



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

RENAN GUILHERME MARIM

**BIOTRANSFORMAÇÃO FÚNGICA E AVALIAÇÃO DA  
ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO ÁCIDO  
GRANDIFLORÊNICO E SEUS DERIVADOS**

---

Londrina  
2019

RENAN GUILHERME MARIM

**BIOTRANSFORMAÇÃO FÚNGICA E AVALIAÇÃO DA  
ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO ÁCIDO  
GRANDIFLORÊNICO E SEUS DERIVADOS**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-graduação em Química da Universidade Estadual de Londrina, como requisito à obtenção do título de Mestre em Química.

Orientador: Prof. Dr. Nilton Syogo Arakawa

Londrina  
2019

RENAN GUILHERME MARIM

**BIOTRANSFORMAÇÃO FÚNGICA E AVALIAÇÃO DA  
ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO ÁCIDO  
GRANDIFLORÊNICO E SEUS DERIVADOS**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-graduação em Química da Universidade Estadual de Londrina como requisito para obtenção do título de Mestre em Química.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Orientador: Prof. Dr. Nilton Sogo Arakawa  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

---

Prof. Dr. Gerson Nakagata  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

---

Prof. Dr. Alexandre Rosato  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Londrina, 26 de abril de 2019.

*Dedico este trabalho especialmente à minha família, por sempre terem acreditado e investido em mim. Mãe, seu cuidado e dedicação foi que deram, em muitos momentos, a esperança para seguir. Pai, sua presença significou segurança e certeza de que nunca estarei sozinho.*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por ter me dado uma família maravilhosa e amigos sinceros. Deus nos atribui missões pelas quais já sabe que temos o potencial de batalhar para conseguir sucesso. Por isso lutar, conquistar, vencer, até mesmo cair e perder, e o principal, viver é essencial para conseguir aquilo que almejamos.

À Universidade Estadual de Londrina, seu corpo docente, direção e administração que me deram a oportunidade de fazer o curso.

Ao meu orientador Prof. Dr. Nilton Syogo Arakawa pela oportunidade de desenvolver este projeto em seu grupo de pesquisa, apoio e dedicação na elaboração deste trabalho, além de me orientar e ensinar com muita paciência, sem medir esforços desde a escolha do título até a conclusão deste trabalho.

Aos meus pais, pelo amor, incentivo e apoio incondicional. Agradeço a minha mãe Rosangela Garcia Marim, heroína que me deu apoio e incentivo nas horas difíceis. Ao meu pai Denilson Cestari Marim, que apesar de todas as dificuldades sempre me fortaleceu o que foi muito importante.

À minha irmã Beatriz Marjorie Marim pela paciência e carinho, além de me ensinar que o futuro é feito a partir da constante dedicação no presente.

Agradeço também a todos os professores por me proporcionar o conhecimento, não somente por terem me ensinado, mas por terem me feito aprender. A palavra mestre, nunca fará justiça aos professores dedicados aos quais sem nominar terão os meus eternos agradecimentos.

Meus agradecimentos a todos meus amigos e companheiros de laboratório, que se tornaram verdadeiros irmãos pela amizade que fizeram parte da minha formação e que vão continuar presentes em minha vida com certeza. Agradeço a permissão de realização de ensaios no Laboratório NIP3. Ao laboratório LABSPEC pela obtenção dos espectros de RMN

Ao programa de Pós-graduação em Química da Universidade Estadual de Londrina pela oportunidade de conhecer incríveis profissionais que contribuíram para minha formação.

Enfim, agradeço a todos que direta ou indiretamente fizeram parte da minha formação, o meu muito obrigado.

*“É o grau de comprometimento que determina o sucesso, não o número de seguidores.”*

**J. K. Rowling**

*“O homem é do tamanho do seu sonho.”*

**Fernando Pessoa**

MARIM, Renan Guilherme. **Biotransformação fúngica e avaliação da atividade antimicrobiana do ácido grandiflorênico e seus derivados**. 2019. 77 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2019.

## RESUMO

A *Sphagneticola trilobata* (L.) Pruski é uma planta que pertence à família Asteraceae, conhecida popularmente como vedélia. Estudos fitoquímicos realizados com esta planta demonstram que há grande concentração de compostos terpênicos, sendo que o diterpeno ácido grandiflorênico (AG) encontra-se como composto majoritário na planta como um todo, principalmente nas folhas. O objetivo deste trabalho foi isolar e biotransformar o AG a partir das folhas da *Sphagneticola trilobata*, além de verificar o potencial antimicrobiano do AG e dos respectivos compostos biotransformados frente às várias cepas bacterianas e suas atividades hemolíticas em glóbulos vermelhos humanos (GVH). Para isso foi feito o isolamento do AG a partir do extrato hexânico das folhas de *S. trilobata*, utilizando cromatografia líquida a vácuo (CLV). Com o AG purificado e identificado, este foi biotransformado com o fungo filamentosso *Cunninghamella echinulata*. O extrato biotransformado (EB) foi submetido às diversas modalidades cromatográficas, isolando-se três compostos (C1 e C2), sendo identificados através de análises espectrométricas de RMN unidimensional ( $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ ) e bidimensional (HMBC, HMQC, Cosy  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ ). A partir dos ensaios de difusão em ágar e da Concentração Inibitória Mínima (CIM), foi observado que o extrato hexânico (EH), uma das frações cromatográficas do EH (F3) e o AG apresentaram atividade antimicrobiana frente a *S. pyogenes* (ATCC 19615) com CIM de 12,5, 12,5 e 3,125  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , respectivamente. Os compostos biotransformados se apresentaram inativos contra bactérias Gram positivas e Gram negativas. O AG apresentou lipossolubilidade (Log P) de 4,48, enquanto os compostos biotransformados apresentaram Log P de aproximadamente 3,8. Portanto a biotransformação reduziu a Log P e conseqüentemente dificultou a passagem dos compostos biotransformados pelas membranas plasmáticas dos microrganismos.

**Palavras-chave:** Asteraceae. Diterpeno. Antimicrobiano. Fungo filamentosso.

MARIM, Renan Guilherme. **Fungal biotransformation and evaluation of the antimicrobial activity of grandiflorenic acid and your derivatives.** 2019. 77 p. Dissertation (Master's degree in Chemistry) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2019.

## ABSTRACT

*Sphagneticola trilobata* (L.) Pruski is a plant belonging to the family Asteraceae, popularly known as vedelia. This study demonstrated that there is a high concentration of terpene compounds, and diterpene grandiflorenic acid (GA) is found in the majority of the plant as a whole, mainly in the leaves. The objective of this work was to isolate and biotransform the GA after the treatment of the bacteria, in addition to detecting the antimicrobial potential of GA and the biotransformed fatty acids in front of the various bacteria and their hemolytic activities in human red blood cells (HRBC). The GA was isolated from the hexagonal extract of the leaves of *S. trilobata* using liquid chromatography (HPLC). With GA purified and identified, it was biotransformed with the filamentous fungus *Cunninghamella echinulata*. The biotransformed extract (BE) was subjected to chromatographic filming, isolating the compound (C1 and C2), being detected in one-dimensional ( $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$ ) and two-dimensional NMR (HMBC, HMQC, Cozy 1H-1H) phylogenetic chains. The minimum inhibitory propagation (MIC) was the hexane extract (HE), one of the chromatographic fractions of EH (F3) and GA, the antimicrobial activity against *S. pyogenes* (ATCC 19615). With MICs of 12.5, 12.5 and 125  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , respectively. The biotransformed compounds are inactive against Gram positive and Gram negative. The GA presented liposolubility (Log P) of 4.48, while the positive biotransformed Log P compounds of approximately 3.8. Therefore, biotransformation reduced Log P and consequently hindered the passage of the biotransformed compounds by the plasma membranes of the microorganisms.

**Key words:** Asteraceae. Diterpene. Antimicrobial. Filamentous fungus.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1.</b>	Papiro de Ebers exposto na Biblioteca da Universidade de Leipzig.....	13
<b>Figura 2.</b>	Estrutura da morfina .....	14
<b>Figura 3.</b>	Estruturas da salicilina (a) e do ácido acetilsalicílico (b).....	14
<b>Figura 4.</b>	Fórmula estrutural da penicilina.....	15
<b>Figura 5.</b>	Foto da espécie <i>S. trilobata</i> .....	16
<b>Figura 6.</b>	Vias do metabolismo secundário simplificado.....	18
<b>Figura 7.</b>	Origem biossintética dos terpenos. ....	20
<b>Figura 8.</b>	Exemplos de esqueletos carbônicos pertencentes à classe dos diterpenos. ....	21
<b>Figura 9.</b>	Exemplos de conversões microbiológicas utilizando diterpenos com esqueleto caurânico.....	22
<b>Figura 10.</b>	Estrutura molecular do ácido grandiflorênico. ....	23
<b>Figura 11.</b>	Imagens do fungo filamentoso <i>Cunninghamella echinulata</i> visto em microscópio de luz (A) e em crescimento em ágar Sabouraud dextrose (B). ....	24
<b>Figura 12.</b>	Biotransformação do lapachol por <i>C. echinulata</i> .....	25
<b>Figura 13.</b>	Biotransformação do ácido ent-15-oxocaur-16-en-19-óico (1) por <i>C. aphidicola</i> .27	27
<b>Figura 14.</b>	Biotransformação do ácido caurenóico (1) por <i>R. stolonifer</i> .....	27
<b>Figura 15.</b>	Biotransformação do ácido grandiflorênico (1) por <i>F. graminearum</i> .....	28
<b>Figura 16.</b>	Formula estrutural da arsfenamina.....	30
<b>Figura 17.</b>	Formula estrutural geral dos principais antibióticos obtidos a partir de produtos naturais. ....	31
<b>Figura 18.</b>	Formula estrutural do Ácido Clavulânico.....	32
<b>Figura 19.</b>	Resumo dos processos para isolamento do ácido grandiflorênico.....	42
<b>Figura 20.</b>	Espectro de RMN <sup>1</sup> H do AG (CDCl <sub>3</sub> ). ....	42
<b>Figura 21.</b>	Espectro de RMN <sup>13</sup> C do AG (CDCl <sub>3</sub> ). ....	43
<b>Figura 22.</b>	Espectro de RMN <sup>1</sup> H do AG (CDCl <sub>3</sub> ) aproximado. ....	43
<b>Figura 23.</b>	Estrutura molecular do AG. ....	44
<b>Figura 24.</b>	Placa de CCD com as frações provenientes da CLV na proporção de hexano : acetato (1:1).....	46
<b>Figura 25.</b>	Placa de CCD com as frações provenientes da CLV na proporção de hexano : acetato (8:2).....	47
<b>Figura 26.</b>	Espectro de RMN <sup>1</sup> H do C1 (DMSO-d <sub>6</sub> ). ....	48
<b>Figura 27.</b>	Espectro de RMN <sup>13</sup> C do C1 (DMSO-d <sub>6</sub> ). ....	48
<b>Figura 28.</b>	Espectro de RMN DEPT 90 do C1 (DMSO-d <sub>6</sub> ). ....	49
<b>Figura 29.</b>	Espectro de RMN DEPT 135 do C1 (DMSO-d <sub>6</sub> ). ....	49
<b>Figura 30.</b>	Estrutura proposta para C1. ....	51
<b>Figura 31.</b>	Placa de CCD da fração 19 na proporção de hexano x acetato (7x3). ....	51
<b>Figura 32.</b>	Espectro de RMN <sup>1</sup> H do C2 (DMSO-d <sub>6</sub> ). ....	52
<b>Figura 33.</b>	Espectro de RMN <sup>13</sup> C do C2 (DMSO-d <sub>6</sub> ). ....	52
<b>Figura 34.</b>	Espectro de RMN HMBC do C2 (DMSO-d <sub>6</sub> ). ....	53
<b>Figura 35.</b>	Estrutura proposta para C2. ....	54
<b>Figura 36.</b>	Resumo dos processos para isolamento dos ácidos biotransformados.....	56
<b>Figura 37.</b>	Atividade hemolítica do F3 em diferentes concentrações.....	63
<b>Figura 38.</b>	Atividade hemolítica do AK em diferentes concentrações. ....	64
<b>Figura 39.</b>	Atividade hemolítica do AG em diferentes concentrações.....	64

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b>	Proporções das fases móveis utilizadas na realização da Cromatografia Líquida a Vácuo.....	36
<b>Tabela 2.</b>	Proporções das fases móveis utilizadas na realização da Cromatografia Líquida a Vácuo e seus respectivos rendimentos. ....	41
<b>Tabela 3.</b>	Valores dos sinais no espectro de RMN de $^1\text{H}$ do AG ( $\text{CDCl}_3$ ), comparado à literatura .....	44
<b>Tabela 4.</b>	Valores dos sinais no espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ do AG ( $\text{CDCl}_3$ ), comparados à literatura.....	45
<b>Tabela 5.</b>	Proporções das fases móveis utilizadas na realização da Cromatografia Líquida a Vácuo com o extrato biotransformado e seus respectivos rendimentos.....	46
<b>Tabela 6.</b>	Valores dos sinais no espectro de RMN de $^1\text{H}$ ( $\text{DMSO-d}_6$ ) de C1 comparados a dados obtidos de espectro simulado.....	50
<b>Tabela 7.</b>	Valores dos sinais no espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ ( $\text{DMSO-d}_6$ ) de C1 comparado a dados obtidos de espectro simulado.....	50
<b>Tabela 8.</b>	Valores dos sinais no espectro de RMN de $^1\text{H}$ ( $\text{DMSO-d}_6$ ) de C2 comparados a dados obtidos de espectro simulado.....	54
<b>Tabela 9.</b>	Valores dos sinais no espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ ( $\text{DMSO-d}_6$ ) de C2 comparado a dados obtidos de espectro simulado.....	55
<b>Tabela 10.</b>	Resultados do halo de inibição formado no teste de antibiograma para as cepas bacterianas.....	57
<b>Tabela 11.</b>	Resultados da Concentração Inibitória Mínima (CIM), para cepas bacterianas. ....	59
<b>Tabela 12.</b>	Valores de lipossolubilidade para os diterpenos isolados. ....	66

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

$\delta$	Deslocamento químico
AG	Ácido Grandiflorênico
AK	Ácido Caurenóico
ATCC	American Type Culture Collection
$^{13}\text{C}$	Carbono 13
C5	Hemiterpenos
C10	Monoterpenos
C15	Sesquiterpenos
C20	Diterpenos
C25	Sesterpenos
C30	Triterpenos
C40	Tetraterpenos
CCCD	Cromatografia Comparativa em Camada Delgada
CLV	Coluna Líquida a Vácuo
Hex.	Hexano
IC50	do inglês <i>inhibitory concentration 50%</i>
$J$	Constante de acoplamento
$m$	múltiplo

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	13
1.1	PRODUTOS NATURAIS .....	13
1.2	FAMÍLIA ASTERACEAE.....	16
1.3	METABÓLITOS SECUNDÁRIOS.....	17
1.3.1	Terpenos.....	19
1.3.1.1	Diterpenos.....	20
1.3.1.2	Cauranos .....	21
1.4	FUNGOS .....	23
1.4.1	Biotransformação.....	25
1.5	BACTÉRIAS.....	29
1.5.1	Antimicrobianos .....	30
1.5.1.1	Resistência Bacteriana .....	33
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	34
2.1	GERAL.....	34
2.2	ESPECÍFICOS.....	34
<b>3</b>	<b>METODOLOGIA</b> .....	35
3.1	MATERIAIS UTILIZADOS.....	35
3.2	OBTENÇÃO DO EXTRATO HEXÂNICO.....	35
3.2.1	Fracionamento do Extrato Hexânico.....	35
3.3	BIOTRANSFORMAÇÃO DO ÁCIDO GRANDIFLORÊNICO .....	36
3.4	IDENTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS ISOLADOS.....	37
3.5	ENSAIOS BIOLÓGICOS .....	38
3.5.1	Cepas Bacterianas.....	38
3.5.2	Disco difusão em ágar .....	39
3.5.3	Concentração Inibitória Mínima .....	39
3.5.4	Atividade Hemolítica em Glóbulos Vermelhos Humanos .....	40
<b>4</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	41
4.1	ISOLAMENTO DO ÁCIDO GRANDIFLORÊNICO .....	41
4.1.1	Identificação do Ácido Grandiflorênico.....	42
4.2	ISOLAMENTO E PURIFICAÇÃO DOS DITERPENOS BIOTRANSFORMADOS.....	45
4.2.1	Identificação do C1 .....	47
4.2.2	Fração 19.....	51
4.3	ENSAIOS BIOLÓGICOS .....	57
4.3.1	Disco difusão em ágar .....	57
4.3.2	Concentração Inibitória Mínima .....	58
4.3.3	Atividade Hemolítica em Glóbulos Vermelhos Humanos .....	62
<b>5</b>	<b>CONCLUSÕES</b> .....	67
<b>6</b>	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	69

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 PRODUTOS NATURAIS

Na natureza, ao longo da história humana, sempre foram utilizadas as plantas como forma de tratamento e de prevenção de várias doenças. O papiro de Ebers (Figura 1), descoberto e publicado por Georg Ebers, é uma das primeiras descrições sobre plantas medicinais feitas pelo homem, é datado de aproximadamente 1550 a.C. Em 1890, H. Joachin o traduziu pela primeira vez. Esse papiro além de enumerar cerca de 100 doenças, também descreve um grande número de drogas de natureza animal e vegetal (VILELA, 1977).

**Figura 1.** Papiro de Ebers exposto na Biblioteca da Universidade de Leipzig.

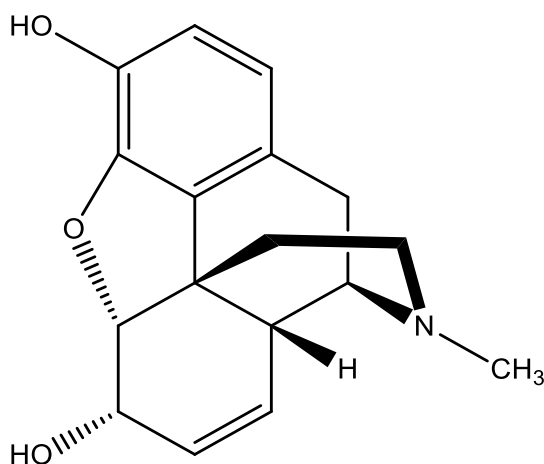


Fonte: ALEGRE, 2012.

Durante a civilização grega, período anterior ao nascimento de Cristo (a.C), diversos filósofos utilizavam os produtos naturais como fonte de remédios. Os filósofos mais conhecidos foram Hipócrates (460 a.C.), considerado o pai da medicina moderna, e Teofrasto (372 a.C.), discípulo de Aristóteles que escreveu sobre a utilização da espécie botânica *Papaver somniferum*, planta da qual cujo princípio ativo é a morfina (Figura 2), um metabólito secundário da classe dos alcalóides (GURIB-FAKIM, 2014; PINTO *et al.*, 2002). Em 1804 d.C. a morfina foi isolada pelo farmacêutico alemão Friedrich Sertürner como constituinte majoritário de *Papaver somniferum* (DUARTE, 2005; PINTO, 2012). Em 1826 a E. Merck começou a

comercializar a morfina, o primeiro metabólito secundário isolado a ser comercializado (CRAGG; GROTHAUS; NEWMAN, 2014; GURIB-FAKIM, 2014). Este foi o início de uma nova era na medicina, onde os medicamentos começaram a ser purificados a partir de plantas e administrado em dosagens precisas, independente da fonte ou a idade do material (CRAGG; GROTHAUS; NEWMAN, 2014; GURIB-FAKIM, 2014).

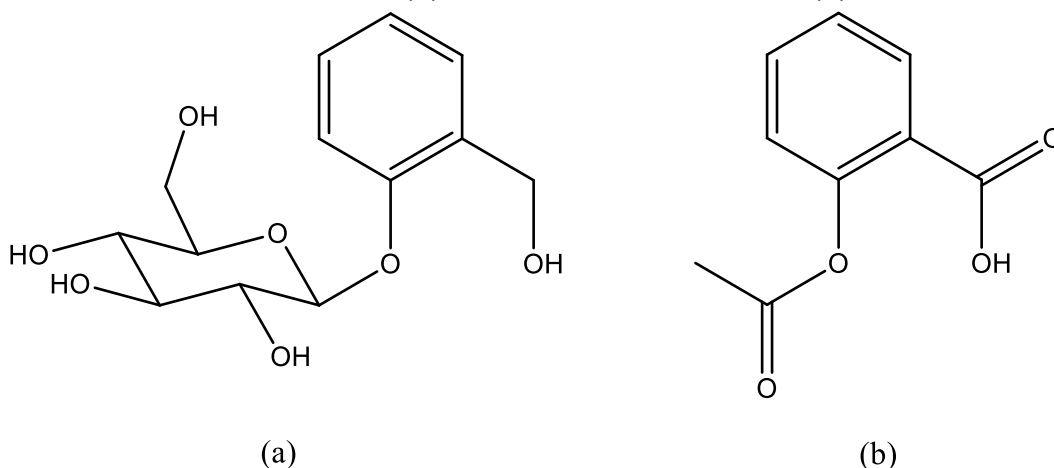
**Figura 2.** Estrutura da morfina



**Fonte:** Adaptado de COUTO (2016).

Em 1897 o laboratório farmacêutico alemão Bayer sintetizou o ácido acetilsalicílico (Figura 3b) a partir do ácido salicílico ou salicilina (Figura 3a), isolada de *Salix alba* (BARREIRO; BOLZANI, 2009; VIEGAS JR.; DA SILVA BOLZANI; BARREIRO, 2006). O ácido acetilsalicílico, aspirina, foi o primeiro fármaco a ser semi sintetizado a partir de um produto natural (BARREIRO; BOLZANI, 2009; CRAGG; GROTHAUS; NEWMAN, 2014; PINTO *et al.*, 2002).

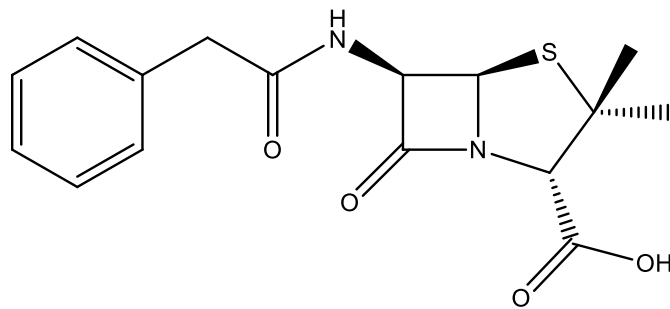
**Figura 3.** Estruturas da salicilina (a) e do ácido acetilsalicílico (b).



**Fonte:** Adaptado de RAINHO (2017).

Outro marco importante relacionado aos produtos naturais foi a descoberta por Fleming (1929) da penicilina G, isolada do fungo *Penicillium notatum*, sendo o primeiro antibiótico a ser utilizado com sucesso (BETTELHEIM *et al.*, 2012). A PENICILINA G (Figura 4), ácido (2S,5R,6R)-3,3-dimetil-7-oxo-6-(2-fenilacetamido)-4-tio-1-azabicyclo[3.2.0]heptano-2-carboxílico ou benzilpenicilina, é um antibiótico beta-lactâmico com fórmula molecular  $C_{16}H_{18}N_2O_4S$  e massa molar  $334,37 \text{ g mol}^{-1}$ , é um sólido com ponto de fusão de  $214-217 \text{ }^\circ\text{C}$  (SOARES, 2014). A atividade da penicilina era superior à das sulfas e a demonstração que fungos produzem substâncias capazes de inibir atividades bacterianas motivou uma nova frente de pesquisas na busca de antibióticos (GUIMARÃES; DA SILVA MOMESSO; PUPO, 2010). Então, em 1940, Sir Howard Florey e Ernst Chain, de Oxford, retomaram as pesquisas de Fleming para a produção da penicilina em escala industrial, inaugurando uma nova era para a medicina, a era dos antibióticos. Com esta descoberta iniciou-se um período de extensa investigação e estudo dos mais variados microrganismos, principalmente por empresas farmacêuticas (CRAGG; GROTHAUS; NEWMAN, 2014).

**Figura 4.** Fórmula estrutural da penicilina.



**Fonte:** Adaptado de SOARES (2014).

De acordo com NEWMAN e CRAGG (2016), entre janeiro de 1981 e dezembro de 2014, 1562 substâncias foram aprovadas como fármacos, sendo que destas 31 % são Produtos, derivados de Produtos Naturais, inspirados em Produtos Naturais, ou são Produtos Naturais botânicos.

No Brasil, por algumas vezes, as plantas com potencial medicinal têm sido o único tipo de tratamento de doenças disponível à população. No entanto, o uso indiscriminado dessas plantas aliado à falta de conhecimento pode causar danos à saúde (DIAS *et al.*, 2014).

Mesmo com tantos estudos na área de produtos naturais e de muitos

compostos já serem comercializados, a busca por novos compostos com atividade biológicas se torna cada vez mais visados, pela necessidade de novos tratamentos eficientes para as doenças cujo tratamento convencional já não é mais eficiente, além de buscar tratamentos eficazes para as doenças que ainda não possuem um tratamento específico (MACIEL *et al.*, 2002; VIEGAS JR.; DA SILVA BOLZANI; BARREIRO, 2006).

## 1.2 FAMÍLIA ASTERACEAE

A família Asteraceae compreende cerca de 25.000 espécies, representada por aproximadamente 1.900 gêneros (HATTORI; NAKAJIMA, 2008). Essa família é uma das mais antigas e importantes famílias, apesar de alguns gêneros apresentarem compostos tóxicos (DE CARVALHO *et al.*, 2001; DIAS *et al.*, 2014).

