



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ORGÂNICA E INORGÂNICA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

JOSÉ RÉGIS DE PAIVA

**ESTUDO DO POTENCIAL BIOCATALÍTICO DO FUNGO *RHIZOPUS STOLONIFER* NA
BIOTRANSFORMAÇÃO DE PRODUTOS NATURAIS**

Dissertação de Mestrado submetida à
Coordenação do Programa de Pós-
Graduação em Química, da
Universidade Federal do Ceará, como
requisito para a obtenção do Grau de
Mestre em Química.

Área de concentração: Química
Orgânica.

Orientador: Prof. Dr. Jair Mafezoli

FORTALEZA

2014

JOSÉ RÉGIS DE PAIVA

ESTUDO DO POTENCIAL BIOCATALÍTICO DO FUNGO *RHIZOPUS STOLONIFER* NA
BIOTRANSFORMAÇÃO DE PRODUTOS NATURAIS

Dissertação de Mestrado submetida à
Coordenação do Programa de Pós-
Graduação em Química, da
Universidade Federal do Ceará, como
requisito para a obtenção do Grau de
Mestre em Química.

Área de concentração: Química
Orgânica.

Orientador: Prof. Dr. Jair Mafezoli
Coorientador: Prof. Dr. Francisco
Geraldo Barbosa

FORTALEZA
2014

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca de Ciências e Tecnologia

-
- P168e Paiva, José Régis de.
Estudo do potencial biocatalítico do fungo *Rhizopus stolonifer* na biotransformação de produtos naturais. – 2014.
73 f. : il. color., enc. ; 30 cm.
- Mestrado (Dissertação) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciência, Departamento de Química Orgânica e Inorgânica, Mestrado em Química, Fortaleza, 2014.
Área de Concentração: Química Orgânica.
Orientação: Prof. Dr. Jair Mafezoli.
Co-orientação: Prof. Dr. Francisco Geraldo Barbosa
1. Fungos 2. Biotecnologia 3. Bioquímica I. Título.

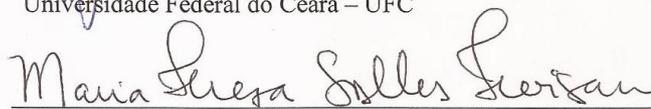
Esta Dissertação foi aprovada como parte dos requisitos necessários à obtenção do Grau de Mestre em Química, área de concentração Química Orgânica, outorgada pela Universidade Federal do Ceará, em cuja Biblioteca de Ciências e Tecnologia/UFC encontra-se à disposição dos interessados.

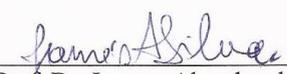

José Régis de Paiva

DISSERTAÇÃO APROVADA EM: . 03/02/2014

EXAMINADORES:


Prof. Dr. Jair Mafezoli
Universidade Federal do Ceará – UFC


Profa. Dra. Maria Teresa Salles Trevisan
Universidade Federal do Ceará – UFC


Prof. Dr. James Almada da Silva
Universidade Federal de Sergipe – UFSe

A Deus.

Aos meus pais, José Regino e Maria Socorro.

AGRADECIMENTOS

A Deus que me deu forças nos momentos mais difíceis.

A minha família, meu irmão e aos meus pais que sempre estiveram ao meu lado.

Aos meus colegas de laboratório que sempre ficavam para trabalhar ao meu lado fora do expediente, Onassis e André. E a todos colegas do LABS, Daniele Holanda, Reinaldo, Thiago, Gleidisson, Gerefson, Carol, Rayanne, Vanessa e Emanuele.

Ao Prof. Jair Mafezoli pelas suas saibas orientações, dedicação e por ter sido um verdadeiro amigo.

Ao prof. Geraldo Barbosa por sua coorientação mostrando-se um exceleto orientador, dedicado e paciente que sempre.

Aos professores Marcos Carlos de Matos e Maria da Conceição F. de Oliveira pela utilização da infra-estrutura, equipamentos do LABS e por ter me recebido tão bem.

A Profa. Mary Anne Sousa Lima por ter sedido o HPLC nos momentos mais criticos.

Ao Prof. James Almada da Silva pela a força, ajuda no HPLC, orientação nos momentos de dúvida e por ter se tornado um bom amigo.

Ao CENAUREMN pela aquisição dos espectros de RMN e em especial ao Ricardo pela realização dos experimentos.

A todos os colegas do Curso de Pós-Graduação em Química.

A todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Química.

A todos aqueles que colaboraram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

Aos órgãos financiadores CAPES, CNPQ e FUNCAP.

“ Não tentes ser bem sucedido,
tenta antes ser um homem de valor.”
(Albert Einstein)

RESUMO

Neste trabalho investigou-se o potencial biocatalítico do fungo *Rhizopus stolonifer*, um fungo fitopatogênico, em biotransformações de metabólitos secundários naturais. Dois desses metabólitos, o diterpeno 3,12-dioxo-15,16-epoxi-4-hidroxicleroda-13(16),14-dieno e o derivado fenólico 6-gingerol foram biotransformados e seus respectivos produtos isolados e quantificados por CLAE. A elucidação estrutural dos produtos de biotransformação pelo fungo *Rhizopus stolonifer* foram realizadas por análise dos espectros de RMN ^1H , RMN ^{13}C , RMN ^{13}C -DEPT 135, IV e EM. Identificou-se que os produtos obtidos eram provenientes de uma biorredução, revelando o potencial deste fungo na redução quimio e regioseletivas de grupos carbonilas não conjugados. Realizou-se o estudo cinético dos produtos de biorredução por CLAE e ensaios citotoxicidade frente às linhagens tumorais humanas OVCAR-8 (ovário), SF-295 (glioblastoma) e HCT-8 (côlon). O produto biorreduzido 6-gingerdiol apresentou os melhores percentuais de inibição do crescimento celular: 91,83; 70,90 e 78,56, respectivamente.

Palavras chaves: *Rhizopus stolonifer*; 6-gingerol; 3,12-dioxo-15,16-epoxi-4-hidroxicleroda-13(16),14-dieno; biorredução.

ABSTRACT

In this work, the biocatalytic potential of the fungus *Rhizopus stolonifer*, a phytopathogenic fungus, in biotransformations of natural secondary metabolites was investigated. Two of these metabolites, the diterpene 3,12-dioxo-15,16-epoxy-4-hydroxycyclohexa-13(16),14-diene and the phenolic derivative 6-gingerol was biotransformed and their products were isolated and quantified by HPLC. The structural determination of biotransformation products was obtained by analysis of ¹H NMR, ¹³C NMR, ¹³C-NMR, DEPT 135, IR and MS spectrum. The products were obtained by a bioreduction process, revealing the potential of this fungus in selective reduction of unconjugated carbonyl groups. The products from bioreduction were submitted to antitumor assay against human tumor cell lines OVCAR-8 (ovarian), SF-295 (glioblastoma), and HCT-8 (colon). The biotransformation product 6-gingerdiol showed the highest percentage of inhibition of cell growth: 91,83; 70,90 e 78,56, respectively.

Keywords: *Rhizopus stolonifer*, 6-gingerol; 3,12-dioxo-15,16-epoxy-4-hydroxycyclohexa-13 (16),14-diene; bioreduction.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Placa de Petri com <i>Rhizopus stolonifer</i>	23
Figura 2 - Morango atacado por <i>R. stolonifer</i>	24
Figura 3 - Reprodução sexuada de <i>Rhizopus stolonifer</i>	25
Figura 4 - Estrutura da ocratoxina (1) e zearalenona (2).....	27
Figura 5 - Posições mais hidroxiladas no esqueleto caurânico por <i>R. stolonifer</i>	29
Figura 6 - Estrutura dos substratos utilizados nos processos de biotransformação por <i>R. stolonifer</i>	32
Figura 7 - Cromatograma do extrato do meio racional de biotransformação de CA pelo fungo do <i>R. stolonifer</i> (A), cromatograma do branco – fungo + tampão (B) e o cromatograma do padrão do substrato CA (C).....	33
Figura 8 - Cromatograma relativo ao 2 ^a dia de biotransformação do substato CA por <i>R. stolonifer</i>	34
Figura 9 - Cromatograma relativo ao 10 ^a dia de biotransformação do substrato CA por <i>R. Stolonifer</i>	35
Figura 10 - Média das áreas dos picos cromatográficos do produto biotransformado por <i>R. stolonifer</i> versus o tempo reacional das triplicata.....	35
Figura 11 - Gráfico das médias das concentrações do produto de biotransformação de CA por <i>R. stolonifer</i> versus tempo reacional.....	36
Figura 12 - Gráfico do percentual de produto biotransformado do CA por <i>R. stolonifer</i> versus a média de cada triplicada nos seus respectivos dias.....	37
Figura 13 - Cromatograma do extrato bruto do meio racional do <i>R. stolonifer</i> (A), cromatograma do branco – fungo + tampão (C) e o cromatograma do padrão 6-gingerol (B).....	38
Figura 14 - Cromatograma relativo ao 2 ^a dia de biotransformação do substato 6-gingerol por <i>R. stolonifer</i>	39
Figura 15 - Cromatograma relativo ao 14 ^a dia de biotransformação do substrato 6-gingerol por <i>R. Stolonifer</i>	39
Figura 16 - Média das áreas dos picos cromatográficos do produto biotransformado do 6-gingerol por <i>R. stolonifer</i> versus o tempo reacional das triplicata.....	40
Figura 17 - Gráfico das médias das concentrações do produto de biotransformação do 6-gingerol por <i>R. stolonifer</i> versus tempo reacional.....	40
Figura 18 - Gráfico do percentual de produto biotransformado do 6-gingerol por <i>R. stolonifer</i> versus tempo reacional.....	41
Figura 19 - Espectro de absorção na região do infravermelho (IV) do produto de biotransformação do substrato CA por <i>R. stolonifer</i>	43
Figura 20 - Espectro de absorção na região do infravermelho (IV) do substrato CA.....	43
Figura 21 - Espectro de RMN ¹ H (500 MHz, CDCl ₃) do produto de biotransformação do substrato CA por <i>R.stolonifer</i>	44
Figura 22 - Espectro de RMN ¹ H (500 MHz, CDCl ₃) do substrato CA.....	45
Figura 23 - Espectro RMN ¹³ C (125 MHz, CDCl ₃) do produto de biotransformação por <i>R. stolonifer</i>	46
Figura 24 - Espectro RMN ¹³ C (125 MHz, CDCl ₃) do substrato CA.....	46
Figura 25 - Espectro RMN ¹³ C –DEPT 135° (125 MHz, CDCl ₃) do produto de biotransformação do CA por <i>R. stolonifer</i>	48
Figura 26 - Espectro RMN ¹³ C –DEPT 135° (125 MHz, CDCl ₃) do substrato CA.....	48
Figura 27 - Espectro de RMN ¹ H (500 MHz, CDCl ₃) do 6- gingerdiol relativo ao produto de biotransformação do Gingerol por <i>R. stolonifer</i>	50
Figura 28 - Espectro de RMN ¹ H (500 MHz, CDCl ₃) do substrato 6- gingerol.....	50

Figura 29 - Espectro de RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) do 6-gingerdiol (produto de biotransformação do 6-gingerol por <i>R. stolonifer</i>).	51
Figura 30 - Espectro de RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) do substrato 6-gingerol.....	52
Figura 31 - Substratos utilizados nas biotransformações por <i>R. stolonifer</i> : (A) 3,12-dioxo-15,16-epoxi-4-hidroxicleroda-13(16),14-dieno e (B) 6-gingerol.	57
Figura 32 - Gráfico da curva de calibração das áreas dos picos cromatográficos do produto biotransformado de 3,12-dioxo-15,16-epoxi-4-hidroxicleroda-13(16),14-dieno por <i>R. stolonifer</i> versus a concentração em ppm desse produto. Ao lado são mostrados dados referentes à regressão linear.	62
Figura 33 - Gráfico da curva de calibração das áreas dos picos cromatográficos do produto biotransformado do 6-gingerol por <i>R. stolonifer</i> versus a concentração em ppm desse produto. Ao lado direito encontra-se os dados referentes a regressão linear	67

