidrogênios, relacionado com os hidrogênios H-4 da metila ligada diretamente à carbonila. Os hidrogênios, H-1 e H-2, dos grupos metilenos (CH_2), apareceram em 2,74 e 2,84 ppm e os hidrogênios do grupamento metoxila um singleto em 3,86 ppm integrando para 3. Na região de hidrogênios aromáticos, foi possível observar três sinais, todos integrando para um hidrogênio cada, como ocorreu com o dubleto em 6,79 ppm com padrão de acoplamento *orto* ($J = 8,0$ Hz) indicando o hidrogênio em H-5', bem como o dubleto em 6,72 ppm do H-2' que chega a se sobrepor com o duplo dupleto em 6,70 ppm, com acoplamento *orto* ($J = 8,0$ Hz) e *meta* ($J = 2,0$ Hz), relacionado com hidrogênio em H-6'. Este conjunto de sinais caracteriza o anel aromático trissubstituído como mostrado na estrutura **P-56** representada na FIGURA 4.86.

A.3 – Obtenção do O-t-butil-dimetilsililzingenona (P-55)



O uso de triflato de t-butil-dimetilsilano (TBDMOTf ou $\text{TBDMSSO}_3\text{CF}_3$) como agente de sililação é largamente empregado na proteção de hidroxilas em álcoois secundários (VIEGAS JR., 2003). Possui um caráter altamente eletrofílico que favorece a proteção de grupos hidroxila pouco reativos, apesar de não ser o caso da hidroxila fenólica a ser protegida e que está presente no material de partida. Entretanto, foi o reagente de sililação mais facilmente disponível no momento em que a reação foi executada, bem como viável a ser utilizado, sem apresentar degradação. A ideia era avaliar, após a síntese final da nova Série A de éter de oxima (D), se as condições de desproteção do grupamento hidroxila degradaria a molécula final, FIGURA 4.87. A reação para se obter o éter de silício **P-55** não foi muito bem elaborada e acompanhada, sendo que a análise por CCD não mostrou a conversão do material de partida.

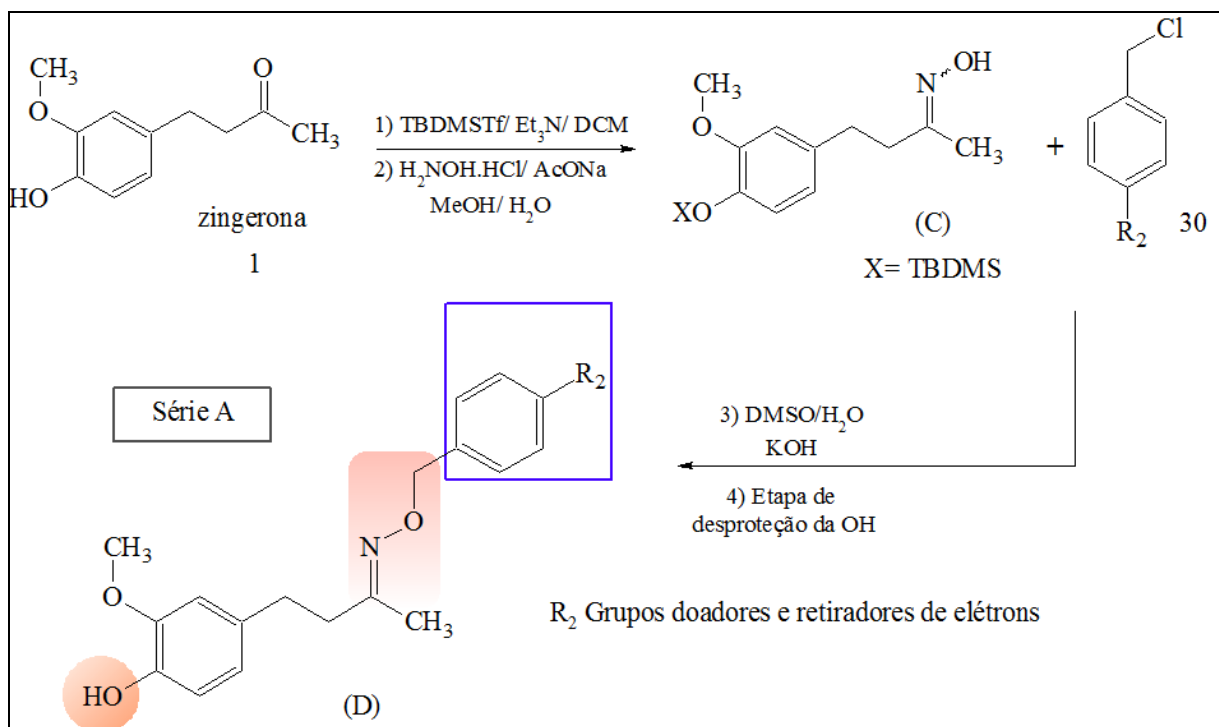
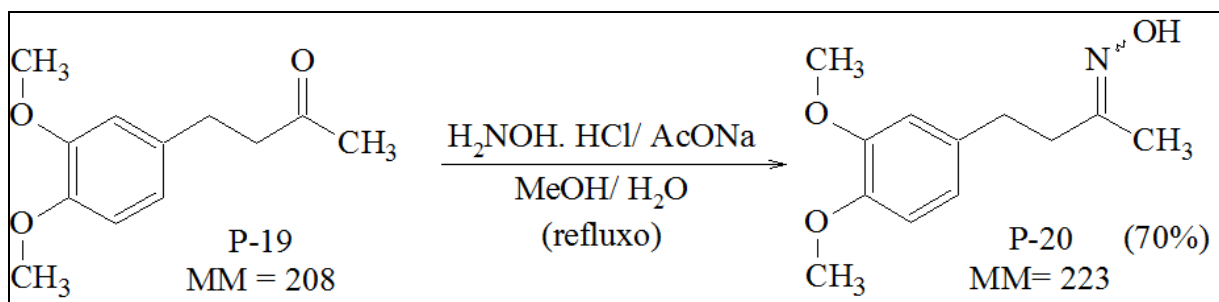


FIGURA 4.87 – Proposta da rota de semi-síntese da nova **Série A** de éter de oxima (D) com o grupamento hidroxila (OH) livre.

B – Reação para a obtenção do intermediário-chave oximínico (P-20)



Devido ao carácter eletrofílico da carbonila cetônica da zingerona (1), foi possível realizar uma reação de adição de cloridrato de hidroxilamina. As oximas têm como característica a presença de uma ligação dupla carbono-nitrogênio e portanto, podem possuir isomeria geométrica (MORRISON e BOYD, 1973 apud SANTOS, 2006). Na literatura encontram-se vários autores que utilizaram a metodologia clássica para a preparação de oximas, em que se emprega o cloridrato de hidroxilamina em meio básico (SAEED et al., 2004; ROSSELLO et al., 2002; BULL et al., 1980 apud SANTOS,

2006). Após purificação por cromatografia em coluna, o intermediário **P-20** foi obtido com 70% de rendimento, sendo que o produto foi obtido como uma mistura de diastereoisômeros (*E/Z*) numa razão aproximada de 3:1, considerando apenas a comparação da área dos picos, sendo necessária a quantificação para um resultado mais exato. Entretanto encontram-se na literatura extensos estudos descrevendo a fotoisomerização e a termoisomerização de oximas (BROWN et al., 1983; SUGINOME, 2004 apud SANTOS, 2006), e dessa forma, os resultados obtidos por GC-MS não são válidos para quantificar a razão de diastereoisômeros obtidos em mistura. A literatura também reporta que para oximas, o diastereoisômero mais estável (termodinâmico) é o *E*, e que nas reações de isomerização prevalece a sua formação (BROWN et al., 1983 apud SANTOS, 2006).

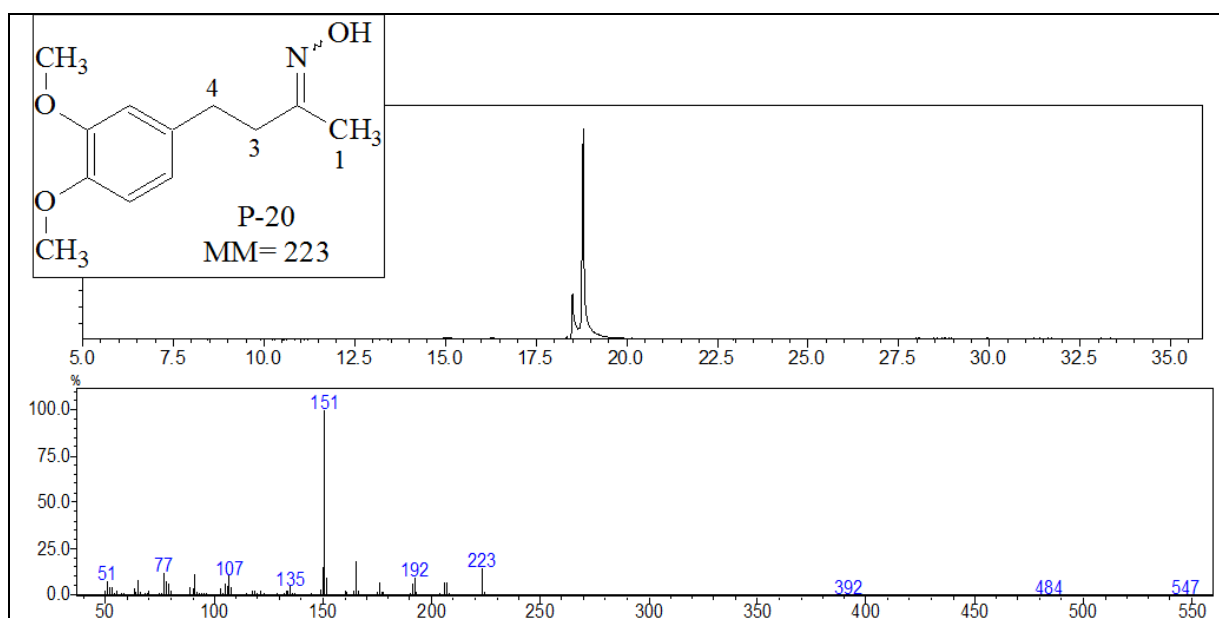


FIGURA 4.88 – Análise por GC-MS para o intermediário oximínico **P-20**.

Dos dados no espectro de RMN de ^1H da mistura de diastereoisômeros da oxima **P-20**, foi possível observar a presença dos dois estereoisômeros e o efeito anisotrópico dos pares de elétrons do átomo de oxigênio sobre os demais prótons vizinhos, principalmente deslocando os sinais para regiões mais blindadas. O sinal dos hidrogênios H-1, da metila ligada diretamente ao carbono imínico, deveria aparecer como um singleto integrando para 3H, se fosse apenas um diastereoisômero isolado. Entretanto, na FIGURA 4.89, pode-se verificar que como se trata de uma mistura, ocorreu o desdobramento do sinal com valores de deslocamento de 1,91 e 2,01 ppm.

Ao se fazer a relação entre as áreas é possível ver que há a prevalência de um diateroisômero em relação ao outro numa proporção de 3:1. Os prótons em H-3 e H-4, dos grupos metilenos (CH₂), apareceriam como dois sinais cada um integrando para 2, mas a mistura da oxima **P-20** mostrou novamente o desdobramento do sinal, sendo que aquele que apareceu em torno de 2,78 ppm, a área sob o pico foi aproximadamente 2, mas o sinal do outro grupo metileno sofreu maior efeito dos pares de elétrons do oxigênio, aparecendo em torno de 2,66 e 2,51 ppm, cuja área integrou para 0,56 e 1,41, respectivamente. A região característica de hidrogênios de grupo metoxila, que normalmente ocorre em torno de 3,85 ppm, apareceria como um singlete, cuja área integraria para 6, por se tratar de uma molécula dimetoxilada, e isto foi o que se observou, dois sinais que integraram para 6 hidrogênios. Na região de hidrogênios aromáticos, foi possível ver um conjunto de sinais sobrepostos, no intervalo de 6,79 a 6,70 ppm, cuja área total integrou para 3, não sendo possível identificar o padrão de acoplamento de cada próton, FIGURA 4.91.

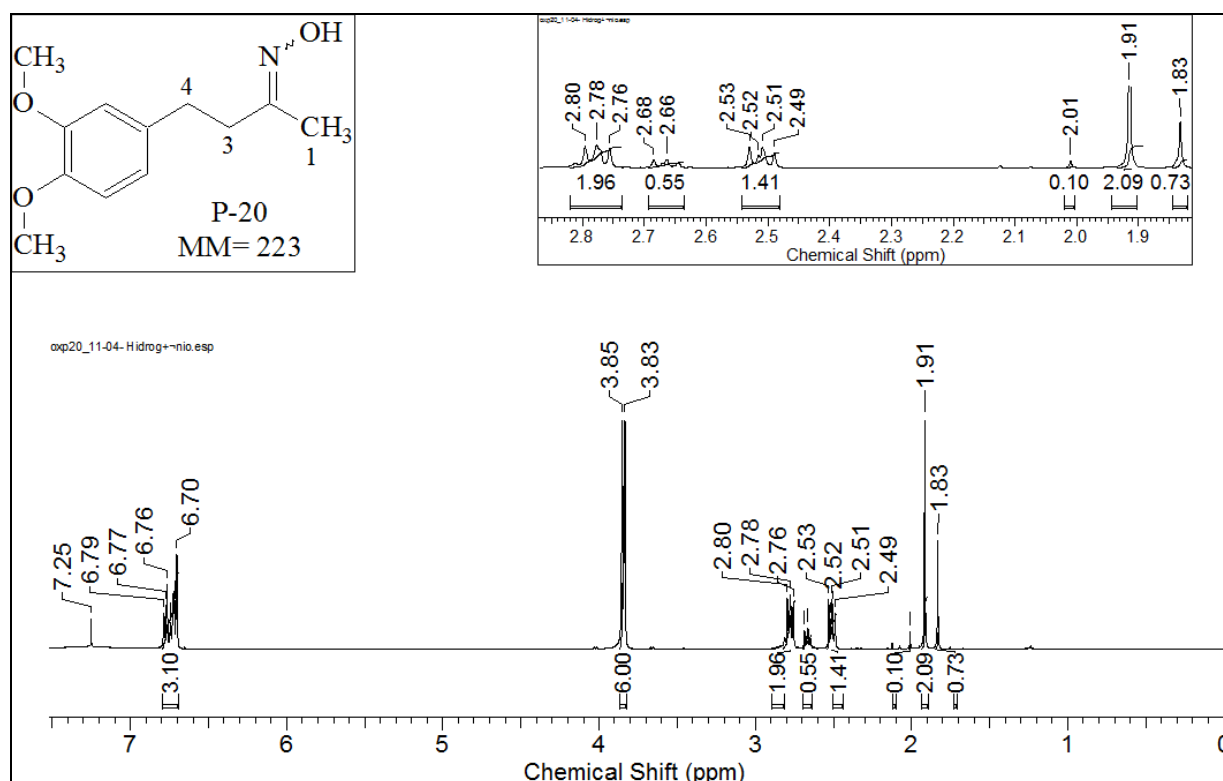


FIGURA 4.89 – Análise por RMN de ¹H (CDCl₃, 400 MHz) do intermediário oxímico **P-20** evidenciando a região mais blindada do espectro.