Um exemplo de planta da família Asteraceae é a espécie *Sphagneticola trilobata*, anteriormente classificada como *Wedelia paludosa* e *Acmella brasiliensis*, é conhecida popularmente como vedélia, margaridão, pseudo-arnica ou mal-me-quer-do-brejo (Figura 5) (DA SILVA *et al.*, 2012). Trata-se de uma planta ornamental, encontrada em várias regiões do Brasil, principalmente em regiões úmidas (BATISTA *et al.*, 2009). Na Figura 5 podemos observar que a *Sphagneticola trilobata* é uma planta herbácea que apresenta flores com coloração amarela, com caule castanho avermelhado, folhas opostas, curto-pecioladas e membranáceas (BACCARIN *et al.*, 2009).

**Figura 5.** Foto da espécie *S. trilobata*.



**Fonte:** KINDEL (2016).

Estudos fitoquímicos realizados com a *Sphagneticoloa trilobata*

(Figura 5) demonstram que há grande concentração de compostos terpênicos esteroidal e favonoídicos (BACCARIN *et al.*, 2009). As concentrações desses compostos são distintas se comparadas com diferentes partes da planta (raiz, caule, folhas e flores), sendo que o diterpeno ácido grandiflorênico encontra-se como composto majoritário na planta como um todo, principalmente nas folhas (BATISTA *et al.*, 2009).

### 1.3 METABÓLITOS SECUNDÁRIOS

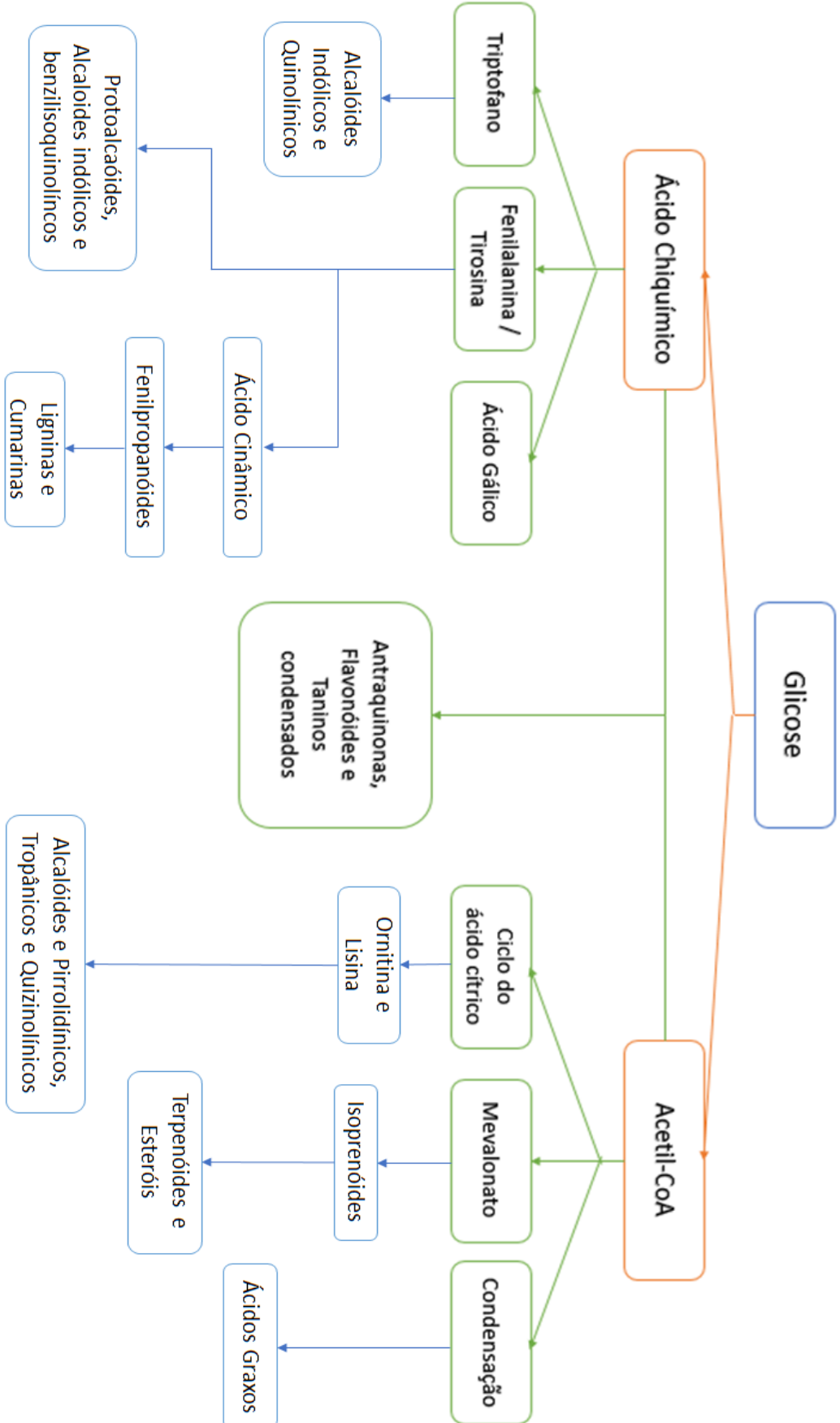
De maneira geral, as plantas em seu metabolismo primário seguem vias metabólicas para sintetizar e utilizar compostos orgânicos essenciais para a sua sobrevivência, como por exemplo, açúcares, aminoácidos, polissacarídeos, proteínas, DNA, RNA, entre outros, chamados de metabólitos primários (FUENTEALBA *et al.*, 2017; ZERBE; CHIANG; BOHLMANN, 2012).

Devido a evolução pela seleção natural, as plantas seguem outras vias metabólicas que produzem compostos peculiares, essas vias são chamadas de metabolismo secundário (Figura 6) (BULGAKOV; AVRAMENKO; TSITSIASHVILI, 2017). O metabolismo secundário é o responsável por sintetizar e utilizar compostos associados a estados específicos do seu desenvolvimento, como por exemplo em períodos de stress causados por deficiência de nutrientes ou por ataques de microrganismos (MULABAGAL; TSAY, 2004).

O metabolismo secundário vegetal é de grande importância para os seres humanos, incluindo princípios ativos de medicamentos e de outros produtos químicos igualmente valiosos, como essências, corantes, inseticidas e aditivos alimentares (SCHULZ; BARANSKA, 2007). Os metabolismos primário e secundário estão interligados, o que se torna difícil estabelecer uma divisão exata entre ambos. O metabolismo primário é o formador dos materiais de partida para as principais vias do metabolismo secundário, como o ácido chiquímico e o acetato (FUENTEALBA *et al.*, 2017).

O ácido chiquímico, pela via do chiquimato, dá origem a muitos compostos aromáticos, entre eles, aminoácidos aromáticos, ácidos cinâmicos e certos polifenóis (SILVA *et al.*, 2017). Já o acetato, pela via de seu próprio nome, dá origem a duas diferentes vias, a via acetato-malonato sintetiza policetídeos, enquanto a via acetato-mevalonato sintetiza os terpenos (SANTOS, 2004; SILVA *et al.*, 2017).

Figura 6. Vias do metabolismo secundário simplificado.



Fonte: Adaptado de SIMÕES *et al.* (2010).

Variações temporais e espaciais, tais como sazonalidade, temperatura, disponibilidade hídrica, radiação ultravioleta, altitude e poluição da atmosfera, podem modificar as interações de processos bioquímicos nas plantas, ou seja, as concentrações dos metabólitos secundários sintetizados podem ser alteradas (GOBBO-NETO; LOPES, 2007).

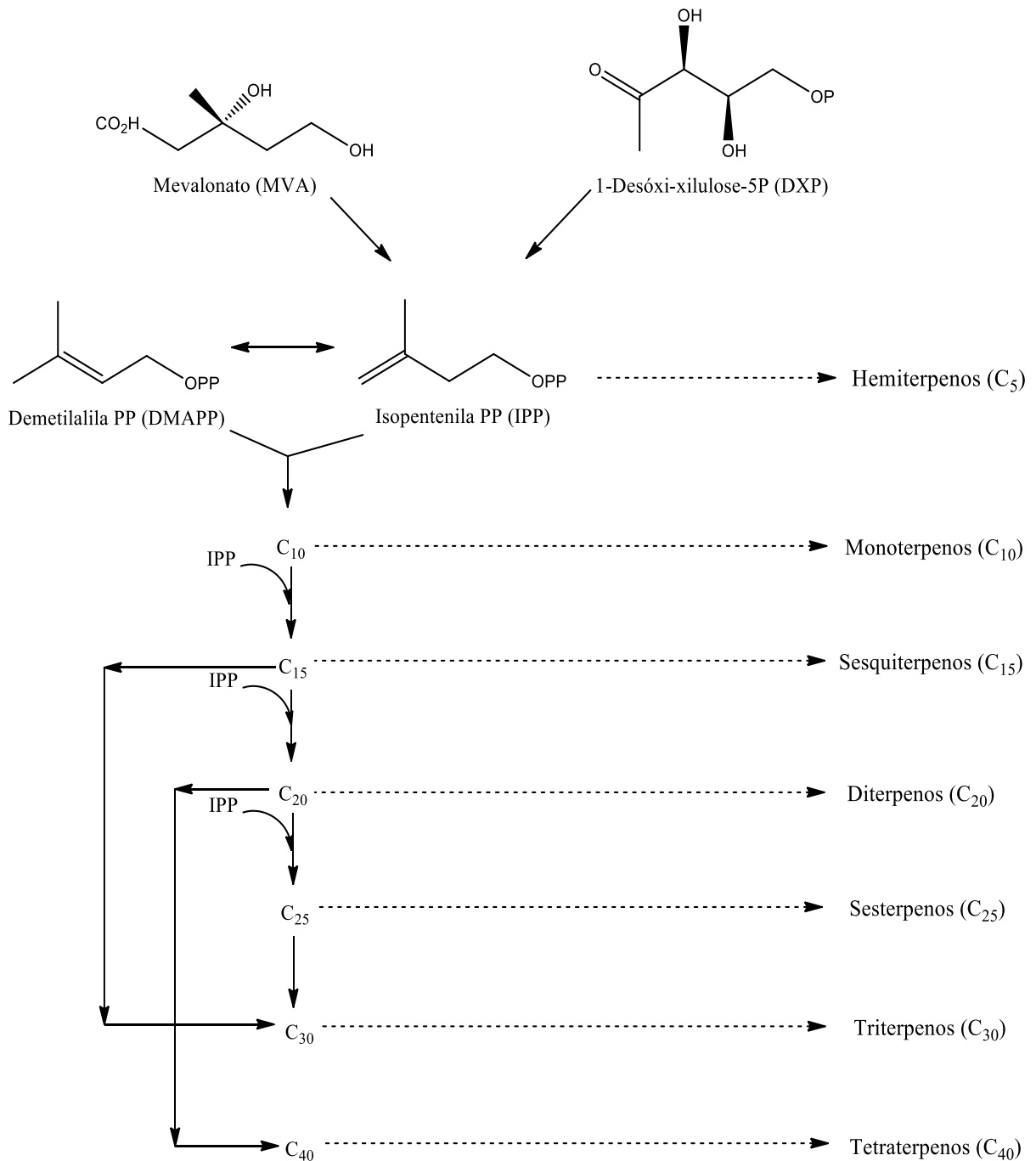
### 1.3.1 Terpenos

Os terpenos são compostos amplamente distribuídos na natureza, sendo constituinte de uma grande variedade de compostos vegetais (SIMÕES *et al.*, 2010). Eles são extremamente complexos em termos estruturais e são os mais diversificados na classe de produtos naturais (DEWICK, 2002).

Os terpenos possuem diversas funções nas plantas atuando como fitoalexinas, repelentes de insetos, agentes de atração polínica, agentes de defesa contra herbívoros, feromônios, inseticidas ou repelentes, hormônios vegetais, moléculas de sinalização, aleloquímicos, antimicrobianos e antifúngicos (MEDEIROS *et al.*, 2015; SILVA *et al.*, 2017).

A Figura 7 complementa a Figura 6, mostrando a continuação da via metabólica do acetil-CoA para a formação dos terpenos, que podem ser formados a partir de duas diferentes rotas biossintéticas: uma dependente do mevalonato (MVA) e outra que ocorre nos plastídios e que passa pelo intermediário 1-desoxi-D-xilulose-5-fosfato (DXP). Sendo que nas duas situações os precursores vão originar duas unidades isoprênicas (C<sub>5</sub>), o pirofosfato de isopentenila (IPP) e o dimetilalila (DMAPP). Na condensação das duas unidades isoprênicas entre si, através do modelo clássico “cabeça-cauda”, inicia a formação de diferentes esqueletos terpênicos: hemiterpenos (C<sub>5</sub>), monoterpenos (C<sub>10</sub>), Sesquiterpenos (C<sub>15</sub>), diterpenos (C<sub>20</sub>) e sesterpenos (C<sub>25</sub>). Para os esqueletos triterpenos (C<sub>30</sub>) e tetraterpenos (C<sub>40</sub>) a condensação ocorre pelo modelo “cabeça-cabeça” (DEWICK, 2002; SIMÕES *et al.*, 2010).

**Figura 7.** Origem biossintética dos terpenos.



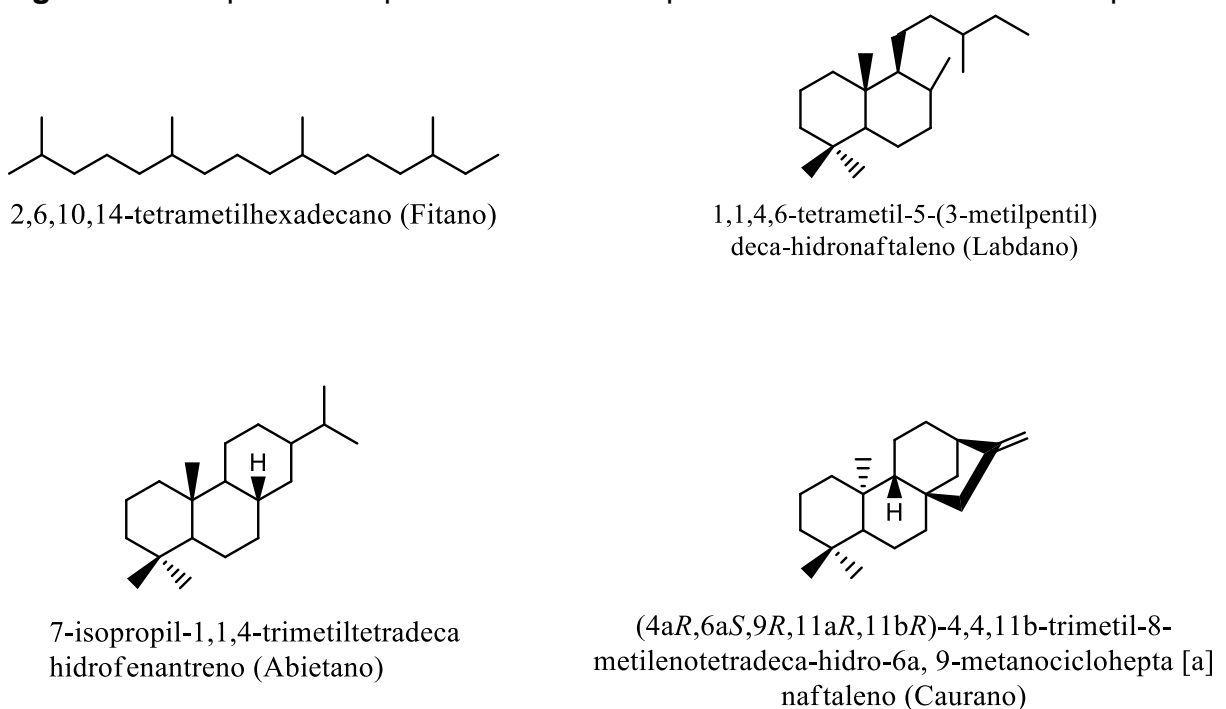
**Fonte:** Adaptado de SIMÕES *et al.* (2010).

### 1.3.1.1 Diterpenos

Os diterpenos são metabólitos secundários da classe dos terpenos, que contêm 20 átomos de carbonos, correspondente a 4 unidades de isopreno. Geralmente são insolúveis em água e conferem certa volatilidade. Possuem características físico-químicas dependentes da estrutura de sua cadeia orgânica e dos grupos funcionais que o formam (ELSON, 1995).

Os diterpenos podem apresentar cadeia aberta, acíclicos, ou apresentar cadeias fechadas, policíclicos. Os diterpenos policíclicos podem ser classificados de acordo com o seu esqueleto carbônico, os principais são: bicíclicos (labdano e clerodano), tricíclicos (pimarano, abietano) e tetracíclicos (graianotoxinas, gibberelinas, estemodanos, cauranos, traquilobanos) (HANSON, 2006). A Figura 8 apresenta estruturas básicas de algumas classes de diterpenos.

**Figura 8.** Exemplos de esqueletos carbônicos pertencentes à classe dos diterpenos.



**Fonte:** Adaptado de HANSON (2006).

### 1.3.1.2 Cauranos

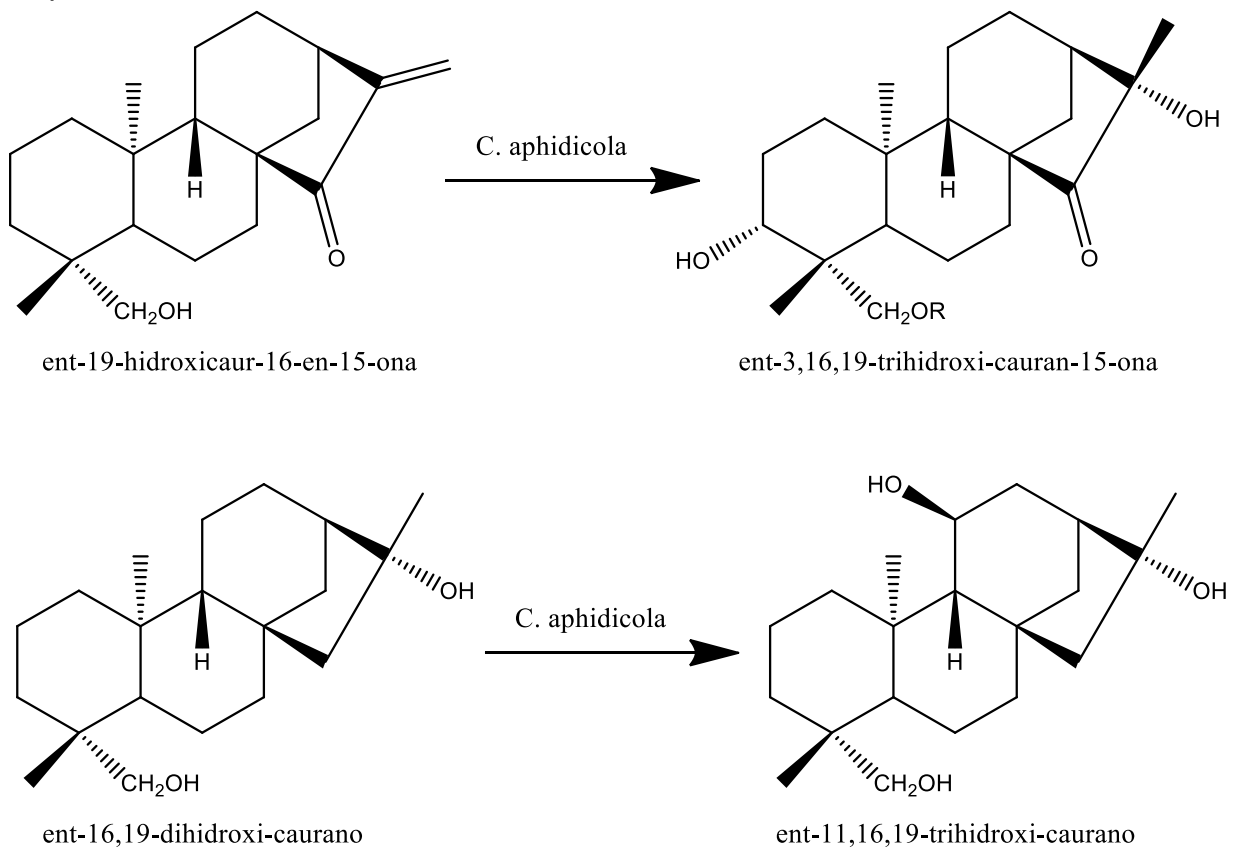
Dentre a classe de diterpenos, tem sido observado um interesse especial com aqueles com esqueleto caurânico, como por exemplo, o ácido grandiflorênico, cuja nomenclatura IUPAC é ácido *ent-caur-9(11),16-dien-19-óico* (Figura 10), pois este esqueleto apresenta uma variedade de atividades biológicas como: anticonvulsivante (OKOYE et al., 2013), antiparasitária (TAKAHASHI; VIEIRA; SILVA, 2002), fitotóxica (DA SILVA et al., 2015), hormonal (TORRENEGRA; GÓMEZ; TÉLLEZ, 2001), anti-inflamatória (CHAVAN *et al.*, 2012), antioxidante (KO; CHANG; LU, 2008), citotóxica (RUIZ et al., 2008), antiviral (WU et al., 1996), antibacteriana (BOAKYE-YIADOM; FIAGBE; AYIM, 1977; MOREIRA et al., 2016), leishmanicida

(DOS SANTOS *et al.*, 2013), moluscicida (SILVA *et al.*, 2015) e cercaricida (MAHAJAN; MONTEIRO, 1973), além de funcionar como intermediários na biossíntese de vários metabólitos de fungos e plantas (HEDDEN, 1997).

Alguns diterpenos com esqueletos caurânicos também exibem atividade citotóxica contra diferentes linhagens de células cancerígenas tais como HL-60, K562 e MKN-2839 (JIANG *et al.*, 1999), enquanto outros exercem atividade tripanocida (BATISTA; CHIARI; DE OLIVEIRA, 1999) e inibem a replicação do HIV *in vitro* (CHEN *et al.*, 1995).

Sabe-se que os diterpenos caurânicos, como o ácido grandiflorênico, são excelentes substratos para os processos de biotransformação (OLIVEIRA; HANSON; TAKAHASHI, 1995). Na Figura 9 podemos observar alguns exemplos da utilização de cauranos em conversões microbiológicas de diferentes compostos com esqueleto caurânico com o fungo *Cephalosporium aphidicola* (HANSON, 1995; HANSON; HITCHCOCK; TAKAHASHI, 1995).

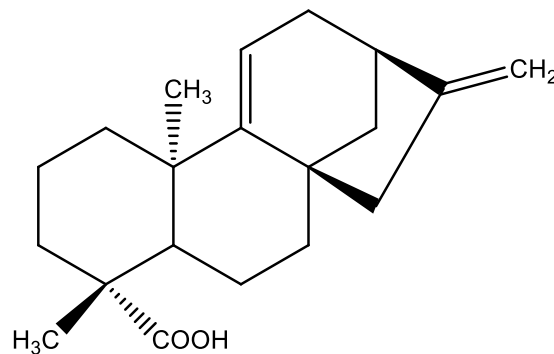
**Figura 9.** Exemplos de conversões microbiológicas utilizando diterpenos com esqueleto caurânico.



**Fonte:** Adaptado de HANSON; HITCHCOCK; TAKAHASHI (1995).

Na Figura 10 está apresentado a estrutura do ácido grandiflorênico (AG). Nesta figura podemos observar que o AG ( $C_{20}H_{28}O_2$ ) contém duas ligações duplas. A existência dessas duplas ligações foram provadas por Piozzi et al. (1972), com a titulação do ácido perbenzóico e por hidrogenação seletiva ao ácido di-hidro-grandifloreólico ( $C_{20}H_{30}O_2$ ) e ácido tetrahydro-grandiflorênico ( $C_{20}H_{32}O_2$ ) sob a forma de um grupo metileno exocíclico confirmada também pela formação de formaldeído por ozonólise, e de um sistema  $C = CH$  trissubstituído, como indicado por RMN e FTIR. O espectro de RMN do ácido grandiflorênico também revela a ocorrência de dois carbonos terciários (BATISTA; BRAGA; OLIVEIRA, 2005).

**Figura 10.** Estrutura molecular do ácido grandiflorênico.



Ácido Grandiflorênico (ent-caur-9(11),16-dien-19-óico)

**Fonte:** Próprio autor.

#### 1.4 FUNGOS

Os fungos são seres heterotróficos aclorofilados, pertencentes ao reino Fungi. Eles são de grande interesse biotecnológico para o desenvolvimento de processos e produtos de interesses econômico ou social (BEATRIZ; LIMA; MARQUES, 2005; HEGAZY *et al.*, 2015). Sua diversidade genética e metabólica tem sido explorada há milhares de anos, desde civilizações antigas, na fabricação de produtos alimentícios por fermentação, até os dias atuais visando à obtenção de diversos produtos biotecnológicos (RAVEN; EVERT; EICHHORN, 2007).

Bactérias e fungos filamentosos são capazes de realizar essas reações como uma resposta adaptativa ao seu ambiente a nível fisiológico e bioquímico, sendo assim os principais decompositores de matéria orgânica da biosfera. A decomposição desta matéria orgânica incorporada nos organismos promove liberação do dióxido de carbono na atmosfera e permitindo assim que várias

substâncias como compostos nitrogenados retornem ao solo podendo ser reutilizados (BURITY *et al.*, 2000; HEGAZY *et al.*, 2015).

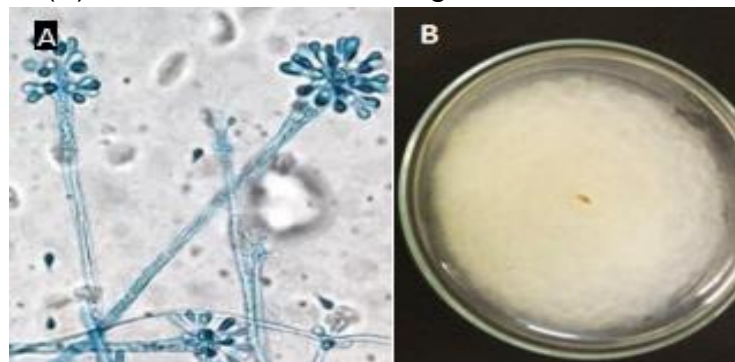
Alguns fungos podem ser utilizados no controle biológico de pragas e doenças de plantas, como por exemplo, existem vários inseticidas biológicos à base de fungos em diferentes regiões pelo mundo (BOAVENTURA; LOPES; TAKAHASHI, 2004).