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Principais classes de enzimas e tipos de reações que catalisam.....	20
Tabela 2 - Classificação taxonômica do fungo <i>R. stolonifer</i>	24
Tabela 3 - Biotransformações de diterpenos caurânicos por <i>Rhizopus stolonifer</i> relatados na literatura.	28
Tabela 4 - Dados de deslocamentos químicos de RMN C-13 (125 MHz, CDCl ₃) do CA e o seu produto de biotransformação por <i>R. stolonifer</i>	46
Tabela 5 - Dados de deslocamentos químicos de RMN C-13 do 6-gingerol e o seu produto de biotransformação por <i>R. stolonifer</i>	52
Tabela 6 - Dados dos valores de R _f para análise em CCD (4cm x 4cm) dos extratos t ₁ , t ₂ , t ₃ , P e B referentes a biotransformação de 3,12-dioxo-15,16-epoxi-4-hidroxicleroda-13(16),14-dieno (CA) por <i>R. stolonifer</i>	61
Tabela 7 - Áreas dos picos cromatográficos do produto de biotransformação em função do tempo de reação (Observação: Em cada triplicata os extratos foram numerados pela ordem crescente das áreas dos picos).	63
Tabela 8 - Concentrações e médias das triplicata de biotransformação de 3,12-dioxo-15,16-epoxi-4-hidroxicleroda-13(16),14-dieno por <i>R. stolonifer</i> a cada dois dias.	64
Tabela 9 - Dados dos valores de R _f para análise por CCD (4cm x 4cm) dos extratos t ₁ , t ₂ , t ₃ , P e B referentes a biotransformação do 6-gingerol por <i>R. stolonifer</i>	66
Tabela 10 - Áreas dos picos cromatográficos do produto de biotransformação do 6-gingerol em função do tempo de reação.....	68
Tabela 11 - Concentrações e médias das triplicatas de biotransformação do 6-gingerol por <i>R. stolonifer</i> a cada dois dias.....	69
Tabela 12 - Percentual de inibição do crescimento celular em 3 linhagens de células tumorais humanas pelos produtos de biotransformação do 6-gingerol e CA-BIO*. Os dados estão apresentados em média ± SD.	70

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1 - Resolução cinética do ácido tartárico pelo fungo <i>Penicillium glaucum</i>	18
Esquema 2 - Resolução cinética do binaftol (2,2'-dihidroxi-1,1'-binaftila) por <i>R. arrhizus</i>	19
Esquema 3 - Biotransformação do substrato 3 e 6 pelo fungo <i>Rhizopus stolonifer</i>	28
Esquema 4 - Produtos 10, 11 e 12 derivados da biotransformação do oxandrolona (9) por <i>R. stolonifer</i>	30
Esquema 5 - Reação de biotransformação de 3,12-dioxo-15,16-epoxi-4-hidroxicleroda-13(16), 14-dieno (CA) por <i>R. stolonifer</i> tendo como produto o composto 12-oxo-15,16- epoxi-3,4-di-hidroxicleroda-13(16),14-dieno.	49
Esquema 6 - Reação de biotransformação do 6-gingerol por <i>R. stolonifer</i> tendo como produto o composto 6-gigerdiol.	53

LISTA DE SIGLAS

BD – Meio de Cultura Batata-Dextrose

BDA – Meio de Cultura Batata-Dextrose-Ágar

CA – 3,12-dioxo-15,16-epoxi-4-hidroxicleroda-13(16),14-dieno

CA-BIO – 12-oxo-15,16-epoxi-3,4-di-hidroxicleroda-13(16),14-dieno

CCD – Cromatografia em Camada Delgada

CLAE – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

DEPT 135° – *Distortionless Enhancement by Polarization Transfer 135°*

IV - Infravermelho

J- Constante de Acoplamento

RMN ¹³C – Ressonância Magnética Nuclear de Carbono-13

RMN ¹H – Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio 1

T_R – Tempo de Retenção

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	18
2. CONSIDERAÇÕES TAXONÔMICAS	23
2.1 Considerações biológicas do fungo <i>Rhizopus stolonifer</i>	23
2.2 Reprodução sexuada do fungo <i>R. stolonifer</i>	24
3. LEVANTAMENTO BIBLIOGRÁFICO	27
3.1 Potencial biocatalítico do fungo <i>Rhizopus stolonifer</i>	27
3.1.1 Degradação de micotoxinas por <i>Rhizopus stolonifer</i>	27
3.1.2 Biotransformação de diterpenos caurânicos por <i>Rhizopus stolonifer</i>	28
3.1.3 Biotransformação do esteroide oxandrolona por <i>Rhizopus stolonifer</i>	29
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	32
4.1 Biotransformação de produtos naturais por <i>R. stolonifer</i>	32
4.2 Biotransformação do diterpeno 3,12-dioxo-15,16-epoxi-4-hidroxicleroda-13(16),14-dieno (CA) por <i>R. stolonifer</i>	32
4.2.1 Estudo cinético de obtenção do produto de biotransformação a partir do substrato 3,12-dioxo-15,16-epoxi-4-hidroxicleroda-13(16),14-dieno (CA) por <i>R. stolonifer</i>	34
4.3 Biotransformação do 6-gingerol por <i>R. stolonifer</i>	37
4.3.1 Estudo cinético de obtenção do produto de biotransformação a partir do substrato 6-gingerol por <i>R. stolonifer</i>	38
4.4 Teste antitumoral	42
4.5.1 Determinação estrutural do produto de biotransformação do 3,12-dioxo-15,16-epoxi-4-hidroxicleroda-13(16),14-dieno (CA) por <i>R. stolonifer</i>	42
4.5.2 Determinação estrutural do produto de biotransformação do 6-gingerol por <i>R. stolonifer</i>	49
5.1 Material e métodos	55
5.1.1 Cromatografia em camada delgada (CCD)	55
5.1.2 Cromatografia líquido de alta eficiência (CLAE)	55
5.1.3 Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG/EM)	55
5.2 Métodos espectroscópicos	56
5.2.1 Ressonância magnética nuclear (RMN)	56
5.2.2 Espectroscopia de absorção na Região do infravermelho (IV)	56
5.3 Solventes	56
5.4 Substratos	56
5.4.1 Isolamento do substrato 6-gingerol	57
5.5 Esterilização e preparação de meios de cultura	58
5.5.1 Preparo dos meios de cultura	58
5.5.2 Meio de caldo de batata (BD)	58
5.5.3 Meio batata-dextrose sintético (BD)	58
5.5.4 Meio batata-dextrose-agar (BDA)	58
5.5.5 Preparação de tampão fosfato pH 7,0	59

	16
5.6 Microorganismo	59
5.7 Biotransformações dos substratos por <i>R. stolonifer</i>	59
5.7.1 Biotransformação do diterpeno 3,12-dioxo-15,16-epoxi-4-hidroxicleroda-13(16),14-dieno (CA) por <i>R. stolonifer</i>	59
5.7.1.2 <i>Fracionamento cromatográfico por CLAE dos extratos da biotransformação de CA do meio líquido por <i>R. stolonifer</i></i>	60
5.7.1.3 <i>Análise qualitativa por cromatografia em camada delgada (CCD) da biotransformação de 3,12-dioxo-15,16-epoxi-4-hidroxicleroda-13(16),14-dieno (CA) por <i>R. stolonifer</i></i>	60
5.7.1.4 <i>Estudo cinético da biotransformação de CA por <i>R. stolonifer</i></i>	61
5.7.1.5 <i>Construção da curva de calibração</i>	61
5.7.1.6 <i>Calculo das concentrações do produto de biotransformação de CA por <i>R. stolonifer</i></i>	62
5.7.2 Biotransformação do 6-gíngerol por <i>R. stolonifer</i>	64
5.7.2.1 <i>Fracionamento cromatográfico por CLAE dos extratos da biotransformação por <i>R. stolonifer</i> do 6-gíngerol</i>	65
5.7.2.2 <i>Análise qualitativa por cromatografia em camada delgada (CCD) da biotransformação do 6-gíngerol por <i>R. stolonifer</i></i>	65
5.7.2.3 <i>Estudo cinético da biotransformação do 6-gíngerol por <i>R. stolonifer</i></i>	66
5.7.2.4 <i>Construção da curva de calibração</i>	66
5.7.2.5 <i>Calculo das concentrações do produto de biotransformação do 6-gíngerol por <i>R. stolonifer</i></i>	67
5.8 Teste antitumoral	69
6. CONCLUSÕES	72
7. REFERÊNCIAS	73

Capítulo 1

Introdução

1. INTRODUÇÃO

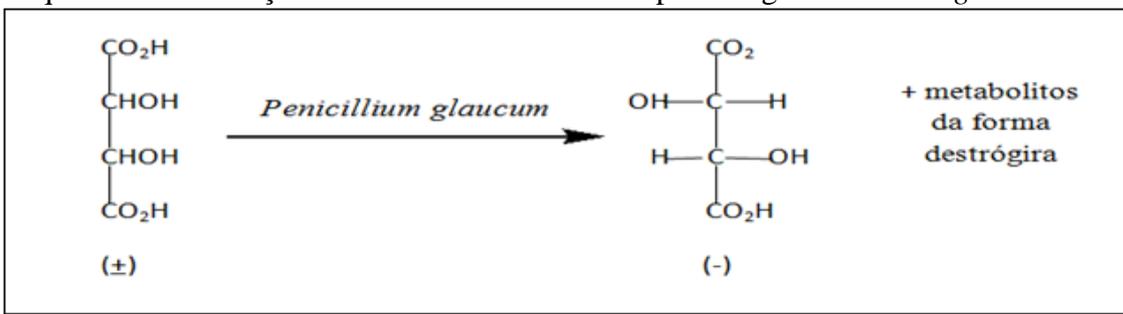
A busca por novas tecnologias limpas que ultrapassem as fronteiras dos processos tecnológicos tradicionais são de extrema importância para as demandas atuais, pois cada vez mais a sociedade é dependente de insumos industriais, produzidos em grande escala.

Nesse contexto de renovação tecnológica, destaca-se a biotecnologia, que é conhecida pelo homem há bastante tempo. A biotecnologia envolve a manipulação de microrganismos por meio de seus complexos enzimáticos visando-se chegar a um produto específico, como metabólitos de interesse comercial, enzimas, biopolímeros, dentre outros (WANG *et al.*, 2010).

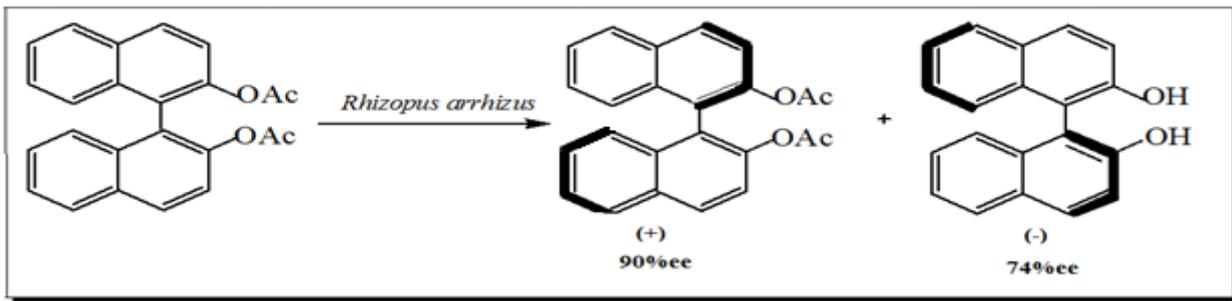
O uso de microrganismos para promoção de determinada reação causa redução de tempo e custos, pois dispensa o uso de grandes quantidades de reagentes químicos e controle das condições do meio reativo (GARCÍA-GRANADOS *et al.*, 2004).