No espectro RMN de ^{13}C , foi possível ver os sinais característicos da estrutura do intermediário-chave P-20, sendo que o sinal com deslocamento em torno de 159 ppm foi atribuído ao carbono imínico, aparecendo dois sinais, um para cada isômero. No intervalo de deslocamento que vai de 148 a 111 ppm apareceram seis picos correlacionados com os átomos de carbono do anel aromático e os dois picos em torno de 55 ppm que se referem aos carbonos dos grupamentos metoxilas. Na região de deslocamento químico em que aparecem os carbonos com hibridização sp^3 também é possível ver a duplicação dos sinais evidenciando a mistura de diastereoisômeros.

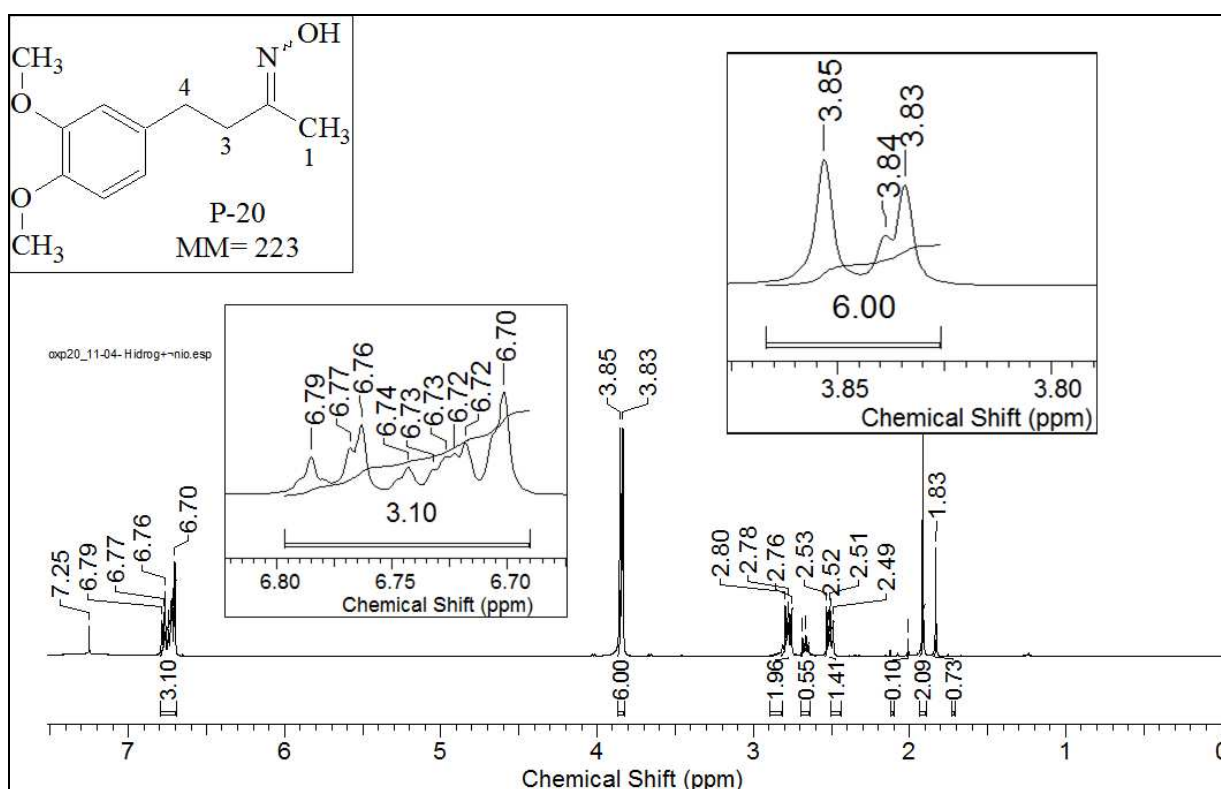


FIGURA 4.90 – Análise por RMN de ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) do intermediário oximínico **P-20** evidenciando as regiões mais desblindadas do espectro.

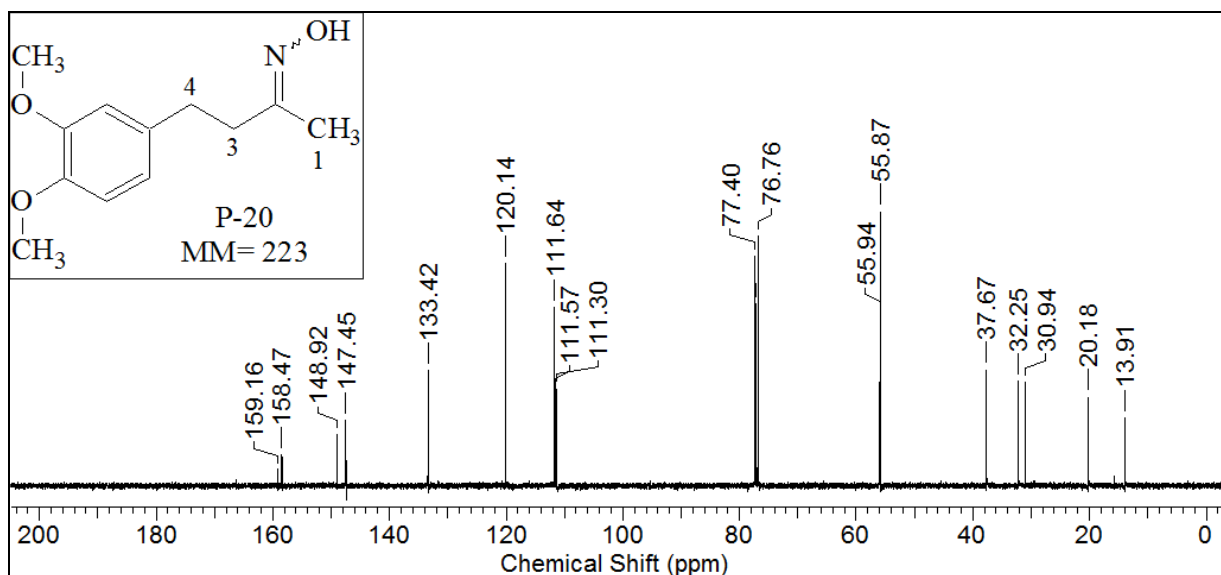


FIGURA 4.91 – Espectro de RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 400 MHz) do intermediário oximínico **P-20**.

C – Reação para se obter a nova Série A dos éteres de oxima (D)

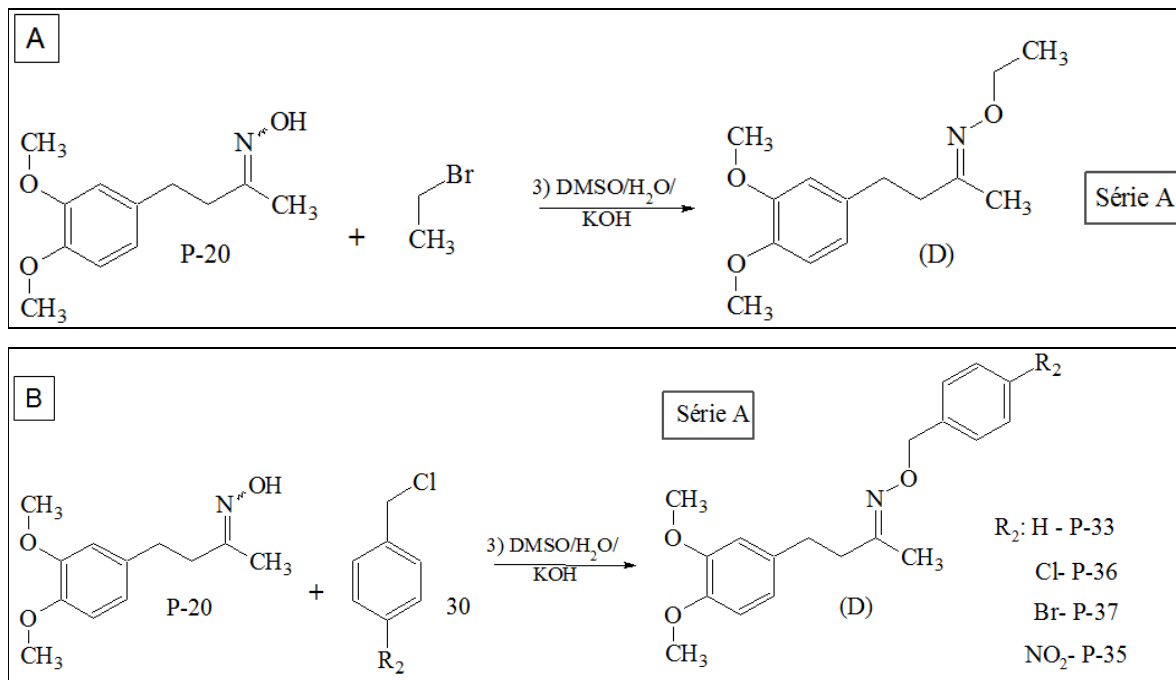
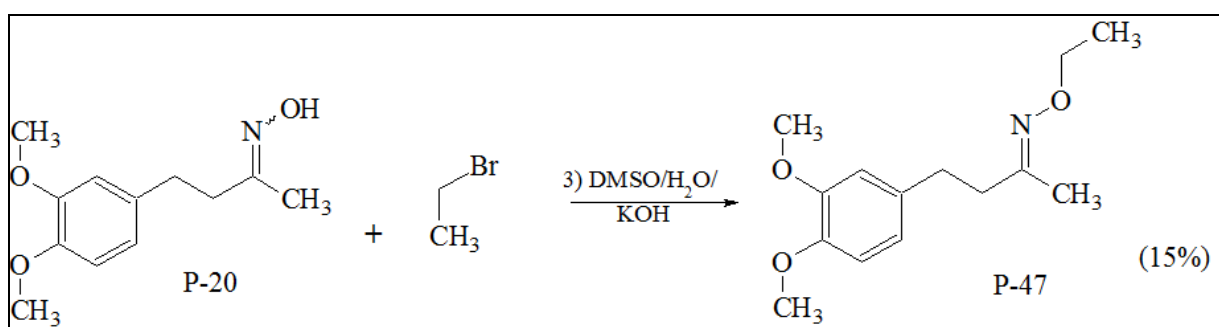


FIGURA 4.92 – Esquema reacional para obtenção dos éteres de oxima (**Série A**).

A última etapa de semi-síntese, a fim de alcançar a Série A de éteres de oximas (D) planejados, FIGURA 4.92, foi feita promovendo uma reação de substituição nucleofílica entre o haleto de alquila ou benzila e a hidroxila da função oxima (**P-20**). As reações de acoplamento foram realizadas em DMSO/H₂O (8:2) a temperatura ambiente na presença de KOH, por períodos que variaram de 3 a 12 horas (LI, C. B. et al., 2002 apud SILVA, 2010).

C.1 – Obtenção do etil éter de oxima (**P-47**)



A obtenção do etil éter de oxima **P-47** foi realizada através de uma reação de acoplamento, utilizando o brometo de etila e a oxima **P-20** como reagentes na proporção estequiométrica de 1:5, sendo que o rendimento final foi de apenas 15%, devido à dificuldade de solubilização do produto reacional bruto em solventes orgânicos e posterior purificação em coluna sendo obtido um óleo incolor. É provável que seja necessária uma melhor etapa de esgotamento e extração envolvendo, por exemplo, ajuste de pH, afim de melhorar o rendimento reacional, bem como ajustar a proporção estequiométrica dos reagentes. A FIGURA 4.93 traz a análise por GC-MS, em que se pode ver a isomeria geométrica envolvendo a ligação carbono nitrogênio, tendo-se dois picos com tempo de retenção de aproximadamente 13,7 e 13,9 minutos, em que se encontra o m/z 251 [M^+] e o pico base m/z 151.

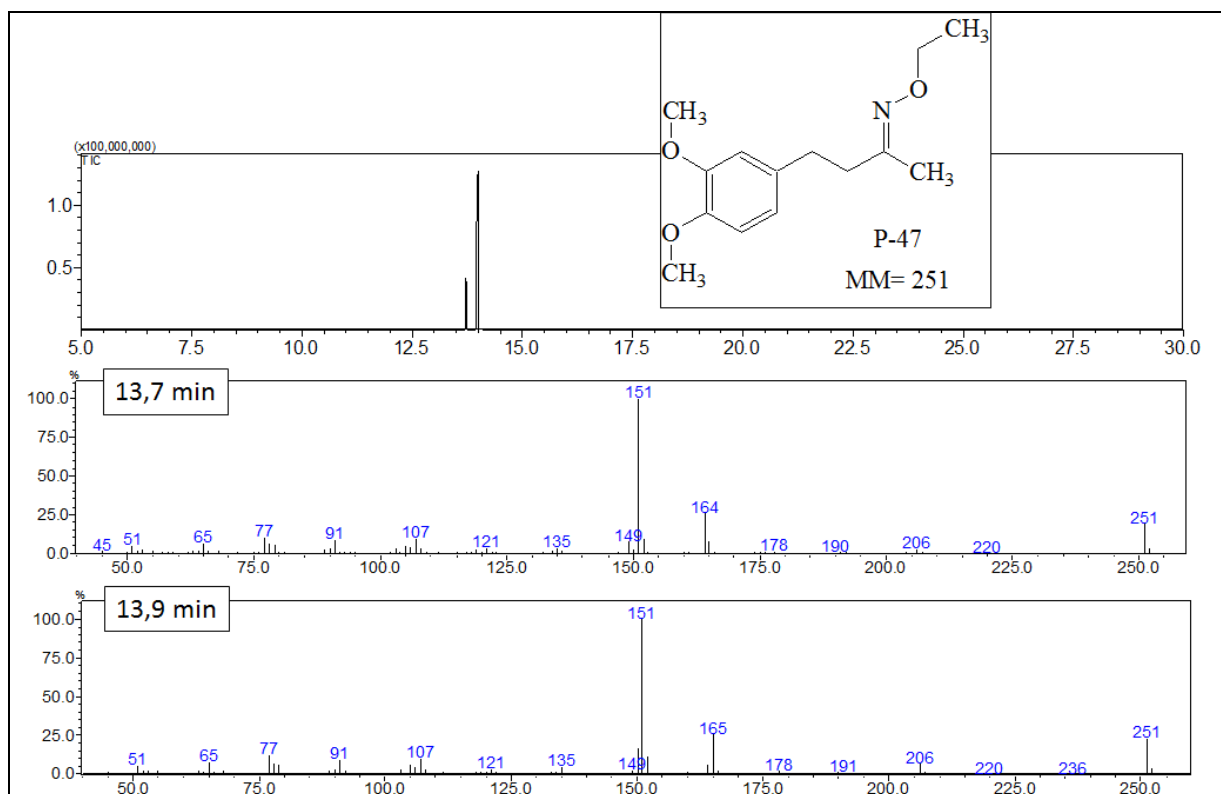


FIGURA 4.93 – Análise por GC-MS do composto etil éter de oxima **P-47**.

A análise do espectro de RMN de ^1H da mistura diastereoisomérica do produto reacional mostrou o sinal de hidrogênio do grupo metileno em C-5 em torno de 4,08 ppm bem como tripleto em 1,25 ppm relacionado com os hidrogênios da metila em C-6, indicando a formação do etil éter de oxima (**P-47**). Os demais sinais da estrutura puderam ser vistos evidenciando-se o efeito dos pares de elétrons do átomo de oxigênio sobre os prótons vizinhos desdobrando os sinais.