Os fungos filamentosos são conhecidos por produzir em grande quantidade uma ampla gama de enzimas e realizarem modificações estruturais com grande eficiência. Com isso, fungos filamentosos têm sido extremamente utilizados para produção de compostos bioativos por meio de transformações microbianas (KRULL *et al.*, 2013).

*Cunninghamella* é um gênero de fungo filamentoso, da família Cunninghamellaceae, estabelecido por Matruchot no ano de 1903. Suas colônias apresentam crescimento rápido, micélio algodinoso e variação de cor entre branco cinza e marrom (ASHA; VIDYAVATHI, 2009).

Fungos do gênero *Cunninghamella*, assim como o *Cunninghamella echinulata* (Figura 11), destacam-se entre os outros gêneros, porque podem catalisar reações mimetizando o metabolismo dos mamíferos, tornando-se uma alternativa promissora para elucidação da rota metabólica de compostos exógenos (MUTAFOVA *et al.*, 2016; PALUDO *et al.*, 2013). Portanto, este gênero de fungos tem sido utilizado em várias reações de biotransformação, funcionando como uma ferramenta importante para a obtenção de compostos com atividades farmacológicas melhoradas, além de ser uma alternativa para obtenção e isolamento de compostos que são inviáveis pela síntese química (MUTAFOVA *et al.*, 2016).

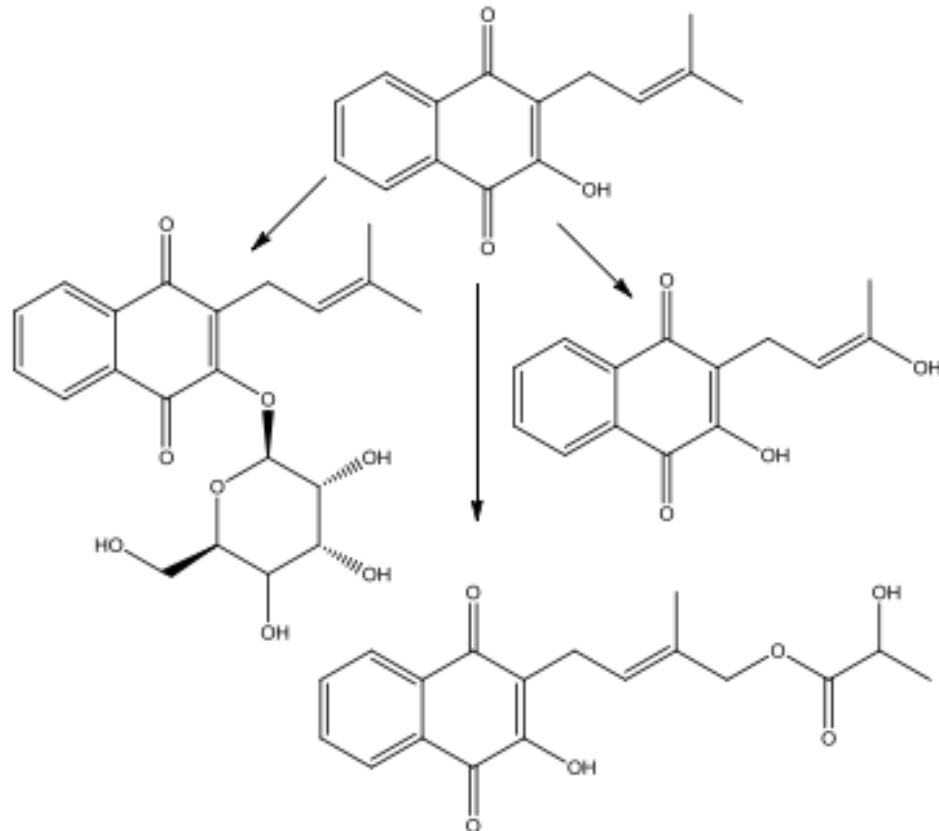
**Figura 11.** Imagens do fungo filamentoso *Cunninghamella echinulata* visto em microscópio de luz (A) e em crescimento em ágar Sabouraud dextrose (B).



**Fonte:** Adaptado de SILVA *et al.* (2014).

Otten e Rosazza (1981), obtiveram três derivados do lapachol, a partir da biotransformação com o fungo *Cunninghamella echinulata*. Os derivados obtidos estão apresentados na Figura 12.

**Figura 12.** Biotransformação do lapachol por *C. echinulata*.



**Fonte:** Adaptado de OTTEN; ROSAZZA (1981).

#### 1.4.1 Biotransformação

A biotecnologia é uma ferramenta moderna muito utilizada no desenvolvimento de técnicas de melhoramento vegetal e pode ser empregada também como uma alternativa interessante na obtenção de metabólitos secundários (MUTAFOVA *et al.*, 2016).

Processos biotecnológicos são investigados desde meados do século XIX, já que pesquisadores haviam observado a ocorrência da fermentação, mas apenas em 1863 Louis Pasteur, com trabalhos sobre vinho e cerveja, foi o responsável por comprovar a presença de microrganismos vivos no ar, que ao entrarem em contato

com a bebida, realizavam sua fermentação (LEITE *et al.*, 2006).

A biotransformação fúngica se trata de uma transformação microbiana, ou reações microbianas, onde um composto orgânico é modificado através de uma reação simples, quimicamente definida e catalisada pelas enzimas contidas nas células, ou seja, biocatalizados. Essas enzimas são classificadas de acordo com a reação química que catalisam (ARAKAWA, 2007; HANSON, 1995; MUTAFOVA *et al.*, 2016).

Considera-se que as reações de transformação microbiana compreendem os passos iniciais em processos de compostos orgânicos estranhos às células microbianas que são definidos como metabolismo preparativo (MUTAFOVA *et al.*, 2016).

Portanto pode-se considerar que a biotransformação fúngica é uma tecnologia verde, por ser realizada em soluções aquosas, a temperatura ambiente e em meio neutro, sem a necessidade de altas pressões e condições severas. Além disso, as enzimas, biocatalizadores, apresentam a capacidade de minimizar reações indesejáveis como decomposição, isomerização, racemização ou rearranjos inoportunos que interferem frequentemente nas metodologias químicas tradicionais, eliminando a necessidade de etapas de separação e purificação complicadas (BASSO *et al.*, 2016; BAYDOUN *et al.*, 2014; MUTAFOVA *et al.*, 2016).

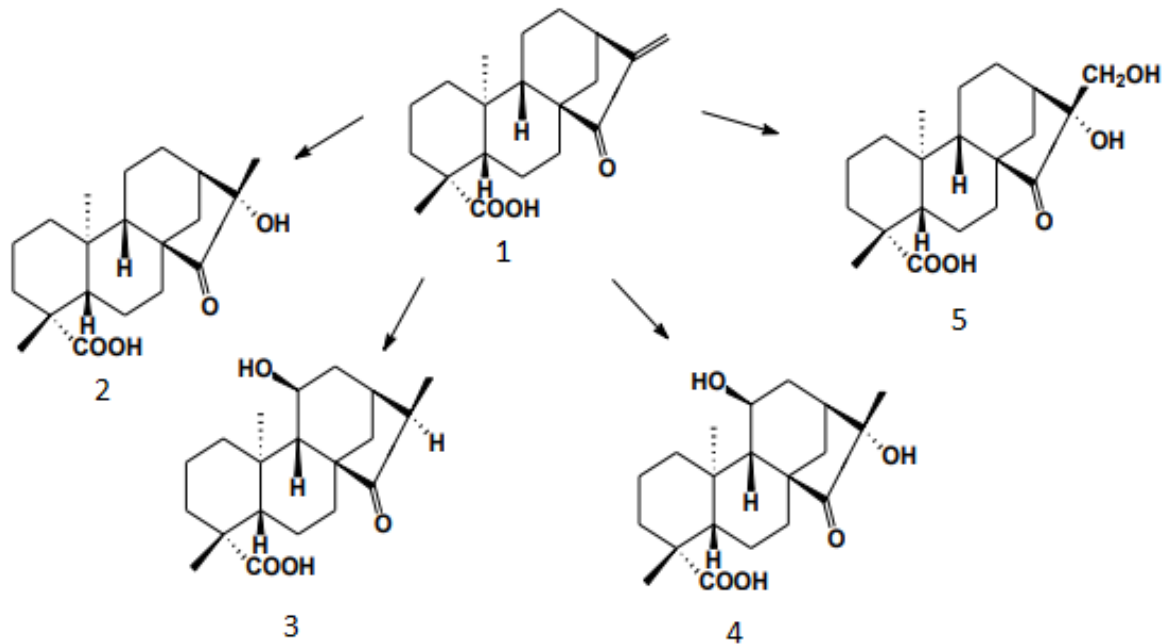
A biotransformação fúngica de produtos naturais menos polares pode ser uma estratégia interessante para a obtenção de derivados mais polares para ensaios biológicos (MUTAFOVA *et al.*, 2016). A biotransformação de diterpenos de esqueleto caurano é de especial interesse, uma vez que os compostos biologicamente ativos desta classe frequentemente possuem grupos hidroxila no esqueleto (HEGAZY *et al.*, 2015; MUTAFOVA *et al.*, 2016; TIAN *et al.*, 2015). Diversos autores relatam a hidroxilação desses tipos de esqueletos diterpênicos por biotransformação fúngica por uma variedade de fungos filamentosos (HEGAZY *et al.*, 2015; TIAN *et al.*, 2015).

A reação de biotransformação mais comum que ocorre em diterpenos de esqueleto caurano é a hidroxilação em algumas posições que são comumente mais ativas do que outras (TAKAHASHI *et al.*, 2014). O grande desafio da biotransformação neste campo é encontrar microrganismos capazes de realizar transformações de forma consistente e regioseletiva para o desenvolvimento de processos industriais de forma racional (ROCHA *et al.*, 2017).

Vieira e colaboradores (2002) na biotransformação do ácido ent-15-

oxocaur-16-en-19-óico (1) com o fungo *Cephalosporium aphidicola*, obtiveram hidroxilações do esqueleto, originando os ácidos ent-16 $\beta$ -hidroxi-15-oxocauran-19-óico (2), ent-11 $\alpha$ -hidroxi-15-oxocauran-19-óico (2), ent-11 $\alpha$ ,16 $\beta$ -dihidroxi-15-oxocauran-19-óico (3), ent-16 $\beta$ ,17- dihidroxi-15-oxocauran-19-óico (4) (Figura 13).

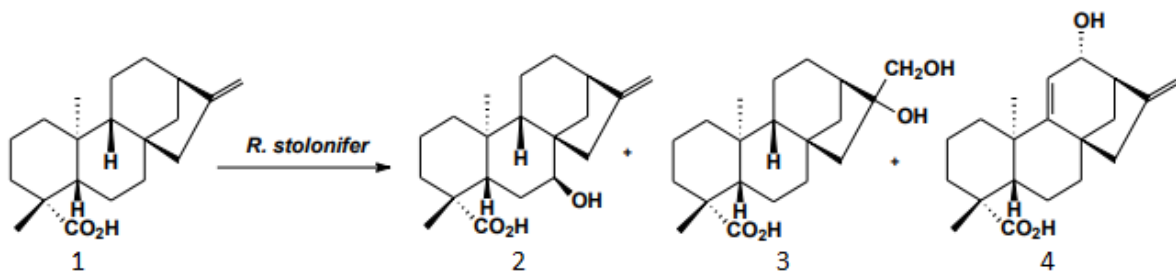
**Figura 13.** Biotransformação do ácido ent-15-oxocaur-16-en-19-óico (1) por *C. aphidicola*.



**Fonte:** Adaptado de VIEIRA *et al.* (2002).

Segundo Silva e colaboradores (1999), o fungo *Rhizopus stolonifer* promoveu a biotransformação do ácido caurenóico (1) em três produtos principais: os produtos de mono e dihidroxilação, ácidos ent-7 $\alpha$ -hidroxi-caur-16-en-19-óico (2) e ent-16 $\beta$ -17-dihidroxi-caur-16-en-19-óico (3) e o produto de hidroxilação e desidrogenação ent-12 $\beta$ -hidroxi-caur-9(11),16-dien-19-óico (4) (Figura 14).

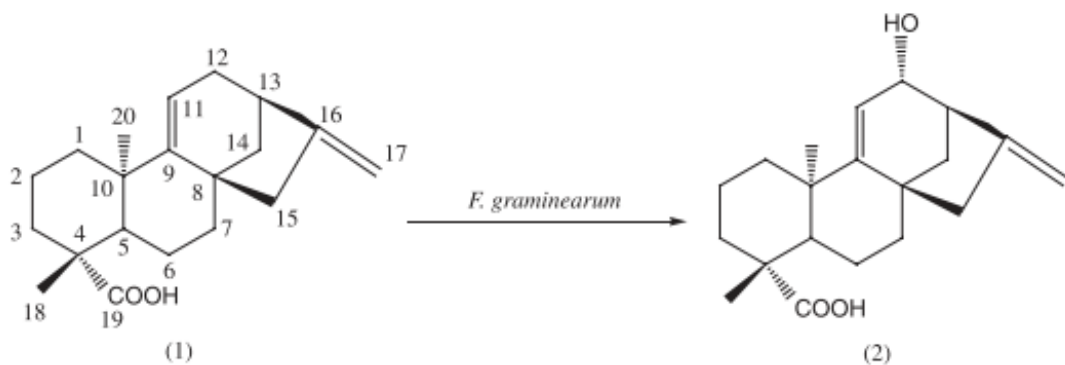
**Figura 14.** Biotransformação do ácido caurenóico (1) por *R. stolonifer*.



**Fonte:** Adaptado de SILVA *et al.* (1999).

Também foi relatado hidroxilação no esqueleto caurano no trabalho de Ruan e colaboradores (2014), onde o fungo *Fusarium graminearum* promoveu a biotransformação do ácido grandiflorênico (1) em um derivado mono hidroxilado (Figura 15).

**Figura 15.** Biotransformação do ácido grandiflorênico (1) por *F. graminearum*.



**Fonte:** Adaptado de RUAN *et al.* (2014).

As reações microbianas podem ser divididas em dois grupos, as biotransformações de xenobióticos e as biossinteticamente dirigidas. Nas biotransformações de xenobióticos, o substrato é estranho ao microrganismo utilizado, ou seja, existe uma especificidade baixa em relação ao substrato. No entanto, observa-se em geral uma seletividade distinta para organismos diferentes. Um exemplo para este tipo de biotransformação é a hidroxilação de esteroides. Já nas reações biossinteticamente dirigidas, o substrato deve ser análogo a um intermediário de uma rota biossintética natural do microrganismo, e assim a biotransformação deve obedecer às regras naturais deste caminho biossintético. Um exemplo para este tipo de biotransformação é a transformação de diterpenos caurânicos em giberelinas (HANSON, 1995).

Assim como todo método as transformações microbianas também têm suas desvantagens, como por exemplo, é um método muitas vezes imprevisível, sendo necessário fazer o uso de enzimas purificadas, e o rendimento ser usualmente baixo. Então para maximizar as chances de se obter o produto esperado, é necessário utilizar uma ampla variedade de espécies de microrganismos na triagem inicial, para a identificação dos microrganismos que realizam biotransformação no composto estudado (ARAKAWA, 2007; HEGAZY *et al.*, 2015).

## 1.5 BACTÉRIAS

As bactérias, pertencentes ao reino Monera, são microrganismos unicelulares, procariontes, são microscópicos e foram visualizados pela primeira vez por volta de 1670 por van Leeuwenhoek, através dos primeiros microscópios (MADIGAN *et al.*, 2016). Porém, somente no século XIX foi levantada a hipótese desses microrganismos serem possivelmente os causadores de processos infecciosos (WALSH, 2003). Essa hipótese foi confirmada após a segunda metade do século XIX, cientistas como Robert Koch identificaram microrganismos responsáveis por doenças como tuberculose, cólera e febre tifóide (WALSH, 2003).

As bactérias, podem ser encontradas na forma isolada ou em colônias, são capazes de viver na presença de ar (aeróbias), na ausência de ar (anaeróbias), ou podem ser anaeróbias facultativas (HOLETZ *et al.*, 2002; MADIGAN *et al.*, 2016). Estão entre os organismos mais antigos e mais sucedidos do planeta, em relação ao número de indivíduos, sendo que a quantidade de bactérias no intestino de uma pessoa é superior ao número total de células humanas no corpo, por exemplo (HOLETZ *et al.*, 2002).

São consideradas microrganismos de alta capacidade de adaptação, como a exposição a agentes químicos potentes e por isso, são extremamente capazes de viver em qualquer ambiente da Terra (BOZDOGAN; APPELBAUM, 2004).

As bactérias podem desempenhar tanto papéis prejudiciais quanto benéficos para o meio ambiente e para os seres vivos, como por exemplo, na sua utilização na indústria de alimentos, para a preparação de comidas ou bebidas fermentadas, na saúde humana, com as bactérias que vivem no intestino, na indústria farmacêutica, com a síntese da insulina por técnicas biotecnológicas, na ecologia, com a biodegradação de lixos, entre outras funções (MADIGAN *et al.*, 2016; VON NUSSBAUM *et al.*, 2006).

De acordo com as estruturas das paredes celulares as bactérias podem ser coradas pela técnica de coloração de Gram. A parede celular dos microrganismos Gram-positivos, coloração violeta, tem uma estrutura mais espessa, de 15 a 50 nm (MADIGAN *et al.*, 2016).

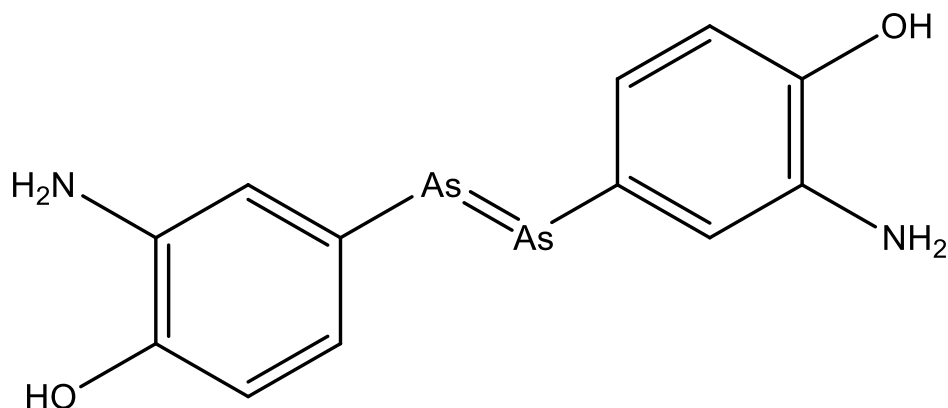
Há diferentes graus de permeabilidade na parede dos microrganismos Gram-positivos e Gram-negativos. A parede celular dos microrganismos Gram-negativos, coloração vermelha, é muito mais complexa. Ela é constituída por um

espaço periplasmático contendo enzimas, uma camada de peptídeoglicanos, uma membrana externa que consiste em uma dupla camada lipídica e por polissacarídeos complexos que formam componentes importantes da superfície externa. Estes polissacarídeos se diferem entre as cepas de bactérias e são os principais determinantes antigênicos. A dificuldade em penetrar nesta camada externa complexa é a razão pela qual alguns antibióticos são menos ativos contra as bactérias Gram-negativas (MADIGAN et al., 2016).

### 1.5.1 Antimicrobianos

Os agentes antimicrobianos podem ser classificados como microbicidas ou microbiostáticos. Os agentes antimicrobianos em geral podem manifestar sua atividade por diversos mecanismos, como por exemplo, lesão da parede celular, alterações da permeabilidade celular, alterações das moléculas de proteínas e ácidos nucleicos, inibição da síntese de ácidos nucleicos, entre outros (GOMES *et al.*, 2010).

**Figura 16.** Formula estrutural da arsfenamina.



Arsfenamina

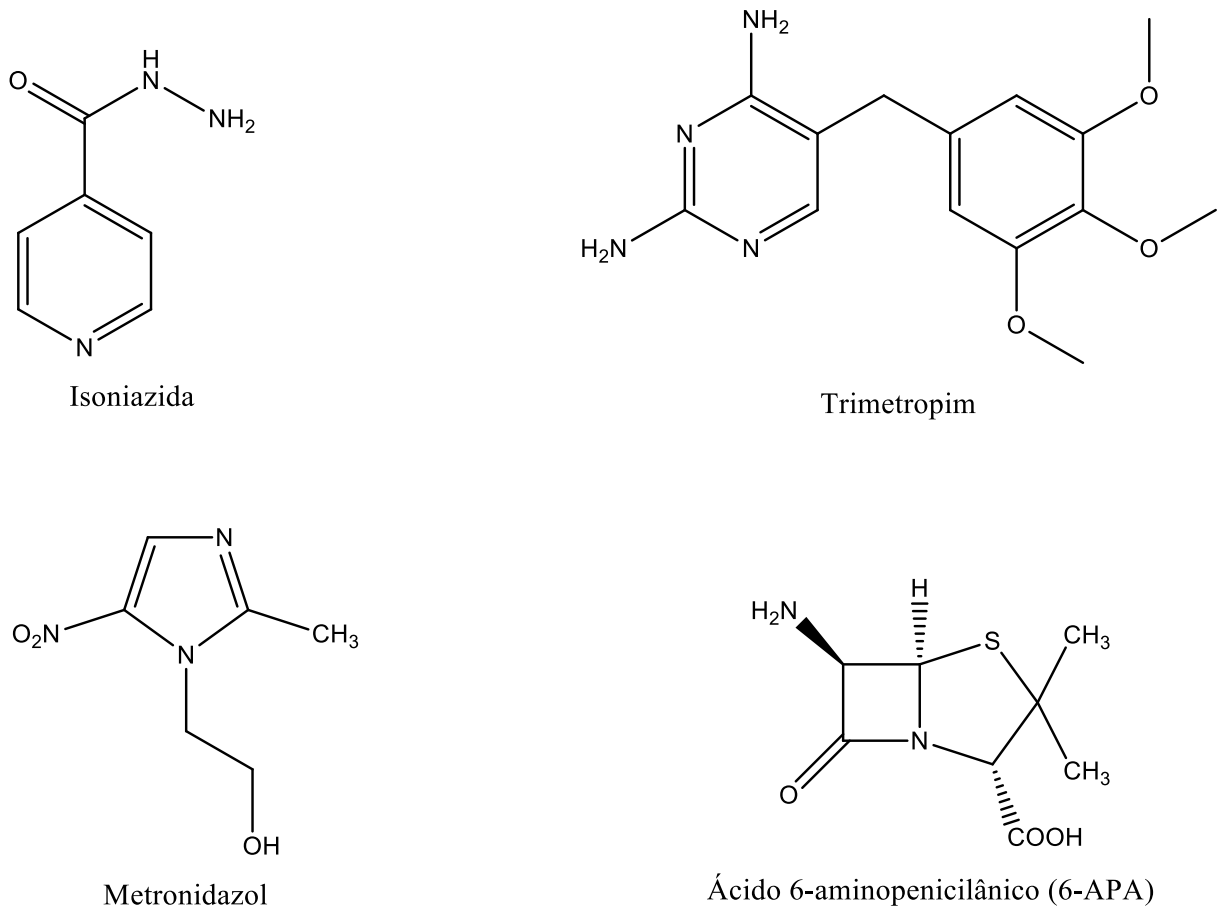
**Fonte:** Adaptado de SAKURAI; YOSHIKAWA; YASUI, (2008).

No século XIX muitas pesquisas eram conduzidas na busca de agentes químicos que apresentassem atividade antimicrobiana. O pesquisador Paul Ehrlich, conhecido como o pai da quimioterapia, em 1910, foi o primeiro a desenvolver um composto antimicrobiano de origem sintética, a arsfenamina, sob a marca de salvarsan (Figura 16), em concentrações não letais para os humanos, sendo este composto antimicrobiano usado para combater a sífilis (NICOLAOU; MONTAGNON,

2008; WALSH, 2003). Em 1934, foi desenvolvido um novo antimicrobiano utilizado em larga escala, a proflavina. Esse composto antimicrobiano foi utilizado principalmente na Segunda Guerra Mundial. Entretanto, este composto era muito tóxico para ser usado em infecções bacterianas sistêmicas, o que evidenciava a necessidade da procura por novos compostos mais eficazes (FERNANDES, 2006; PUPO *et al.*, 2006).

Em 1935 Gerhard Domagk descobriu que o corante vermelho, prontossil, apresentava atividade *in vivo* contra infecções causadas por espécies de *Streptococcus* (DOMAGK, 1935). Com o prontossil foi possível a criação de uma nova classe de antimicrobianos sintéticos, as sulfas ou sulfonamidas, que constituem a primeira classe de agentes efetivos contra infecções sistêmicas introduzida no início dos anos 1940. (FERNANDES, 2006; WALSH, 2003).

**Figura 17.** Formula estrutural geral dos principais antibióticos obtidos a partir de produtos naturais.



**Fonte:** Adaptado de FERNANDES (2006).

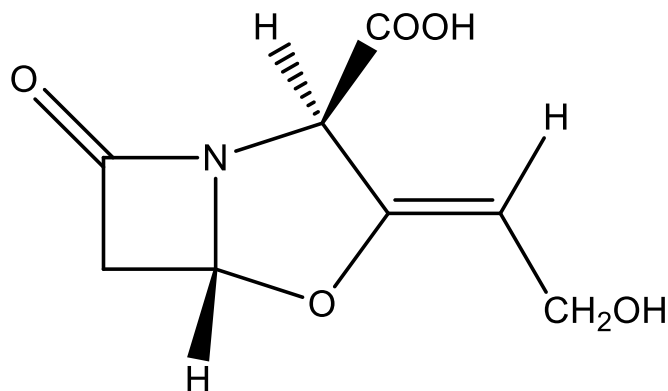
Como já foi mencionado anteriormente, no tópico 1.1, em 1928

ocorreu a descoberta da penicilina, por Alexander Fleming (PEREIRA e PITA, 1928). Essa descoberta foi muito importante, pois além da atividade da penicilina ser superior à das sulfas, foi possível perceber que fungos produziam substâncias capazes de controlar a proliferação bacteriana. Esse fato motivou pesquisas em uma nova vertente na busca de novos antibióticos. Como consequência foi observado um rápido crescimento na descoberta e desenvolvimento de novos compostos antimicrobianos (FERNANDES, 2006; PUPO *et al.*, 2006).