Outra grande vantagem da utilização de microrganismos é na resolução cinética de racematos por meio de sistemas biológicos vivos ou por componentes enzimáticos isolados (HANSON; ROSE, 1975). O primeiro a observar a resolução bioquímica foi Pasteur ao realizar a fermentação de um racemato do ácido tartárico pelo fungo filamentoso *Penicillium glaucum*, que resultou no isolamento do ácido (-)-tartárico opticamente puro, Esquema 1 (STEFANI, 2012).

Esquema 1 - Resolução cinética do ácido tartárico pelo fungo *Penicillium glaucum*.



Outro fungo utilizado em resoluções cinéticas é o *Rhizopus arrhizus*, que promove a resolução do binaftol (2,2'-dihidroxi-1,1'-binaftila), o qual é utilizado como um agente auxiliar quiral, Esquema 2, (STEFANI, 2012).

Esquema 2 - Resolução cinética do binaftol (2,2'-dihidroxi-1,1'-binaftila) por *Rhizopus arrhizus*.

A biotransformação é outra importante atividade da biotecnologia, pois é um processo natural que ocorrem a milhares de anos nos seres vivos sejam eles eucariontes, procariontes ou pluricelulares complexos. A biotransformação pode ser definida como qualquer transformação biológica de um composto exógeno utilizando-se microrganismos para biocatalisar uma ou mais etapas específicas de uma síntese. Diferentemente da síntese convencional, as reações que ocorrem por meio de microrganismos são consideradas ecologicamente corretas. Biotransformações de substâncias orgânicas ou biocatálise, em síntese orgânica, pode ser entendida como o uso de catálise enzimática para realizar modificações em substâncias orgânicas (FABER, 2011).

Dentre os microrganismos com potencial para realizar biotransformações, os fungos merecem destaque devido sua capacidade de degradar vários compostos orgânicos resistentes, tais como fenóis clorados, inseticidas, dioxinas, corantes, dentre outros (CARLILE; WATKINSON; GOODAY, 2001).

Os fungos são seres vivos eucariótas, apresentando um único núcleo, como as leveduras ou sendo multinucleados, como se observa entre os fungos filamentosos ou bolores. Todos são heterotróficos e nutrem-se de matéria orgânica morta (fungos saprofiticos) ou viva (fungos parasitários). Em alguns fungos não existe diferenciação sexual no aspecto morfológico (como no caso do *Rhizopus stolonifer*). Contudo, apresentam diferenças sexuais fisiológicas dizendo-se existirem linhagens positivas e negativas. Estes fungos são designados heterotáticos (heteros = dissemelhante). E a reprodução sexual só pode ocorrer entre talos com linhagens positivas e negativas (CARLILE; WATKINSON; GOODAY, 2001).

Os fungos podem ser encontrados no solo, no ar, na água, em plantas, animais, no homem e em detritos em geral. O vento age como um importante veículo de dispersão de seus propágulos e fragmentos de hifa (CARLILE; WATKINSON; GOODAY, 2001). Durante o seu desenvolvimento, os fungos podem formar dois tipos de colônias, as leveduriformes e as filamentosas. A primeira tem aspecto leitoso ou pastoso constituído por um sistema unicelular. Já a

segunda podem ser algodonosas, aveludadas ou pulverulentas e são constituídas por elementos multicelulares, denominados de hifas (TALARO, 2009).

Nos fungos, assim como em outros organismos vivos, as enzimas catalisam reações com alta quimiosseletividade, regioseletividade ou enantioseletividade e em condições brandas de temperatura e pressão (DAVIES, 1989).

Uma enzima não é um catalisador estático, imutável e característico de apenas um substrato, mais sim, uma molécula dinâmica que reage a interações com seu substrato otimizando seu encaixe (KOSHLAND, 1958).

Segundo a união internacional de Bioquímica as enzimas podem ser agrupadas, conforme o tipo de reação que catalisam, conforme está apresentado na Tabela 1 (DAVIES, 1989).

Tabela 1 - Principais classes de enzimas e tipos de reações que catalisam.

Nº	Classificação da enzima	Tipo de reação catalisada
1	Oxidoredutases	Reações de oxidação-redução ou transferência de elétrons.
2	Transferases	Transferem grupos funcionais entre moléculas.
3	Hidrolases	Reações de Hidrolises.
4	Liases	Catalisam a quebra de ligações covalentes e a remoção de moléculas de água, amônia e gás carbônico.
5	Isomerases	Transferência de grupos dentro da mesma molécula para formar isômeros.
6	Ligases	Catalisam reações de formação de novas moléculas a partir da ligação entre duas pré-existentes, sempre às custas de energia.

Fonte: Davies (1989).

Biotransformações podem ser realizadas com os mais variados substratos, sejam eles complexos ou simples. Como exemplo relatado na literatura é citada a biotransformação do 6-gingerol pelo fungo *Aspergillus niger*, sendo hidroxilado no carbono primário, formando assim o produto principal (TAKAHASHI *et al.*, 1993). A biotransformação da forma degradada (desidratada) do 6-gingerol, o 6-shogaol, por *Aspergillus niger* produziu os compostos, 1-(4'-hidroxi-3'-metoxi-fenil)-decan-10-ol-3-ona e 1-(4'-hidroxi-3'-metoxi-fenil)-decan-3,10-diol, que são relatados como substâncias com efeito antioxidante e antitumoral (KOH, 1983).

O 6-gingerol é um derivado fenólico presente nos rizomas de *Zingiber officinale*, conhecido popularmente como gengibre (JOLAD *et al.*, 2004). Esse composto pertence a uma série homóloga constituída pelos 6, 8 e 10-gingerol (HE *et al.*, 1998). Esses, entre outros, são

responsáveis pelo sabor pungente do gengibre. O 6-gingerol pode reduzir náuseas (ERNST; PITTLER, 2000) e também pode aliviar a enxaqueca (MUSTAFA; SRIVASTAVA, 1990). Investigações tem sido realizadas para o seu efeito sobre os tumores cancerígenos no cólon (JEONG *et al.*, 2009), tecido da mama (LEE *et al.*, 2008), ovários (RHODE, 2007), pâncreas (PARK *et al.*, 2006), entre outros tecidos, com resultados positivos (SILVA *et al.*, 2012).

O diterpeno 3,12-dioxo-15,16-epoxi-4-hidroxicleroda-13(16),14-dieno é pouco citado na literatura, tendo sido relatado apenas trabalhos relacionados ao seu isolamento a partir de espécies como a *Croton argyrophylloides* (MONTE *et al.*, 1988). Não há relatos na literatura de trabalhos sobre processos de biotransformação deste metabólito.

Dessa forma, este trabalho tem como objetivo realizar um estudo de investigação do potencial biocatalítico do fungo *Rhizopus stolonifer* em biotransformar produtos naturais e submeter os produtos de biotransformação a ensaios de citotoxicidade *in vitro* de células tumorais humanas, contribuindo com dados inéditos para literatura.

Capítulo 2

Considerações

Taxonômicas

2. CONSIDERAÇÕES TAXONÔMICAS

2.1 Considerações biológicas do fungo *Rhizopus stolonifer*

O microrganismo utilizado nas biotransformações neste trabalho foi o fungo *Rhizopus stolonifer* classificado pela primeira vez por Shipper e Stalpers (1984), que dividiu o gênero em três espécies referentes às características do aparelho esporangial e temperatura de crescimento: *R. oryzae*, *R. stolonifer* (Figura 1) e *R. micosporus*. A espécie *R. stolonifer* obtém nutrientes, geralmente, de frutas macias e de pães, onde cresce e se reproduz. O seu micélio contém filamentos vegetativos e uma estrutura de frutificação. Tem um molde filiforme e é uma espécie heterotrófica dependente, conhecida popularmente como o bolor-preto-do-pão. Esse bolor forma colônias filamentosas da família Mucoraceae caracterizadas por possuírem o talo não segmentado ou ramificado, com uma distribuição tida como cosmopolita (LIOU *et al.*, 2007).

Figura 1 - Placa de Petri com *Rhizopus stolonifer*.



Fonte: http://www.uwo.edu/virtual_edge/lab13/fungi_results.htm

O fungo *R. stolonifer* deve ser manipulado com os procedimentos adequados, pois esse bolor pode causar infecções oportunistas em humanos (zigomicose), já que o contato com os seus esporos é facilmente ocasionado, pois são comuns no ar. O mesmo tem sido utilizado em fermentações alimentícias e na produção industrial de enzimas (LIOU *et al.*, 2007; SAKAI *et al.*, 2008). Ele também pode causar o apodrecimento da produção agrícola (Figura 2), através da produção de micotoxinas e outros compostos bioativos, sendo considerado fitopatogênico e devem ser controlado, pois contaminam alimentos destinados a humanos e animais (LIOU *et al.*, 2007). A Tabela 2 apresenta a classificação taxonômica do fungo *R. stolonifer*.

Figura 2 - Morango atacado por *R. stolonifer*.



Fonte: <http://zygomycetes.org/index.php?id=70>

Tabela 2 - Classificação taxonômica do fungo *R. stolonifer*.

<i>Rhizopus stolonifer</i>	
Taxonomia	
Reino	Fungi
Filo	<i>Incertae sedis</i>
Subfilo	mocoromycotina
Ordem	Mucorales
Família	Mucoraceae
Gênero	<i>Rhizopus</i>
Espécie	<i>R. stolonifer</i>

Fonte: www.catalogueoflife.org (2012).

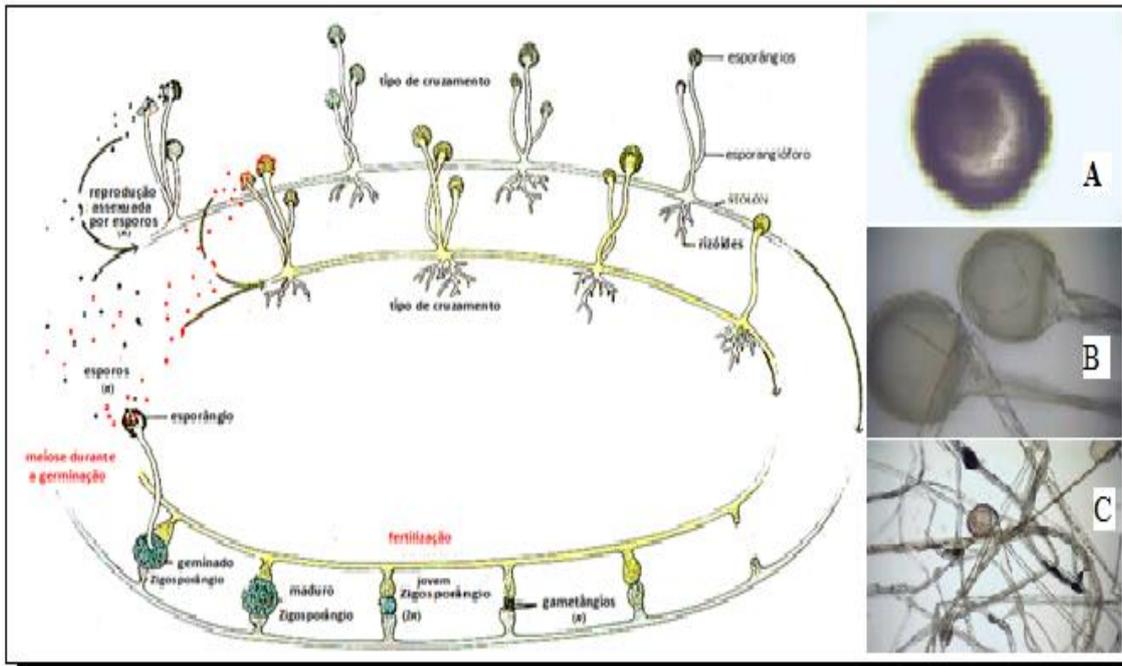
2.2 Reprodução sexuada do fungo *R. stolonifer*

A maior parte da massa de micélio de *R. stolonifer* é multinucleada e seu desenvolvimento é rápido devido a suas hifas em constante crescimento. Mais micélio é produzido por germinação quando os esporos são liberados, dando certa homogeneidade genética à colônia e com o amadurecimento o molde começa a ficar preto (GOETZ; PHILIP, 1988).