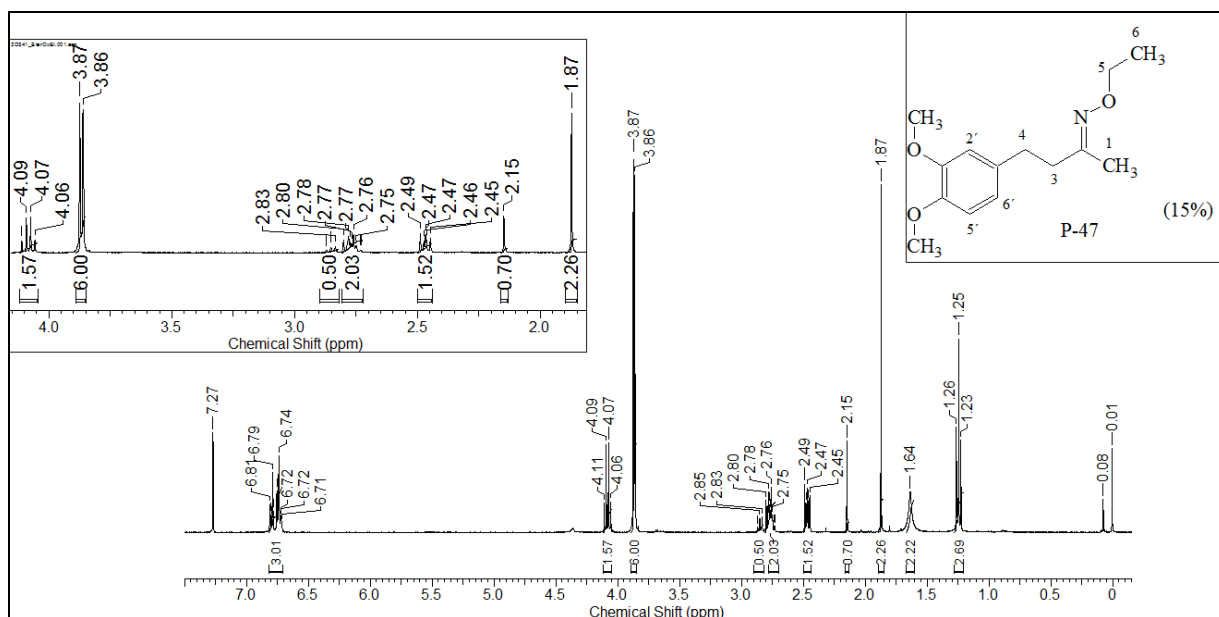


FIGURA 4.94 – Análise por RMN ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) da mistura de diastereoisômeros do etil éter de oxima **P-47**.

No espectro RMN de ^{13}C , foi possível verificar os sinais característicos da estrutura do produto **P-47**, sendo que o deslocamento com valor de 156 ppm está correlacionado ao carbono imínico (C-2). No intervalo de deslocamento que vai de 147 a 111 ppm apareceram seis picos que foram atribuídos aos átomos de carbono do anel aromático e os dois sinais em torno de 55 ppm se referem aos carbonos dos grupamentos metoxilas. Outro pico em 69 ppm está correlacionado com o metileno diretamente ligado ao átomo de oxigênio (C-5). Na região de deslocamento químico em que aparecem os carbonos com hibridização sp^3 é possível ver a duplicação dos sinais indicando uma mistura de diastereoisômeros apesar do sinal relacionado com o carbono imínico ter sido único. Os picos em 14,97 e 14,63 ppm provavelmente estão correlacionados os com os carbonos das metilas em C-1 e C-6.

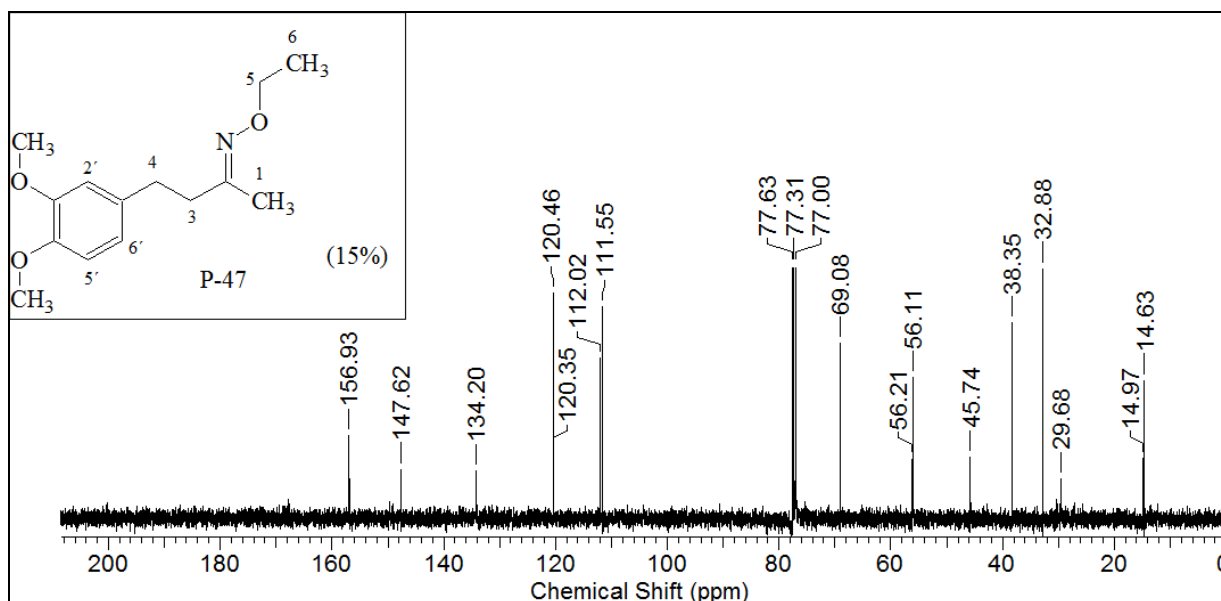
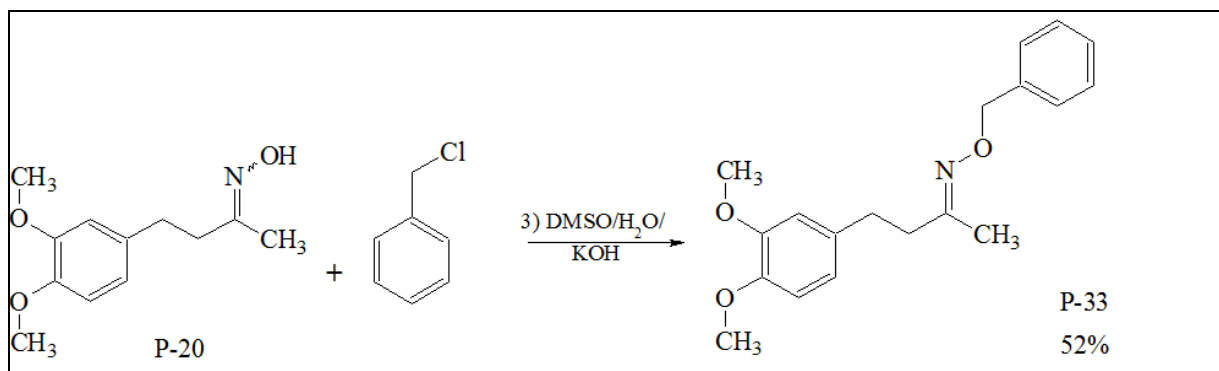


FIGURA 4.95 – Espectro de RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 400 MHz) do composto etil éter de oxima (**P-47**).

C.2 – Obtenção do (2*E/Z*)-*N*-(benziloxi)-4-(3,4-dimetoxifenil)butan-2-imina (**P-33**)



A obtenção do (2*E/Z*)-*N*-(benziloxi)-4-(3,4-dimetoxifenil)butan-2-imina (**P-33**) foi realizada através de uma reação de acoplamento, utilizando o cloreto de benzila e a oxima **P-20** como reagentes na proporção estequiométrica de 1:5. O produto reacional, sendo um óleo laranja foi obtido com 52% de rendimento. A FIGURA 4.96 traz a análise por GC-MS em que o pico com tempo de retenção de aproximadamente 26,0 minutos, se encontra o m/z 313 [M^+] e o pico base m/z 151 característico.

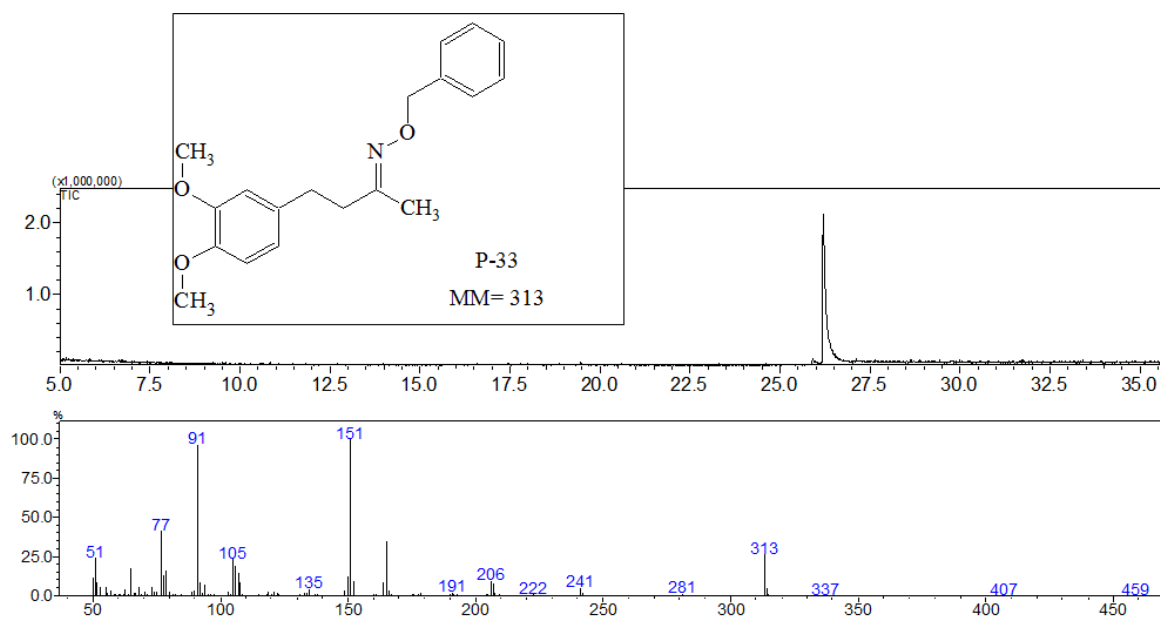


FIGURA 4.96 – Análise por GC-MS para o composto éter de oxima **P-33**.

Dos dados observados no espectro de RMN de ^1H da mistura de diastereoisômeros do éter de oxima **P-33**, foi possível observar a presença do sinal dos hidrogênios do grupo metileno H-5 em aproximadamente 5,0 ppm, que confirma a formação da ligação éter, FIGURA 4.97. Este sinal se mostra duplicado, mostrando a interferência dos pares de elétrons do átomo oxigênio sobre os prótons vizinhos e que há formação de um estereoisômero majoritariamente após purificação do produto reacional. Na região de hidrogênios aromáticos, foi possível ver além dos três sinais 6,83; 6,81 e 6,72 ppm todos integrando para um hidrogênio cada, que caracteriza o anel aromático trissubstituído, também foi possível ver em torno de 7,24 a 7,35 ppm, cuja área integra para cinco, os prótons do anel monossustituído da molécula, FIGURA 4.98. Nas regiões mais blindadas do espectro, é possível ver a duplicação dos sinais dos prótons H-3 e H-4 da mistura de diastereoisômeros, em torno de 2,76 e 2,42 ppm; em 1,86 ppm cuja área sob pico dá 3 está o sinal dos prótons H-1 da metila do composto **P-33**, FIGURA 4.99.

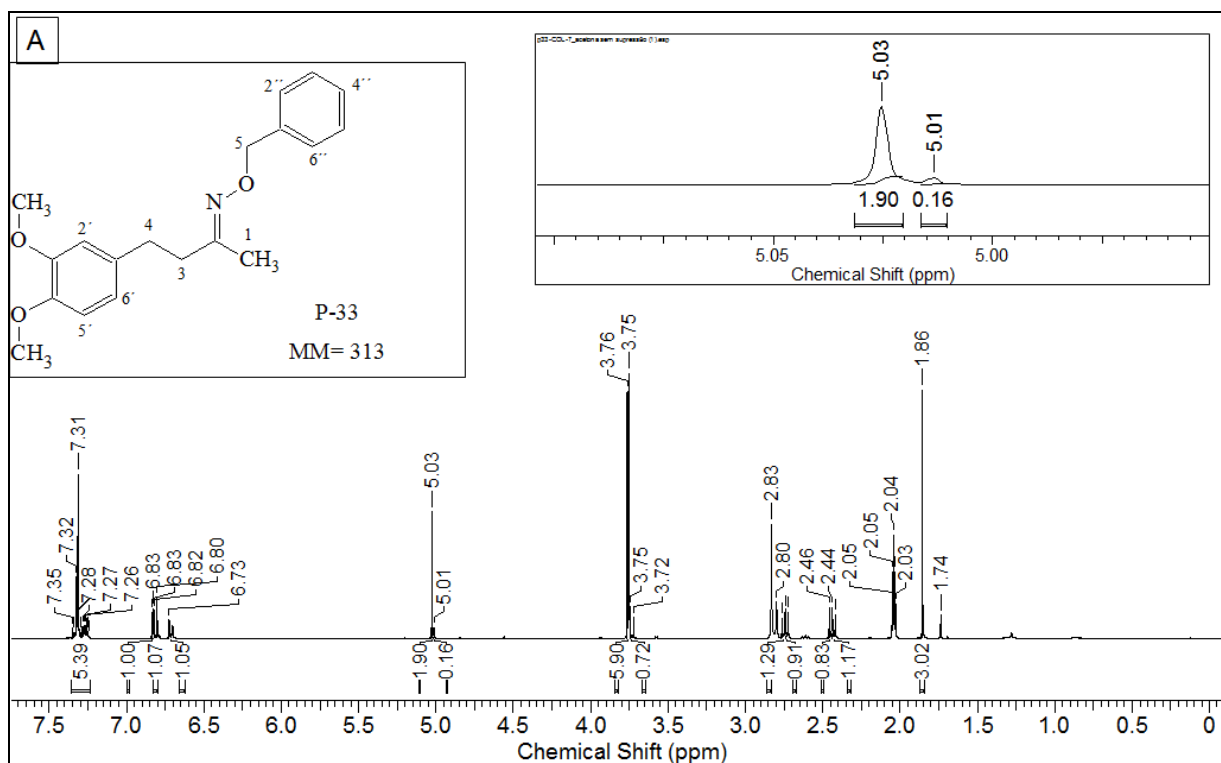


FIGURA 4.97 – Espectro de RMN de ^1H (Acetona-d, 400 MHz) para o composto éter de oxima P-33.