Entre os anos 1940 e 1960 foram descobertos vários antibióticos através de triagens de produtos naturais microbianos, sendo a maioria deles eficazes para o tratamento de bactérias Gram positivas e Gram negativas, como por exemplo, outros  $\beta$ -lactâmicos, aminoglicosídeos, tetraciclina, entre outros. A Figura 17 mostra os quatro derivados sintéticos que foram introduzidos no mercado durante esse período, a isoniazida, trimetopim, metronidazol e o ácido 6-aminopenicilânico (6-APA) (FERNANDES, 2006).

Entre os anos 1960 e 1980 compostos semissintéticos demonstraram ser eficazes para o tratamento de bactérias, tanto Gram positivas quanto Gram negativas, análogos aos antibióticos naturais já existentes. A grande maioria desses compostos foi obtida a partir de protótipos naturais microbianos, como os derivados  $\beta$ -lactâmicos, como os análogos de penicilina e cefalosporina, entre eles o ácido clavulânico (Figura 18) (FERNANDES, 2006).

**Figura 18.** Formula estrutural do Ácido Clavulânico.



Ácido Clavulânico

**Fonte:** Adaptado de (FERNANDES, 2006).

Entre os anos 1980 e 2000 ocorreu uma grande diminuição na síntese de novos compostos antimicrobianos, porém ao mesmo tempo houve um aumento

significativo na incidência de bactérias resistentes. Durante esse período, de 1980 a 2000, o mercado de compostos antimicrobianos foi modificado pela introdução da classe das fluoroquinolonas sintéticas na metade dos anos 1980, sintetizadas a partir do ácido nalidíxico. A partir de 2000, poucos antibióticos foram introduzidos para a terapêutica antimicrobiana (FERNANDES, 2006; PERCÍNIO; CRESPO, 2017).

#### 1.5.1.1 Resistência Bacteriana

A resistência bacteriana pode ser considerada um fenômeno ecológico e age como se fosse uma resposta da bactéria frente à presença de compostos antimicrobianos (LEVY, 2001). Essa resistência bacteriana por um determinado composto ocorre pelo fato das bactérias se multiplicarem rapidamente, podendo sofrer mutações e, também, ocorrer a troca do material genético entre linhagens de mesma espécie ou de espécies diferentes (BOZDOGAN; APPELBAUM, 2004).

Apesar dos mecanismos de resistência bacteriana dependerem de patógeno para patógeno, a resistência é causada por alguns fatores básicos, tais como a inativação do composto antimicrobiano por alterações químicas, modificação do alvo que leva à perda de sensibilidade ao composto e redução da permeabilidade externa da membrana que promovem a redução da concentração do composto sem sua modificação química (HAPPI *et al.*, 2005; LEVY, 2001).

O aumento da resistência a compostos antimicrobianos muitas vezes é causado por utilização inadequada dos antimicrobianos, como o uso extensivo e inapropriado de antibióticos, principalmente sem prescrição médica, más condições de higiene, demora no diagnóstico das infecções bacterianas, entre diversas outras (VON NUSSBAUM *et al.*, 2006). Para evitar o desenvolvimento de resistência bacteriana algumas estratégias simples podem ser adotadas, tais como prevenção de infecções bacterianas com o uso de vacinas, uso racional de antibióticos, além de estratégias mais elaboradas, tais como, controle e prevenção da disseminação de microrganismos resistentes, e pesquisas para desenvolver novos antibióticos eficazes (LAZOVSKI *et al.*, 2017).

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 GERAL

O presente trabalho teve como objetivo geral obter análogos estruturais do ácido grandiflorênico, através do processo de biotransformação fúngica através do fungo *Cunninghamella echinulata*, além de avaliar a atividade antimicrobiana do ácido grandiflorênico e seus derivados biotransformados obtidos.

### 2.2 ESPECÍFICOS

- Isolar, purificar e identificar o ácido grandiflorênico;
- Realizar as transformações fúngicas (*Cunninghamella echinulata*) do ácido grandiflorênico;
- Isolar, purificar e identificar os análogos biotransformados;
- Avaliar o efeito antibacteriano do ácido grandiflorênico e dos análogos biotransformados;

### 3 METODOLOGIA

#### 3.1 MATERIAIS UTILIZADOS

Os solventes utilizados para a partição e técnicas cromatográficas foram comerciais P.A. e/ou das marcas: Dinâmica, Synth, Anidrol e Panreac.

A sílica gel utilizada como fase estacionária na CCD é pertencente a marca Macherey-Nagel (código 816310.1). Para a CLV, CLC e CLMP foram utilizadas sílica da marca Merck (código 1.09385.1000).

A balança analítica utilizada para a pesagem dos materiais, reagentes e amostras é do modelo AW220 (Marte).

#### 3.2 OBTENÇÃO DO EXTRATO HEXÂNICO

A espécie *Sphagneticola trilobata* (L.) Pruski foi coletada no horto de plantas medicinais do Centro de Ciências Agrárias (CCA), localizada no campus Universitário da Universidade Estadual de Londrina (Londrina – PR). O material testemunho foi identificado pela Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. A.O.S. Vieira e depositado no Herbário da Universidade Estadual de Londrina (FUEL) sob o n<sup>o</sup> 49306.

Para a obtenção do extrato hexânico das folhas (1,8 kg) desta espécie foi utilizada a maceração por esgotamento com diclorometano, após a evaporação do diclorometano a parte sólida foi solubilizada com uma mistura hidroalcoólica em proporção de 4 partes de água para 1 de álcool etílico e posteriormente particionada com hexano e diclorometano, obtendo-se desta forma o extrato hexânico (EH).

##### 3.2.1 Fracionamento do Extrato Hexânico

O extrato hexânico de *Sphagneticola trilobata* L. Pruski foi submetida ao fracionamento por Cromatografia Líquida à Vácuo (CLV), devido à grande quantidade de extrato inicial (65 g) foi necessário dividi-lo em quatro porções. Cada porção foi submetida ao fracionamento por CLV, utilizando-se 325 g de sílica, para cada porção, como fase estacionária e misturas de hexano e acetato de etila em gradiente de polaridade como fase móvel, além do álcool metílico para limpeza da sílica ao final do processo. As fases móveis utilizadas e suas proporções volumes

estão apresentadas detalhadamente na Tabela 1.

**Tabela 1.** Proporções das fases móveis utilizadas na realização da Cromatografia Líquida a Vácuo.

Fração	Proporção solvente (%)
1	Hexano 100%
2	Hexano: Acetato de etila 19:1
3	Hexano: Acetato de etila 9:1
4	Hexano: Acetato de etila 17:3
5	Hexano: Acetato de etila 4:1
6	Hexano: Acetato de etila 3:1
7	Hexano: Acetato de etila 7:3
8	Hexano: Acetato de etila 13:7
9	Hexano: Acetato de etila 3:2
10	Hexano: Acetato de etila 1:1
11	Hexano: Acetato de etila 3:7
12	Acetato de etila 100%
13	Álcool metílico 100%

**Fonte:** Próprio autor.

Após o fracionamento por Cromatografia Líquida à Vácuo (CLV) do extrato hexânico de *Sphagneticola trilobata* L. Pruski todas as frações foram levadas a evaporação para que elas sejam avaliadas através do monitoramento por Cromatografia em Camada Delgada (CCD) para a presença de diterpenos e foi escolhida a fração que apresentou o maior rendimento e com a melhor avaliação das CCDs entre as frações apresentadas na tabela 1.

Com a fração escolhida o isolamento foi realizado utilizando metanol gelado para solubilizar a amostra e levado a congelador por 7 dias, após este tempo, com auxílio de uma pipeta de Pasteur, a parte líquida foi retirada e levada ao processo novamente. A parte sólida foi levada para análise em RMN para identificação de sua estrutura.

### 3.3 BIOTRANSFORMAÇÃO DO ÁCIDO GRANDIFLORÊNICO

Após o isolamento do ácido grandiflorênico (0,700 g) o mesmo foi levado a biotransformação. Onde a manutenção do fungo assim como a preparação das culturas e extração dos fluídos destas foi realizado de acordo com FREITAS *et al.*, (2002), com modificações necessárias. O fungo utilizado foi o *Cunninghamella echinulata*, repicado, mantido em Potato Dextrose Agar (PDA) e incubado a 30 °C por

7 dias para a obtenção de esporos (ARAKAWA et al., 2008). Em seguida, os esporos foram coletados em suspensão aquosa por raspagem de pipeta e após contagem, em câmara de Neubauer. Inoculou-se alíquotas dessa suspensão, de maneira a se obter cerca de  $1.10^3$  esporos  $\text{mL}^{-1}$ . Inicialmente foi testado o meio líquido de Czapeck (ALVIANO et al., 1992). As culturas foram incubadas a  $25\text{ }^\circ\text{C}$  com agitação (120 rpm) por 24 a 72 h, dependendo da massa micelial obtida nesta primeira etapa do cultivo, designada pré-fermentativa.

Posteriormente, o fluído da cultura foi descartado e ao meio de cultivo fresco juntamente com a massa micelial obtida foi adicionado o ácido grandiflorênico ( $0,2\text{ mg mL}^{-1}$ ), dissolvido em DMSO (2%), concentração não tóxica para o fungo selecionado. A cultura foi re-incubada nas mesmas condições anteriores e amostras do meio de cultura foram coletadas a cada 24 h por um período máximo de 10 dias de cultivo. Paralelamente ao processo de biotransformação, foi realizado o controle sendo este constituído por apenas meio de cultura e o inóculo sem adição do substrato. Todo esse procedimento foi avaliado através de monitoramento por Cromatografia em Camada Delgada (CCD), baseando-se nas condições analíticas previamente descritas por OLIVEIRA et al. (2002).

### 3.4 IDENTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS ISOLADOS

As Cromatografias em Camada Delgada (CCD) foram realizadas em placas de sílica-gel 60 GF254, de 0,25 mm de espessura e preparadas sobre placas de vidro. Para a visualização da fluorescência dos compostos nas CCD, as placas foram reveladas sob luz ultravioleta Minerallight 254 e 365 nm. Posteriormente, as cromatoplasmas foram reveladas com solução de anisaldeído sulfúrico 1%, e submetidas ao aquecimento à temperatura de  $110^\circ\text{C}$ .

A estrutura química dos compostos isolados e purificados foram identificados no Laboratório de Ressonância Magnética Nuclear da Universidade Estadual de Londrina, utilizando-se a espectrometria de Ressonância Magnética Nuclear (RMN), espectrômetro Bruker Avance Modelo III, utilizando experimentos de 1D e 2D operando a 400,13 MHz para  $^1\text{H}$  e a 100,61 MHz para  $^{13}\text{C}$ , utilizando uma sonda de banda larga de 5 mm, e foram registrados utilizando  $\text{CD}_3\text{OD}$ ,  $\text{CDCl}_3$  ou  $\text{DMSO-d}_6$ , dependendo da solubilidade do composto isolado, como solvente e tetrametilsilano (TMS) como padrão interno, sendo posteriormente comparados com

base nos dados da literatura.

Para comparar os valores obtidos experimentalmente pelos RMN de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$  dos compostos inéditos foi necessário simular os espectros com auxílio do programa nmrdb.org tools for NMR spectroscopists utilizando o site <http://www.nmrdb.org/about/>.

Para calcular a Lipossolubilidade (Log P) dos compostos foi utilizado o programa molinspiration Cheminformatics utilizando o site <https://www.molinspiration.com>.

### 3.5 ENSAIOS BIOLÓGICOS

Os ensaios de atividade antimicrobiana foram realizados no Núcleo Integrado de Pesquisa (NIP) 3, Bloco 01. Departamento de Microbiologia, Centro de Ciências Biológicas. Universidade Estadual de Londrina e referem-se às diferentes técnicas ou métodos laboratoriais *in vitro* utilizados para determinar o potencial antimicrobiano de um determinado agente.

#### 3.5.1 Cepas Bacterianas

Nos testes de atividade antimicrobiana as cepas *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923, ATCC 29213 ATCC 19615, N315 e BEC9393), *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12228), *Escherichia coli* (ATCC 25922, ESBL176), *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212), *Salmonella typhimurium* (UK1) e *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 10031) foram crescidas a 37 °C em estufa durante 18-24 horas em ágar Müeller Hinton (MH) (Difco®). Então foram diluídas em salina, e a quantidade de bactérias foi ajustada na escala 0,5 McFarland, que corresponde a  $1,5 \times 10^8$  UFC mL<sup>-1</sup>. Já as cepas *Streptococcus pyogenes* (ATCC 19615), *Streptococcus mutans* (ATCC 25175) e *Streptococcus agalactiae* (ATCC 13813), foram crescidas a 37 °C em estufa com 5% de CO<sub>2</sub> durante 18-24 horas em ágar Brain Heart Infusion (BHI) (Difco®), e posteriormente diluídas em salina, e a quantidade de bactérias foi ajustada na escala 0,5 McFarland, que corresponde a  $1,5 \times 10^8$  UFC mL<sup>-1</sup>.

As cepas bacterianas foram cedidas pelo Prof. Dr. Gerson Nakazato e pela Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Renata Katsuko Takayama Kobayashi (Universidade Estadual de Londrina, Londrina-PR, Brasil). As cepas bacterianas foram armazenadas em caldo

BHI contendo glicerol a 20% (2,5 M) (Sigma-Aldrich®), a -80 °C.

### 3.5.2 Disco difusão em ágar

Para a técnica de disco difusão em ágar foi utilizado a técnica descrita na Farmacopeia Brasileira de 1988. A bactéria foi crescida previamente em ágar Muller-Hinton (MH) e ajustada em salina de acordo com a turbidez correspondente a escala 0,5 de McFarland (aproximadamente  $1,5 \times 10^8$  UFC mL<sup>-1</sup>). Foram utilizados discos de papel secos e estéreis, medindo 6 mm de diâmetro e impregnados com 7 µL da solução estoque de cada composto, sendo a concentração de 10 mg mL<sup>-1</sup> para o extrato hexânico (EH), fração 3 (F3) e extrato biotransformado (EB) e 4 mg mL<sup>-1</sup> para o ácido grandiflorênico (AG), ácido caurenóico (KA) e os ácidos biotransformados (C1 e C2), ou seja, 70 µg de EH, F3 e EB, e 28 µg de AG, KA, C1 e C2 em cada disco. Um swab foi umedecido na suspensão bacteriana e distribuídos uniformemente sobre a superfície do ágar MH. Os discos foram distribuídos em triplicada para cada bactéria sobre a superfície do ágar e incubados em estufa a 37 °C por 18-24 horas. Após o período de incubação, a placa foi retirada da estufa e os halos formados foram medidos em milímetros (BAUER; KIRBY, 1966).

### 3.5.3 Concentração Inibitória Mínima

Para determinação da concentração inibitória mínima (CIM) foi utilizado o método de diluição em caldo de acordo com o Clinical & Laboratory Standards Institute (CLSI, 2016) com as modificações necessárias. Em microplacas de 96 poços (Corning®), diferentes concentrações do extrato hexânico, fração 3, do extrato biotransformado ( $3,125 \mu\text{g mL}^{-1}$  a  $400 \mu\text{g mL}^{-1}$ ), do Ácido Grandiflorênico (AG), do Ácido Caurenóico (KA) e dos diterpenos isolados ( $0,781 \mu\text{g mL}^{-1}$  a  $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) foram testadas frente às bactérias. Os compostos testados foram diluídos serialmente em caldo MH e a bactéria previamente crescida foi ajustada na escala 0,5 de McFarland, diluídas em caldo MH e adicionadas frente aos compostos ( $1,5 \times 10^8$  UFC mL<sup>-1</sup>). As microplacas foram incubadas a 37 °C em estufa de ar circulante ou em estufa com 5% de CO<sub>2</sub>, caso necessário, durante 18-24 horas e, em seguida, a leitura foi realizada através da turbidez.

### 3.5.4 Atividade Hemolítica em Glóbulos Vermelhos Humanos

A atividade hemolítica em glóbulos vermelhos humanos (GVH) dos compostos isolados e purificados foram determinados de acordo com IZUMI *et al.*, (2012), com as modificações necessárias. O sangue foi coletado, em tubos contendo anticoagulante (heparina), de um doador humano saudável com consentimento voluntário, que foi aprovado pelo comitê de ética humana (CAAE 47661115.0.0000.5231, nº 1.268.019 - UEL). Os eritrócitos foram separados por centrifugação (5000 rpm, 4 °C, 5 min) e foram preparados em solução salina tamponada com fosfato (PBS 0,1 M, pH 7,2) a 6% (v / v).

Em placas de 96 poços, 100 µL de glóbulos vermelhos a 6 % foram adicionados a 100 µL de PBS com diferentes concentrações dos compostos (100,00 µg mL<sup>-1</sup> a 31,25 µg mL<sup>-1</sup>). Após 3 h de incubação em estufa a 37 °C, os sobrenadantes (120 µL) foram transferidos para outra placa de 96 poços e lidos em espectrofotômetro a 550 nm para monitorar a liberação de hemoglobina. O grau de hemólise determinado de acordo com a equação 1.

$$\% \text{ Hemólise} = \frac{\text{Abs}(\text{composto}) - \text{Abs}(\text{controle negativo})}{\text{Abs}(\text{controle positivo}) - \text{Abs}(\text{controle negativo})} \times 100 \quad \text{Eq.1}$$

Onde, o controle positivo representa 100 % de hemólise, preparado com 200 µl de solução de Triton X-100 a 1% (v / v); o controle negativo preparado com 100 µl do tampão PBS + 100 µl de água destilada.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 ISOLAMENTO DO ÁCIDO GRANDIFLORÊNICO

Após o fracionamento por Cromatografia Líquida à Vácuo (CLV) do extrato hexânico de *Sphagneticola trilobata* L. Pruski houve a escolha pela fração 9:1 (F3) com rendimento de 29,4 %, maior rendimento entre as frações, apresentado na Tabela 2, além de apresentar cristalização na superfície de seu precipitado e pelo monitoramento pela Cromatografia em Camada Delgada (CCD), que se demonstrou favorável à presença de diterpenos.

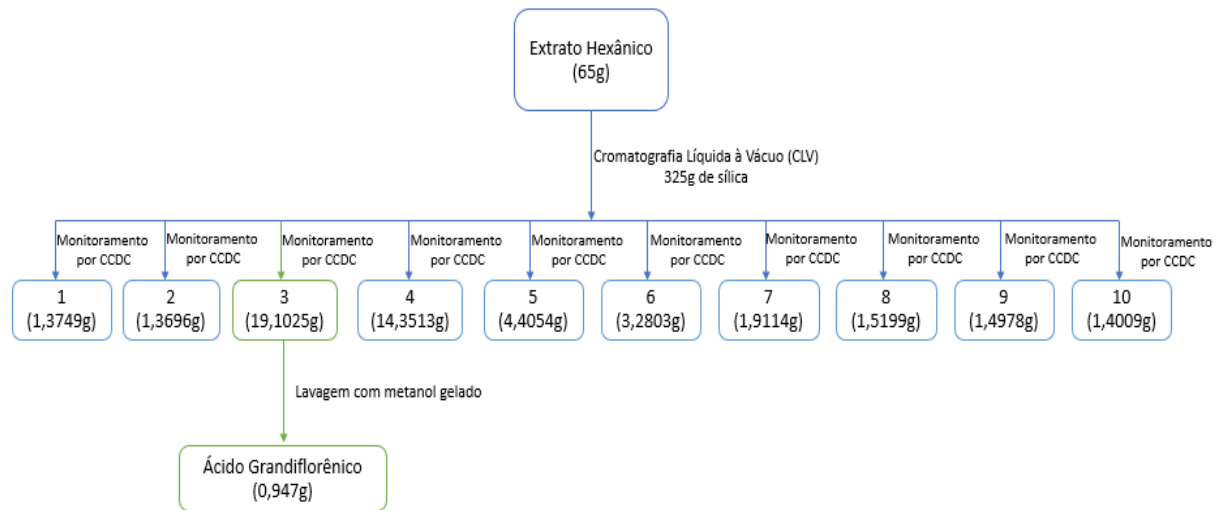
**Tabela 2.** Proporções das fases móveis utilizadas na realização da Cromatografia Líquida a Vácuo e seus respectivos rendimentos.

Fração	Proporção solvente (%)	Rendimento (g)	Rendimento (%)
1	Hexano 100%	1,3749	2,12
2	Hexano: Acetato de etila 19:1	1,3696	2,11
3	Hexano: Acetato de etila 9:1	19,1025	29,4
4	Hexano: Acetato de etila 17:3	14,3513	22,1
5	Hexano: Acetato de etila 4:1	4,4054	6,78
6	Hexano: Acetato de etila 3:1	3,2803	5,05
7	Hexano: Acetato de etila 7:3	1,9114	2,94
8	Hexano: Acetato de etila 13:7	1,5199	2,34
9	Hexano: Acetato de etila 3:2	1,4978	2,30
10	Hexano: Acetato de etila 1:1	1,4009	2,15
11	Hexano: Acetato de etila 3:7	1,5501	2,38
12	Acetato de etila 100%	1,2508	1,92
13	Álcool metílico 100%	4,5945	7,07

**Fonte:** Próprio autor.

Após a purificação do Ácido Grandiflorênico (AG) o seu rendimento foi calculado a partir de 19,1025g da fração 9:1 (F3) e a partir do Extrato Hexânico (EH), sendo de 4,96% e 1,46%, respectivamente. A Figura 19 resume os processos realizados desde o extrato hexânico até o isolamento do ácido grandiflorênico.

**Figura 19.** Resumo dos processos para isolamento do ácido grandiflorênico.

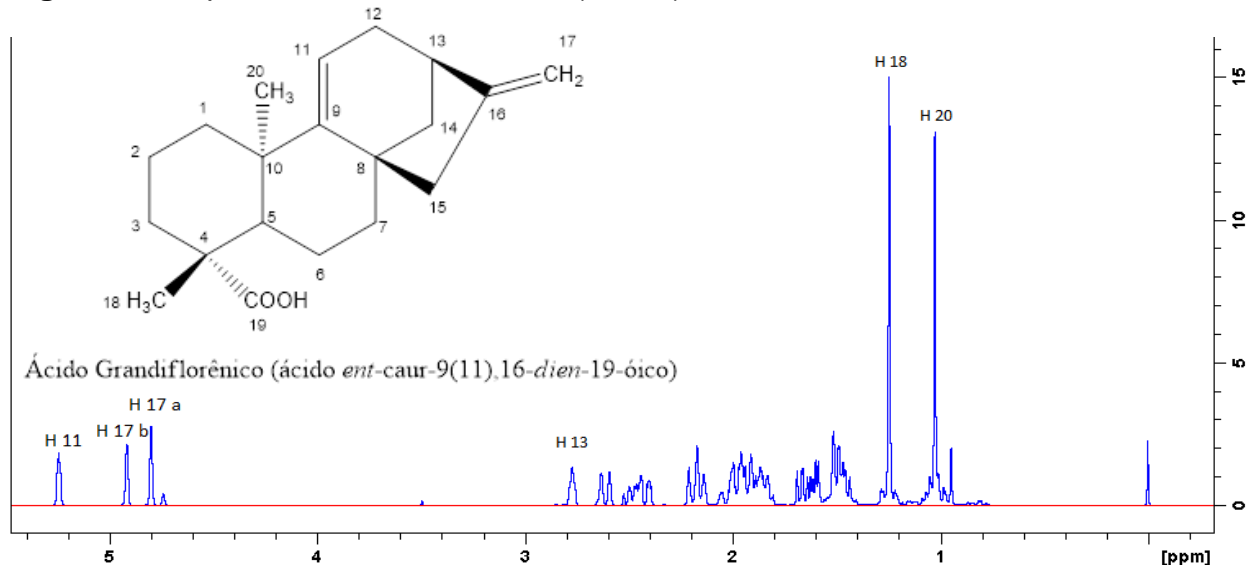


**Fonte:** Próprio autor.

#### 4.1.1 Identificação do Ácido Grandiflorênico

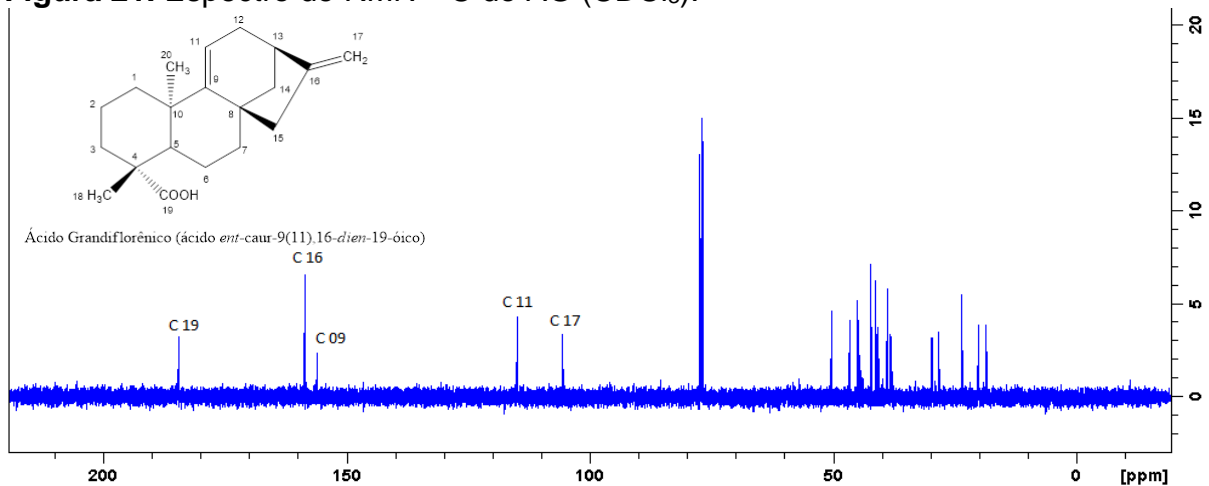
Com as análises de RMN dos cristais dessa fração foi possível identificar e confirmar que o composto isolado realmente foi o ácido grandiflorênico (AG), conforme apresentado nas Figuras 20 e 22 dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ , respectivamente. A partir das análises do sistema policíclico pouco oxigenado e/ou pouco insaturado, pode-se deduzir que seria um diterpeno, visto que estes compostos são identificados nesta planta (BATISTA *et al.*, 2009). A análise do espectro de RMN  $^1\text{H}$  apresentam poucos sinais de hidrogênio desblindados, enquanto o espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  indica a presença de 20 sinais de carbonos.