Nos esporângios, que são formados os esporos assexuados, são liberados os esporos maduros, os quais germinam formando hifas haploides de um novo micélio. A temperatura adequada para o crescimento é entre 15 e 30°C (HANSON; ROSE, 1975).

A reprodução de *R. stolonifer* se dá apenas entre tipos sexuais opostos, pois se trata de uma espécie heterotática. Quando o contato sexual é bem sucedido formam-se zigósporos no mesmo ponto de interação. Os zigósporos germinam dando o esporangióforo, cujo esporângio contém esporos haploides positivos e negativos (SCHIPPER, 1984). A Figura 3 esquematiza a reprodução do fungo *R. stolonifer*.

Figura 3 - Reprodução sexuada de *Rhizopus stolonifer*, destacando (A) - esporo, (B) - esporangióforos e (C) - esporângios.



Fonte: Hagedorn, Blanch e Harwood (2006)

Capítulo 3

Levantamento

Bibliográfico

3. LEVANTAMENTO BIBLIOGRÁFICO

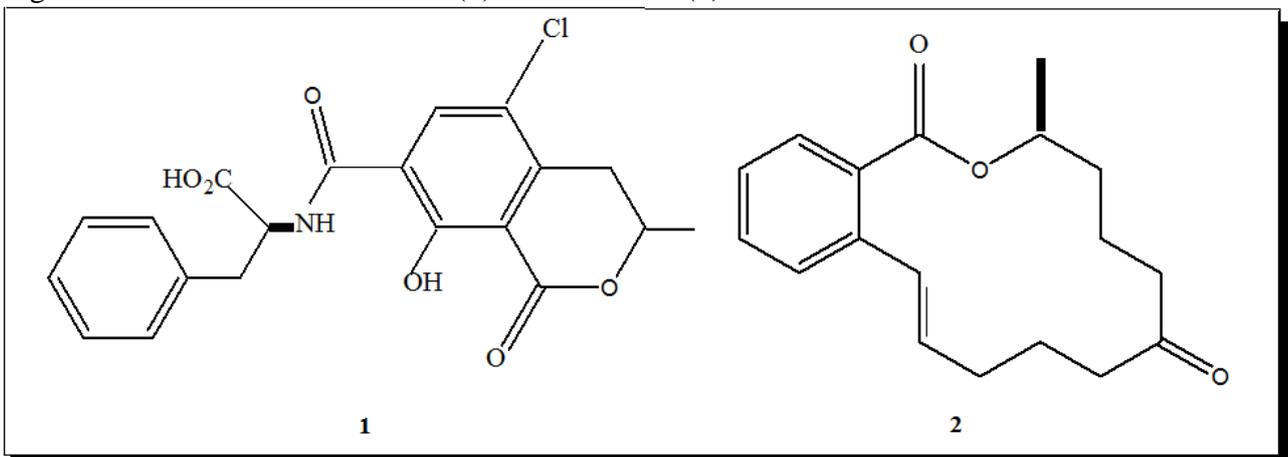
3.1 Potencial biocatalítico do fungo *Rhizopus stolonifer*

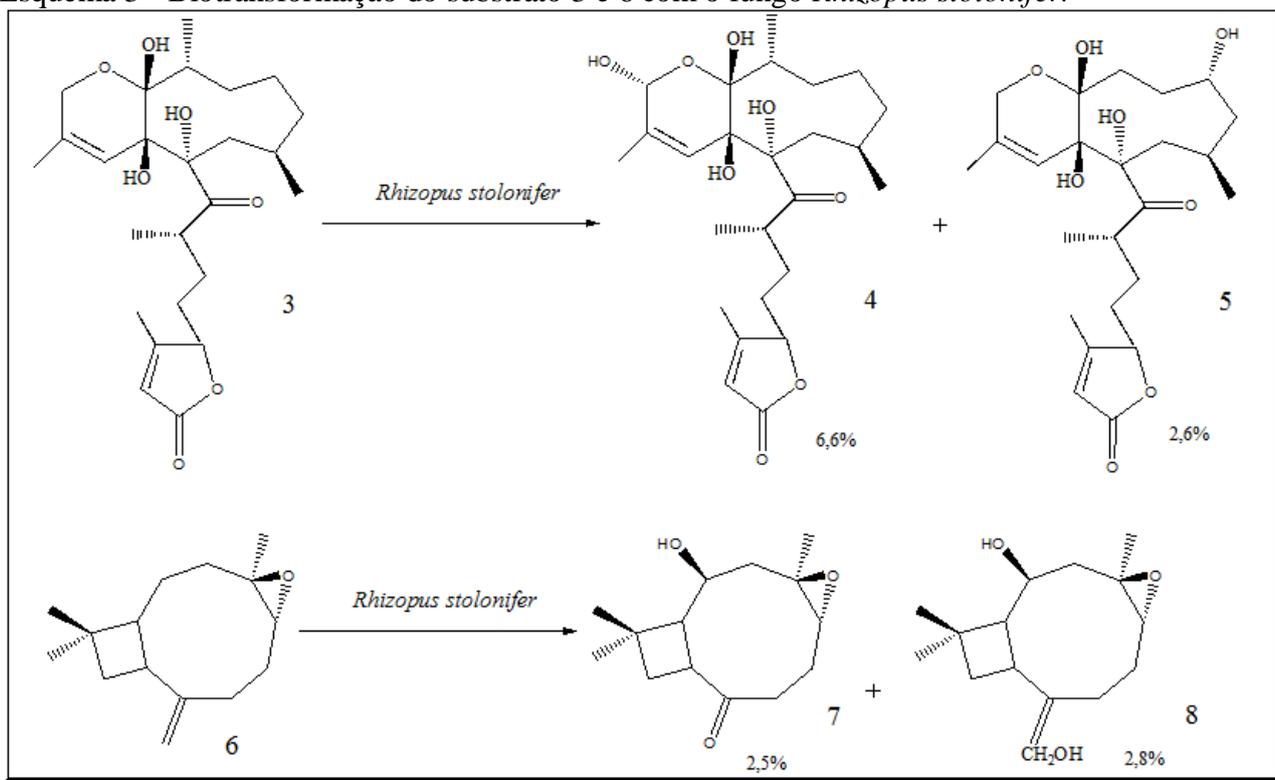
Há diversos estudos publicados relativos à biotransformação por *R. stolonifer* em todo o mundo. Sendo que pesquisas com esse fungo tem demonstrado uma boa atividade biocatalítica em condições brandas de temperatura do meio reacional, além de uma aceitação considerável a diferentes tipos de substratos. Dentre os trabalhos relatados na literatura, são encontrados estudos de degradação de micotoxinas, biotransformação de terpenos e esteroides, dentre outros (CHOUDHARY *et al.*, 2006a; CHOUDHARY *et al.*, 2006b; GHISALBERTI, 1997; CHOUDHARY, 2009).

3.1.1 Degradação de micotoxinas por *Rhizopus stolonifer*

O fungo *R. stolonifer*, além de muito citado na literatura por realizar modificações estruturais em terpenos, também é conhecido por degradar algumas micotoxinas como a ocratoxina A (1) e zearalenona (2), Figura 4, (VARGA *et al.*, 2005). O Esquema 3 mostra exemplos de biotransformações efetuadas por *R. stolonifer*, sendo possível observar, inclusive, uma hidroxilação alílica no substrato 3, além de oxidações em uma ligação dupla no substrato 6. (CHOUDHARY *et al.*, 2006a e CHOUDHARY *et al.*, 2006b).

Figura 4 - Estrutura da ocratoxina (1) e zearalenona (2).



Esquema 3 - Biotransformação do substrato 3 e 6 com o fungo *Rhizopus stolonifer*.

3.1.2 Biotransformação de diterpenos caurânicos por *Rhizopus stolonifer*.

Diterpenos caurânicos são metabolitos secundários de elevada importância como substratos em biotransformações, pois estes constituem uma classe de substâncias ricas em atividades biológicas, tais como, antimicrobiana, antitumoral, tripanosomicida, antiinflamatória, analgésica e anti-HIV (GHISALBERTI, 1997).

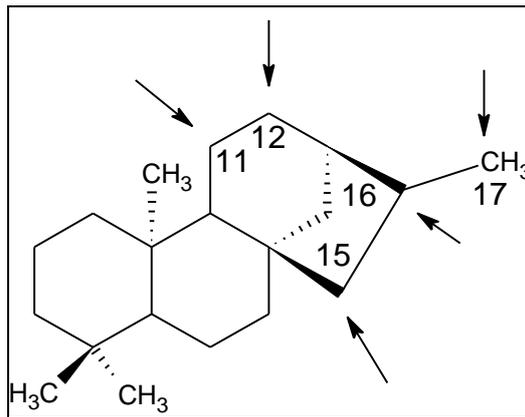
Na literatura há uma diversidade de diterpenos caurânicos biotransformados por *Rhizopus stolonifer*. A Tabela 3 resume as biotransformação destes diterpenos.

Tabela 3 - Biotransformações de diterpenos caurânicos por *Rhizopus stolonifer* relatados na literatura.

Substrato	Produto	Referência
<i>ent</i> -17-hidroxi-16 β -cauran-19-oato de metila	<i>ent</i> -9 α ,17-dihidroxi-16 β -cauran-19-oato de metila <i>ent</i> -7 α ,17-dihidroxi-16 β -cauran-19-oato de metila	VIERA <i>et al.</i> , 2000
ácido <i>ent</i> -caur-16-en-19-óico	ácido <i>ent</i> -7 α -hidroxi-caur-16-en-19-óico ácido <i>ent</i> -12 β -hidroxi-caur-9(11),16-dien-19-óico ácido <i>ent</i> -16 β ,17-dihidroxicauran-19-óico	SILVA <i>et al.</i> , 1999
-15-oxo-caur-16-en-19-oato de metila	<i>ent</i> -7 β ,11 α -dihidroxi-15-oxocaur-19-oato de metila	BOAVENTURA <i>et al.</i> , 1995

O fungo *Rhizopus stolonifer* foi capaz de realizar desidrogenação e hidroxilação nos substratos caurânicos iniciais. A modificação mais relatada foi a hidroxilação. A Figura 5 mostra as posições mais hidroxiladas, sendo esta a 11 (Boaventura, *et al.*, 1995), 12 e 17 (VIERA, *et al.*, 2000; SILVA, *et al.*, 1999) e 15 e 16 (Boaventura, *et al.*, 1995; VIERA, *et al.*, 2000; SILVA, *et al.*, 1999).