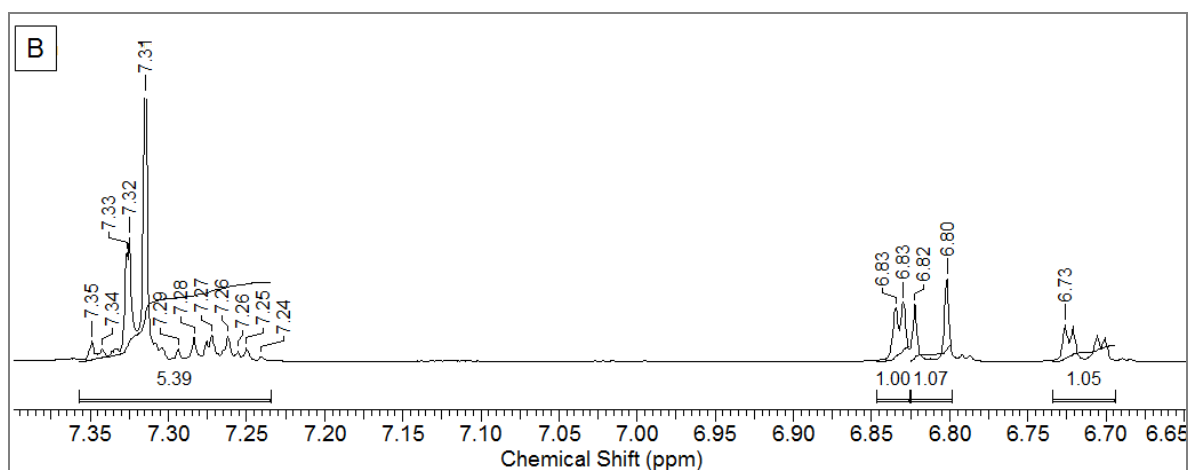


FIGURA 4. 98 – Região de hidrogênios aromáticos do espectro de RMN de ^1H (Acetona-d₆, 400 MHz) para o composto éter de oxima P-33.

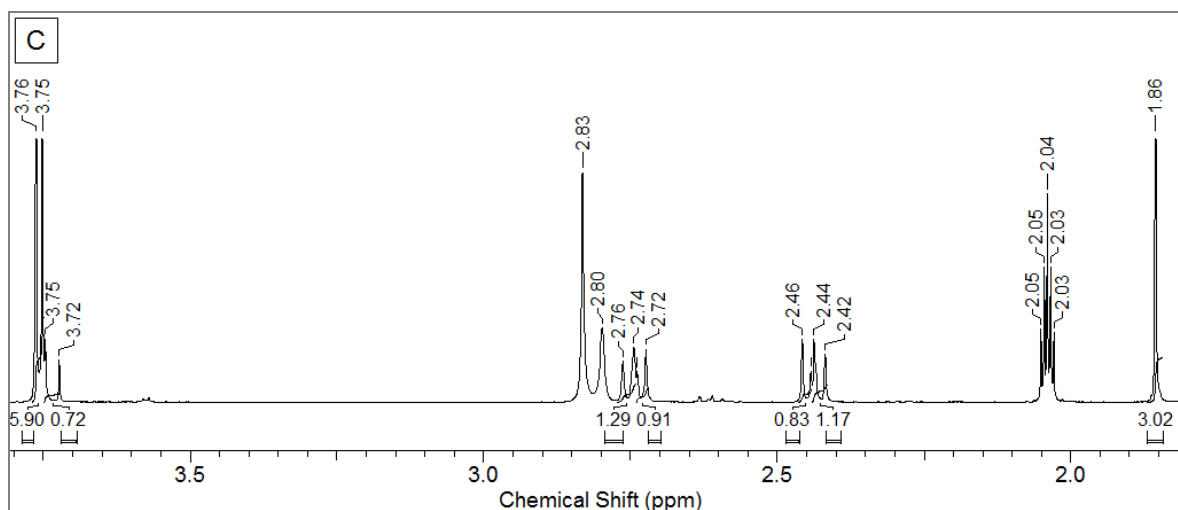


FIGURA 4.99 – Regiões mais blindadas do espectro de RMN de ^1H (Acetona- d_6 , 400 MHz) para o composto éter de oxima **P-33**.

No espectro RMN de ^{13}C , foi possível verificar os sinais característicos da estrutura do produto **P-33**, sendo que o deslocamento com valor de 157 ppm está correlacionado ao carbono imínico (C-2). No intervalo de deslocamento que vai de 148 a 111 ppm apareceram os picos que foram atribuídos aos átomos de carbono dos dois anéis aromáticos da molécula **P-33** e os dois sinais em torno de 55 ppm se referem aos carbonos dos grupamentos metoxilas. Outro pico em 75 ppm está correlacionado com o metileno diretamente ligado ao átomo de oxigênio (C-5). Na região de deslocamento químico em que aparecem os carbonos com hibridização sp^3 pode-se ver os picos em 37, 32 e 14 ppm correlacionados os com os carbonos C-3, C-4 e C-1.

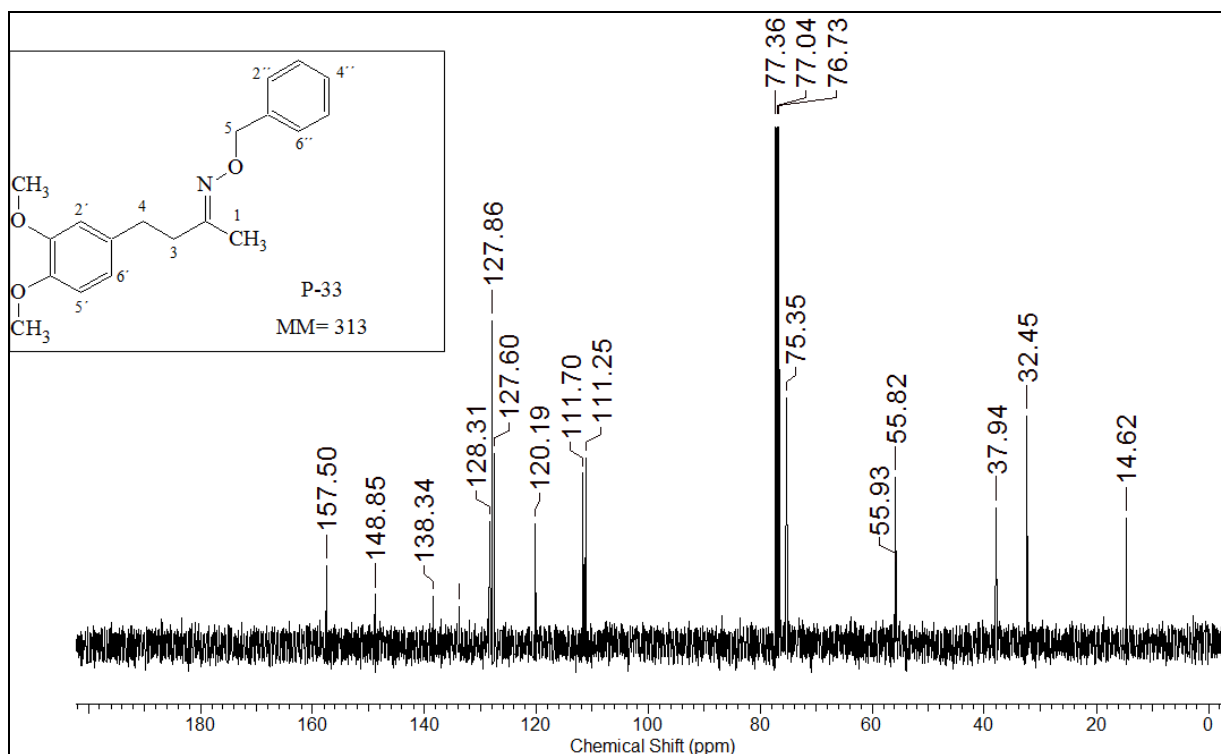
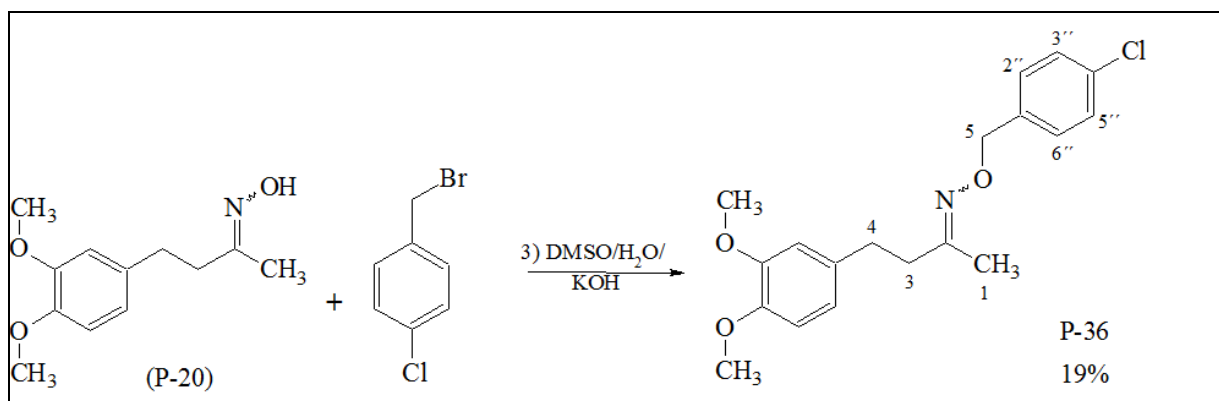


FIGURA 4.100 – Espectro de RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 400 MHz) para o composto éter de oxima **P-33**.

C.3 – Obtenção do (2E/Z)-N-(4-clorobenziloxi)-4-(3,4-dimetoxifenil)butan-2-imina (**P-36**)



A obtenção do (2E/Z)-N-(4-clorobenziloxi)-4-(3,4-dimetoxifenil)butan-2-imina (**P-36**) foi realizada através de uma reação de acoplamento, utilizando o brometo de *para*-cloro benzila e a oxima **P-20** como reagentes na proporção estequiométrica de 1:2. A

FIGURA 4.101 traz a análise por GC-MS em que o pico com tempo de retenção de aproximadamente em 27,1 e 27,3 minutos, se encontra o m/z 347 [M^+] e o pico base m/z 151 característico.

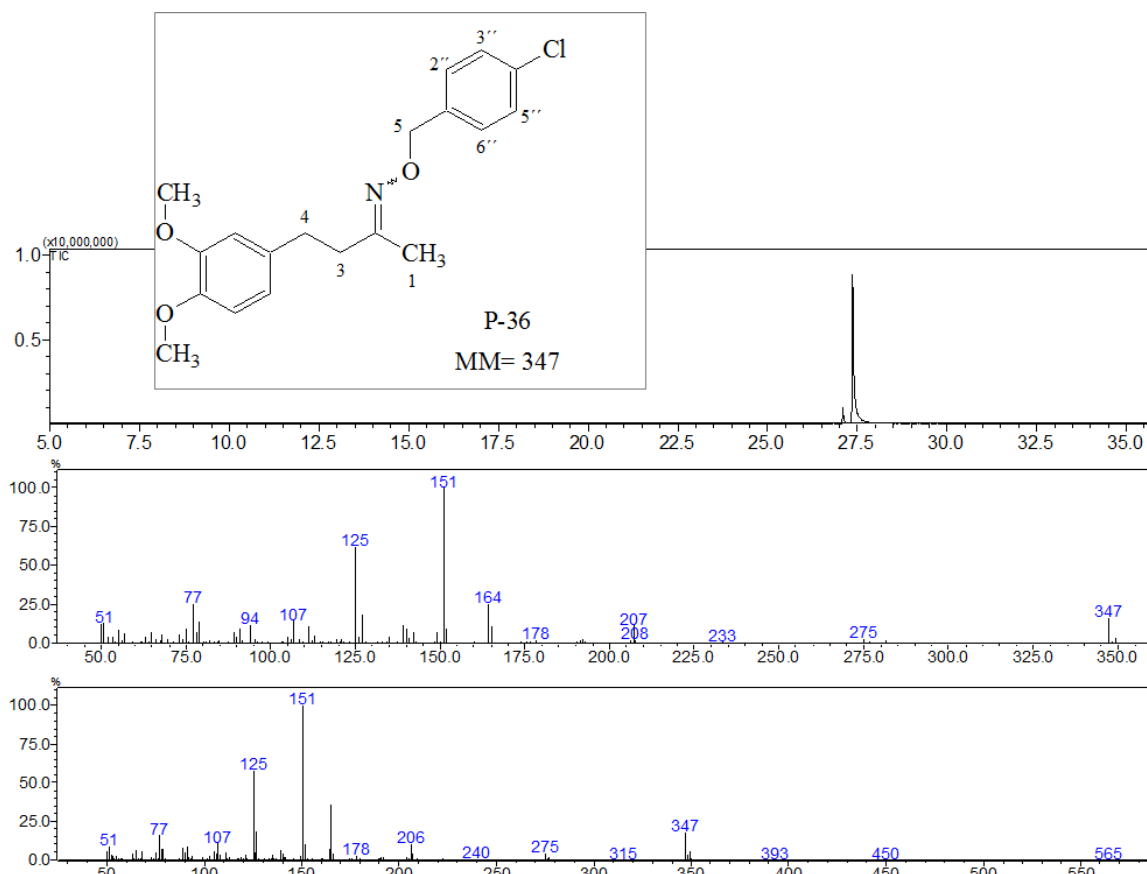


FIGURA 4.101 – Análise por GC-MS do composto $(2E/Z)$ - N -(4-clorobenziloxi)-4-(3,4-dimetoxifenil)butan-2-imina (**P-36**).

Os dados do espectro de RMN de 1H da mistura de diastereoisômeros do éter de oxima **P-36**, mostram a presença do sinal dos hidrogênios do grupo metileno H-5 em aproximadamente 5,0 ppm, que confirma a formação da ligação éter, FIGURA 4.102. Na região de hidrogênios aromáticos, foi possível ver além os sinais dos três hidrogênios, que caracteriza o anel aromático trissubstituído, também foi possível ver em torno de 7,24 a 7,34 ppm cuja área integra para cinco, os prótons do anel *para* substituído da molécula, FIGURA 4.102. Nas regiões mais blindadas do espectro, é possível ver a duplicação de um dos sinais relacionados com os prótons H-3 e H-4 da

mistura de diastereoisômeros, em torno de 2,76 e 2,46 ppm mostrando a prevalência de um dos diastereoisômeros; em 1,89 ppm cuja área sob pico é 2,2 está o sinal dos prótons H-1 da metila do composto **P-36**, FIGURA 4.103.

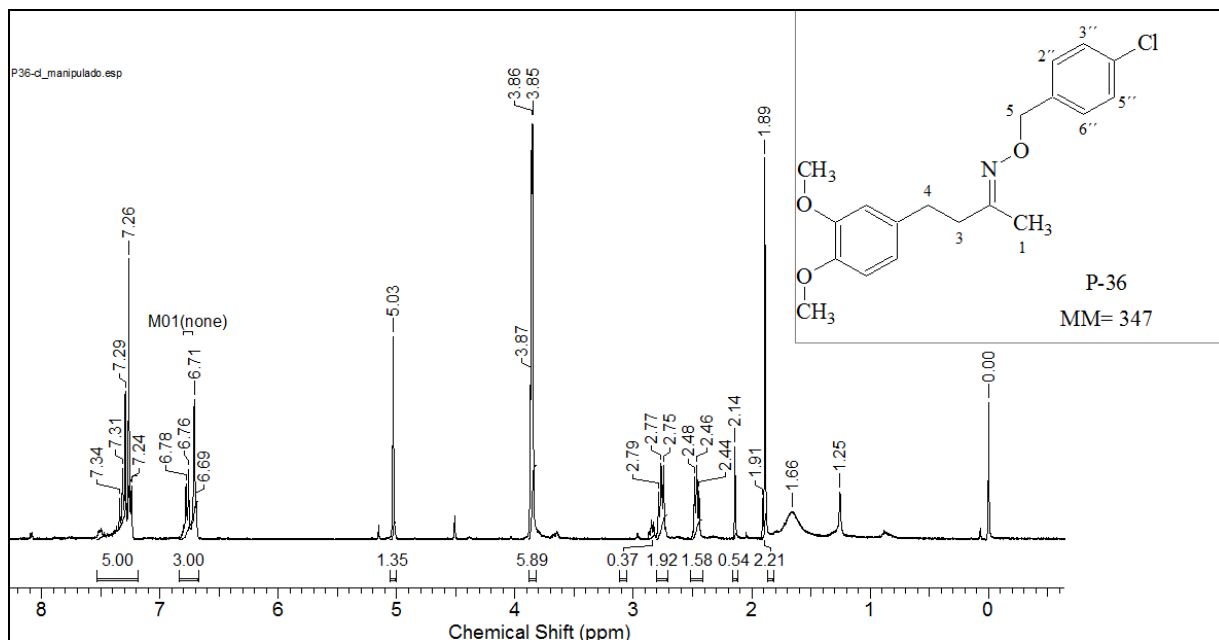


FIGURA 4.102 – Espectro de RMN de ^1H (Acetona- d_6 , 400 MHz) para o composto éter de oxima P-36.