**Figura 20.** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  do AG ( $\text{CDCl}_3$ ).



**Fonte:** Próprio autor.

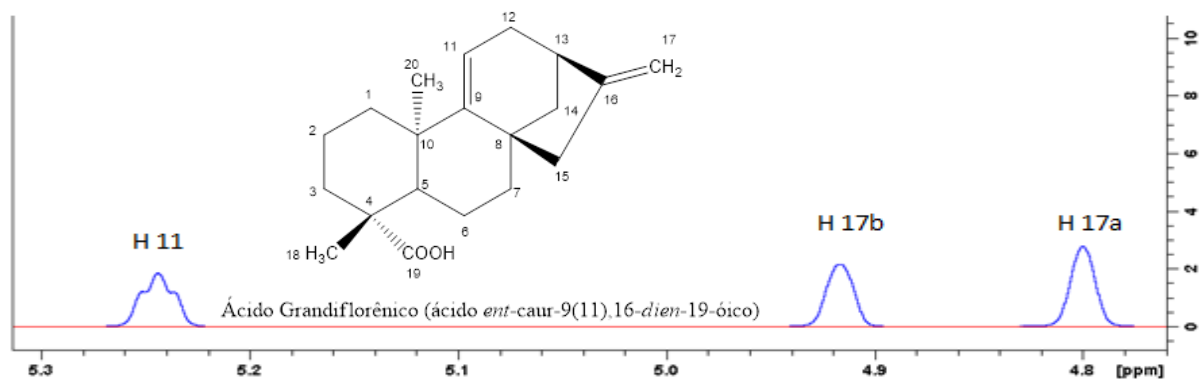
**Figura 21.** Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  do AG ( $\text{CDCl}_3$ ).



Fonte: Próprio autor.

No espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  um sinal em  $\delta$  184,7 ppm foi atribuído ao carbono de uma carboxila, que ocorre em C<sub>19</sub>. Outro sinal em  $\delta$  158,7 ppm foi atribuído ao carbono quaternário olefínico C<sub>16</sub> e o sinal em  $\delta$  105,8 ppm foi atribuído ao carbono metilênico C<sub>17</sub>, influenciando diretamente sobre o espectro de  $^1\text{H}$ , no qual observa-se a presença de dois sinais de hidrogênio em  $\delta$  4,80 ppm e  $\delta$  4,92 ppm relativo à presença de uma ligação dupla exocíclica sobre o C<sub>17</sub>. A partir destes dados foi possível confirmar que a substância isolada trata-se de um diterpeno do tipo caurano, a suposição sobre a derivação a partir do ácido caurenóico, foi detectada devido à presença de um sinal em  $\delta$  115,1 ppm indicando a presença de outro carbono quaternário olefínico, indicando a presença da dupla ligação entre os carbonos C<sub>9</sub>-C<sub>11</sub>, assim como observado no espectro de  $^1\text{H}$  deste composto, a presença de um sinal de hidrogênio em  $\delta$  5.25 ppm atribuído ao hidrogênio ligado ao C<sub>11</sub> olefínico (Figuras 20 e 21) (BATISTA; BRAGA; OLIVEIRA, 2005).

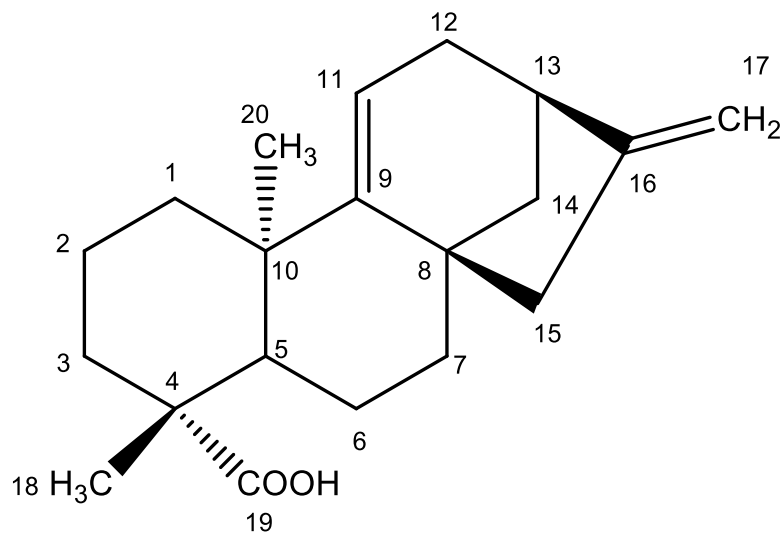
**Figura 22.** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  do AG ( $\text{CDCl}_3$ ) aproximado.



Fonte: Próprio autor.

Diante da análise dos espectros de RMN foi possível comprovar que o composto isolado das folhas da *Sphagneticola trilobata* realmente se trata do ácido grandiflorênico (ácido *ent-caur-(9-11)-16-dien-19-óico*), os dados espectrais foram comparados com a literatura, de acordo com dados obtidos por BATISTA; BRAGA; OLIVEIRA, 2005 (Tabelas 3 e 4). Na Figura 23 apresenta-se a estrutura e a nomenclatura do AG com seus carbonos enumerados, conforme regra para enumeração de diterpenos.

**Figura 23.** Estrutura molecular do AG.



Ácido Grandiflorênico (ácido *ent-caur-9(11),16-dien-19-óico*)

**Fonte:** Próprio autor.

**Tabela 3.** Valores dos sinais no espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do AG ( $\text{CDCl}_3$ ), comparado à literatura.

Hidrogênio	$\delta$ (BATISTA; BRAGA; OLIVEIRA, 2005) (ppm)	$\delta$ AG (ppm)
H-11	5,24 (1H, t, $J$ 3,3)	5,25 (1H, t, $J$ 3,2)
H-13	2,77 (1H, s)	2,78 (1H, s)
H-17 a	4,79 (1H, s)	4,80 (1H, s)
H-17 b	4,91 (1H, s)	4,92 (1H, s)
H-18	1,24 (3H)	1,25 (3H)
H-20	1,02 (3H)	1,03 (3H)

**Fonte:** BATISTA; BRAGA; OLIVEIRA (2005).

**Tabela 4.** Valores dos sinais no espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  do AG ( $\text{CDCl}_3$ ), comparados à literatura.

Carbono	$\delta$ (BATISTA; BRAGA; OLIVEIRA, 2005) (ppm)	$\delta$ AG (ppm)
1	40,7	40,8
2	20,1	20,2
3	38,2	38,2
4	44,7	44,8
5	46,6	46,7
6	18,4	18,5
7	29,6	29,7
8	42,2	42,3
9	155,9	156,2
10	38,8	38,9
11	114,9	115,1
12	37,9	37,9
13	41,2	41,3
14	44,9	44,9
15	50,3	50,6
16	158,5	158,7
17	105,5	105,8
18	28,2	28,2
19	184,7	184,7
20	23,6	23,6

**Fonte:** BATISTA; BRAGA; OLIVEIRA (2005).

#### 4.2 ISOLAMENTO E PURIFICAÇÃO DOS DITERPENOS BIOTRANSFORMADOS

Primeiramente, fez-se a recristalização do extrato biotransformado (1 g) utilizando-se o álcool metílico a quente para solubilização do extrato, após a solubilização o foi levado para armazenamento em congelador, visando a formação de cristais puros. O sobrenadante foi retirado, com auxílio de uma pipeta de Pasteur, durante a recristalização e foi armazenado em um frasco em temperatura ambiente, após o processo foram observados a formação de cristais no sobrenadante, os cristais foram nomeados e anotados suas massas para o cálculo de rendimento de C1 e levados à análise de RMN.

Com a parte restante do extrato biotransformado (540 mg) foi feito um fracionamento por Cromatografia Líquida à Vácuo (CLV), utilizando-se 50 g de sílica, como fase estacionária e misturas de hexano e acetato de etila em gradiente de polaridade como fase móvel, além do álcool metílico para limpeza da sílica ao final do

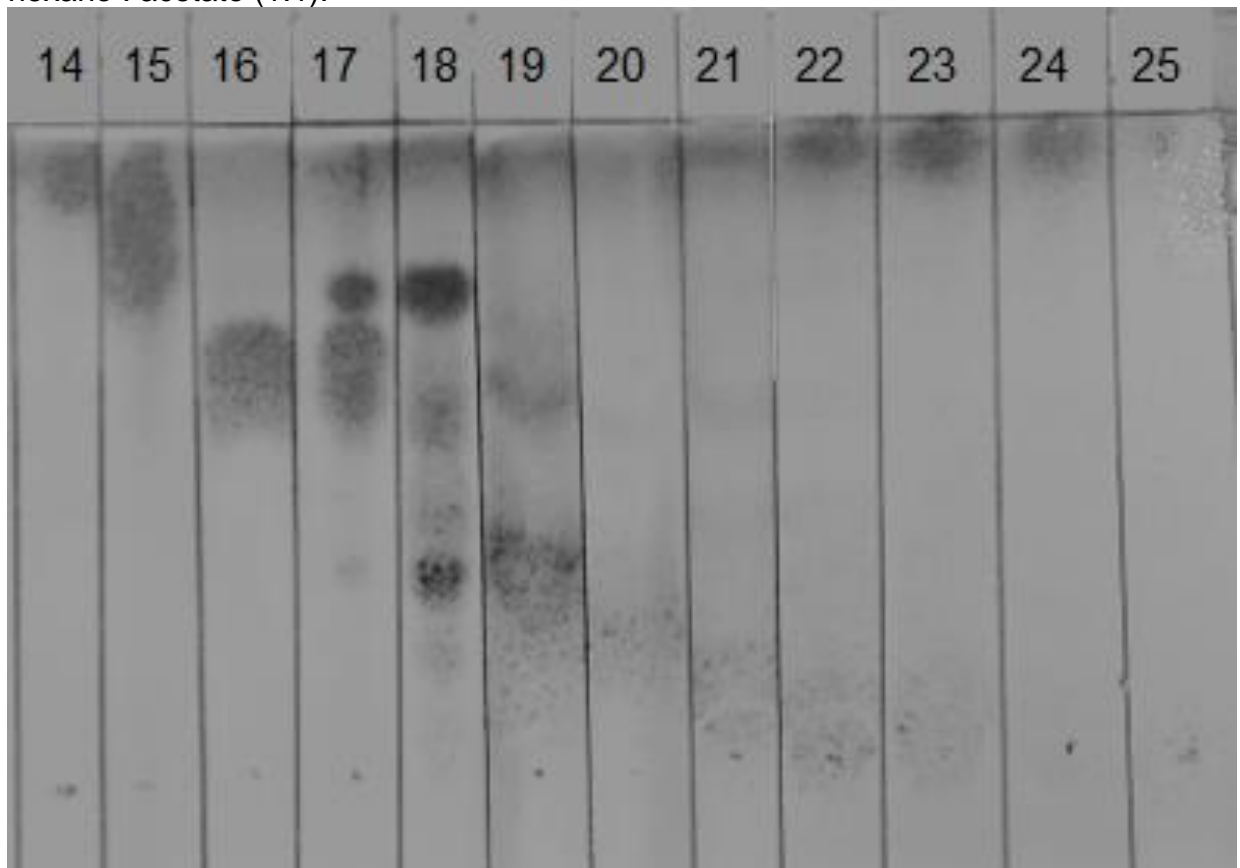
processo (PELLETIER; CHOKSHI; DESAI, 1986). As fases móveis utilizadas, seus volumes e suas massas obtidas para cada fração estão apresentadas detalhadamente na Tabela 5.

**Tabela 5.** Proporções das fases móveis utilizadas na realização da Cromatografia Líquida a Vácuo com o extrato biotransformado e seus respectivos rendimentos.

Fração	Proporção solvente (%)	Rendimento (mg)	Rendimento (%)
14	Hex. 100%	4	0,0062
15	Hex. : Acetato de etila 9:1	106	0,1631
16	Hex. : Acetato de etila 4:1	122	0,1877
17	Hex. : Acetato de etila 7:3	23	0,0354
18	Hex. : Acetato de etila 3:2	41	0,0631
19	Hex. : Acetato de etila 1:1	60	0,0923
20	Hex. : Acetato de etila 2:3	37	0,0569
21	Hex. : Acetato de etila 3:7	17	0,0261
22	Hex. : Acetato de etila 1:4	15	0,0231
23	Hex. : Acetato de etila 1:9	7	0,0108
24	Acetato de etila 100%	13	0,0200
25	Álcool metílico 100%	86	0,1323

**Fonte:** Próprio autor.

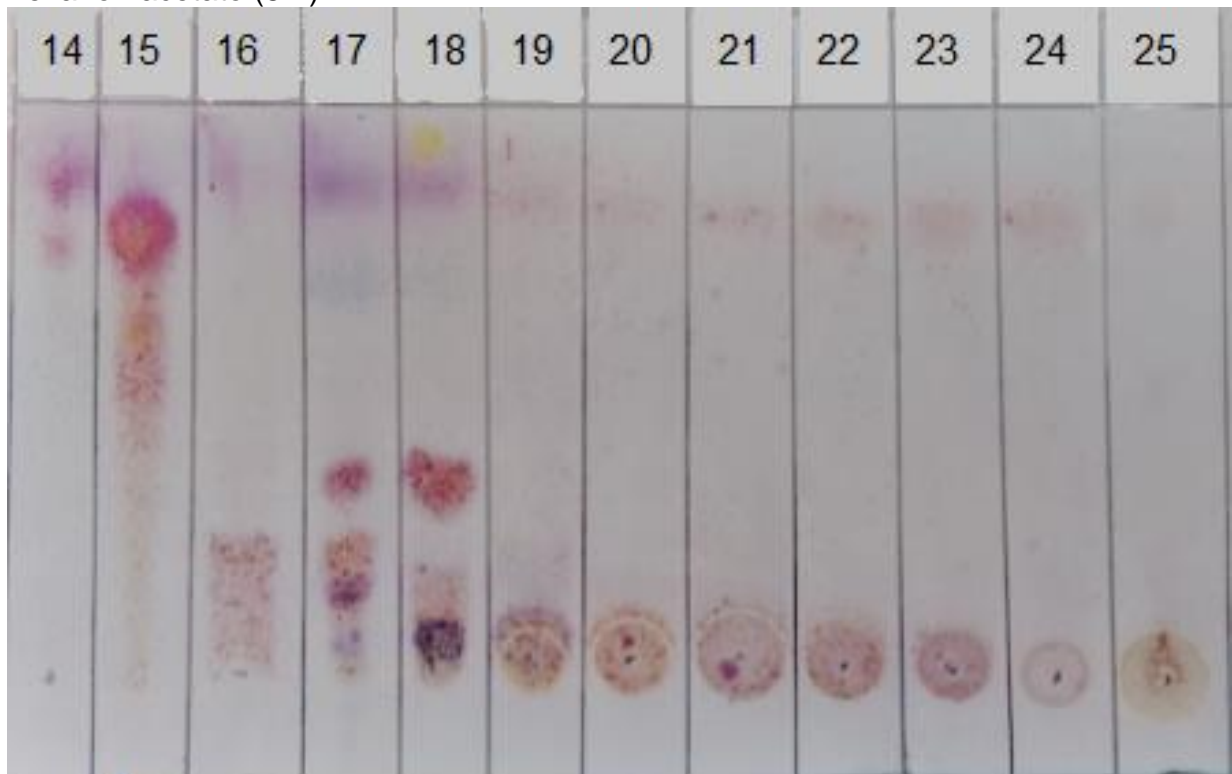
**Figura 24.** Placa de CCD com as frações provenientes da CLV na proporção de hexano : acetato (1:1).



**Fonte:** Próprio autor.

Após a realização da CLV, fez-se o monitoramento das frações por CCD (Figuras 24 e 25), para a determinação da quantidade de compostos presentes em cada fração, também foram analisados os rendimentos de cada fração. Analisando esses dois fatores foram escolhidas 3 frações que apresentaram menor quantidade de compostos e que apresentaram quantidade de massa suficiente para realização do isolamento e purificação. As frações selecionadas foram as de número 16, 19 e 20 (Figuras 24 e 25).

**Figura 25.** Placa de CCD com as frações provenientes da CLV na proporção de hexano : acetato (8:2).

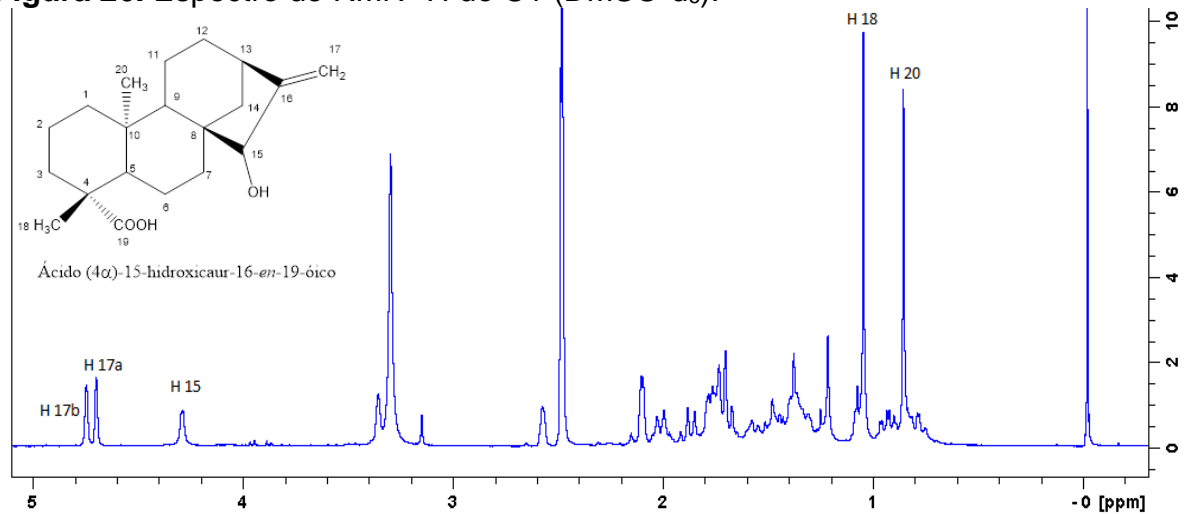


**Fonte:** Próprio autor.

#### 4.2.1 Identificação do C1

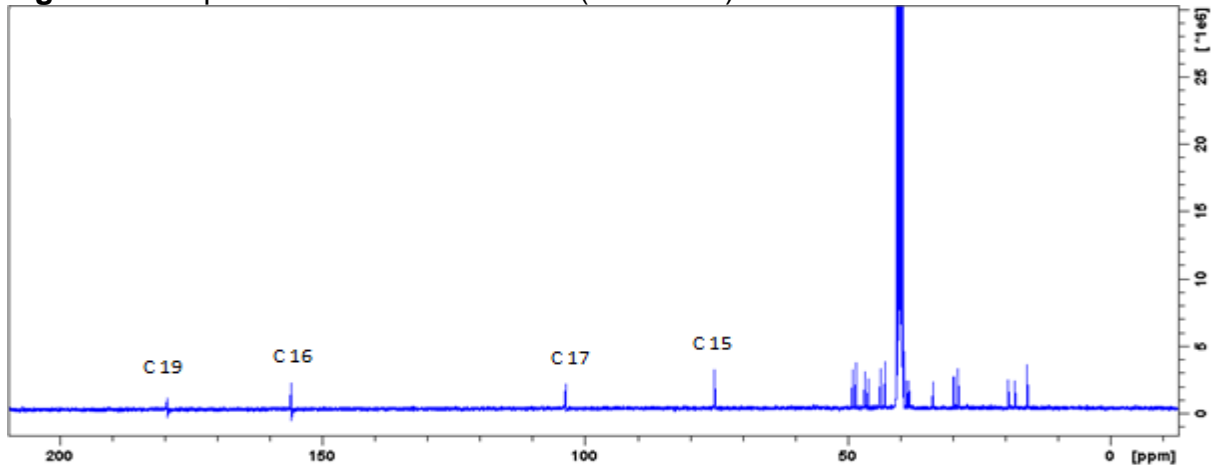
Após a recristalização do extrato biotransformado utilizando álcool metílico, os cristais foram pesados e nomeados como C1. Seu rendimento, em relação ao ácido grandiflorênico, foi de aproximadamente 11,43 %. Com as análises de RMN dos cristais dessa fração foi possível identificar o composto isolado, conforme as Figuras 26 e 27 dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ , respectivamente.

**Figura 26.** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  do C1 (DMSO- $d_6$ ).



Fonte: Próprio autor.

**Figura 27.** Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  do C1 (DMSO- $d_6$ ).



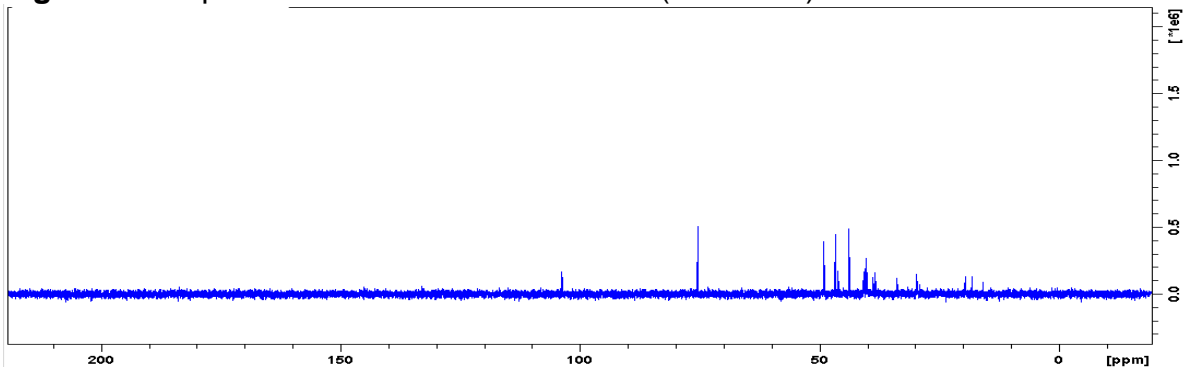
Fonte: Próprio autor.

A análise do espectro de RMN  $^1\text{H}$  apresenta poucos sinais de hidrogênio desblindados, enquanto o espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  indica a presença de 20 sinais de carbonos. No espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  os principais sinais encontrados foram em  $\delta$  179,5 ppm, atribuído ao carbono de uma carboxila (C<sub>19</sub>), e um sinal em  $\delta$  155,8 ppm indica a presença de um carbono quaternário olefínico, já que não se observa este sinal nos espectros de DEPT 135 (Figura 29) e DEPT 90 (Figura 28), influenciando diretamente sobre os espectros de RMN  $^1\text{H}$ , na qual observa-se a presença de sinais de hidrogênio em  $\delta$  4,75 ppm e 4,70 ppm relativo à presença de uma ligação dupla exocíclica sobre o C<sub>17</sub>. Porém o carbono metilênico C<sub>11</sub>, encontrado no espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  do AG em  $\delta$  114,9 ppm, não foi encontrado em C1, indicando o rompimento da dupla ligação entre os carbonos C<sub>9</sub>-C<sub>11</sub>, assim como no espectro de  $^1\text{H}$  que não apresentou o sinal de hidrogênio em  $\delta$  5.26 ppm atribuído ao hidrogênio

ligado ao C<sub>11</sub> olefínico do AG (Figuras 26 e 27). No espectro de RMN <sup>1</sup>H também foi possível observar um sinal de hidrogênio em δ 4,30 ppm com multiplicidade singleto, assim como no espectro de RMN <sup>13</sup>C que apresentou um sinal em δ 75,2 ppm, isso indica uma hidroxilação no esqueleto caurânico realizada a partir do processo de biotransformação, esta hidroxilação foi atribuída ao carbono C<sub>15</sub>.

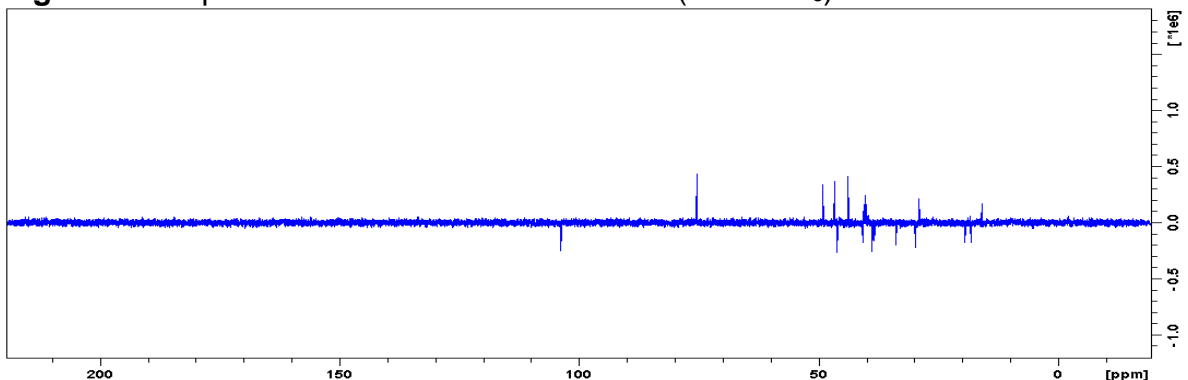
A hidroxilação no esqueleto caurano também foi observada no trabalho de Ruan e colaboradores (2014), onde o fungo *Fusarium graminearum* promoveu a biotransformação do ácido grandiflorênico em um derivado mono hidroxilado, ácido 12α -hidroxigrandiflorencio (Tópico 1.4.1).