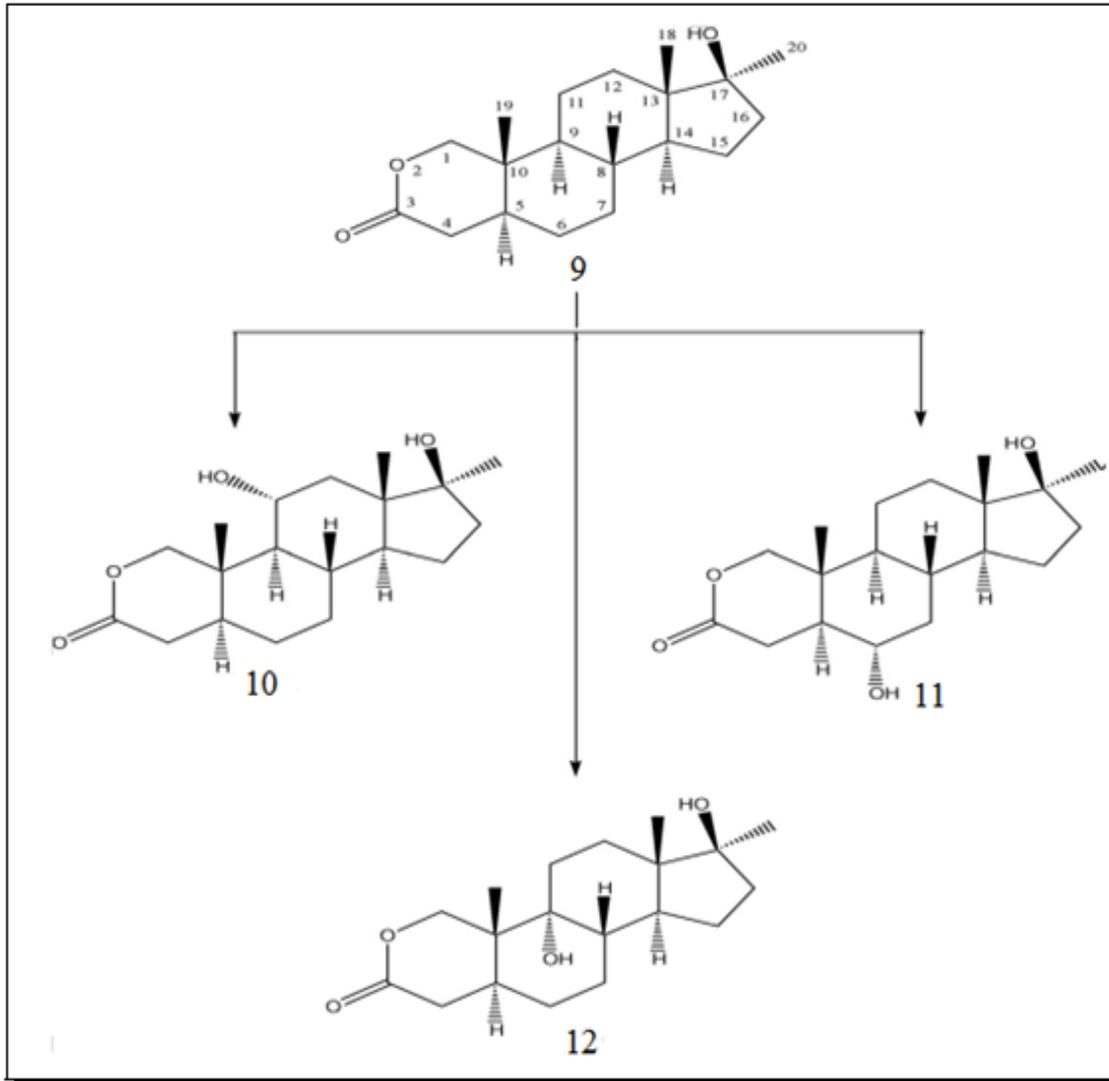
Figura 5 - Posições mais hidroxiladas no esqueleto caurânico por *R. stolonifer*.



3.1.3 Biotransformação do esteroide oxandrolona por *Rhizopus stolonifer*.

Um experimento em escala de triagem demonstrou que *R. stolonifer* (NRRL 1392) tinha a capacidade de transformar o esteroide oxandrolona no seu derivado polar. Já em larga escala *R. stolonifer* rendeu três novos metabolitos hidroxilados: 11 α -hidroxioxandrolona, produzido por hidroxilação do carbono 11 do substrato oxandrolona com rendimento de 25%; o 6 α -hidroxioxandrolona, com hidroxilação do carbono 6 e o 9 α -hidroxioxandrolona, com hidroxilação do carbono 9 (Esquema 4). Os compostos 9 a 12 foram testados para a inibição da glucuronidase, que é uma enzima exoglicosidase, que catalisa a clivagem do glucoronosil. Têm sido descrito que a atividade de glucuronidase aumenta em certas doenças, como câncer, doenças inflamatórias comuns, alguns distúrbios hepáticos e AIDS (CHOUDHARY, 2009).

Esquema 4 - Produtos 10, 11 e 12 derivados da biotransformação do oxandrolona (9) por *R. stolonifer*.



Capítulo 4

Resultados e Discussão

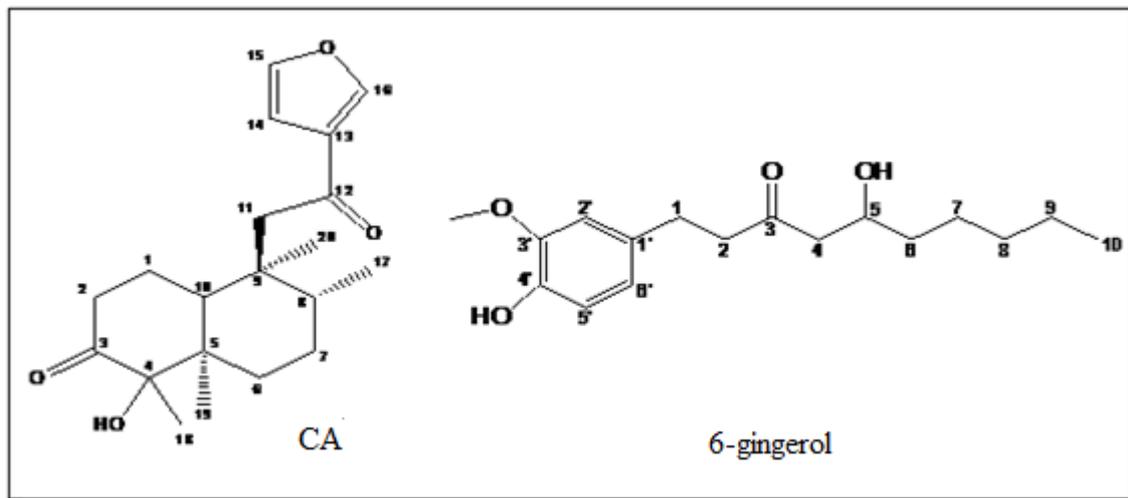
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Biotransformação de produtos naturais por *R. stolonifer*

Neste trabalho foram utilizadas células integras do fungo *Rhizopus stolonifer* nos processos biocatalíticos de biotransformação de dois produtos naturais. Este fungo foi selecionado com base nos dados da literatura, que apontavam bons rendimentos biocatalíticos (CHOUDHARY *et al.*, 2006a; CHOUDHARY *et al.*, 2006b; GHISALBERTI, 1997; VIERA *et al.*, 2000; SILVA *et al.*, 1999; BOAVENTURA *et al.*, 1995), além de sua disponibilidade na micoteca do LABS.

Os substratos utilizados nas biotransformações foram o diterpeno clerodênico 3,12-dioxo-15,16-epoxi-4-hidroxicleroda-13(16),14-dieno que foi denominado CA, e que foi escolhido por ser inédita sua aplicação em biotransformações por *R. stolonifer*; além do metabólito 6-gingerol, que foi escolhido por ter propriedades terapêuticas, tais como, inibição da catepsina K (SILVA, 2011; SILVA *et al.*, 2012) e também por ser inédito o seu estudo em biotransformações por *R. stolonifer*, Figura 6.

Figura 6 - Estrutura dos substratos utilizados nos processos de biotransformação por *R. stolonifer*.

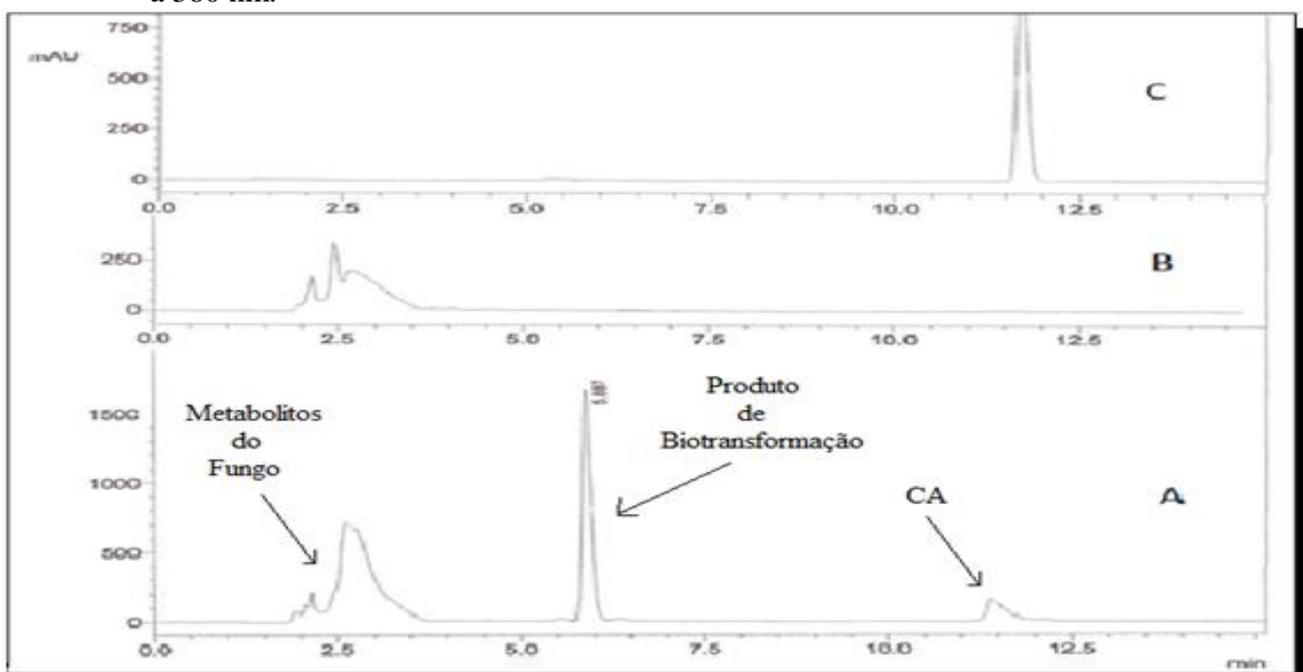


4.2 Biotransformação do diterpeno 3,12-dioxo-15,16-epoxi-4-hidroxicleroda-13(16),14-dieno (CA) por *R. stolonifer*

O substrato CA foi submetido a um processo de biotransformação pelo complexo enzimático presente no micélio do fungo *R. stolonifer*, conforme descrito no Item 5.7.1, p. 63. Inicialmente, realizou-se análise por cromatografia em camada delgada (CCD) do produto, que revelou tratar-se de uma substância ($R_f = 0,25$) de maior polaridade em relação ao substrato (Item 5.7.1.3, p. 64). Em seguida, foi realizada análise por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), através de comparação dos tempos de retenção mostrados nos cromatogramas do substrato CA, do branco (tampão + fungo) e do extrato bruto do meio reacional (Figura 7 - C, B e A, respectivamente).

A partir da análise do cromatograma do extrato do meio reacional, 14 dias de reação, (Figura 7-A) em comparação com os cromatogramas do branco e do substrato CA (Figura 7-B e C), foi possível observar que o pico em 2,8 minutos era de metabólitos do fungo, e que o pico em 5,88 minutos era relativo ao produto de biotransformação de CA por *R. stolonifer*. Os componentes do extrato do meio reacional foram isolados por CLAE em coluna semipreparativa (C18, 10 μ , 30 x 1,0 cm), conforme descrito no Item 5.7.1.2, p. 59.