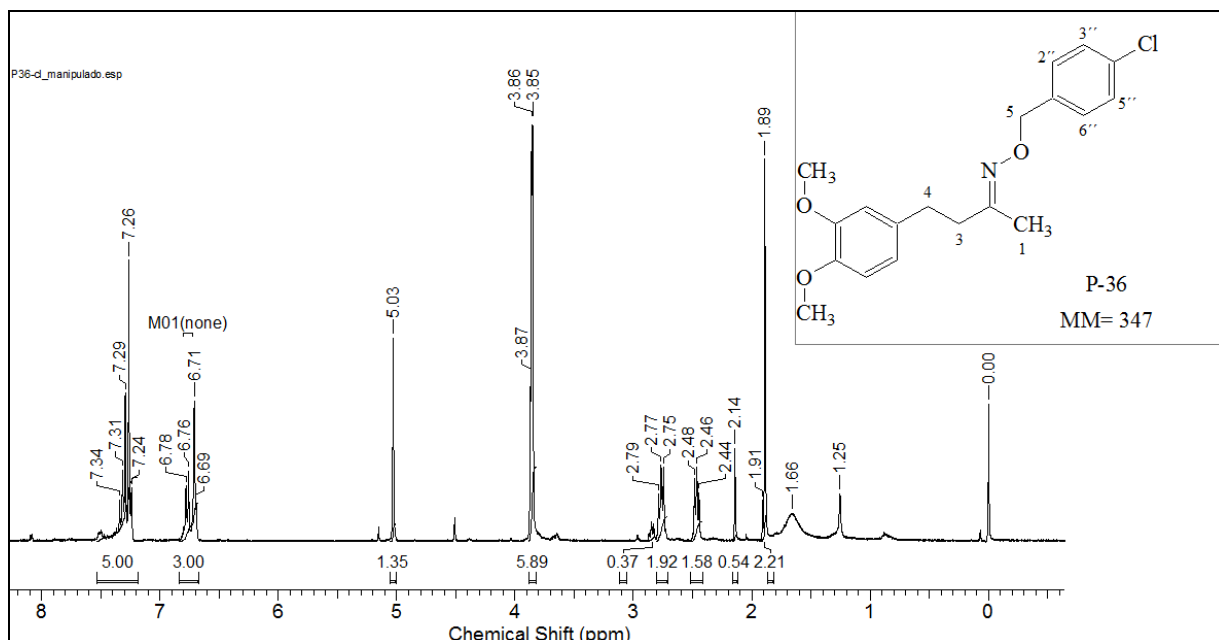


FIGURA 4.103 – Regiões mais blindadas do espectro de RMN de ^1H (Acetona- d_6 , 400 MHz) para o composto éter de oxima **P-36**

No espectro RMN de ^{13}C , foi possível ver os sinais característicos da estrutura do produto **P-36**, sendo que o sinal com deslocamento químico de 157 ppm é atribuído ao carbono imínico (C-2). No intervalo de deslocamento que vai de 133 a 111 ppm apareceram 10 picos relacionados com os átomos de carbono dos anéis aromáticos, o sinal em torno de 56 ppm se refere aos carbonos do grupamento metoxila. Outro pico em 75 ppm pode ser atribuído ao metileno diretamente ligado ao átomo de oxigênio (C-5). Na região de deslocamento químico em que aparecem os carbonos com hibridização sp^3 é possível ver os sinais dos carbonos em C-3, C-4 e C-1, FIGURA 4.104.

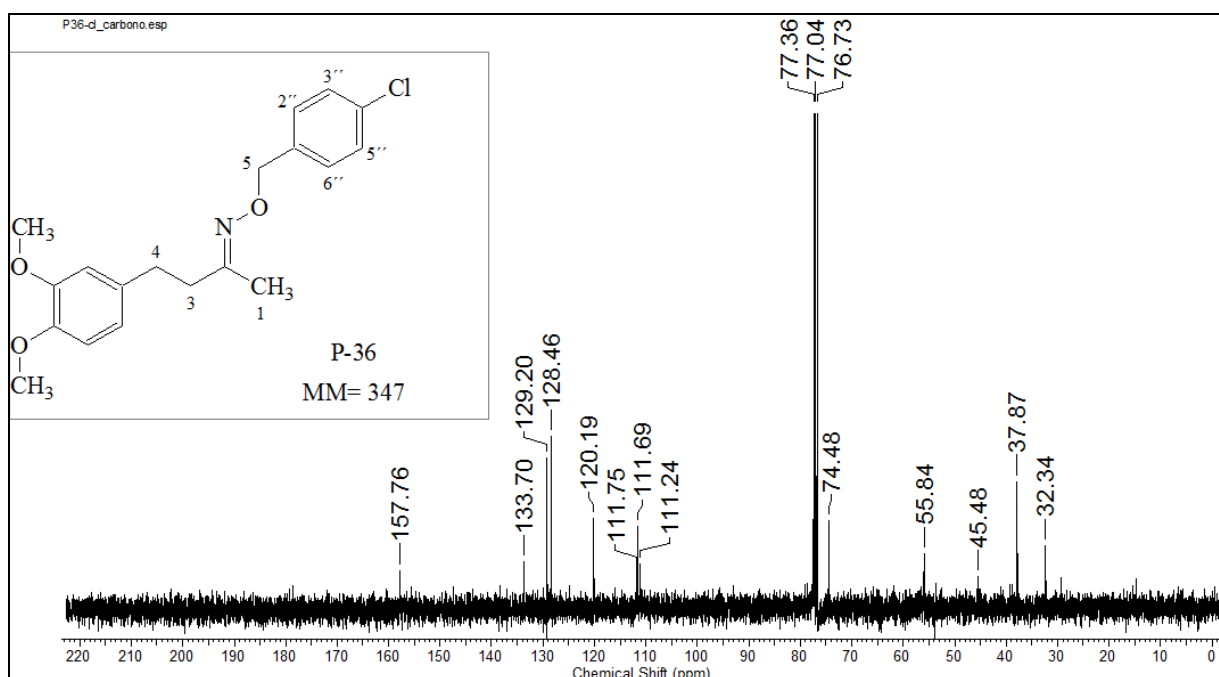
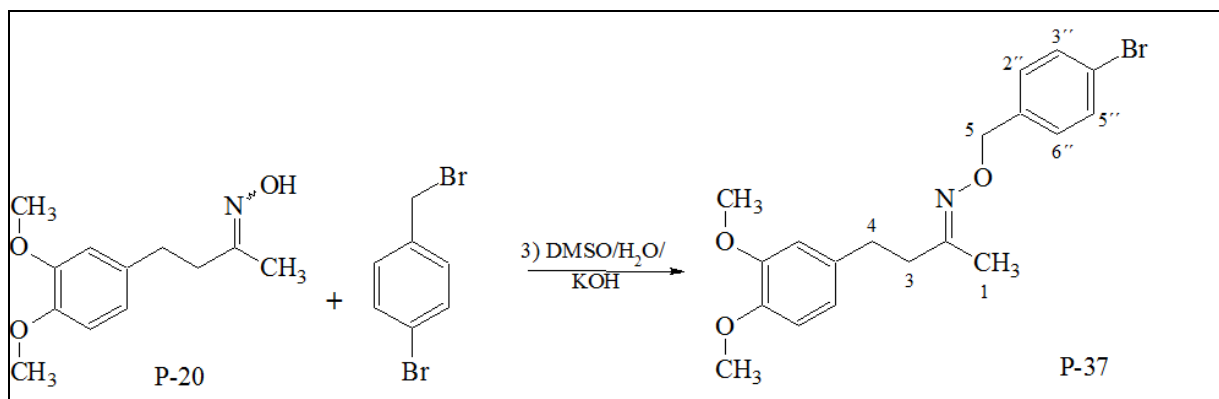


FIGURA 4.104 – Espectro de RMN de ^{13}C (CDCl₃, 400 MHz) para o composto éter de oxima **P-36**.

C.4 – Obtenção do (2E/Z)-N-(4-bromobenziloxi)-4-(3,4-dimetoxifenil)butan-2-imina (P-37)



A obtenção do (2E/Z)-N-(4-bromobenziloxi)-4-(3,4-dimetoxifenil)butan-2-imina (**P-37**) foi realizada através de uma reação de acoplamento, utilizando o brometo de *para*-bromobenzila e a oxima **P-20** como reagentes, na proporção estequiométrica de 1:2. Devido ao erro na quantidade de hidróxido de potássio (KOH) utilizada no momento de executar a reação, 141 mg (2,5 mmol), não foi possível acompanhá-la muito bem por CCD, sendo esgotada antes que se obtivesse um melhor rendimento para a formação do produto desejado. A FIGURA 4.105, traz a análise por GC-MS em que o pico com tempo de retenção de aproximadamente 28 minutos, se encontra o m/z 313 [M^+] e o pico base m/z 151 característico, indicando a formação do produto reacional. Entretanto, o pico em torno de 18,7 minutos, que traz o m/z 223 [M^+] com pico base de m/z 151 relacionada com a oxima **P-20**, aparece no cromatograma com grande intensidade de sinal em relação ao produto reacional, mostrando grande sobra de material de partida, sendo necessário otimizar as condições de trabalho para melhorar o rendimento da reação e isolar o composto desejado.

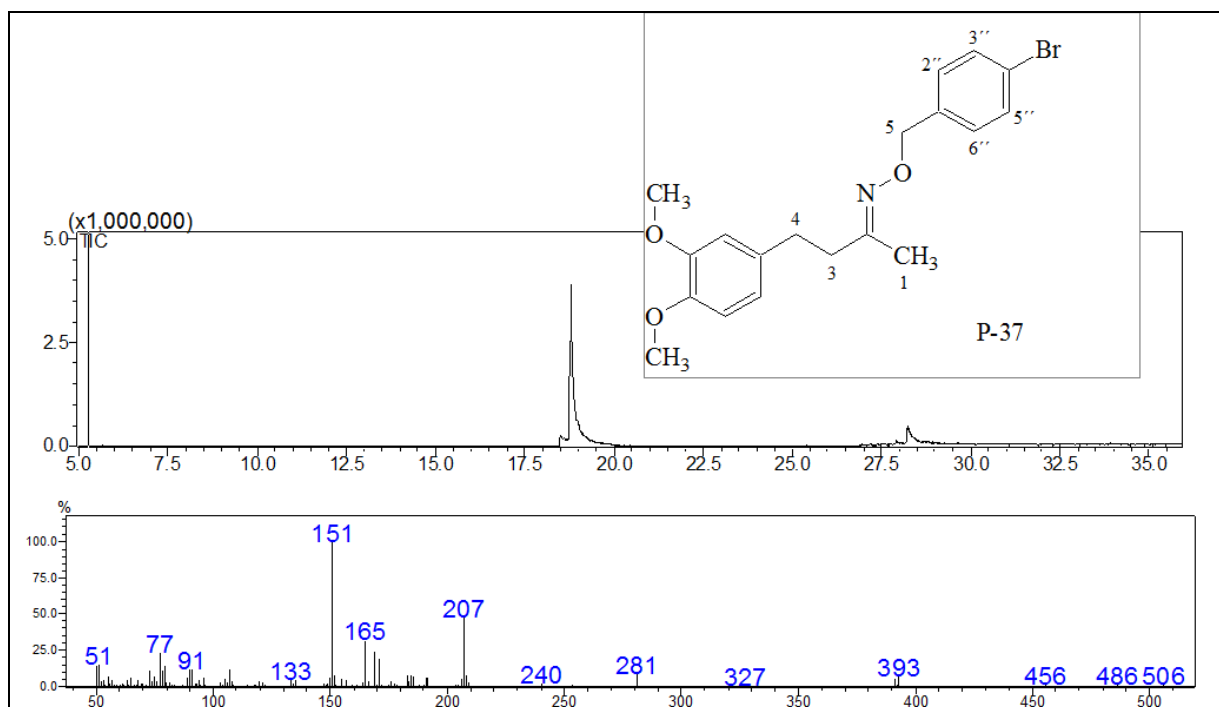
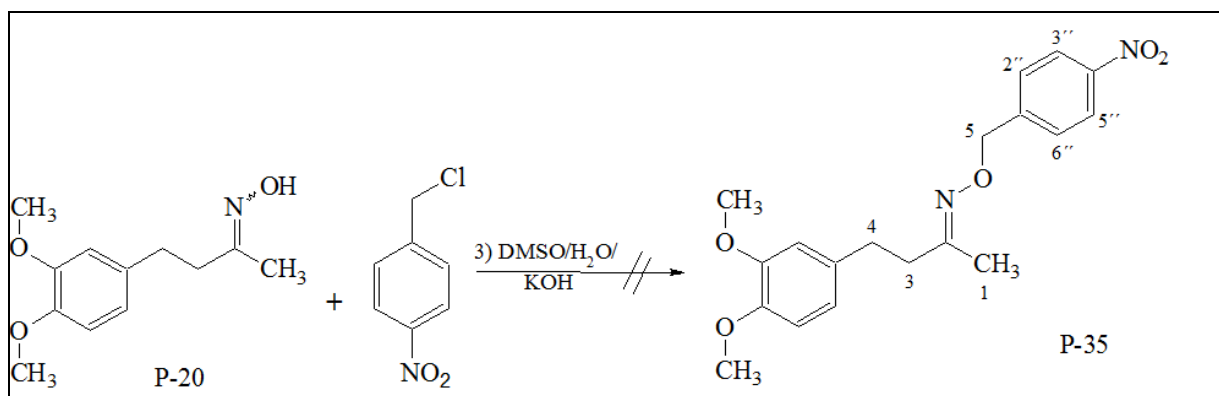


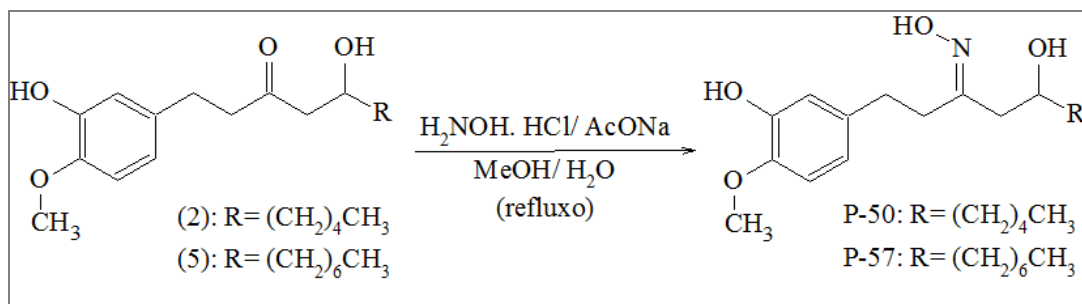
FIGURA 4.105 – Análise por GC-MS do composto (2E/Z)-N-(4-bromobenziloxi)-4-(3,4-dimetoxifenil)butan-2-imina (**P-37**)

C.5 – Obtenção do (2E/Z)-N-(4-nitrobenziloxi)-4-(3,4-dimetoxifenil)butan-2-imina (**P-35**)



A obtenção do (2E/Z)-N-(4-nitrobenziloxi)-4-(3,4-dimetoxifenil)butan-2-imina (**P-35**) foi realizada através de uma reação de acoplamento, utilizando o cloreto de *para*-nitrobenzila e a oxima **P-20** como reagentes, na proporção estequiométrica de 1:2. Para essa reação é necessário otimizar as condições de trabalho pois de acordo com os dados no GC-MS e o espectro de RMN de ^1H o produto reacional não se formou.