**Figura 28.** Espectro de RMN DEPT 90 do C1 (DMSO-d<sub>6</sub>).



Fonte: Próprio autor.

**Figura 29.** Espectro de RMN DEPT 135 do C1 (DMSO-d<sub>6</sub>).



Fonte: Próprio autor.

Nas Tabelas 6 e 7, encontram-se os valores dos sinais no espectro do composto biotransformado C1 de RMN de <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C, respectivamente comparados com dados obtidos de espectro simulado, foi utilizado o espectro simulado, utilizando o programa nmrdb.org, pois não foi encontrado a caracterização desse composto na literatura. A Figura 30 apresenta a estrutura proposta para o C1 com seus carbonos enumerados, conforme regra para enumeração de diterpenos.

**Tabela 6.** Valores dos sinais no espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (DMSO- $d_6$ ) de C1 comparados a dados obtidos de espectro simulado.

Hidrogênio	$\delta$ Espectro simulado <sup>1</sup> (ppm)	$\delta$ C1 (ppm)
H-9	1,47; dd	1,47; dd
H-11	1,55; dddd	1,55; dddd
H-15	4,28; s	4,30; s
H-17 a	5,07; d	4,75; d
H-17 b	5,06; d	4,70; d
H-18	1,15; s	1,08; s
H-20	0,97; s	0,88; s

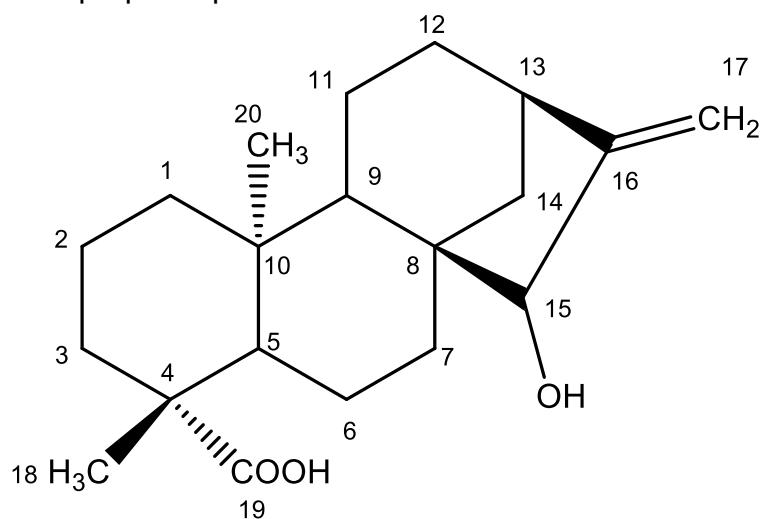
**Legenda:** <sup>1</sup>(AIRES-DE-SOUSA; HEMMER; GASTEIGER, 2002; BANFI; PATINY, 2008; BINEV; AIRES-DE-SOUSA, 2004; BINEV; CORVO; AIRES-DE-SOUSA, 2004; CASTILLO; PATINY; WIST, 2011).

**Tabela 7.** Valores dos sinais no espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (DMSO- $d_6$ ) de C1 comparado a dados obtidos de espectro simulado.

Carbono	$\delta$ Literatura <sup>2</sup> (ppm)	$\delta$ C1(ppm)
1	40,0	40,3
2	19,0	19,7
3	37,8	37,9
4	44,3	44,1
5	57,0	56,9
6	19,2	18,9
7	34,5	34,5
8	47,3	47,5
9	52,8	52,9
10	37,4	37,3
11	17,9	17,5
12	32,1	32,3
13	41,9	41,6
14	35,9	46,3
15	82,1	75,2
16	158,6	155,8
17	108,4	103,7
18	23,9	23,4
19	183,7	179,5
20	15,9	15,9

**Legenda:** <sup>2</sup>(BANFI; PATINY, 2008; CASTILLO; PATINY; WIST, 2011; PIOZZI *et al.*, 1972; STEINBECK; KRAUSE; KUHN, 2003)

**Figura 30.** Estrutura proposta para C1.



Ácido (4 $\alpha$ )-15-hidroxicaur-16-*en*-19-óico

**Fonte:** Próprio autor.

#### 4.2.2 Fração 19

Com o monitoramento realizado na fração 19 (60 mg), utilizando as análises feitas em CCD (Figuras 25 , 26 e 31), decidiu-se que a cromatografia de média pressão (CLMP) seria a melhor opção, por ocasionar uma separação a nível de purificação em menor tempo (STILL; KAHN; MITRA, 1978).

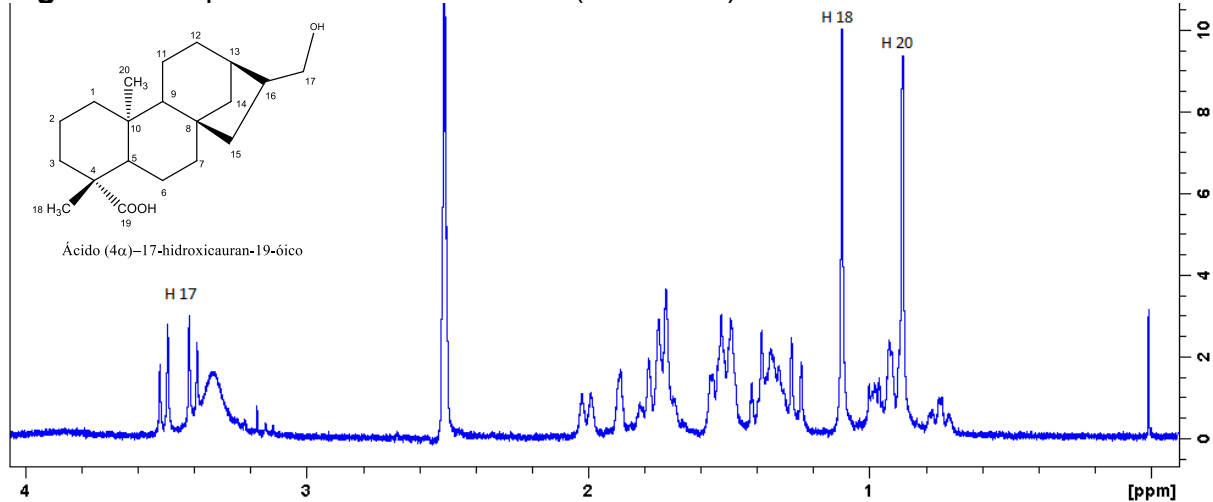
**Figura 31.** Placa de CCD da fração 19 na proporção de hexano x acetato (7x3).



**Fonte:** Próprio autor.

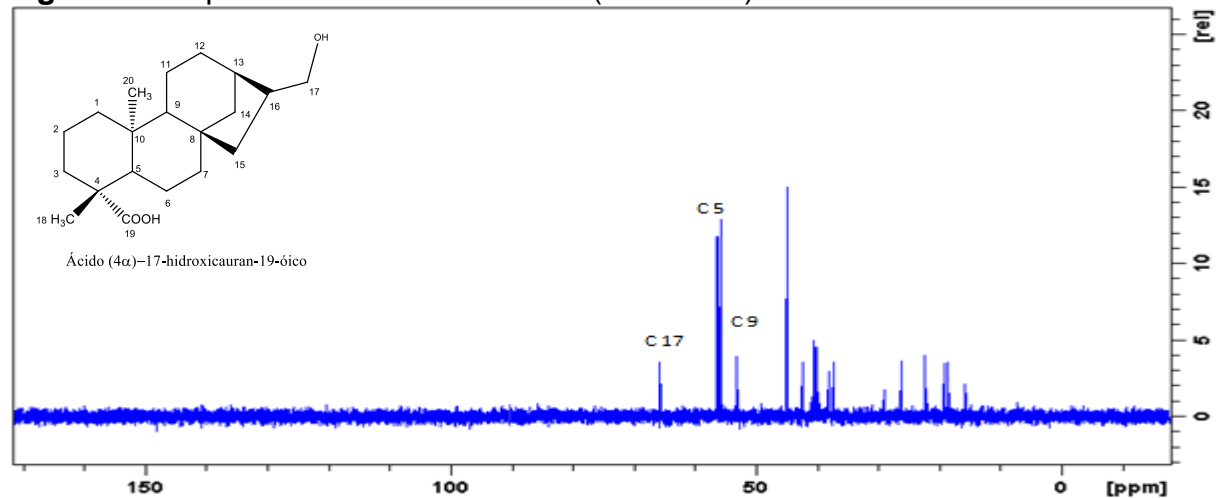
Para a CLMP foram utilizadas 700 mL de uma mistura de Hexano e Acetato de etila na proporção 7:3 como fase móvel. O fracionamento dessa fração originou 70 subfrações de 10 mL, estes foram igualmente monitorados por CCD e realizada as junções necessárias. O composto isolado foi pesado e nomeado como C2 e levado à análise de RMN. Seu rendimento, em relação ao ácido grandiflorênico, foi de aproximadamente 4,43 % Com as análises de RMN dos cristais dessa fração foi possível identificar o composto isolado, conforme as Figuras 32 e 33 dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ , respectivamente.

**Figura 32.** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  do C2 (DMSO- $d_6$ ).



Fonte: Próprio autor.

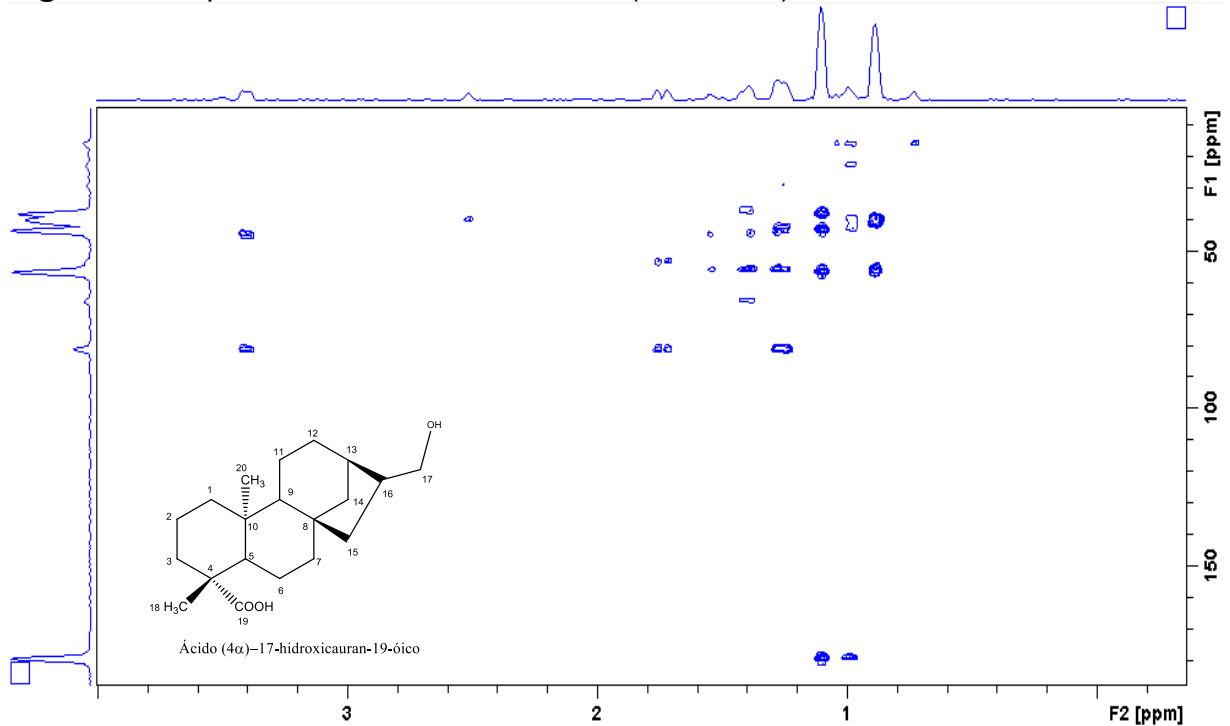
**Figura 33.** Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  do C2 (DMSO- $d_6$ ).



Fonte: Próprio autor.

A análise do espectro de RMN  $^1\text{H}$  apresenta poucos sinais de hidrogênio desblindados, enquanto o espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  indica a presença de 20 sinais de carbonos, sendo que um deles ( $\delta$  179,2 ppm) foi encontrado apenas no espectro de HMBC (Figura 34) e foi atribuído ao carbono de uma carboxila, que ocorre em C<sub>19</sub>. Porém, este composto não apresentou os principais sinais característicos do AG nos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ , devido à ausência de um sinal no espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  em  $\delta$  155,4 ppm, este sinal indica a presença de carbono quaternário olefínico, o que indica uma quebra da ligação dupla entre os carbonos C<sub>16</sub>-C<sub>17</sub>, influenciando diretamente sobre o espectro de  $^1\text{H}$ , na qual não apresenta os sinais de hidrogênio em  $\delta$  4,80 ppm e  $\delta$  4,92 ppm, relativos à presença de uma ligação dupla exocíclica sobre o C<sub>17</sub>. Outro sinal característico do AG no espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  que não foi encontrado neste composto foi o sinal em  $\delta$  114,9 ppm, este sinal é característico do carbono metilênico, C<sub>11</sub>, encontrado no AG, indicando que também houve rompimento da dupla ligação entre os carbonos C<sub>9</sub>-C<sub>11</sub>. O sinal de hidrogênio encontrado em  $\delta$  3,46 ppm no espectro de RMN  $^1\text{H}$  atribui-se ao grupo hidroxila (H<sub>17</sub>), confirmando a reação de hidroxilação no C<sub>17</sub> no processo de biotransformação do AG, fazendo com que a dupla ligação existente entre os carbonos C<sub>16</sub>-C<sub>17</sub> fosse rompida.

**Figura 34.** Espectro de RMN HMBC do C2 (DMSO-d<sub>6</sub>).

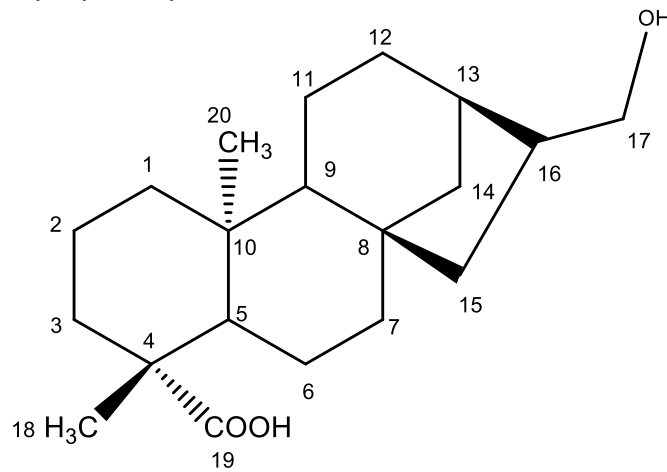


Fonte: Próprio autor.

Assim como o resultado obtido no composto biotransformado C1, resultado similar foi observado por Vieira e colaboradores (2002) na biotransformação do ácido ent-15-oxocaur16-en-19-óico com o fungo *Cephalosporium aphidicola*, obteve hidroxilações do esqueleto, promovendo rompimento de duplas ligações e originando os ácidos ent-16 $\beta$ -hidroxi-15-oxocauran-19-óico, ent-11 $\alpha$ -hidroxi-15-oxocauran-19-óico, ent-11 $\alpha$ ,16 $\beta$ -dihidroxi-15-oxocauran-19-óico, ent-16 $\beta$ ,17-dihidroxi-15-oxocauran-19-óico (Tópico 1.4.1).

Nas Tabelas 8 e 9, encontram-se os valores dos sinais no espectro do composto biotransformado C2 de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ , respectivamente comparados com dados obtidos de espectro simulado, utilizando o programa nmrdb.org, foi utilizado o espectro simulado pois não foi encontrado a caracterização desse composto na literatura. Na Figura 35 é apresentado a estrutura proposta para o C2 com seus carbonos enumerados, conforme regra para enumeração de diterpenos.

**Figura 35.** Estrutura proposta para C2.



Ácido (4 $\alpha$ )-17-hidroxicauran-19-óico

**Fonte:** Próprio autor.

**Tabela 8.** Valores dos sinais no espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (DMSO- $d_6$ ) de C2 comparados a dados obtidos de espectro simulado.

Hidrogênio	$\delta$ Espectro simulado $^1$ (ppm)	$\delta$ C2 (ppm)
H-9	1,79; dd	1,79; m
H-11	1,6; dddd	1,6; m
H-17	3,62; dd	3,46; dd
H-18	1,15; s	1,10; s
H-20	0,88; s	0,88; s

**Fonte:**  $^1$ (AIRES-DE-SOUSA; HEMMER; GASTEIGER, 2002; BANFI; PATINY, 2008; BINEV; AIRES-DE-SOUSA, 2004; BINEV; CORVO; AIRES-DE-SOUSA, 2004; CASTILLO; PATINY; WIST, 2011).

**Tabela 9.** Valores dos sinais no espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (DMSO- $d_6$ ) de C2 comparado a dados obtidos de espectro simulado.

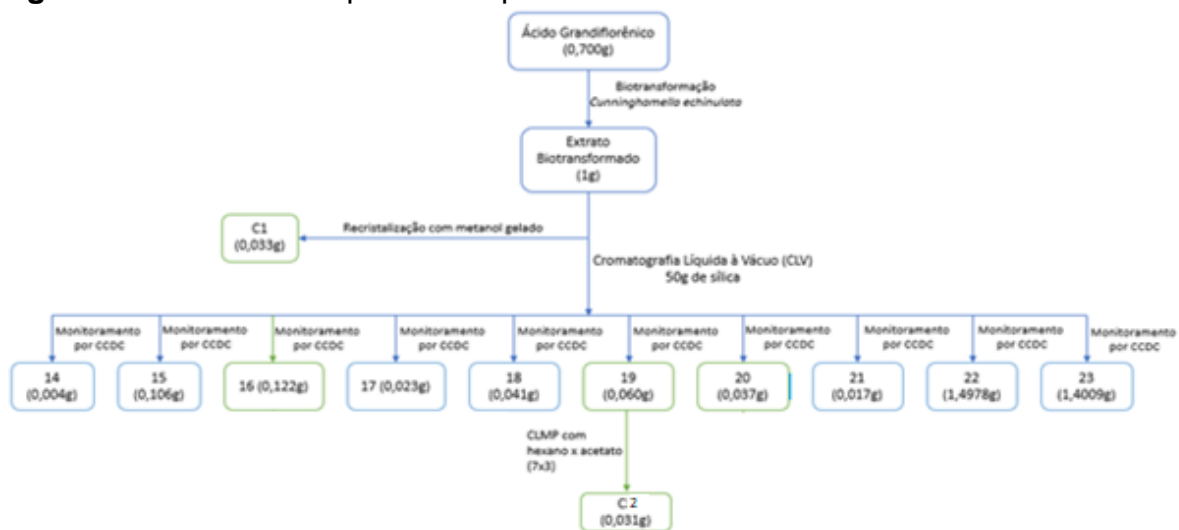
Carbono	$\delta$ Espectro simulado <sup>2</sup> (ppm)	$\delta$ C2(ppm)
1	40,0	40,1
2	19,0	19,2
3	37,8	38,1
4	44,3	43,5
5	57,0	56,7
6	22,1	22,4
7	41,7	41,3
8	44,9	45,0
9	54,5	53,9
10	41,2	38,3
11	18,3	18,6
12	30,9	31,0
13	39,5	39,6
14	38,3	38,1
15	41,5	40,9
16	42,3	42,4
17	63,6	64,8
18	23,9	24,4
19	183,7	179,2
20	15,9	15,9

**Fonte:**<sup>2</sup>(BANFI; PATINY ,2008; CASTILLO; PATINY; WIST, 2011; STEINBECK; KRAUSE; KUHN, 2003).

A Figura 36 resume os processos realizados desde o composto isolado, ácido grandiflorênico, até o isolamento dos ácidos biotransformados, C1 e C2.

Após a purificação e identificação dos compostos isolados os mesmos foram levados aos ensaios biológicos para identificação de suas atividades frente às cepas de microrganismos. Sabendo que os ensaios de atividade antimicrobiana podem ser influenciados por diversos fatores que podem interferir significativamente na pesquisa de atividade de agente antimicrobiano, desde a preparação do inóculo, até o critério utilizado para a verificação do resultado do ensaio, para se obter êxito e uniformidade nos testes de atividade, esses fatores devem ser muito bem controlados (ESPINEL-INGROFF, A.; PFALLER, 1995).

**Figura 36.** Resumo dos processos para isolamento dos ácidos biotransformados.



**Fonte:** Próprio autor.

### 4.3 ENSAIOS BIOLÓGICOS

#### 4.3.1 Disco difusão em ágar

O ácido caurenóico (AK) foi cedido pelo Prof. Dr. Nilton Syogo Arakawa (Universidade Estadual de Londrina, Londrina-PR, Brasil) e foi utilizado neste trabalho a fim de servir como comparação para os resultados obtidos com o ácido grandiflorênico (AG).

Os resultados obtidos através do teste de disco difusão em ágar são apresentados na Tabela 14. O extrato hexânico (EH), a fração 3 (F3), o Ácido Grandiflorênico (AG) e o Ácido Caurenóico (AK) apresentaram halos de inibição frente às cepas bacterianas de *S. pyogenes* (ATCC 19615) e *S. aureus* (ATCC 25923, N315 e BEC9393).

**Tabela 10.** Resultados do halo de inibição formado no teste de antibiograma para as cepas bacterianas.

Cepas bacterianas	EH (mm)	F3 (mm)	AG (mm)	AK (mm)	DMSO (mm)
<i>S. pyogenes</i> (ATCC 19615)	13	16	11	0	0
<i>S. aureus</i> (ATCC 25923)	11	12	8	0	0
<i>S. aureus</i> (BEC9393)	10	11	7	0	0
<i>S. aureus</i> (N315)	9	10	6	0	0
<i>S. agalactiae</i> (ATCC 13813)	0	0	0	0	0
<i>S. aureus</i> (ATCC 29213)	0	0	0	0	0
<i>S. aureus</i> (ATCC 19615)	0	0	0	0	0
<i>S. epidermidis</i> (ATCC 12228)	0	0	0	0	0
<i>E. coli</i> (ATCC 25922)	0	0	0	0	0
<i>E. coli</i> (ESBL176)	0	0	0	0	0
<i>E. faecalis</i> (ATCC 29212)	0	0	0	0	0
<i>S. typhimurium</i> (UK1)	0	0	0	0	0
<i>K. pneumoniae</i> (ATCC 10031)	0	0	0	0	0
<i>S. mutans</i> (ATCC 25175)	0	0	0	0	0

**Fonte:** Próprio autor.

Sendo: CIM: concentração inibitória mínima; EH: extrato hexânico das folhas da *Sphagneticola trilobata*, F3: Fração 3, AG: Ácido grandiflorênico, AK: Ácido Caurenóico e DMSO: Dimetilsulfóxido.

As outras cepas (*S. agalactiae* (ATCC 13813), *S. aureus* (ATCC 29213 e ATCC 19615), *S. epidermidis* ATCC 12228, *E. coli* ATCC 25922, *E. coli* ESB176, *E. faecalis* ATCC 29212, *S. typhimurium* UK1, *K. pneumoniae* ATCC 10031 e *S. mutans* ATCC 25175) não foram sensíveis a nenhum composto testado.

Alguns desses resultados também foram encontrados por BARATTO e colaboradores (2008), onde o autor utilizou vários tipos de extratos de *M. laevigata* (Asteracea), popularmente conhecido como guaco, e não observou atividade antibacteriana significativa, nas concentrações testadas, para as linhagens de *S. aureus* (ATCC 29213), *E. coli* (ATCC 25992), *P. aeruginosa* (ATCC 27853), *E. faecalis* (ATCC 29212) e *E. faecium* (ATCC 10541). Segundo Baratto e colaboradores (2008) esses resultados encontrados são, de certa forma, inesperados, se levados em conta o uso popular da espécie utilizada (*M. laevigata*) como antisséptico e outros estudos publicados com espécies de guaco (GASPARETTO et al., 2010; YATSUDA et al., 2005).

Porém, segundo SOUZA e colaboradores (2015) o extrato hexânico de *Aspilia latissima* (asteracea), que se destaca pela presença de diterpenos do tipo caurano, apresentou halos de inibição de 10 mm, 11 mm, 9 mm e 12 mm, frente às cepas bacterianas de *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027), *E. faecalis* (ATCC 29212), *E. coli* (ATCC 25922) e *S. aureus* (ATCC 25923), respectivamente. Um resultado similar foi relatado por DEY, 2011 onde o extrato acetato de etila de *Sphagneticola trilobata* (asteracea) apresentou halos de inibição de 6 mm e 8 mm, frente às cepas bacterianas de *E. coli* (ATCC 25922) e *S. aureus* (ATCC 25923), respectivamente.

O ácido caurenico (AK) e os ácidos biotransformados (C1 e C2), não apresentaram formação de halo de inibição frente às cepas bacterianas utilizadas. Este resultado pode ter sido ocasionado pelos compostos não se difundirem bem no meio utilizado (MH) (JORGENSEN, 1997). Então foram feitos os testes de CIM com o AG e com os ácidos biotransformados, para a confirmação do resultado.

#### 4.3.2 Concentração Inibitória Mínima

Após realizado o ensaio biológico de disco difusão em ágar foram selecionadas as principais cepas bacterianas para a determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM).