Figura 7 - Cromatograma do extrato do meio reacional de biotransformação de CA pelo fungo do *R. stolonifer* (A) em 14 dias, cromatograma do branco – fungo + tampão (B) e o cromatograma do padrão do substrato CA (C). CH₃CN/Água (67:33); 4,72 mL/min; 200 a 380 nm.



O produto de biotransformação do substrato CA foi isolado com um rendimento de 52,0%. Esse dado nos levou a realizar um teste para verificar a eficiência da extração do meio aquoso com acetato de etila. Dessa forma, foram adicionados 40 mg do substrato CA no tampão e em seguida realizou-se a extração. Foram obtidos 26 mg de CA, ou seja, um rendimento de 65% do material recuperado. Esse fato sugere que poderia está ocorrendo perda do produto de biotransformação durante a extração.

4.2.1 Estudo cinético de obtenção do produto de biotransformação a partir do substrato 3,12-dioxo-15,16-epoxi-4-hidroxicleroda-13(16), 14-dieno (CA) por *R. stolonifer*

Com o objetivo de avaliar a eficiência do processo biocatalítico de biotransformação do diterpeno 3,12-dioxo-15,16-epoxi-4-hidroxicleroda-13(16),14-dieno pelo fungo *R. stolonifer*, realizou-se estudo cinético, da biotransformação, por CLAE (Item 5.7.1.4, p. 60). Os cromatogramas da cinética revelaram que já no segundo dia (primeira extração, Figura 8) havia formação do produto de biotransformação ($T_r = 5,88$ minutos). O pico com tempo de retenção 12,00 minutos referente ao substrato CA que ainda não havia reagido e o pico com tempo de retenção em 2,88 minutos referente aos metabólitos do fungo. Conforme mostrado nos cromatogramas (Figura 8 e 9), a área do pico relativo ao produto de biotransformação cresce com o tempo. Os resultados mostraram que a partir do décimo dia praticamente todo o substrato CA já havia sido consumido (Figura 9).

Figura 8 - Cromatograma relativo ao 2^a dia de biotransformação do substato CA por *R. stolonifer*, CH₃CN/Água (67:33); 4,72mL/min; 200 a 380 nm..

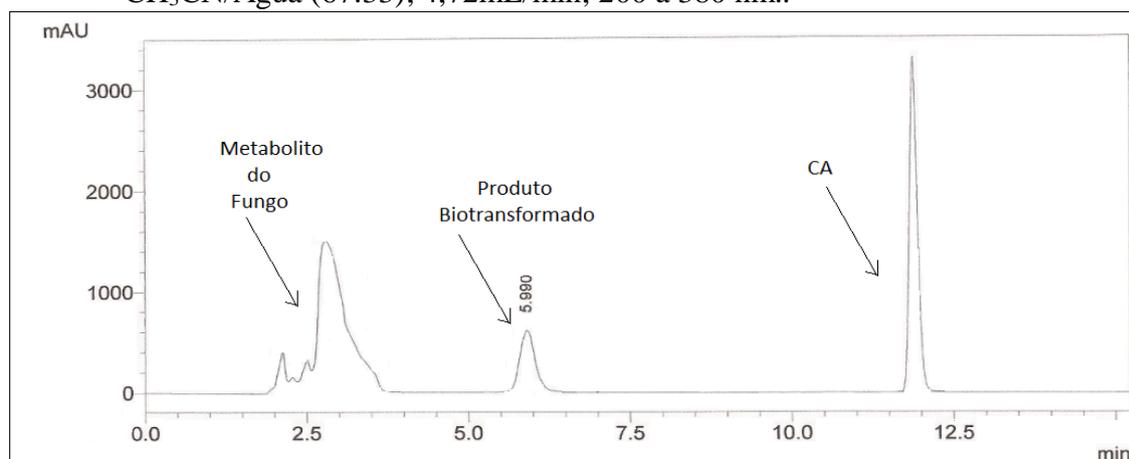
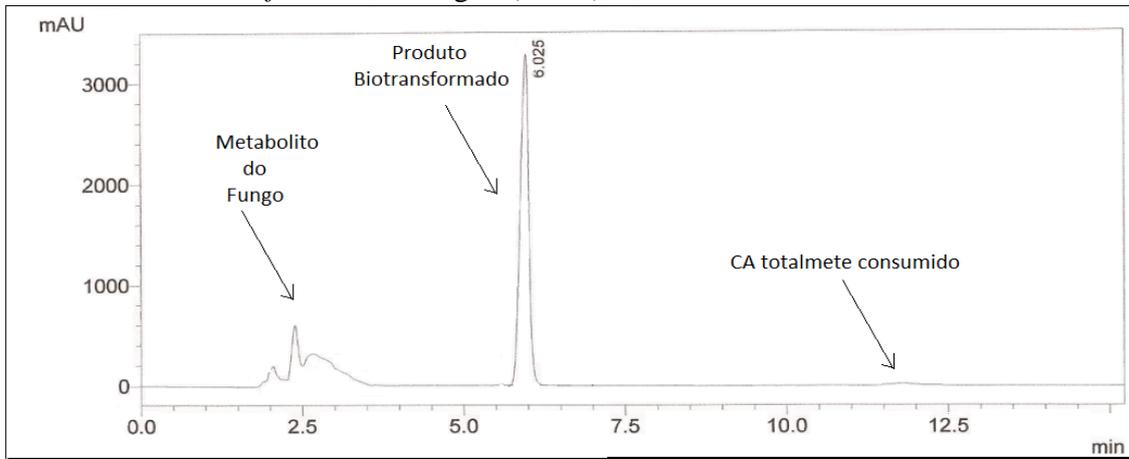
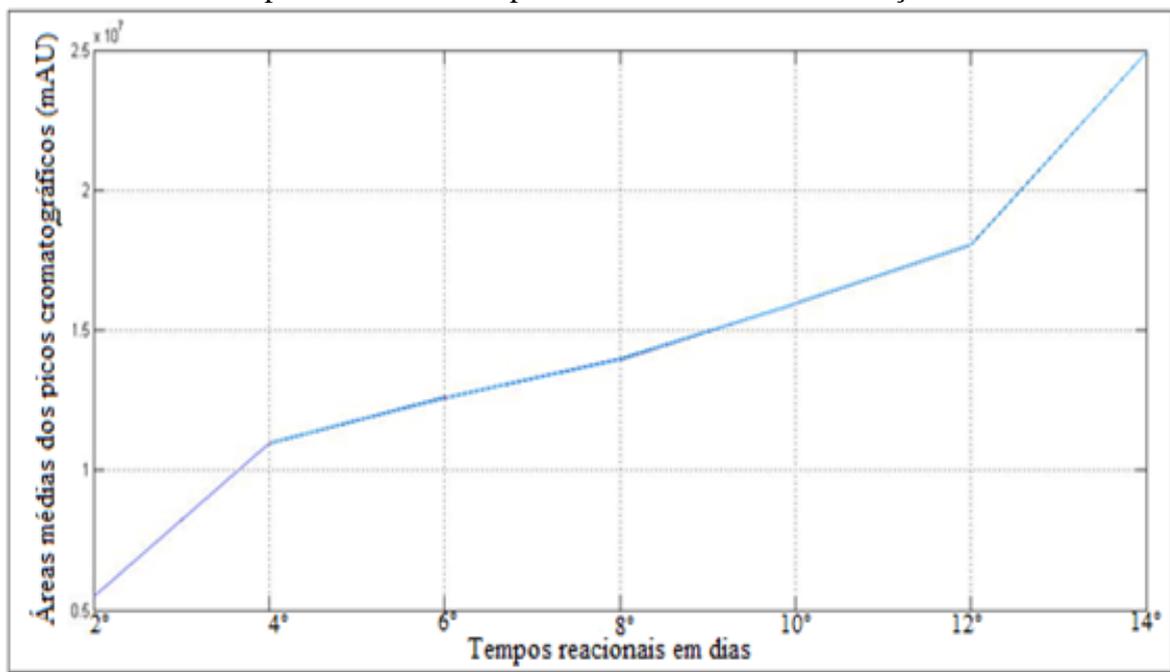


Figura 9 - Cromatograma relativo ao 10^a dia de biotransformação do substrato CA por *R. Stolonifer*, CH₃CN/Água (67:33); 4,72mL/min; 200 a 380 nm..



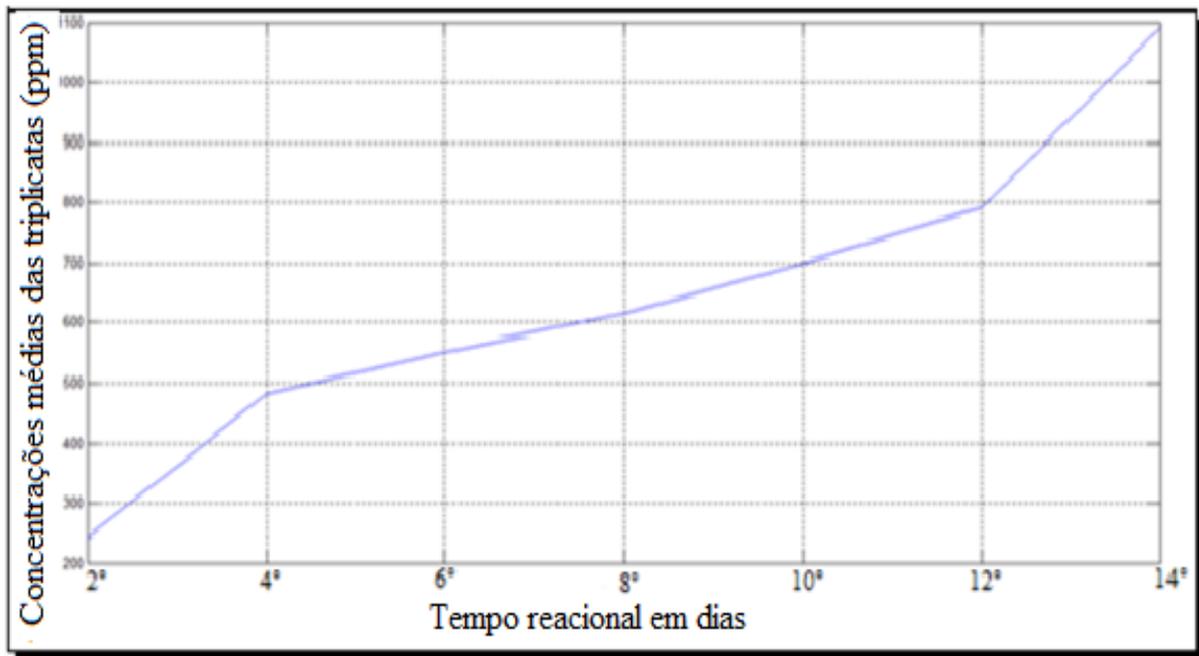
Portanto, com bases nos resultados demonstrados, a cada 2 dias, temos um aumento do produto de biotransformação, que segue até todo o substrato diterpenóide ter sido totalmente biotransformado. Este fato fica evidente quando as áreas médias dos picos cromatográficos do produto de biotransformação são plotadas em um gráfico de área versus o tempo reacional (Figura 10).

Figura 10 - Média das áreas dos picos cromatográficos do produto biotransformado por *R. stolonifer* versus o tempo reacional das triplicata a cada dois dias de reação.