4.4.1– Obtenção do derivado oxímínico a partir de 6-gingerol (2) e de 8-gingerol (5)



No esquema reacional podemos ver as condições para se obter os derivados oxímicos utilizando o 6-gingerol (2) e o 8-gingerol (5) como material de partida. Para a obtenção do derivado oxímico **P-50**, o produto reacional que se apresentou como um óleo amarelo, foi alcançado com 44% de rendimento, a análise por GC-MS mostrou um pico em 19,9 minutos em que aparece o íon m/z 309 [M^+] e o pico base m/z 137 como mostra a FIGURA 4.106. Os demais picos estão relacionados com a desidratação e degradação térmica do composto.

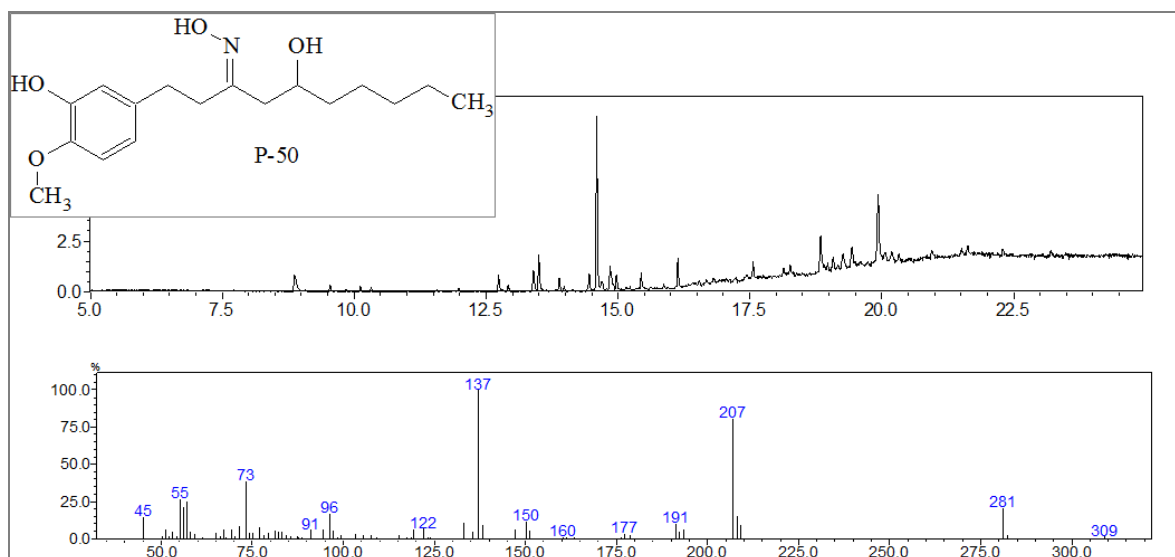


FIGURA 4.106 – Análise por GC-MS para o composto (P-50).

Dos dados observados no espectro de RMN de ^1H da mistura de diastereoisômeros do derivado oxímico **P-50**, foi possível observar na região de hidrogênios aromáticos, o

sinal dos três prótons que caracteriza o anel trissubstituído da molécula, outro sinal com valor de deslocamento de 3,89 ppm cuja área de integração foi três é característico dos prótons da metoxila e o sinal do hidrogênio oximetínico aparece sobrepondo a este sinal. Em 0,90 ppm ocorreu o sinal relacionado aos hidrogênios da metila terminal da cadeia alifática, em torno de 1,30 ppm há um sinal largo provavelmente relacionado com os hidrogênios metilênicos H6, H-7, H-8 e H-9 que integra para 11 hidrogênios indicando a presença de mistura diastereoisomérica e a ação dos pares de elétrons aos prótons vizinhos. Os picos que aparecem entre 2,20 a 2,81 ppm provavelmente estão relacionados aos hidrogênios metilênicos ligados ao carbono α -carbonila e aos hidrogênios H-1 e H-2, FIGURA 4.107.

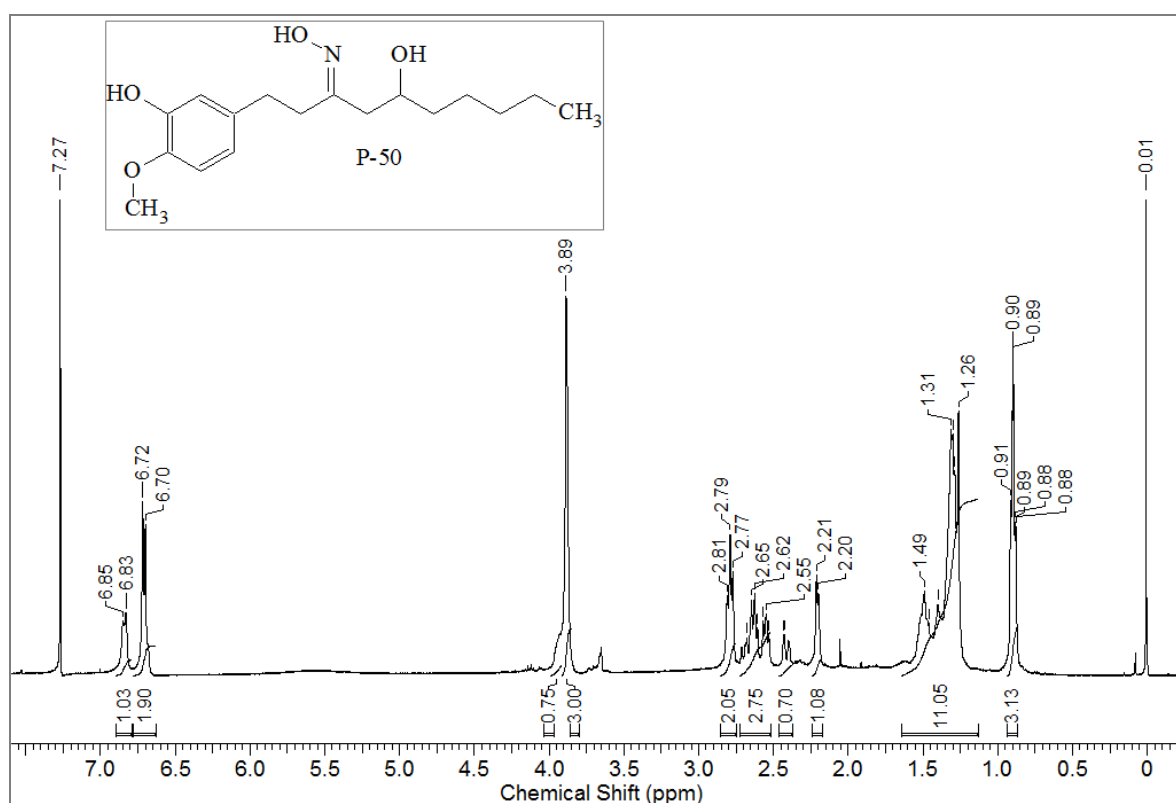


FIGURA 4.107 – Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) para o composto **P-50**.

O espectro de RMN ^{13}C mostrado na FIGURA 4.108 para o derivado oxímico **P-50** mostra o pico do carbono imínico com deslocamento de 159 ppm, os seis carbonos relacionados com anel aromático da molécula ocorrem no intervalo entre 146 a 110 ppm. Em torno de 69 ppm pôde-se ver o pico relacionado com o carbono oximetínico e em 55 ppm o carbono da metoxila. Na região mais blindada do espectro, em torno de 14 ppm, está o pico do carbono da metila e também foi possível ver os demais sinais na

região de carbono sp^3 , relacionados com os carbonos metilênicos, todos duplicados por se tratar de uma mistura diastereoisomérica.

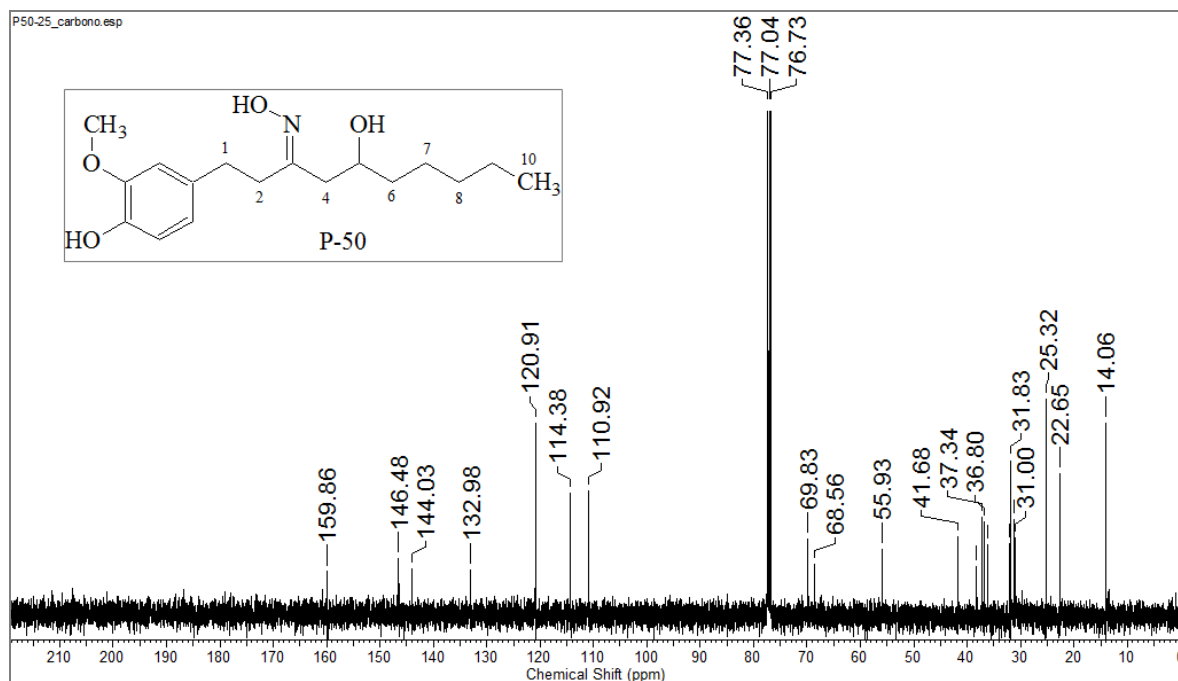


FIGURA 4.108 – Espectro de RMN de ^{13}C ($CDCl_3$, 400 MHz) para o composto **P-50**.

Para a obtenção do derivado oxímico **P-57**, a partir do derivado do 8-gingerol, o produto reacional que se apresentou como um óleo amarelo, foi alcançado com 84% de rendimento bruto, sem purificação por cromatografia em coluna. A análise por GC-MS não trouxe dados relevantes que pudessem confirmar a formação do produto **P-57**, provavelmente devido a degradação térmica do composto no injetor do cromatógrafo, como se pode ver na FIGURA 4.109. No espectro de RMN de 1H para o composto **P-57** foi possível observar na região de hidrogênios aromáticos, o sinal dos três prótons que caracterizam o anel trissubstituído da molécula, outro sinal com valor de deslocamento de 3,88 ppm cuja área de integração foi três é característico dos prótons da metoxila e o sinal do hidrogênio oximetínico aparece sobrepondo a este sinal. Em 0,88 ppm ocorreu o sinal relacionado aos hidrogênios H-12 da metila terminal da cadeia alifática, em torno de 1,28 ppm há um sinal largo que integra para 12 sendo provavelmente relacionado com os hidrogênios metilênicos de H6 a H-11. Os picos que aparecem entre 2,20 a 2,81 ppm estão relacionados aos hidrogênios metilênicos ligados ao carbono α -carbonila e aos hidrogênios H-1 e H-2

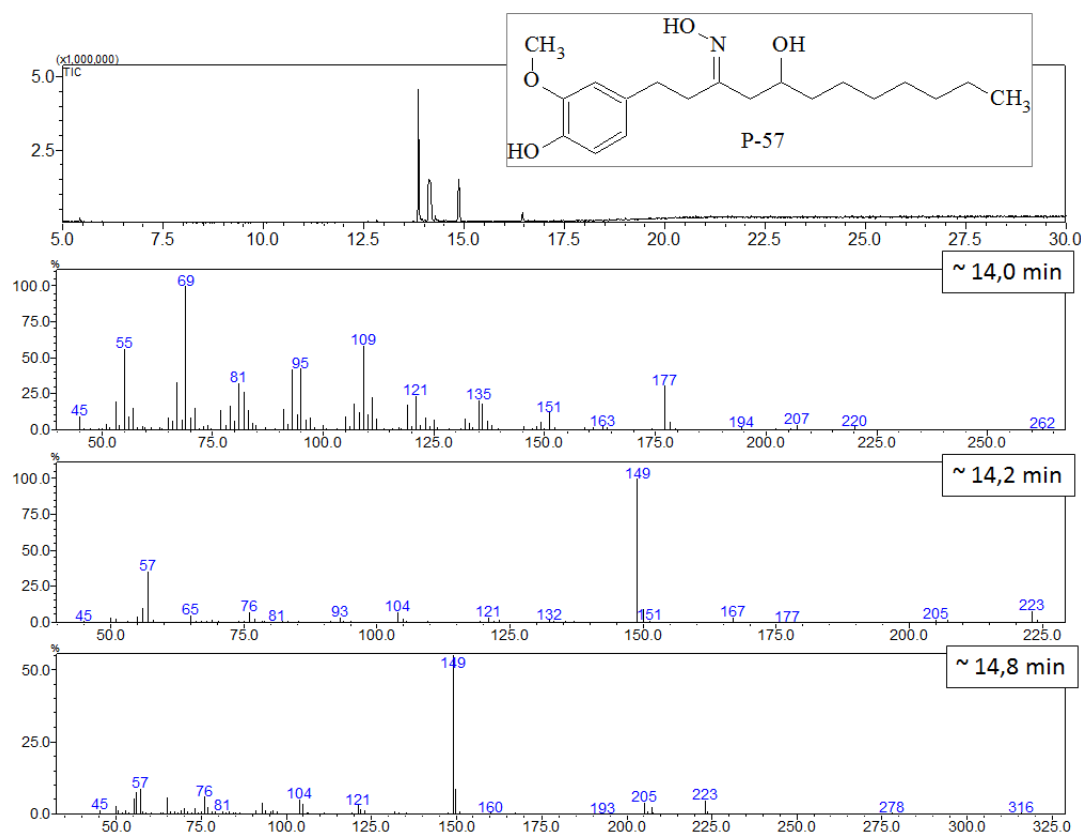


FIGURA 4.109 – Análise por GC-MS para o composto **P-57**.