O critério utilizado para classificação da atividade do extrato (EH) e da fração (F3) foi: CIM menor que  $100 \mu\text{g mL}^{-1}$  foi considerado como boa atividade antimicrobiana, quando o CIM estiver entre  $100 \mu\text{g mL}^{-1}$  e  $400 \mu\text{g mL}^{-1}$  foi considerado como moderadamente ativo e CIM acima de  $400 \mu\text{g mL}^{-1}$  inativo. O critério utilizado para classificação dos compostos isolados (AK, AG, C1 e C2) foi: CIM menor que  $50 \mu\text{g mL}^{-1}$  foi considerado como boa atividade antimicrobiana, quando o CIM estiver entre 50 e  $100 \mu\text{g mL}^{-1}$  foi considerado como moderadamente ativo e CIM acima de  $100 \mu\text{g mL}^{-1}$  inativo (HOLETZ et al., 2002).

Os resultados referentes à ação dos compostos EH, F3, AG, AK e DMSO frente a cada microrganismo utilizado estão apresentados na Tabela 15.

**Tabela 11.** Resultados da Concentração Inibitória Mínima (CIM), para cepas bacterianas.

Cepas bacterianas	EH ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )	F3 ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )	AG ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )	AK ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )	DMSO (% v/v)
<i>S. pyogenes</i> (ATCC 19615)	12,5	12,5	3,125	3,125	>10
<i>S. agalactiae</i> (ATCC 13813)	12,5	12,5	<100	3,125	>10
<i>S. aureus</i> (ATCC 25923)	100	100	25	>100	>10
<i>S. aureus</i> (N315)	200	200	50	>100	>10
<i>S. aureus</i> (BEC9393)	200	200	100	>100	>10
<i>S. aureus</i> (ATCC 29213)	>400	>400	>100	>100	>10
<i>S. aureus</i> (ATCC 19615)	>400	>400	>100	>100	>10
<i>S. epidermidis</i> (ATCC 12228)	>400	>400	>100	>100	>10
<i>E. coli</i> (ATCC 25922)	>400	>400	>100	>100	>10
<i>E. coli</i> (ESBL176)	>400	>400	>100	>100	>10
<i>E. faecalis</i> (ATCC 29212)	>400	>400	>100	>100	>10
<i>S. typhimurium</i> (UK1)	>400	>400	>100	>100	>10
<i>K. pneumoniae</i> (ATCC 10031)	>400	>400	>100	>100	>10
<i>S. mutans</i> (ATCC 25175)	>400	>400	>100	>100	>10

**Fonte:** Próprio autor.

Sendo: CIM: concentração inibitória mínima; EH: extrato hexânico das folhas da *Sphagneticola trilobata*, F3: Fração 3, AG: Ácido grandiflorênico, AK: Ácido Caurenóico e DMSO: Dimetilsulfóxido.

Na CIM o extrato hexânico (EH) e a fração 3 (F3) inibiram a cepas de *S. pyogenes* (ATCC 19615), *S. agalactiae* (ATCC 13813) e de *S. aureus* (ATCC 25923, N315 e BEC9393). O ácido caurenóico (AK) inibiu as cepas de *S. pyogenes* (ATCC 19615) e *S. agalactiae* (ATCC 13813). O ácido grandiflorênico (AG) inibiu as cepas de *S. pyogenes* (ATCC 19615), *S. agalactiae* (ATCC 13813) e de *S. aureus* (ATCC 25923, N315 e BEC9393)

A cepa de *S. agalactiae* (ATCC 13813) foi inibida apenas pelo EH, F3 e AK. Já as cepas de *S. aureus* (ATCC 29213 e ATCC 19615), *S. epidermidis* (ATCC 12228), *E. coli* (ATCC 25922, ESBL176), *E. faecalis* (ATCC 29212), *S. typhimurium* (UK1) e *K. pneumoniae* (ATCC 10031) não foram sensíveis a esses compostos.

Esse resultado também foi encontrado por BARATTO e colaboradores (2008), onde o autor utilizou vários extratos de *M. laevigata*, de modo que nas concentrações testadas não houve atividade antibacteriana significativa para as linhagens de *S. aureus* (ATCC 29213), *E. coli* (ATCC 25992), *P. aeruginosa* (ATCC 27853), *E. faecalis* (ATCC 29212) e *E. faecium* (ATCC 10541). Para esses autores os resultados encontrados são, de certa forma, inesperados, se levados em conta o uso popular da espécie utilizada (*M. laevigata*) como antisséptico e outros estudos publicados com espécies de guaco.

Portanto, comparando as atividades entre EH, F3 e AG podemos observar que o AG é um dos compostos responsáveis pela atividade antimicrobiana em EH e F3 frente às cepas *S. pyogenes* (ATCC 19615), *S. aureus* (ATCC 25923, N315 e BEC9393), pois o composto isolado (AG) apresenta atividade superior ( $3,125 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) se comparado ao EH e ao F3 ( $12,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ ).

Também foi possível observar que o AG não é um dos responsáveis pela atividade antimicrobiana de EH e F3 frente à cepa de *S. agalactiae* (ATCC 13813), já que o AG não inibiu essa cepa bacteriana nas concentrações testadas, enquanto o EH e o F3 obtiveram resultado satisfatório de inibição (menor que  $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ ). O DMSO, a partir de testes realizados com todas as bactérias utilizadas, não apresenta atividade antimicrobiana na concentração utilizada (5% v / v).

As cepas bacterianas que foram inibidas pelo extrato EH, fração F3 e AG foram, em sua totalidade, cepas bacterianas pertencentes ao grupo das Gram positivas. Esse resultado provavelmente está relacionado com as diferenças nas composições química e estrutural da parede celular bacteriana. As paredes celulares das bactérias Gram negativas apresentam maior concentração de lipídeos. Assim,

observa-se que as bactérias Gram positivas são mais permeáveis devido à menor concentração de lipídeos em sua parede celular (VOLPATO, 2005). Resultado similar foi encontrado por SILVA e colaboradores (2002), onde o ácido caurenóico e as frações hexânica, diclorometano, acetato de etila e butanólica obtidos da *M. lanuginosa*, apresentaram atividade antimicrobiana contra as bactérias *S. aureus*, *S. epidermidis* e *B. cereus* e foram inativos contra as bactérias Gram negativas testadas.

O resultado encontrado nos testes de CIM foi similar ao encontrado por diversos autores. Como por exemplo, o resultado obtido por BRASILEIRO e colaboradores (2006), onde o extrato etanólico das folhas de *M. hirsutissima* não apresentou atividade antibacteriana contra *E. coli* (Gram negativa), no entanto mostrou-se ativo contra *S. aureus* (Gram positiva). Outro resultado similar foi obtido por AL-SNAFI (2016), onde o extrato e os diterpenos, 6-desoxododona (11-hidroxi-7, 9 (11), 13-abietatrien-12-ona) e taxodona, isolados dos frutos de *Cupressus sempervirens* apresentaram potentes atividades antibacterianas contra Gram positiva (*S. aureus*), porém, apresentaram baixa atividade contra Gram negativas (*E. coli*, *P. aeruginosa*, *Salmonella typhi*).

Porém, as análises de CIM feitas para avaliar o potencial antimicrobiano dos diterpenos biotransformados isolados (C1 e C2) frente as cepas de *S. pyogenes* (ATCC 19615), *S. agalactiae* (ATCC 13813), *S. aureus* (ATCC 25923, ATCC 29213, ATCC 19615, N315 e BEC9393), *S. epidermidis* (ATCC 12228), *E. coli* (ATCC 25922, ESB176), *E. faecalis* (ATCC 29212), *S. typhimurium* (UK1) e *K. pneumoniae* (ATCC 10031) e *S. mutans* (ATCC 25175) demonstraram que estas cepas não foram sensíveis a estes compostos biotransformados nas concentrações testadas (0,781  $\mu\text{g mL}^{-1}$  a 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ).

Esses resultados estão de acordo com os resultados obtidos por PORTO e colaboradores (2009), onde a presença de dois grupos doadores de hidrogênio no esqueleto diterpênico do tipo pimarano ocasionou diminuição da atividade antimicrobiana. A atividade antimicrobiana dos diterpenos está relacionada ao esqueleto hidrofóbico e a uma porção hidrofílica oxigenada (PORTO *et al.*, 2009). O que é reforçado por URZÚA e colaboradores (2008), relatando que a presença de um segundo grupo doador de hidrogênio no esqueleto diterpênico promove a redução ou suspensão da atividade antimicrobiana.

Esses dois trabalhos apontam dois motivos principais para relação entre atividade antimicrobiana e hidroxilação no esqueleto diterpênico, o primeiro

deles é que à diminuição da lipofilicidade pode levar a diminuição da interação com a membrana, o segundo motivo é a competição existente entre as interações intramoleculares e as ligações de hidrogênio intermoleculares entre os grupos doadores de hidrogênio e a membrana celular. Ou seja, com a biotransformação, grupos hidroxilas ligaram-se ao esqueleto hidrofóbico, tornando-o muito mais hidrofílico, justificando a diminuição da atividade antimicrobiana dos ácidos biotransformados, em relação ao ácido grandiflorênico.

Ao comparar os resultados das atividades antibacterianas observou-se que houve diferença entre a metodologia de disco difusão e a metodologia da CIM. Pode-se considerar que o método CIM foi a melhor opção para determinar a atividade antimicrobiana, por fornecer dados quantitativos.

#### 4.3.3 Atividade Hemolítica em Glóbulos Vermelhos Humanos

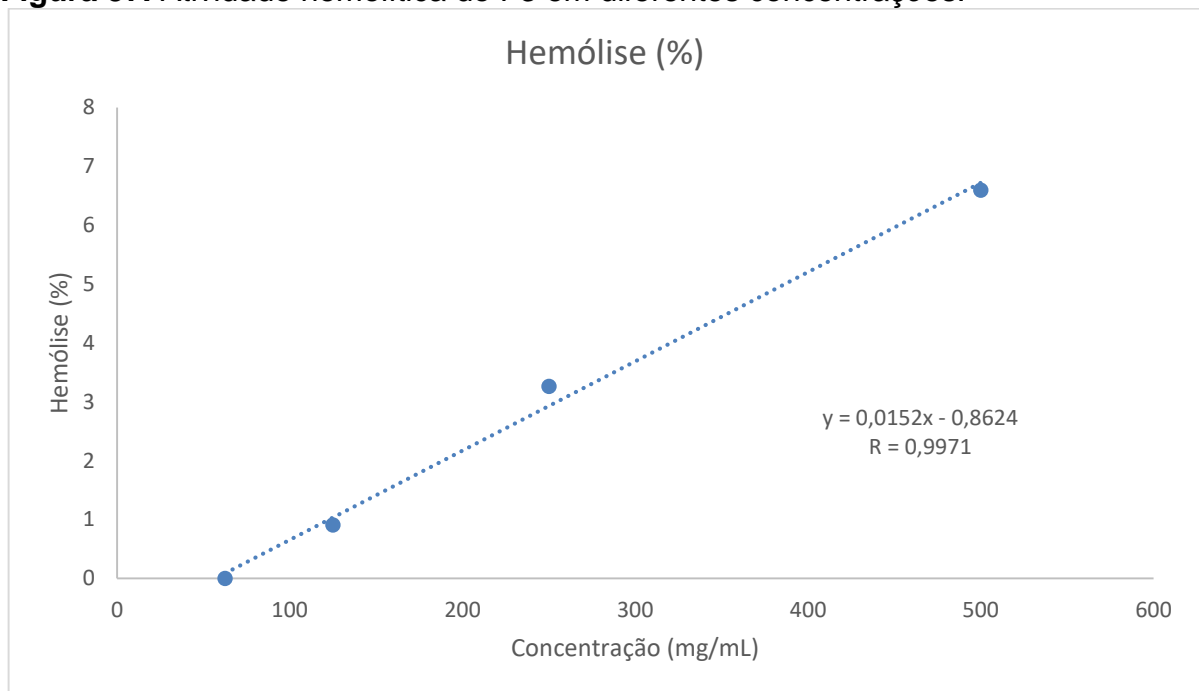
O teste de hemólise *in vitro* tem sido utilizado como uma das metodologias de triagem para diversos agentes tóxicos e para avaliação toxicológica de diferentes plantas (GANDHI; CHERIAN, 2000).

Após a realização dos ensaios biológicos de disco difusão em ágar e de concentração inibitória mínima (CIM), foi necessário a realização do ensaio de atividade hemolítica em glóbulos vermelhos humanos (GVH) para avaliar a toxicidade dos compostos. Estudos encontrados na literatura indicam que algumas substâncias vegetais, tais como, polifenóis, diterpenos, entre outros, podem causar danos às membranas de glóbulos vermelhos e produzir hemólise (COSTA-LOTUFO *et al.*, 2002).

O resultado da atividade hemolítica em GVH dos compostos testados neste trabalho demonstra que apenas a fração 3 (F3), o ácido grandiflorênico (AG) e o ácido caurenico (AK) apresentam atividade hemolítica, com porcentagem de hemólise de 6,60% para o F3, 50,14% para o AK e 73,05% para o AG, correspondente à concentração de 500  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de cada composto. Já o extrato hexânico (EH) e os ácidos biotransformados (C1 e C2) não apresentaram atividade hemolítica para GVH nas concentrações utilizadas (31,5  $\mu\text{g mL}^{-1}$  a 500  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ). Também foi possível observar que o controle feito com DMSO não foi tóxico para GVH na concentração utilizada nos compostos (10%). Assim como o controle positivo apresentou 100% de toxicidade em GVH (Triton X-100 a 1% v / v).

Utilizando os valores de absorvância obtidos experimentalmente na equação 1, foi possível estimar o  $CC_{50}$  hemolítico para o F3, ou seja, a concentração de F3 capaz de hemolisar 50% das células sanguíneas, conforme é mostrado na Figura 37.

**Figura 37.** Atividade hemolítica do F3 em diferentes concentrações.



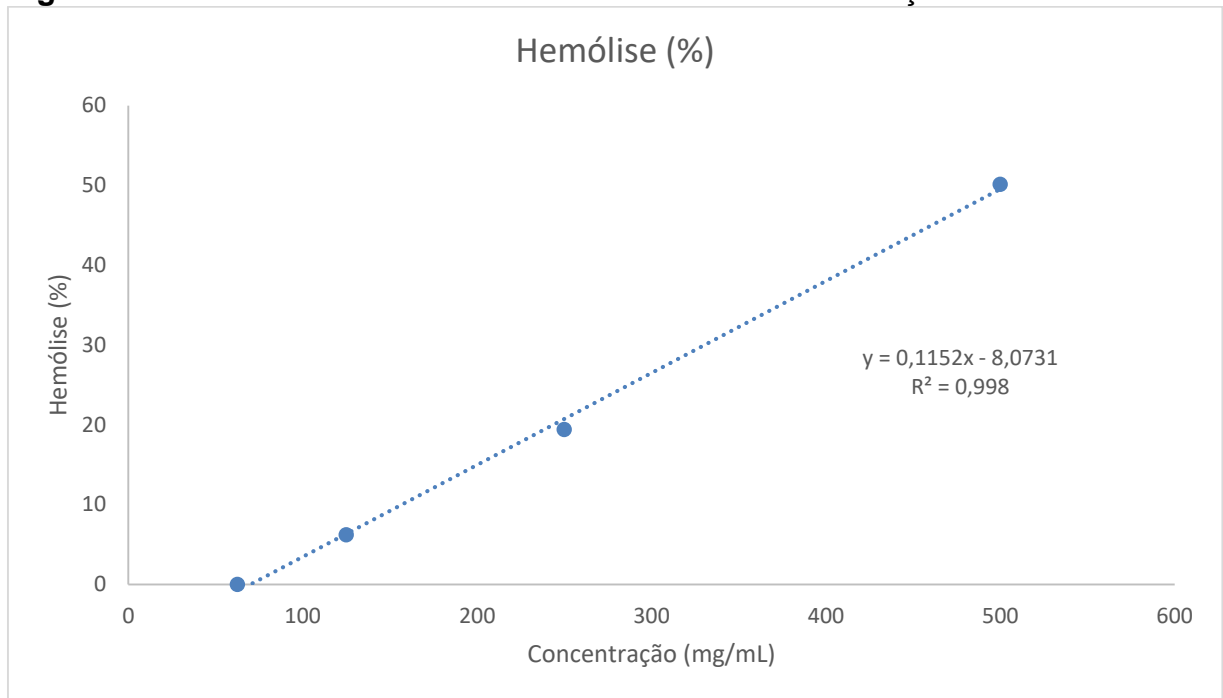
**Fonte:** Próprio autor.

Com a equação da reta obtida pelo gráfico (Figura 37) temos que a  $CC_{50}$  estimada para o F3 é de aproximadamente  $3600 \mu\text{g mL}^{-1}$ .

Utilizando os valores de absorvância obtidos experimentalmente na equação 1, também foi possível estimar o  $CC_{50}$  hemolítico para o AK. A  $CC_{50}$  para o AK foi de aproximadamente  $500 \mu\text{g mL}^{-1}$ , utilizando a equação da reta obtida pelos dados experimentais (Figura 38).

Apesar da  $CC_{50}$  do AK ser bem menor que o F3, ou seja, cerca de 7 vezes mais tóxicos para GVH que o F3, esse resultado é satisfatório, visto que a concentração inibitória mínima (CIM) para as cepas bacterianas sensíveis a este composto está na faixa de 3 a  $12 \mu\text{g mL}^{-1}$ , ou seja, menos de 1% dos GVH iriam ser hemolisados pelo AK. Isto quer dizer que o AK pode produzir instabilidade na membrana de GVH e eventualmente causar hemólise com aumento dessa dose.

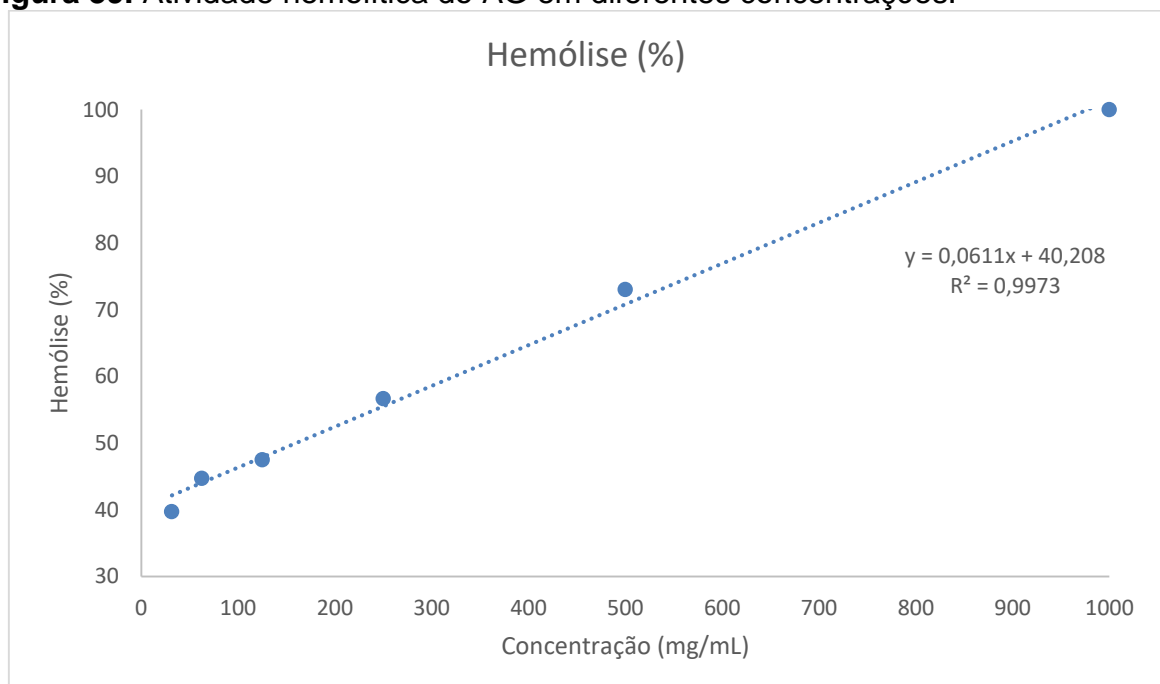
**Figura 38.** Atividade hemolítica do AK em diferentes concentrações.



**Fonte:** Próprio autor.

Utilizando os valores de absorvância obtidos experimentalmente na equação 1, também foi possível estimar o  $CC_{50}$  hemolítico para o AG. A  $CC_{50}$  para o AG foi de aproximadamente  $160 \mu\text{g mL}^{-1}$ , utilizando a equação da reta obtida pelos dados experimentais (Figura 39).

**Figura 39.** Atividade hemolítica do AG em diferentes concentrações.



**Fonte:** Próprio autor.

Apesar da  $CC_{50}$  do AG ser bem menor que a  $CC_{50}$  do F3 e do AK, ou seja, mais de 20 vezes mais tóxico para GVH que o F3 e cerca de 3 vezes mais tóxico para GVH que o AK, esse resultado é satisfatório, visto que a concentração inibitória mínima (CIM) para as cepas bacterianas sensíveis a este composto está na faixa de 3 a 12  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , ou seja, menos de 5% dos GVH iriam ser hemolisados pelo AG. Isto quer dizer que o AG pode produzir instabilidade na membrana de GVH e eventualmente causar hemólise com aumento dessa dose.

Resultado similar foi encontrado por BALEKAR; NAKPHENG; SRICHANA (2013), ensaios hemolíticos realizados em GVH não mostraram evidências de hemólise com ácido grandiflorênico até 8  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , assim, o AG pode ser utilizado para feridas abertas e crônicas.

A diminuição da atividade hemolítica em GVH nos ácidos biotransformados (C1 e C2) em comparação com AG e AK já era esperada, uma vez que houve aumento da polaridade desses compostos com a inserção de hidroxilas no esqueleto caurano do AG. Com base nesses dados, pode-se propor que com o aumento da polaridade ocorre a diminuição da hemólise dos GVH. Então pode-se dizer que a atividade hemolítica encontrada no AG deve-se em grande parte por se tratar de um composto com baixo grau de polaridade e que os ácidos biotransformados não apresentaram atividade hemolítica por apresentarem um maior grau de polaridade.

A Lipossolubilidade (Log P) é conceituado como o coeficiente de partição de uma substância entre uma fase orgânica e uma fase aquosa, isto é, a razão entre a concentração de fármaco que tende a ficar na fase orgânica e a concentração de fármaco que tende a permanecer na fase aquosa num modelo de dois compartimentos. Este modelo mimetiza o que ocorre no organismo, dando a informação sobre o perfil de afinidade do fármaco ao óleo (octanol) ou a água. Portanto quanto maior a lipossolubilidade maior a afinidade do fármaco pela fase orgânica (oleosa), isto é, maior a facilidade deste fármaco de atravessar as membranas plasmáticas constituídas de uma bicamada lipídica (fosfolípidios).

Com os valores obtidos de log P (Tabela 16), utilizando o programa molispiration, foi possível verificar que os diterpeno biotransformados (C1 e C2) tem menor facilidade de atravessar as membranas plasmáticas quando comparados aos diterpeno AG e AK. Este fator explica o motivo dos diterpeno biotransformados (C1 e C2) não apresentar ação microbiana nos testes realizados anteriormente.

**Tabela 12.** Valores de lipossolubilidade para os diterpenos isolados.

Composto	Lipossolubilidade (log P)
Ácido Caurenóico (AK)	4,67
Ácido Grandiflorênico (AG)	4,48
C1	3,75
C2	3,75

**Fonte:** Próprio autor.

## 5 CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos pode-se concluir que os processos de obtenção do ácido grandiflorênico (AG) a partir da *Sphagneticola trilobata* foram efetivos, com rendimento aproximado de 1,5%. O rendimento foi semelhante ao observado em pesquisas anteriores, mostrando que esta etapa foi bem conduzida.

Tratando-se de atividade antimicrobiana, o AG apresentou uma concentração mínima inibitória (CIM) de 3,125  $\mu\text{g mL}^{-1}$  para a cepa bacteriana *S. pyogenes* (ATCC 19615), valor semelhante ao encontrado pelo ácido caurenóico (AK), porém, o AG apresentou maior atividade antimicrobiana relativa frente a cepas de *S. aureus* (ATCC 25923, N315 e BEC9393) com um CIM de 25  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , 50  $\mu\text{g mL}^{-1}$  e 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , respectivamente. Os resultados obtidos por AG apresentaram uma maior atividade antimicrobiana comparados com os seus precursores, extrato hexânico (EH) e a fração 3 (F3), comprovando que o AG é um dos responsáveis pelas atividades antimicrobianas do EH e do F3. Os diterpenos isolados a partir da biotransformação do AG (C1 e C2) não apresentam ação antimicrobiana nas concentrações testadas (0,781  $\mu\text{g mL}^{-1}$  a 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ). Este fato deve ter ocorrido devido à adição de hidroxilas no esqueleto diterpênico, diminuindo a interação dos compostos com a membrana dos microrganismos e tornando-os muito mais hidrofílicos. O AG apresentou lipossolubilidade (Log P) de 4,48, enquanto os compostos biotransformados apresentaram Log P de aproximadamente 3,8. Portanto a biotransformação reduziu a Log P e conseqüentemente dificultou a passagem dos compostos biotransformados pelas membranas plasmáticas dos microrganismos.

No que diz respeito à atividade hemolítica frente aos glóbulos vermelhos humanos (GVH), pode-se concluir pelos resultados obtidos que o fungo *Cunninghamella echinulata* biotransformou o AG em compostos que não se apresentaram tóxicos para os GVH, diferentemente do AG que apresentou um  $\text{CC}_{50}$  de aproximadamente 160  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , valor 20 vezes mais tóxicos para GVH que o F3 e cerca de 3 vezes mais tóxico para GVH que o AK. Porém este resultado é satisfatório, visto que, menos de 5% dos GVH iriam ser hemolisados pelo AG, na concentração de 3,125  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , frente a cepa bacteriana *S. pyogenes* (ATCC 19615).