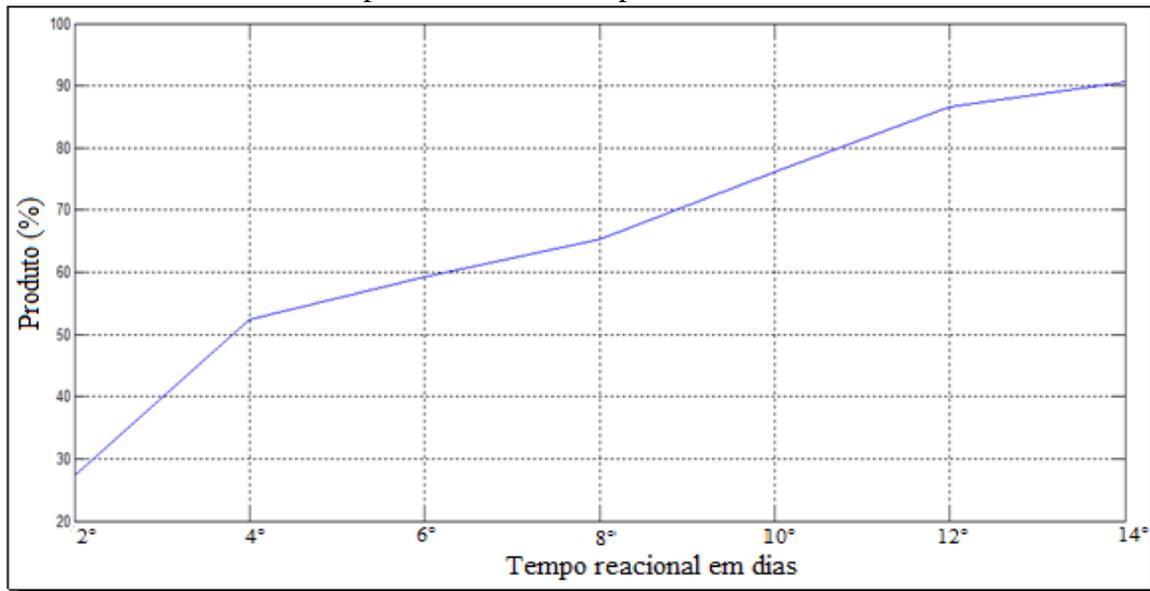
De acordo com a Tabela 8 (Item 45.7.1.6, p. 63) temos as médias das concentrações (em ppm) das triplicatas a cada dois dias do produto da reação de biotransformação de CA, obtida por meio da curva de calibração, padrão externo, do produto de biotransformação de CA (Item 5.7.1.5, p. 60). Foi verificado que houve um aumento gradativo das massas do produto de biotransformação por *R. stolonifer*. Isto fica mais bem representado no gráfico das concentrações médias versus tempo reacional das triplicatas (Figura 11).

Figura 11 - Gráfico das médias das concentrações do produto de biotransformação de CA por *R. stolonifer* versus tempo reacional a cada dois dias de reação.



Tendo as concentrações do produto de biotransformação em cada triplicata, podemos encontrar o percentual de substrato convertido a cada dia. Dessa forma, foi possível construir um gráfico do percentual de produto de biotransformação para a média de cada triplicata em função do tempo reacional (Figura 12).

Figura 12 - Gráfico do percentual de produto biotransformado do CA por *R. stolonifer* versus a média de cada triplicada nos seus respectivos dias.

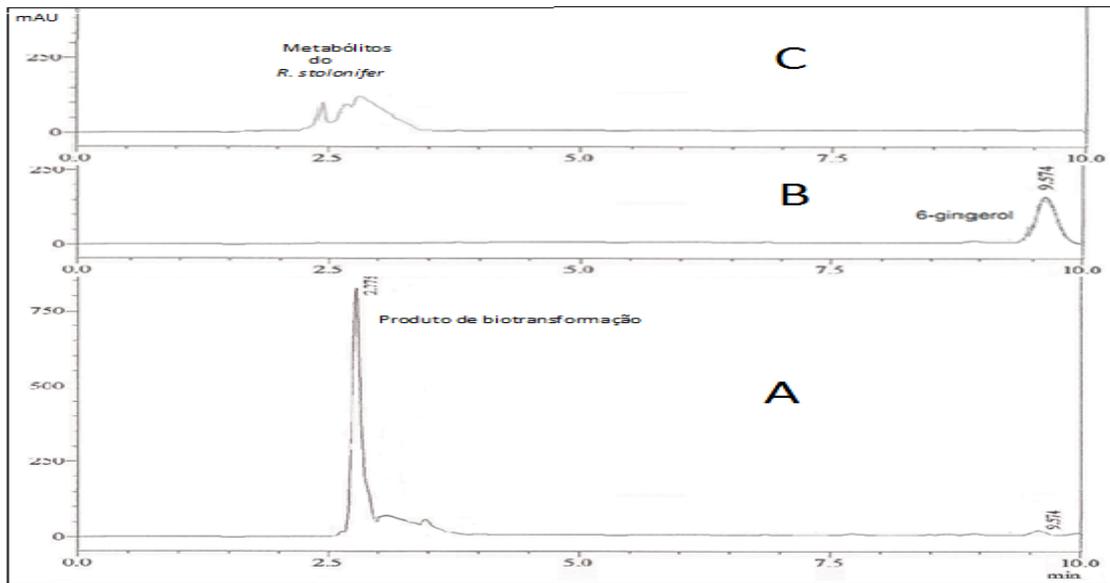


A partir da análise do gráfico anterior (Figura 12) é possível verificar que já no segundo dia de reação houve uma conversão de 27,26% da massa de CA no seu produto de biotransformação; no quarto dia houve 52,26% de conversão; no sexto dia 59,30%; no oitavo dia 65,32%; no décimo dia 76,13%; no décimo segundo dia 86,59% e finalmente, no décimo quarto dia 90,58% de conversão; indicando que praticamente toda a massa analisada do substrato CA havia sido biotransformada.

4.3 Biotransformação do 6-gingerol por *R. stolonifer*

O substrato 6-gingerol foi submetido a um processo de biotransformação pelo complexo enzimático do fungo *R. stolonifer*, conforme descrito no Item 5.7.2, p. 63. A análise por CCD (Item 5.7.2.2, p. 64) do extrato do meio reacional, revelou uma nova substância ($R_f = 0,18$) de polaridade maior que o da substância de partida ($R_f = 0,53$). A análise por CLAE e comparação dos tempos de retenção dos picos cromatográficos do substrato (Figura 13-B), do branco - tampão + fungo (Figura 13-C) e do extrato do meio reacional (Figura 15-A), revelou que o cromatograma do extrato do meio reacional apresenta um pico em 9,57 minutos, quase que imperceptível, e que apresenta o mesmo tempo de retenção do substrato 6-gingerol. Com base nos cromatogramas do extrato do meio reacional e do branco foi possível observar que o pico em 3,0 minutos diz respeito aos metabolitos do fungo. Dessa forma, o pico em 2,77 minutos era relativo ao produto de biotransformação (Figura 13-A, B e C).

Figura 13 - Cromatograma do extrato bruto do meio racional do *R. stolonifer* em 14 dias (A), cromatograma do branco – fungo + tampão (C) e o cromatograma do padrão 6-gingerol (B). Metanol/água (3:7), 1 mL/min e 200 a 400 nm.



A injeção em CLAE em coluna semipreparativa (C18, 10 μ , 30 x 1,0 cm) do extrato do meio reacional (Item 5.7.2.1, p. 64) resultou no isolamento de 120 mg (57%) do produto de biotransformação do 6-gingerol. Após o isolamento, o produto de biotransformação teve sua estrutura caracterizada com base nas análises dos dados espectrométricos de RMN (SILVA, 2011).

4.3.1 Estudo cinético de obtenção do produto de biotransformação a partir do substrato 6-gingerol por *R. stolonifer*

Com o intuito de se avaliar o potencial do processo biocatalítico de biotransformação do 6-gingerol pelo fungo *R. stolonifer*, realizou-se o estudo cinético utilizando CLAE como ferramenta (Item 5.7.2.3, p. 65). Os cromatogramas revelaram que já no segundo dia havia a formação do produto de biotransformação ($T_r = 2,77$ minutos). O pico em 9,57 minutos é referente ao substrato 6-gingerol que ainda não havia sido consumido, enquanto o pico coeluído ao pico do produto de biotransformação é referente aos metabólitos do fungo (Figura 14). A análise dos cromatogramas revelou que o pico relativo ao produto de biotransformação cresce com o tempo. No entanto, os resultados mostraram que no último dia de biotransformação (14^a dia) ainda remanesce substrato que ainda não havia sido consumido (Figura 15).

Figura 14 - Cromatograma relativo ao 2^a dia de biotransformação do substrato 6-gingerol por *R. stolonifer*, metanol/água (75:25), 1 mL/min, 200 a 400 nm.

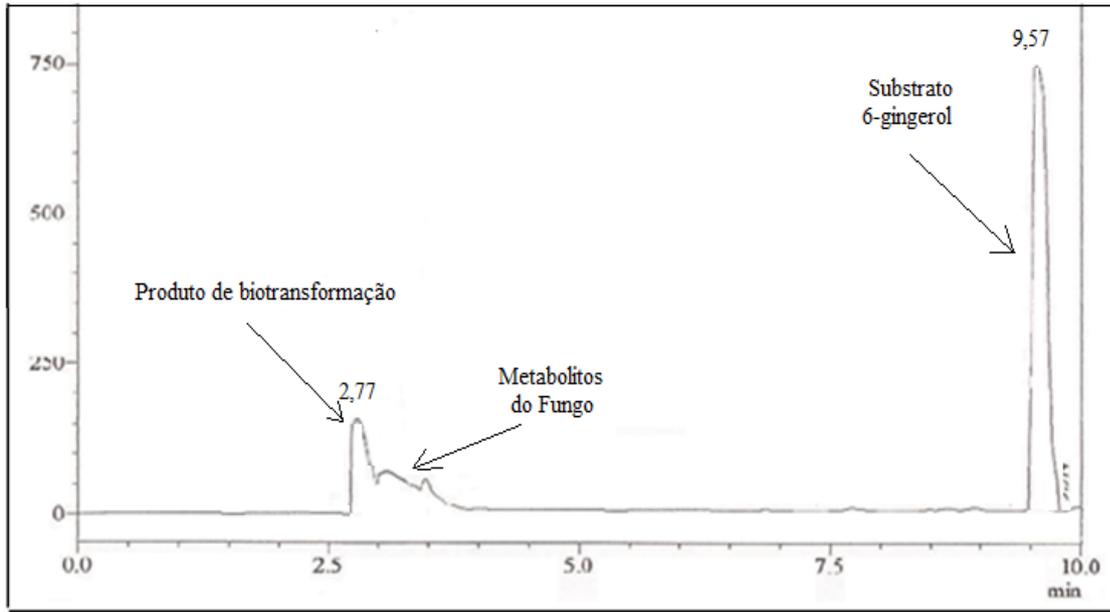
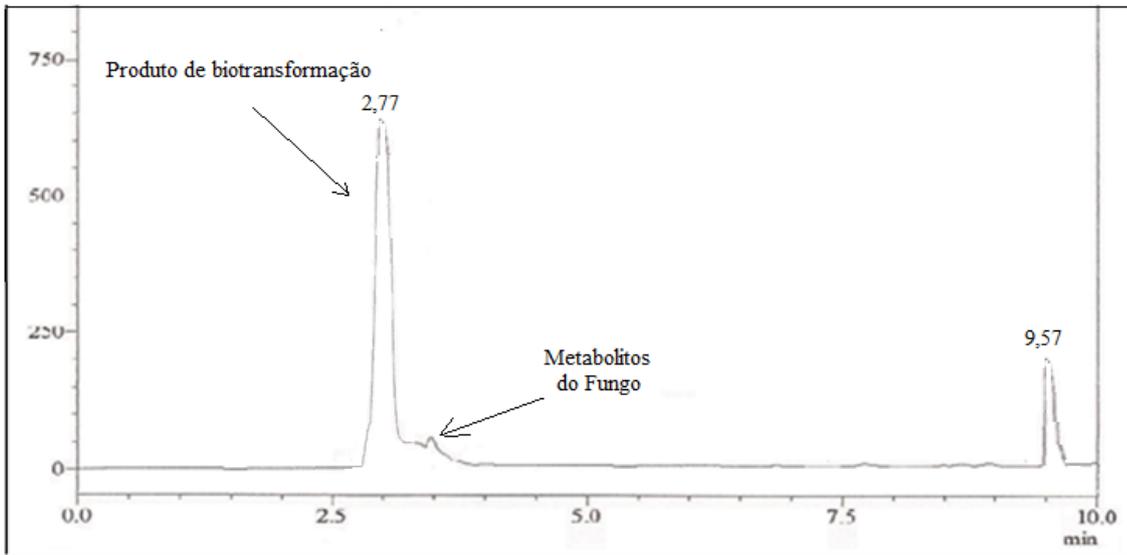
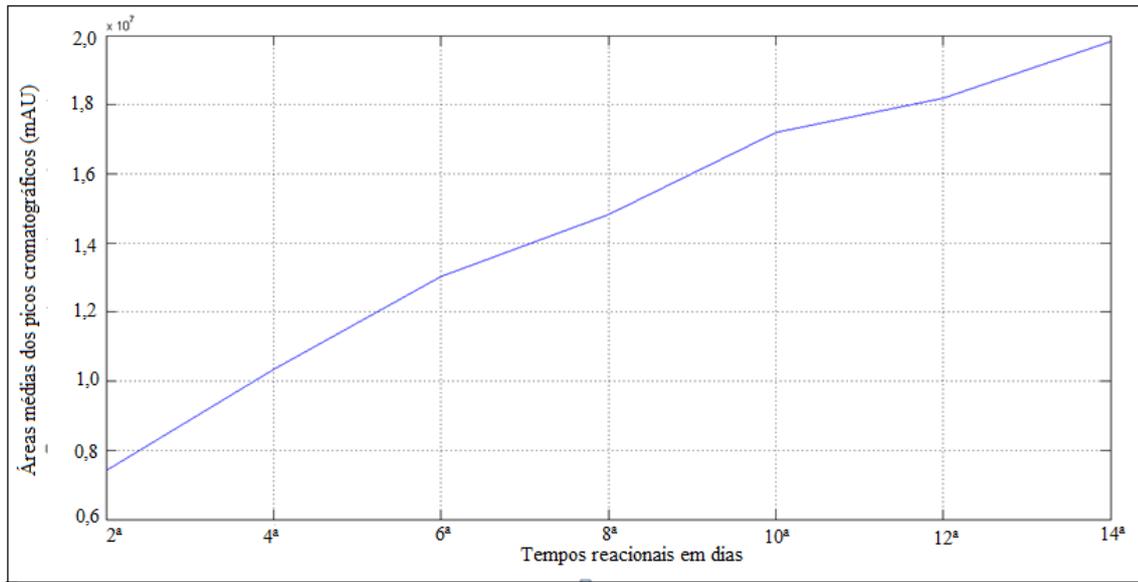