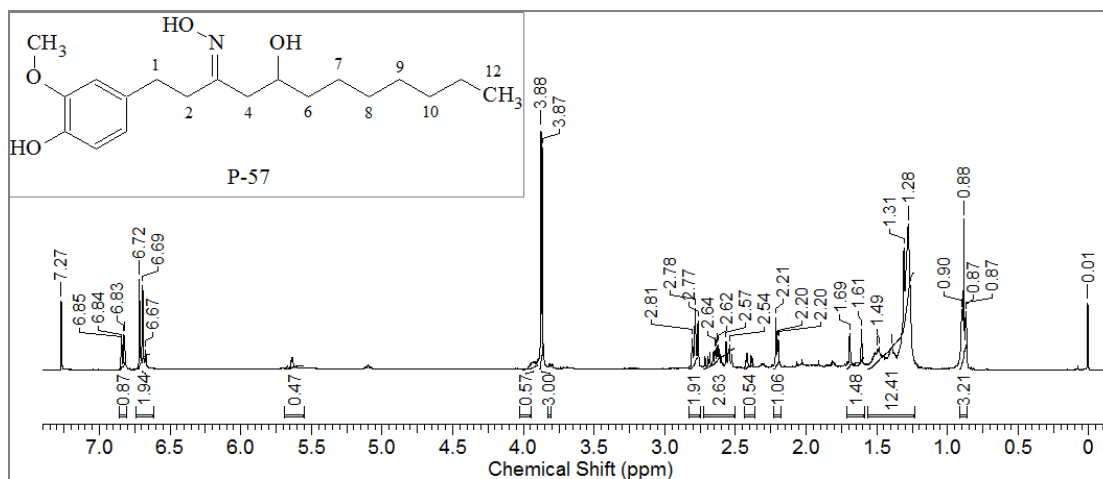


FIGURA 4.110 – Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) para o composto (**P-57**).

O espectro de RMN de ^{13}C mostrado na FIGURA 4.111 para a mistura dos diastereoisômeros do derivado oxímico **P-57**, mostra o pico relacionado com o carbono imínico em 160 e 159 ppm; os sinais relacionados com anel aromático da molécula

ocorrem no intervalo entre 146 a 110 ppm. Em torno de 69 e 68 ppm pôde-se ver os picos relacionados com o carbono oximetínico da mistura de estéreisômeros e em 55 ppm o carbono da metoxila. Na região mais blindada do espectro, em torno de 14 ppm, está o pico do carbono da metila e também foi possível ver os demais sinais na região de carbono sp^3 , relacionados com os carbonos metilênicos, todos duplicados por se tratar de uma mistura de diastereoisômeros.

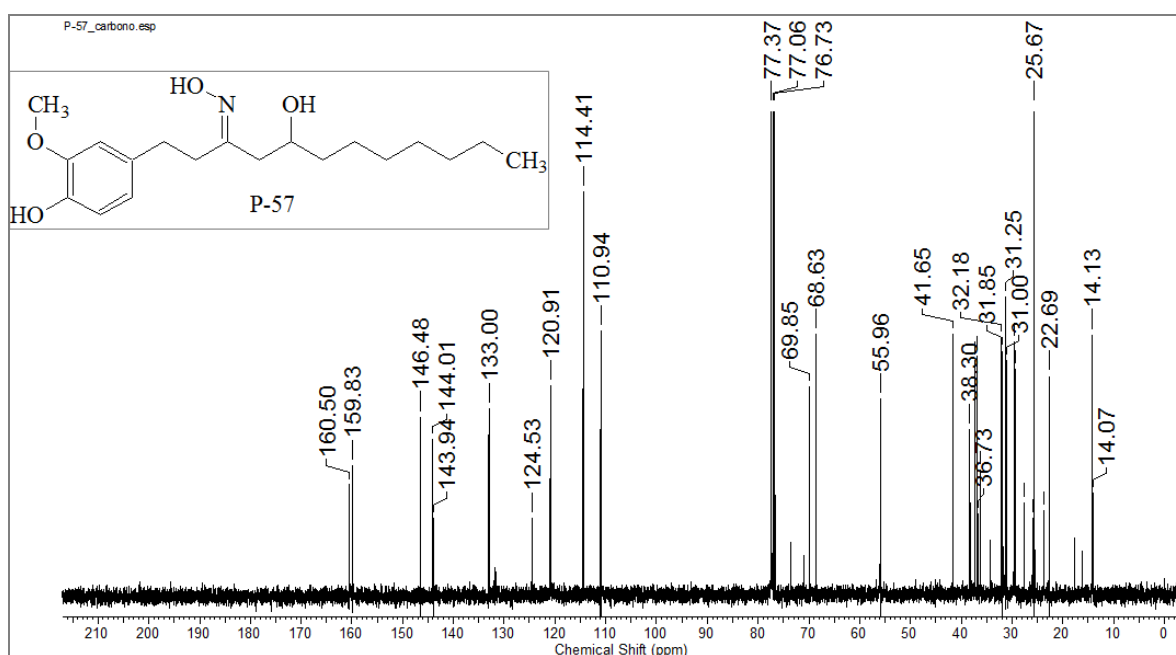


FIGURA 4.112 – Espectro de RMN de ^{13}C ($CDCl_3$, 400 MHz) para o composto (P-57).

4.5 – Ensaios bioquímicos e biológicos

A – Ensaio de inibição enzimática frente às catepsinas

O décimo dia do extrato aquoso (Aq), que se tratava do fluido da cultura, do extrato em acetato de etila (Ac) tanto dos metabólitos produzidos pelo fungo ou dos produtos de biotransformação dos substratos, bem como do extrato metanólico (MM) da massa micelial, seja pelos experimentos conduzidos com o fungo *Colletotrichum gloeosporioides*, quanto para os experimentos conduzidos com o fungo *Fusarium oxysporum*, foram ensaiados frente a inibição da catepsina V. Todos os extratos foram ensaiados à concentração de 125 $\mu g/mL$ no poço da placa de Eliza. Na FIGURA 4.113,

podemos ver que em cor azul se faz referência aos ensaios conduzidos com o fungo *Fusarium oxysporum* e em vermelho com o fungo *Colletotrichum gloesporioides*.

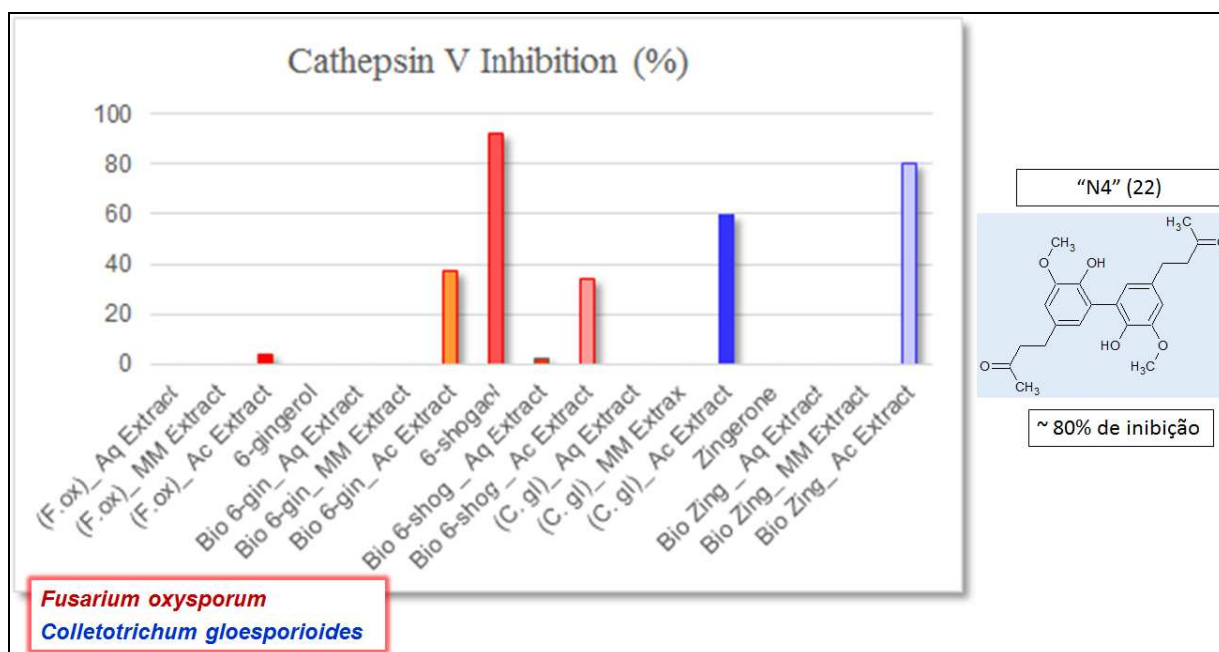


FIGURA 4.113 – Ensaio da porcentagem de inibição dos extratos Ac, Aq e MM dos experimentos conduzidos com o fungo *Fusarium oxysporum*, em vermelho e com o fungo *Colletotrichum gloesporioides*, em azul.

O extrato em acetato de etila (Ac) dos metabólitos produzidos pelo fungo *F. oxysparum* apresentou menos do que 5% de inibição da catepsina V. O extrato em acetato de etila (Ac) dos produtos de biotransformação do 6-gingerol (**2**) e do 6-shogaol (**4**) por *F. oxysparum* apresentou em torno de 40% de inibição. O 6-shogaol (**4**) diluído em DMSO, apresentou mais de 80% da inibição da catepsina V.

Os valores que não aparecem tratam-se dos extratos ou substâncias sem qualquer atividade, o extrato acetato de etila (Ac) da biotransformação da zingerona pelo fungo *C. gloesporioides* foi o que apresentou maior atividade de inibição, em torno de 80% frente a catepsina V, FIGURA 4.113, sendo maior do que a produção dos próprios metabólitos do fungo, que apresentou uma inibição da catepsina V em torno de 60%. Neste ensaio ainda é necessário avaliar os extratos do controle B, o controle de degradação de cada substância, para considerar a influência do meio de cultura na

atividade de inibição da zingerona (1). Um dos produtos principais da biotransformação da zingerona (1) foi a reação de acoplamento oxidativo aromático formando o seu dímero, uma vez que foi isolado se torna importante ensaiar frente a catepsina V para confirmar se realmente é o dímero responsável pela atividade de inibição do extrato Ac de tal experimento. Outros ensaios de inibição frente outras catepsinas, como a K e a L, também deveriam ser feitos, e outras catepsinas disponíveis no laboratório.

B – Teste de disco-difusão em meio sólido

No teste de avaliação do possível halo de inibição sobre os fungos *Colletotrichum gloesporioides* e *Fusarium oxysporum* o controle ocupou toda extensão da placa desde as primeiras 24 horas. Para o composto etil éter de oxima **P-47** não houve nenhum halo de inibição mas para o derivado oxímico do 8-gingerol (**P-57**), o halo de inibição médio foi de 2,65 cm nas primeiras 24 hs e de 1,50 cm em 72 horas.

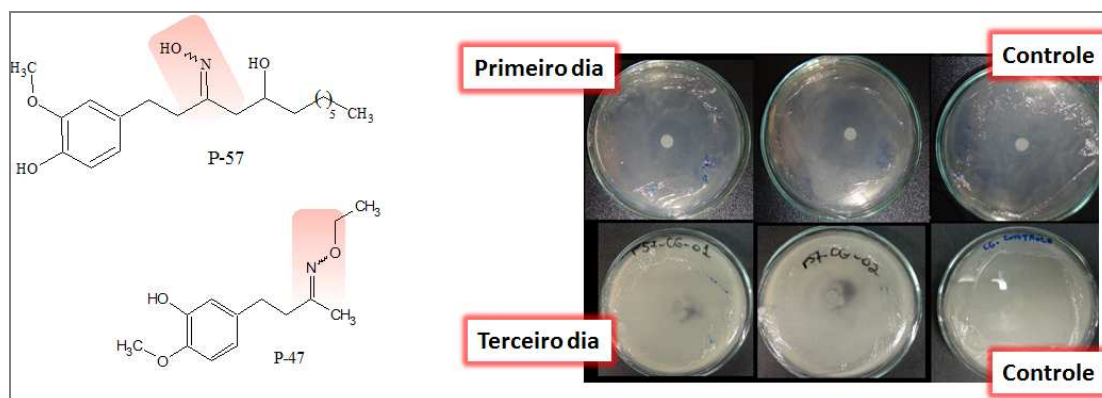


FIGURA 4.114 – Halo de inibição para o derivado oxímico do 8-gingerol (**P-57**) sobre o fungo *C. gloesporioides*.

No trabalho de MARTINEZ et al. 2003, a expressão de cistina (HV-CPI) em cevada geneticamente modificada inibiu o crescimento de fungos fitopatogênicos da espécie *Colletotrichum graminicola*. Uma série de cistina recombinante de cevada foram gerados e suas propriedades de inibição de cisteíno-proteínases foram avaliadas sendo um fator importante na determinação de propriedades antifúngicas. De acordo com VALDES-RODRIGUEZ et al. 2010, a cistatina de amaranto inibiu a papaína, a ficina e a catepsina L. Também foi capaz de deter o crescimento de fungos de *Fusarium*

oxysporum. Diante desses dados e do resultado obtido, outros ensaios de inibição de crescimento do fungo devem ser realizados para o composto **P-57**, para confirmar a atividade antifúngica de tal derivado e se existe alguma relação com a propriedade de inibição de cisteíno-proteinase.

5 – CONCLUSÕES

A escolha do uso de células totais do fungo fitopatogênico, *Colletotrichum gloesporioides*, como biocatalisador em reações para promover modificações estruturais dos compostos isolados do gengibre apresentou resultados satisfatórios. A principal transformação química observada a partir dos sistemas fenólicos, como por exemplo a zingerona (1), foi a dimerização por acoplamento oxidativo aromático, provavelmente realizada por enzimas oxidases como o sistema de lacases. O dímero da zingerona (1), além de ser detectado por técnicas de LC-MS, também foi isolado e identificado por ressonância magnética nuclear de hidrogênio e caracterizado por espectrometria de massas de alta resolução. Outra modificação observada e que foi realizada pelo fungo se tratou da reação de Baeyer Villiger seguida por hidrólise sobre a cadeia lateral do 6-gingerol (2) formando um álcool com 168 Da e o seu dímero é que foi detectado por técnicas de LC-SPE-NMR além do LC-MS. A dupla ligação da cadeia do 6-shogaol (4) não interferiu na ação do *pool* enzimático do fungo *Colletotrichum gloesporioides*, sendo possível detectar o álcool com 168 Da. A grande vantagem destes resultados é que o fungo que foi utilizado neste trabalho faz parte da microbiota que causa doença de plantas que ocorrem no território nacional. Isso contribui para o estudo do potencial biotecnológico de tais microorganismos, que ainda precisa ser explorada como um campo promissor para candidados a novos biocatalisadores afim de promover transformações químicas em moléculas orgânicas com aplicabilidade em indústria farmacêutica ou de polímeros, por exemplo, já que o fungo *Colletotrichum gloesporioides* é passível ao cultivo em larga escala através do uso de biorreatores.

A técnica de LC-SPE/NMR foi muito valiosa para o estudo dos produtos de biotransformação sem a necessidade de isolamento de bancada a partir de quantidades pequenas, aproximadamente 5 mg do extrato bruto, sendo que a identificação dos produtos de biotransformação do 6-gingerol (2) no extrato acetato de etila (Ac) foi realizada em quantidades em torno de 200 µg. A otimização da separação cromatográfica somada à otimização dos parâmetros de retenção por SPE foi essencial para conduzir aos bons resultados do trabalho, sendo que a técnica hifenada LC-

SPE/NMR se mostrou uma ferramenta valiosa na área de produtos naturais, já que substâncias orgânicas podem ser identificadas de forma rápida, segura e reprodutível.