Investigações adicionais devem ser realizadas posteriormente, sendo que o primeiro passo seria a obtenção destes derivados em maior quantidade com vistas à realização de diferentes bioensaios. Etapas posteriores deste estudo ainda poderia envolver o isolamento das enzimas responsáveis por tais reações de modo a se compreender as transformações envolvidas com maiores detalhes.

Em suma este trabalho obteve importantes conclusões acerca dos processos de transformações microbianas de uma importante classe de produtos naturais com importância ecológica e farmacológica.

## 6 REFERÊNCIAS

- AIRES-DE-SOUSA, J.; HEMMER, M. C.; GASTEIGER, J. Prediction of  $^1\text{H}$  NMR Chemical Shifts Using Neural Networks. **Analytical Chemistry**, v. 74, n. 1, p. 80–90. 2002.
- AL-SNAFI, A. E. Medical importance of *Cupressus sempervirens*- A review. **IOSR Journal Of Pharmacy** , v. 6, n. 6, p. 66–76, 2016.
- ALEGRE, J. M. **Papiro Ebers: medicamentos para o tratamento dos olhos, 1536 a.C.** Disponível em: <[http://www.deficienciavisual.pt/r-Papiro\\_Ebers.htm](http://www.deficienciavisual.pt/r-Papiro_Ebers.htm)>. Acesso em: 26 out. 2017.
- ARAKAWA, N. S. **Transformações microbianas e avaliação da citotoxicidade de lactonas sesquiterpênicas de *Viguiera robusta* Gardn . ( Asteraceae )**. [s.l.] Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Riberão Preto/USP, 2007.
- ARAKAWA, N. S. et al. Further sesquiterpene lactones from *Viguiera robusta* and the potential anti-inflammatory activity of a heliangolide: Inhibition of human neutrophil elastase release. **Zeitschrift fur Naturforschung - Section C Journal of Biosciences**, v. 63, n. 7–8, p. 533–538, 2008.
- ASHA, S.; VIDYAVATHI, M. *Cunninghamella* - A microbial model for drug metabolism studies - A review. **Biotechnology Advances**, v. 27, n. 1, p. 16–29, 2009.
- BACCARIN, T., CZEPULA, A. I., FERREIRA, R. A., & LUCINDA-SILVA, R. M., Morphoanatomic analysis of aerial parts of *Wedelia paludosa* DC. (*Acmela brasiliensis*, *Sphagneticola trilobata*), Asteraceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, n. 2B, p. 612-616, 2009
- BALEKAR, N.; NAKPHENG, T.; SRICHANA, T. Wound-healing potential of grandiflorenic acid isolated from *Wedelia trilobata* (L.) leaves. **Songklanakarín J Sci Technol**, v. 35, n. 5, p. 537-546, 2013.
- BANFI, D.; PATINY, L. Resurrecting and Processing NMR Spectra On-line. **CHIMIA International Journal for Chemistry**, v. 62, n. 4, p. 280–281, 30 abr. 2008.
- BARATTO, L. et al. Investigação das atividades alelopática e antimicrobiana de *Mikania laevigata* (Asteraceae) obtida de cultivos hidropônico e tradicional. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 18, n. 4, p. 577–582, 2008.
- BARREIRO, E. J.; BOLZANI, V. DA S. Vanderlan da Silva. Biodiversidade: fonte potencial para a descoberta de fármacos. **Química nova**, p. 679-688, 2009.
- BASSO, A. V., NICOTRA, V. E., PARRA, A., MARTÍNEZ, A., & FERNÁNDEZ-VIVAS, A. Biotransformation of salpichrolides A, C, and G by three filamentous fungi. **Journal of natural products**, v. 79, n. 6, p. 1658-1667, 2016.
- BATISTA, R., BRANDÃO, G. C., BRAGA, F. C., & OLIVEIRA, A. B. Cytotoxicity of

Wedelia paludosa D.C. extracts and constituents. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 19, n. 1 A, p. 36–40, 2009.

BATISTA, R.; BRAGA, F. C.; OLIVEIRA, A. B. Quantitative determination by HPLC of ent-kaurenoic and grandiflorenic acids in aerial parts of Wedelia paludosa D.C. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 15, n. 2, p. 119–125, 2005.

BATISTA, R.; CHIARI, E.; DE OLIVEIRA, A. B. Trypanosomicidal kaurane diterpenes from Wedelia paludosa. **Planta medica**, v. 65, n. 3, p. 283–284, 1999.

BAUER, A. W.; KIRBY, W. M. M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized disk method. **American Journal of Pathology**, v. 45, p. 493–496, 1966.

BAYDOUN, E. et al. Microbial transformation of nandrolone with Cunninghamella echinulata and Cunninghamella blakesleeana and evaluation of leishmaniocidal activity of transformed products. **Steroids**, v. 88, p. 95–100, 2014.

BEATRIZ, A.; LIMA, D. DE; MARQUES, R. Biotransformações com Microrganismos em Mato Grosso do Sul: Histórico e Perspectivas. **Revista Ágora**, 2005.

BETTELHEIM, F. et al. Introduction to general, organic and biochemistry. In: **Nelson Education**. 8. ed. [s.l.] Cengage Learning, 2012. p. 243.

BINEV, Y.; AIRES-DE-SOUSA, J. Structure-Based Predictions of <sup>1</sup>H NMR Chemical Shifts Using Feed-Forward Neural Networks. **Journal of Chemical Information and Computer Sciences**, v. 44, n. 3, p. 940–945, 2004.

BINEV, Y.; CORVO, M.; AIRES-DE-SOUSA, J. The Impact of Available Experimental Data on the Prediction of <sup>1</sup>H NMR Chemical Shifts by Neural Networks. **Journal of Chemical Information and Computer Sciences**, v. 44, n. 3, p. 946–949, 2004.

BOAKYE-YIADOM, K.; FIAGBE, N. I.; AYIM, J. S. Antimicrobial properties of some West African medicinal plants iv. Antimicrobial activity of xylopic acid and other constituents of the fruits of Xylopia aethiopica (Annonaceae). **Lloydia**, v. 40, n. 6, p. 543–545, 1977.

BOAVENTURA, M. A. D.; LOPES, R. F. A. P.; TAKAHASHI, J. A. Microorganisms as tools in modern chemistry: The biotransformation of 3-indolylacetonitrile and tryptamine by fungi. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 35, n. 4, p. 345–347, 2004.

BOZDOGAN, B.; APPELBAUM, P. C. Oxazolidinones: Activity, mode of action, and mechanism of resistance. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 23, n. 2, p. 113–119, 2004.

BRASILEIRO, B. G. et al. Antimicrobial and cytotoxic activities screening of some Brazilian medicinal plants used in Governador Valadares district. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 42, n. 2, p. 195–202, 2006.

BULGAKOV, V. P.; AVRAMENKO, T. V.; TSITSIASHVILI, G. S. Critical analysis of protein signaling networks involved in the regulation of plant secondary metabolism: focus on anthocyanins. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 37, n. 6, p. 685–700,

2017.

BURITY, H. A., DE SOUZA, E. S., SANTO MERGULHÃO, A. C. D. E., & DA SILVA, M. L. R. B. Efetividade da inoculação com rizóbio e fungos micorrízicos arbusculares em mudas de sabiá submetidas a diferentes níveis de fósforo. **Pesquisa agropecuária brasileira**, v. 35, n. 4, p. 801-807, 2000.

CASTILLO, A. M.; PATINY, L.; WIST, J. Fast and accurate algorithm for the simulation of NMR spectra of large spin systems. **Journal of Magnetic Resonance**, v. 209, n. 2, p. 123–130. 2011.

CHAVAN, M. J. et al. Analgesic and Antiinflammatory Activity of Kaur - 16 - en - 19 - oic acid from *Annona reticulata* L . Bark. **PHYTOTHERAPY RESEARCH**, v. 276, n. 2011, p. 273–276, 2012.

CHEN, K. et al. HIV Principle from *Tripterygium wilfordii* : Isolation and Structural Elucidation. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 3, n. 10, p. 1345–1348, 1995.

COSTA-LOTUFO, L. V. et al. The cytotoxic and embryotoxic effects of kaurenoic acid, a diterpene isolated from *Copaifera langsdorffii* oleo-resin. **Toxicol**, v. 40, n. 8, p. 1231–1234, 2002.

CRAGG, Gordon M.; GROTHAUS, Paul G.; NEWMAN, David J. New horizons for old drugs and drug leads. **Journal of natural products**, v. 77, n. 3, p. 703-723, 2014.

DA SILVA, C. J. et al. Chemical composition and histochemistry of *Sphagneticola trilobata* essential oil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 22, n. 3, p. 482–489, 2012.

DA SILVA, J. A. T. et al. Allelopathic Potential of Select Gymnospermous Trees. **Journal of Forest and Environmental Science**, v. 31, n. 2, p. 109–118, 2015.

DE CARVALHO, G. J. A. et al. Diterpenos, triterpenos e esteróides das flores de *Wedelia paludosa*. **Quimica Nova**, v. 24, n. 1, p. 24–26, 2001.

DEWICK, P. M. **Medicinal Natural Products. A Biosynthetic Approach**. Chichester ed. [s.l.: s.n.].

DEY, Shajib Kanti. **Biological Investigation of Ethyl Acetate Extract of Wedelia Trilobata Leaves**. 2014. Tese de Doutorado. East West University.

DIAS, M. G. et al. Efeito genotóxico e antiproliferativo de *Mikania cordifolia* (L. F.) Willd. (Asteraceae) sobre o ciclo celular de *Allium cepa* L. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 16, n. 2, p. 202–208, 2014.

DOMAGK, G. Ein Beitrag zur Chemotherapie der bakteriellen Infektionen. **DMW - Deutsche Medizinische Wochenschrift**, v. 61, n. 07, p. 250–253. 1935.

DOS SANTOS, A. O. et al. Antileishmanial activity of diterpene acids in copaiba oil. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 108, n. 1, p. 59–64, 2013.

DUARTE, D. F. Uma breve história do ópio e dos opióides. **Revista Brasileira de**

**Anestesiologia**, v. 55, n. 1, p. 135–146, 2005.

ELSON, C. . Suppression of mevalonate pathway activities by dietary isoprenoids: protective roles in cancer and cardiovascular disease. **The Journal of Nutrition**, v. 125, n. 6, p. 1666–1672, 1995.

ESPINEL-INGROFF, A.; PFALLER, M. A. In: **Murray, P. R.; Baron, E. J.; Pfaller, M. A.; TENOVER, F. C.; YOLKEN, R. H.** 6. ed. Washington: C.V. Mosby.: Manual of clinical microbiology, 1995.

**Farmacopeia Brasileira**. São Paulo: Atheneu, 1988. v. 4

FERNANDES, P. Antibacterial discovery and development—the failure of success? **Nature Biotechnology**, v. 24, n. 12, p. 1497–1503, 2006.

FREITAS, T. P. et al. Active substances against trypomastigote forms of *Trypanosoma cruzi* and microorganisms are produced in sequence by *Talaromyces flavus*. **Microbiol Res**, v. 157, n. 3, p. 201–206, 2002.

FUENTEALBA, C. et al. Colour and in vitro quality attributes of walnuts from different growing conditions correlate with key precursors of primary and secondary metabolism. **Food Chemistry**, v. 232, p. 664–672, 2017.

GANDHI, V. .; CHERIAN, K. . Red cell haemolysis test as an in vitro approach for the assessment of toxicity of karanja oil. **Toxicology in Vitro**, v. 14, n. 6, p. 513–516. 2000.

GASPARETTO, J. C. et al. *Mikania glomerata* Spreng. e *M. laevigata* Sch. Bip. ex Baker, Asteraceae: estudos agronômicos, genéticos, morfoanatômicos, químicos, farmacológicos, toxicológicos e uso nos programas de fitoterapia do Brasil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n. 4, p. 627–640. 2010.

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. Plantas medicinais: Fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Quimica Nova**, v. 30, n. 2, p. 374–381, 2007.

GUIMARÃES, D. O.; DA SILVA MOMESSO, L.; PUPO, M. T. Antibióticos: Importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. **Quimica Nova**, v. 33, n. 3, p. 667–679, 2010.

GURIB-FAKIM, Ameenah (Ed.). **Novel plant bioresources: applications in food, medicine and cosmetics**. John Wiley & Sons, 2014.

HANSON, J. R. **An Introduction to Biotransformations in Organic Chemistry**. New York: W. H. Freeman/Spectrum and Co. Ltd, 1995.

HANSON, J. R. Diterpenoids. **Natural Product Reports**, v. 23, n. 6, p. 875, 2006.

HAPPI, C. T. et al. Polymorphisms in *Plasmodium falciparum* dhfr and dhps genes and age related in vivo sulfadoxine-pyrimethamine resistance in malaria-infected patients from Nigeria. **Acta Tropica**, v. 95, n. 3, p. 183–193, 2005.

HATTORI, E. K. O.; NAKAJIMA, J. N. A família Asteraceae na estação de Pesquisa

e Desenvolvimento Ambiental Galheiros, Perdizes, Minas Gerais, Brasil. **Rodriguesia**, v. 59, n. 4, p. 687–749, 2008.

HEDDEN, Peter; KAMIYA, Yuji. Gibberellin biosynthesis: enzymes, genes and their regulation. **Annual review of plant biology**, v. 48, n. 1, p. 431-460, 1997.

HEGAZY, M. F. et al. Microbial biotransformation as a tool for drug development based on natural products from mevalonic acid pathway : A review. **Journal of Advanced Research**, v. 6, n. 1, p. 17–33, 2015.

HOLETZ, F. B. et al. Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 97, n. 7, p. 1027–1031, 2002.

IZUMI, E. et al. Terpenes from *Copaifera* demonstrated *in vitro* antiparasitic and synergic activity. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 55, n. 7, p. 2994–3001, 2012.

JIANG, B. et al. ent-Kaurane Diterpenoids from *Isodon lungshengensis*. **Journal of Natural Products**, v. 62, n. 7, p. 941–945, 1999.

JORGENSEN, J. H. Laboratory issues in the detection and reporting of antibacterial resistance. **Infectious disease clinics of North America**, v. 11, n. 4, p. 785–802. 1997.

KINDEL, I. **BUTZKE AGRÍCOLA E FLORESTAL - TAIÓ/SC: Sphagneticola trilobata (Margaridão)**. Disponível em: <<http://adolfobutzkeblog.blogspot.com.br/2016/07/sphagneticola-trilobata-margaridao.html>>. Acesso em: 3 fev. 2018.

KO, Horng-Huey; CHANG, Wen-Ling; LU, Tzy-Ming. Antityrosinase and antioxidant effects of ent-kaurane diterpenes from leaves of *Broussonetia papyrifera*. **Journal of natural products**, v. 71, n. 11, p. 1930-1933, 2008.

KRULL, R. et al. Characterization and control of fungal morphology for improved production performance in biotechnology. **Journal of Biotechnology**, v. 163, n. 2, p. 112–123, 2013.

LAZOVSKI, J. et al. Estrategia de control de la resistencia bacteriana a los antimicrobianos en Argentina. **Rev Panam Salud Publica Pan American Journal of Public Health**, v. 41, n. 7, p. 1–7, 2017.

LEITE, Z. T. C. et al. Leite e alguns de seus derivados-da antiguidade a atualidade. **Química Nova**, v. 29, n. 4, p. 876–880, 2006.

LEVY, S. B. Antibiotic Resistance: Consequences of Inaction. **Clinical Infectious Diseases**, v. 33, n. s3, p. S124–S129, 2001.

MACIEL, M. A. M. et al. Plantas medicinais: A necessidade de estudos multidisciplinares. **Química Nova**, v. 25, n. 3, p. 429–438, 2002.

MADIGAN, M. T. et al. **MICROBIOLOGIA de brock**. 14. ed. Porto Alegre: ARTMED, 2016.

MAHAJAN, J. R.; MONTEIRO, M. B. New diterpenoids from *Pterodon emarginatus* vog. **Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1**, v. 0, p. 520–525, 1973.

MEDEIROS, V. P. B. DE et al. Identificação da microbiota fúngica anemófila em uma indústria de polpas de frutas e susceptibilidade antifúngica a terpenos Identification of the airborne fungal microbiota in a fruit pulp industry and antifungal susceptibility to terpenes. **Rev Inst Adolfo Lutz. São Paulo**, v. 74, n. 3, p. 266-73, 2015.

MOREIRA, M. R. et al. Ent-Kaurenoic acid-rich extract from *Mikania glomerata*: In vitro activity against bacteria responsible for dental caries. **Fitoterapia**, v. 112, p. 211–216, 2016.

MULABAGAL, V.; TSAY, H. Plant Cell Cultures - An Alternative and Efficient Source for the Production of Biologically Important Secondary Metabolites. **International Journal of Applied Science and Engineering**, v. 2, n. 1, p. 29–48, 2004.

MUTAFOVA, B., FERNANDES, P., MUTAFOV, S., BERKOV, S., & PAVLOV, A.. Microbial transformations of plant secondary metabolites. **Bioprocessing of Plant In Vitro Systems**, p. 85-124, 2018.

NEWMAN, David J.; CRAGG, Gordon M. Natural products as sources of new drugs from 1981 to 2014. **Journal of natural products**, v. 79, n. 3, p. 629-661, 2016.

NICOLAOU, K. C.; MONTAGNON, T. No Title. In: **Molecules that Changed the World**. [s.l.] Wiley-VCH, 2008. p. 385.

OKOYE, T. C., AKAH, P. A., OMEJE, E. O., OKOYE, F. B., & NWORU, C. S. Anticonvulsant effect of kaurenoic acid isolated from the root bark of *Annona senegalensis*. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 109, p. 38-43, 2013.

DE OLIVEIRA, Alaide B.; HANSON, James R.; TAKAHASHI, Jacqueline A. The biotransformation of ent-15-oxokaur-16-en-19-oic acid and its methyl ester by *Cephalosporium aphidicola*. **Phytochemistry**, v. 40, n. 2, p. 439-442, 1995.

OTTEN, S. L.; ROSAZZA, J. P. Microbial Transformations of Natural Antitumor Agents. 17. Conversions of Lapachol by *Cunninghamella echinulata*. **Journal of Natural Products**, v. 44, n. 5, p. 562–568. 1981.

PALUDO, C. R. et al. Microbial transformation of  $\beta$ -lapachone to its glycosides by *Cunninghamella elegans* ATCC 10028b. **Phytochemistry Letters**, v. 6, n. 4, p. 657–661, 2013.

PELLETIER, S. W.; CHOKSHI, H. P.; DESAI, H. K. Separation of diterpenoid alkaloid mixtures using vacuum liquid chromatography. **Journal of natural products**, v. 49, n. 5, p. 892–900, 1986.

PERCÍNIO, J. M. DE S.; CRESPO, J. M. R. E S. Análise das prescrições de antimicrobianos em uma unidade pública de saúde de um distrito da cidade de Muriaé ( MG ). **Revista Científica da Faminas**, v. 12, n. 2, p. 37–45, 2017.

PINTO, A. C. et al. Produtos naturais: Atualidade, desafios e perspectivas. **Quimica**

**Nova**, v. 25, n. SUPPL. 1, p. 45–61, 2002.

PIOZZI, F. et al. Structure of Grandiflorenic Acid. **Canadian Journal of Chemistry**, v. 50, n. 1, p. 109–112, 1972.

PORTO, T. S., SIMÃO, M. R., CARLOS, L. Z., MARTINS, C. H., FURTADO, N. A., SAID, S., ... & AMBRÓSIO, S. R. Pimarane-type diterpenes obtained by biotransformation: antimicrobial properties against clinically isolated Gram- positive multidrug-resistant bacteria. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 27, n. 10, p. 1502-1507. 2009.

PUPO, M. T. et al. Microbial natural products: a promising source of bioactive compounds. **Modern Biotechnology in Medicinal Chemistry and Industry**, v. 1, p. 51–78, 2006.

RAINHO, D. **Aromaterapia em Perspectiva: História, Escolas e Abordagens**. Disponível em: <<http://perdido.co/2017/06/aromaterapia-em-perspectiva-historia-escolas-e-abordagens/>>. Acesso em: 28 out. 2017.

RAVEN, P. H.; EVERT, R. F.; EICHHORN, S. E. **Biologia Vegetal**. 7. ed. Rio de Janeiro: Guanabara: Guanabara Koogan, 2007.

ROCHA, A. D. et al. Synthesis of a new allelopathic agent from the biotransformation of *ent*-15  $\alpha$ -hydroxy-16-kauren-19-oic acid with *Fusarium proliferatum*. **Natural Product Research**, v. 31, n. 22, p. 2647–2653, 2017.

RUAN, Y. et al. Specific 12 $\alpha$ -hydroxylation of grandiflorenic acid by permeabilised fungus *Fusarium graminearum*. **Natural Product Research**, v. 28, n. 9, p. 677–679, 2014.

RUIZ, Y. et al. Cytotoxic and apoptosis-inducing effect of *ent*-15-oxo-kaur-16-en-19-oic acid, a derivative of grandiflorolic acid from *Espeletia schultzii*. **Phytochemistry**, v. 69, n. 2, p. 432–438, 2008.

SAKURAI, H.; YOSHIKAWA, Y.; YASUI, H. Current state for the development of metallopharmaceutics and anti-diabetic metal complexes. **Chemical Society Reviews**, v. 37, n. 11, p. 2383, 2008.

SANTOS, R. I. DOS. Metabolismo básico e origem dos metabólitos secundários. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**, p. 403–434, 2004.

SCHULZ, H.; BARANSKA, M. Identification and quantification of valuable plant substances by IR and Raman spectroscopy. **Vibrational Spectroscopy**, v. 43, n. 1, p. 13–25, 2007.

SILVA, C. P. DA et al. Extratos Vegetais de Espécies de Plantas do Cerrado Sul-Matogrossense com Potencial de Bioherbicida e Bioinseticida. **Uniciências**, v. 21, n. 1, p. 25–34, 2017.

SILVA, R. Z. DA et al. Investigação Fitoquímica e Avaliação da Atividade Antibacteriana da *Mikania lanuginosa* DC (ASTERACEAE). **Visão Acadêmica. Curitiba-PR**, v. 3, p. 59–64, 2002.

- SILVA, E. A. et al. The biotransformation of ent-kaur-16-en-19-oic acid by *Rhizopus stolonifer*. **Phytochemistry**, v. 52, n. 3, p. 397–400, 1999.
- SILVA, L. E. et al. Plantas do Gênero *Xylopia*: Composição Química e Potencial Farmacológico. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 17, n. 4, p. 814–826, 2015.
- SILVA, N. R. A. et al. Biosurfactant-and-bioemulsifier produced by a promising *Cunninghamella echinulata* isolated from caatinga soil in the Northeast of Brazil. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 15, n. 9, p. 15377–15395, 2014.
- SOUZA, J. M. E. et al. Antimicrobial activity of *Aspilia latissima* (Asteraceae). **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 46, n. 4, p. 1103–1110. 2015.
- STEINBECK, C.; KRAUSE, S.; KUHN, S. NMRShiftDBConstructing a Free Chemical Information System with Open-Source Components. **Journal of Chemical Information and Computer Sciences**, v. 43, n. 6, p. 1733–1739. 2003.
- STILL, W. C.; KAHN, M.; MITRA, A. Rapid chromatographic technique for preparative separations with moderate resolution. **J. Org. Chem**, v. 43, n. 14, 1978.
- TAKAHASHI, J., GOMES, D., LYRA, F., DOS SANTOS, G., & MARTINS, L. The Remarkable Structural Diversity Achieved in ent-Kaurane Diterpenes by Fungal Biotransformations. **Molecules**, v. 19, n. 2, p. 1856-1886, 2014.
- Preparation and activity of diterpenoids against trypanomastigotes of *Trypanosoma cruzi*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 12, p. 118-120, 2002.
- TIAN, T. et al. Identification of metabolites of oridonin in rats with a single run on UPLC-Triple-TOF-MS / MS system based on multiple mass defect filter data acquisition and multiple data processing techniques. **Journal of Chromatography B**, v. 1006, p. 80–92, 2015.
- TORRENEGRA, R.; GÓMEZ, D. L.; TÉLLEZ, A. N. Actividad giberélica de los compuestos diterpénicos derivados de kaureno aislados de *Espeletopsis santanderensis* Cuatr. **Actual Biol**, v. 23, n. 75, p. 19–22, 2001.
- URZÚA, A. et al. A structure-activity study of antibacterial diterpenoids. **Molecules**, v. 13, n. 4, p. 882–891, 2008.
- VIEGAS JR., C.; DA SILVA BOLZANI, V.; BARREIRO, E. J. OS produtos naturais e a química medicinal moderna. **Química Nova**, v. 29, n. 2, p. 326–337, 2006.
- VIEIRA, H. S. et al. Novel derivatives of kaurenoic acid: Preparation and evaluation of their trypanocidal activity. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 13, n. 2, p. 151–157, 2002.
- VILELA, J. D. Natural life. **Rev. Paul. Med** 89, p. v. 89, 115, 1977.
- VON NUSSBAUM, F. et al. Antibacterial Natural Products in Medicinal Chemistry—Exodus or Revival? **Angewandte Chemie International Edition**, v. 45, n. 31, p. 5072–5129, 2006.

WALSH, C. **No Title**. washington: American Society for Microbiology (ASM), 2003.

WU, L. et al. CD4-induced interaction of primary HIV-1 gp120 glycoproteins with the chemokine receptor CCR5. **Nature**, v. 384, n. 14, p. 179, 1996.

YATSUDA, R. et al. Effects of Mikania genus plants on growth and cell adherence of mutans streptococci. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 97, n. 2, p. 183–189, 2005.

ZERBE, P.; CHIANG, A.; BOHLMANN, J. Mutational analysis of white spruce (*Picea glauca*) ent-kaurene synthase (PgKS) reveals common and distinct mechanisms of conifer diterpene synthases of general and specialized metabolism. **Phytochemistry**, v. 74, p. 30–39, 2012.