No estudo de metabolismo ou de biotransformação, normalmente se detectam metabólitos em pequenas quantidades e outra técnica hifenada, o LC-MS, foi eficientemente empregada para alcançar os resultados desse trabalho, seja com o analisador de massas do tipo triplo-quadrupolo ou ion trap. Outra vantagem destas duas técnicas foi o uso do *eletronspray* como fonte de ionização que possibilita uma ionização branda, sendo pouca fragmentação é obtida no processo. Essa ferramenta foi muito útil para identificar os derivados por biotransformação dos compostos relacionados com o gingerol, por se tratar de substâncias termicamente lábeis que muitas vezes não podem ser prontamente detectadas por análise em GC-MS.

Outro resultado obtido no desenvolvimento deste projeto foi o halo de inibição contra a proliferação do fungo *Colletotrichum gloeosporioides* apresentado pelo derivado oxímico do 8-gingerol, **P-57**. Os demais compostos obtidos por reações de semi-síntese foram moléculas com padrão estrutural inédito, de fácil obtenção e com bom rendimento global das etapas de síntese. Apesar do estudo de modelagem molecular indicar boa complementariedade a um modelo de cisteinil-protease, como a catepsina K, nenhum dos derivados testados apresentou porcentagem de inibição das catepsinas V e B mas ainda precisam ser testados contra a catepsina K. É necessário ampliar a série sintetizada, bem como ensaiar os compostos que não foram avaliados tanto na inibição de catepsinas quanto à potencial de inibição do crescimento micelial dos fungos fitopatogênicos como por exemplo, o *C. gloeosporioides* seja pelo teste de difusão em disco ou outros tipos de ensaios.

6 – REFERÊNCIAS

ALI, B. H.; BLUNDEN G.; TANIRA, M. O.; NEMMAR A. Some phytochemical, pharmacological and toxicological properties of ginger (*Zingiber officinale* Roscoe): A review of recent research. *Food and Chemical Toxicology*, **46**: 409, 2008.

ALJAWISH, A.; CHEVALOT, I.; JASNIEWSKI, J.; REVOL-JUNELLES, A. M.; SCHER, J.; MUNIGLIA, L. Laccase-catalysed functionalisation of chitosan by ferulic acid and ethyl ferulate: Evaluation of physicochemical and biofunctional properties. *Food Chemistry*, **161**: 279, 2014.

ALTMAN, R.D., MARCUSSEN, K.C. Effects of a ginger extract on knee pain in patients with osteoarthritis. *Arthritis and Rheumatism*, **44**: 2531, 2001.

ALTMANN, E.; ALCHHOLZ, R.; BETSCHART, C.; BUHL, T.; GREEN, J.; Irie, O.; Teno, N.; LATTMANN, R.; TINTELNOT-BLOMLEY, M.; MISSBACH, M. 2-Cyano-pyrimidines: a new chemotype for inhibitors of the cysteine protease cathepsin K. *Journal of Medicinal Chemistry*, **50**: 591, 2007.

BARRETT, D. G.; BONCEK, V. M.; CATALANO, J. G.; DEATON, D. N.; HASSELL, A. M.; JURGENSEN, C. H.; LONG, S. T.; MCFADYEN, R. B.; MILLER, A. B.; MILLER, L. R.; PAYNE, J. A.; RAY, J. A.; SAMANO, V.; SHEWCHUK, L. M.; TAVARES, F. X.; WELLS-KNECHT, K. J.; WILLARD, D. H.; WRIGHT, L. L.; ZHOU, H.-Q. Q. P2-P3 conformationally constrained ketoamide-based inhibitors of cathepsin K. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters* **15**, 3540, 2005.

BASTOS, D. Z. L. Biotransformação por Fungos do Ácido Betunílico e Derivados. Curitiba. Programa de Pós-graduação em Química. UFPR, 2005. Tese de Doutorado, 117 p.

BROMME, D.; KLAUS, J. L.; OKAMOTO, K.; RASNICK, D.; PALMER, J. T. Peptidyl vinyl sulphones: a new class of potente and selective cysteine protease inhibitors: S₂P₂ specificity of human cathepsin O2 in comparison with cathepsins S and L. *Biochemical Journal*, **315**: 85, 1996.

BUNGIHAN, M. E.; MARIO, A. T.; TAKAYAMA, T.; CRUZ, T. E. E.; NONATO, M. G. A new macrolide isolated from the endophytic fungus *Colletotrichum* sp. *Philippine Science Letters*, **6**: 57, 2013.

DEATON, D. N.; TAVARES F.X.; Design of Cathepsin K Inhibitors for Osteoporosis. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, **5**: 1639, 2005.

DENWICK, P. M. Medicinal natural products: a biosynthetic approach. 3a ed. John Wiley and Sons Ltd, 2009, p 539.

DUGASANI, S.; PICHKA M. R.; NADARAJAH, V. D.; BALIJEPALLI M. K.; TANDRA, S.; KORLAKUNTA, J. N. Comparative antioxidant and anti-inflammatory effects of [6]-gingerol, [8]-gingerol, [10]-gingerol and [6]-shogaol. *Journal of Ethnopharmacology*, **127**: 515, 2010.

DUNAEVSKY, D. E., POPOVA, V.V; SEMENOVA, T.A.; BELIAKOVA, T.A.; BELOZERSKY, M. A. Fungal inhibitors of proteolytic enzymes: classification, properties, possible biological roles, and perspectives for practical use. *Biochimie*, **101**: 10, 2014.

FEMENÍA-RÍOS, M.; GARCÍA-PAJÓN, C.M.; HERNÁNDEZ-GALÁN, R.; ANTONIO J. MACÍAS-SÁNCHEZ, A.J.; COLLADO, I.G. Synthesis and free radical scavenging activity of a novel metabolite from the fungus *Colletotrichum gloesporioides*. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, **16**: 5836, 2006.

GARCÍA-PAJÓN C. M., HERNÁNDEZ-GALÁN, R., COLLADO, I. G. Biotransformations by *Colletotrichum* species. *Tetrahedron Asymmetry*, **14**: 1229, 2003.

GIANOTI, A.; SOMMER, C. A.; CARMONA, A. K.; SILVA-HENRIQUE, F. Inhibitory effect of sugarcane cystatin CaneCPI-4 on cathepsins B and L human breast cancer cell invasion. *Biological Chemistry*, **389**: 447, 2008.

IMADA, C. Enzyme Inhibitors of Marine Microbial Origin with Pharmaceutical Importance. *Marine Biotechnology*, **6**: 193, 2004.

JIANG, H. SÓLYOM, A. M.; TIMMERMANN, B. N.; GANG, D. R. Characterization of gingerol-related compounds in ginger rhizome (*Zingiber officinale* Rosc.) by high-performance liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry. *Rapid Communication Mass Spectrometry*, **19**: 2957, 2005.

JOLAD, S. D. LANTZ, R. C.; SÓLYOM, A. M.; CHEN, G. J.; BATES, R. B.; TIMMERMANN, B. N. Fresh organically grown ginger (*Zingiber officinale*): composition and effects on LPS-induced PGE₂ production, *Phytochemistry*, **65**: 1937, 2004.

JUNG, D.; PARK, H.; BYUN, H.; PARK, Y.; KIM, T.; KIM, T.; UM, S.; PYO, S. Diosgenin inhibits macrophage-derived inflammatory mediators through down regulation of CK2, JNK, NF- κ B and AP-1 activation. *International Immunopharmacology*, **10**: 1047, 2010.

KIKUZAKI, H.; TSAI, S. M.; NAKATANI, N. Gingerdiol related compounds from the rhizomes of *Zingiber officinale*. *Phytochemistry*, **31**: 1783, 1992.

KÜRTI, L.; CZAKÓ, B. Strategic Applications of Named Reactions Organic Synthesis - Background and Detailed Mechanisms, 2005, 758 p.

LIU, JI-HUA; YU, BO-YANG. Biotransformation of Bioactive Natural Products for Pharmaceutical Lead Compounds. *Current Organic Chemistry*, **14**: 1400, 2010.

LV, LISHUANG; CHEN, H.; SOROKA, D.; CHEN, X.; LEUNG, T.; SANG, S. 6-Gingerdiols as the Major Metabolites of 6-Gingerol in Cancer Cells and in Mice and Their Cytotoxic Effects on Human Cancer Cells. *Journal Agricultural and Food Chem.*, **60**: 11372, 2012.

MARTÍNEZ, M.; LÓPEZ-SOLANILLA, E.; RODRÍGUEZ-PALENZUELA, P.; CARBONERO, P.; DÍAZ, I. Inhibition of plant-pathogenic fungi by the barley cystatin Hv-CPI (Genelcy) is not associated with its cysteine-proteinase inhibitory properties. *Molecular plant-microbe interactions* **16**: 876, 2003.

MARQUIS, R. W.; RU, Y.; LOCASTRO, S. M.; ZENG, J.; YAMASHITA, D. S.; OH, H.-J.; ERHARD, K. F.; DAVIS, L. D.; TOMASZEK, T. A.; TEW, D.; SALYERS, K.; PROKSCH, J.; WARD, K.; SMITH, B. Azepanone-Based Inhibitors of Human and Rat Cathepsin K. *Journal of Medicinal Chemistry*, **44**: 1380, 2001.

MIYAZAWA, M.; WADA, T. Biotransformation of γ -Terpinene and (-)- α -Phellandrene by the Larvae of Common Cutworm (*Spodoptera litura*). *Journal Agricultural and Food Chemistry*, **48**: 2893, 2000.

MIYAZAWA, M.; NANKAI, H.; KAMEOKA, H. Biotransformations of acyclic terpenoids, (\pm)-*cis*-nerolidol and nerylacetone, by plant pathogenic fungus, *Glomerella cingulate*. *Phytochemistry*, **40**: 1133, 1995.

MOALEMIYAN, M.; VIKRAM, A.; KUSHALAPPA, A.C. Detection and discrimination of two fungal diseases of mango (cv. Keitt) fruits based on volatile metabolite profiles using GC/MS. *Postharvest Biology and Technology*, **45**: 117, 2007.

MOREIRA, C.A.; MÜLLER, A. C. A.; PEREIRA JR, N.; ANTUNES, A. M. S. Pharmaceutical patents on plant derived materials in Brazil, law and statistics. *World Patent Information* **28**: 34, 2006.

NANKAI, H.; MIYAZAWA, H.; KAMEOKA, H. Biotransformation of (2Z,6Z)-farnesol by the plant pathogenic fungus *Glomerella cingulate*. *Phytochemistry*, **47**: 1025, 1998.

PAN, X.; TAN, N.; ZENG, G.; ZHANG, Y.; JIA, R. Amentoflavone and its derivatives as novel natural inhibitors of human cathepsin B. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, **13**: 5819, 2005.

PARK, E.J.; PIZZUTO, J.M., Botanicals in cancer chemoprevention. *Cancer Metastasis Review* , **21**: 231, 2002.

POLI, A.; PIETRO, A.D.; ZIGON, D.; LESANI, H. Possible involvement of G-proteins and cAMP in the induction of progesterone hydroxylating enzyme system in the vascular wilt fungus *Fusarium oxysporum*. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, **113**: 241, 2009.

RANKOVIC, Z.; CAI, J.; KERR, J.; FRADERA, X.; ROBINSON, J.; MISTRY, A.; FINLAY, W.; MCGARRY, G.; ANDREWS, F.; CAULFIELD, W.; CUMMING, I; DEMPSTER,

M.;WALLER J.; ARBUCKLE, W.; MARTIN, I.; MITCHELL, A.; LONG, C.; Optimisation of 2-cyano-pyrimidine inhibitors of cathepsin K: Improving selectivity over hERG. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, **20**: 6237, 2010.

SANTOS, R. Síntese, modelagem molecular e avaliação da atividade inseticida de novos piretróides do tipo éter de oxima. Rio de Janeiro, Programa de Pós-graduação em Química Orgânica – UFRRJ, 2006. Dissertação de mestrado, 312 p.

SCHWERTNER, H. A.; RIOS, D. C. High-performance liquid chromatographic analysis of 6-gingerol, 8-gingerol, 10-gingerol, and 6-shogaol in ginger-containing dietary supplements, spices, teas, and beverages. *Journal of Chromatography B*, **856**: 41, 2007.

SHIMODA, K.; HARADA, T.; HAMADA, H.; NAKAJIMAN, N.; HAMADA, H.; Biotransformation of raspberry ketone and zingerone by cultured cells of *Phytolacca americana*. *Phytochemistry*, **68**: 487, 2007.

SHUKLA, Y.; SINGH, M. Cancer preventive properties of ginger: a brief review. *Food Chemical Toxicology*. **45**: 683, 2007.

SILVA, J. A. Busca de Inibidores da Catepsina K em Plantas Medicinais Utilizadas no Tratamento de Doenças Osteoarticulares. São Carlos, Programa de Pós-Graduação em Química - UFSCar, 2011. Tese de doutorado, 157 p.

SILVA, R. C. Novos compostos anti-inflamatórios – éteres de oxima – planejamento estrutural, obtenção e avaliação farmacológica. Alfenas, Programa de Pós-graduação em Química – Unifal, 2010. Dissertação de mestrado, 134 p.

SILVESTRINI, A.; LOTÉRIO, A. F.; FUMANÉRIO, E.; SIMÃO, F.; CARVALHO, H. F.; THIEME, H. J. H.; HAMMERSCHMIDT, I.; CORDONI, J. A.; COSTA, J. C.; MULLER, J. J. V.; SILVA, L. A. F.; CHISTÓFORO, P. R.; LISSA, S. L. A cultura do gengibre. Curitiba: EMATER/PR, 1996.

SUR, P.; GOMES, A.; VEDASIROMONI, J.R.; SAHU, N.P.; BANERJEE, S. *Trigonella foenum graecum* (fenugreek) seed extract as an antineoplastic agent. *Phytotherapy Research* **15**: 257, 2001.

TAO, Y.; LI, W.; LIANG, W.; BREEMEN, R. B. V. Identification and Quantification of Gingerols and Related Compounds in Ginger Dietary Supplements Using High-Performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **57**: 1014, 2009.

TAO, Y. Characterization of cyclooxygenase-2 inhibitors from ginger dietary supplements. Chicago, Departamento de Química Medicinal e Farmacognosia - Universidade de Illinois - UIC, 2007. Tese de Doutorado, 143 p.

VALDES-RODRIGUEZ, S.; CEDRO-TANDA, A.; AGUILAR-HERNANDEZ, V.; CORTES-ONOFRE, E.; BLANCO-LABRA, A.; GUERRERO-RANGEL, A. Recombinant amaranth cystatin (AhCPI) inhibits the growth of phytopathogenic fungi. *Plant Physiology and Biochemistry*, **48**: 469, 2010.

VIEGAS JR, C. Isolamento, Estudo Farmacológico e da Relação Estrutura-Atividade de Alcalóides Piperidínicos de *Cassia spectabilis* (DC.) Irwin et Barn. (Leguminosae). Araraquara, Programa de Pós-graduação em Química – UNESP, 2003, 216 p.

WILSON, M. R.; GALLIMORE, W. A.; REESE, P. B. Steroid transformations with *Fusarium oxysporum* var. *cubense* and *Colletotrichum musae*. *Steroids*, **64**: 834, 1999.

YAMADA, T.; HOSHINO, M.; HAYAKAWA, T.; OHHARA, H.; YAMADA, H.; NAKAZAWA, T. Dietary diosgenin attenuates subacute intestinal inflammation associated with indomethacin in rats. *American Journal Physiology*, **273**: 355, 1997.