Figura 15 - Cromatograma relativo ao 14^a dia de biotransformação do substrato 6-gingerol por *R. Stolonifer*, metanol/água (75:25), 1 mL/min, 200 a 400 nm.



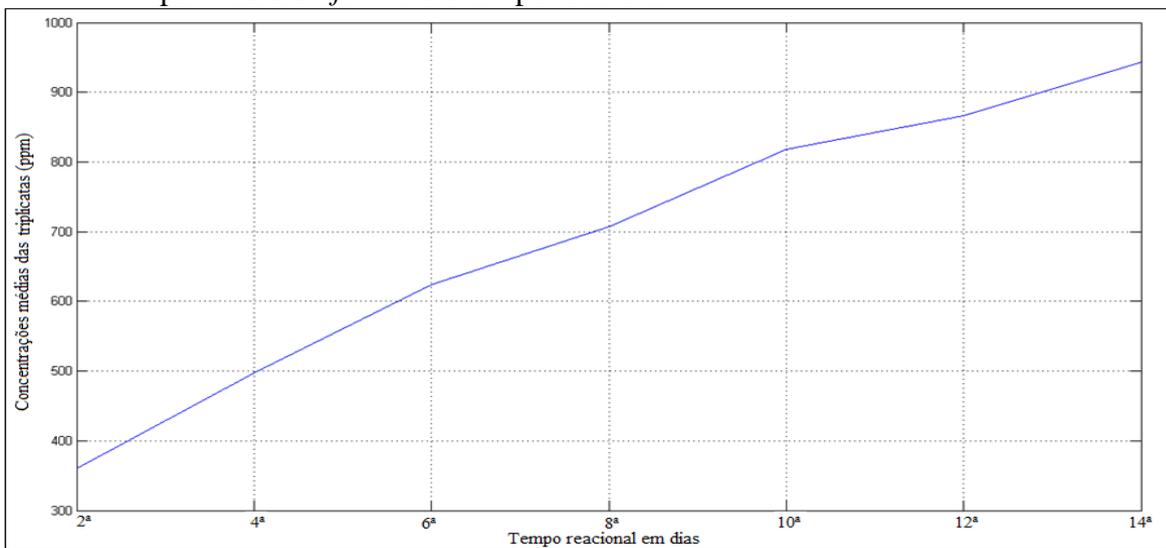
Portanto, com bases nos resultados demonstrados, a cada dois dias, temos um aumento do produto de biotransformação, que segue até uma pequena parte do substrato permanecer constante. Este fato fica evidente quando as áreas médias dos picos cromatográficos do produto de biotransformação, listados na Tabela 10 página 55, são plotadas em um gráfico de área versus tempo reacional (Figura 16).

Figura 16 - Média das áreas dos picos cromatográficos do produto biotransformado do 6-gingerol por *R. stolonifer* versus o tempo reacional das triplicatas, metanol/água (75:25), 1 mL/min, 200 a 400 nm.



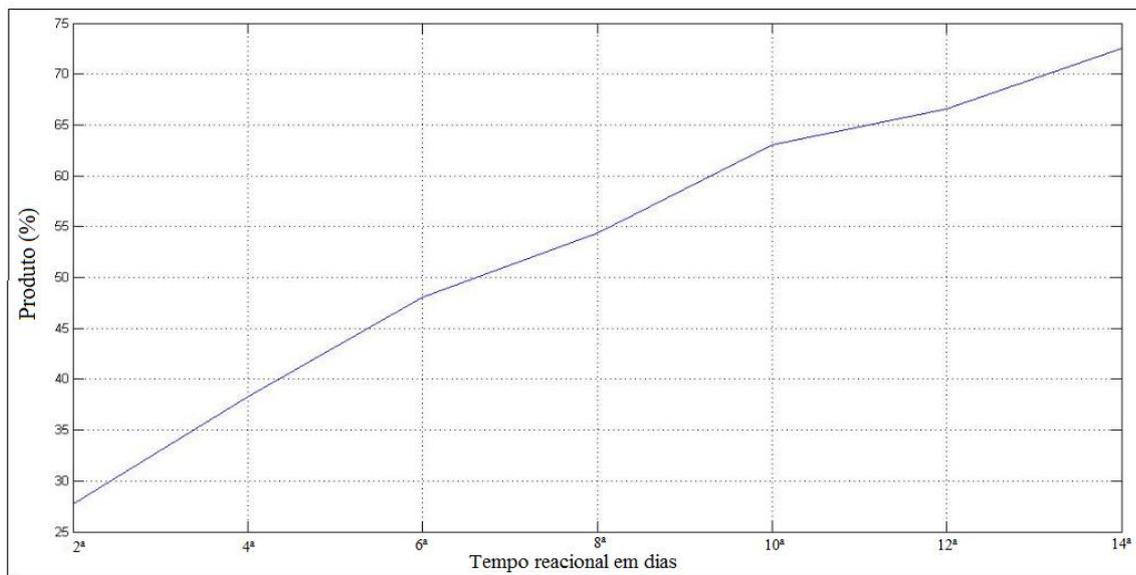
Com base na análise da Tabela 11 (Item 5.7.2.5, p. 67), que apresenta as médias das concentrações (em ppm) das triplicatas a cada dois dias do produto da reação de biotransformação do 6-gingerol, obtida por meio da equação da reta da curva de calibração, padrão externo, do produto de biotransformação do 6-gingerol (Item 5.7.2.4, p. 65). Foi verificado que houve um aumento gradativo das massas do produto de biotransformação por *R. stolonifer*. Este crescimento fica mais evidente quando plotado em um gráfico das concentrações médias versus tempo reacional das triplicatas (Figura17).

Figura 17 - Gráfico das médias das concentrações do produto de biotransformação do 6-gingerol por *R. stolonifer* versus tempo reacional.



Utilizando os dados desse aumento gradativo das massas do produto de biotransformação por *R. stolonifer*, chegamos a um gráfico do percentual de produto biotransformado do 6-gingerol por *R. stolonifer* versus tempo reacional. (Figura 18).

Figura 18 - Gráfico do percentual de produto biotransformado do 6-gingerol por *R. stolonifer* versus tempo reacional.



Por meio da análise do gráfico anterior (Figura 18) é possível verificar que já no segundo dia de reação houve uma conversão de 27,69% da massa do 6-gingerol no seu produto de biotransformação; no quarto dia houve 38,27% de conversão; no sexto dia 48,01%; no oitavo dia 54,41%; no décimo dia 63,00%; no décimo segundo dia 66,61% e finalmente, no décimo quarto dia 72,52% de conversão; indicando que 27,48% do substrato 6-gingerol não havia sido biotransformado, como observado no cromatograma do 14ª dia de reação (figura 15, p. 41).

Em trabalhos anteriores, Takahashi e colaboradores (1993) haviam utilizado o 6-gingerol em processos de biotransformação pelo fungo *Aspergillus niger*. Em seus produtos de biotransformação não foi observada a redução seletiva da carbonila (C-3), o que destaca o potencial do fungo *R. stolonifer* em processos biocatalíticos de redução quimiosseletiva de grupos carbonila não conjugada.

4.4 Teste antitumoral

A citotoxicidade *in vitro* dos produtos de biotransformação do 6-gingerol e do diterpeno CA, foi ensaiada frente a três linhagens de células tumorais humanas (item 5.8, p. 68), onde o produto de biotransformação 6-gingerdiol destacou-se apresentando boa atividade na inibição do crescimento celular com as médias percentuais de 91,83 ; 70,90 e 78,56 nas linhagens OVCAR-8 (ovário) e SF-295^a (glioblastoma) e HCT-116 (côlon), respectivamente.

4.5 Determinação estrutural dos produtos de biotransformação por *R. stolonifer*

4.5.1 Determinação estrutural do produto de biotransformação do 3,12-dioxo-15,16-epoxi-4-hidroxicleroda-13(16),14-dieno (CA) por *R. stolonifer*

Conforme descrito no Item 5.7.1.2, p. 59, a análise cromatográfica por CLAE do extrato proveniente da biotransformação do substrato CA pelo fungo *R. stolonifer* resultou no isolamento de um composto na forma de um sólido cristalino branco.

O espectro de absorção na região do infravermelho (Figura 19) do produto de biotransformação de CA por *R. stolonifer*, revelou uma banda larga na região de estiramento de ligação O-H referente à deformação axial em 3332 cm^{-1} , que sugere a existência de ligação de hidrogênio de grupos hidroxilas intramolecular. Já no espectro de absorção na região do infravermelho do substrato CA (figura 20), observou-se uma banda fina referente ao estiramento da ligação O-H em 3469 cm^{-1} , que é característico de hidroxila relativamente livre de ligação de hidrogênio intermolecular. Como essa banda apareceu um pouco mais deslocada para região de frequência mais alta existe a possibilidade de uma interação do grupo hidroxila com a carbonila vizinha através de uma ligação de hidrogênio intramolecular. Para CA observou-se uma absorção em 1701 cm^{-1} característica de carbonila cetônica não conjugada, além da absorção em 1663 cm^{-1} característica da presença de carbonila cetônica conjugada. Para o produto de biotransformação de CA foi observado somente à banda em 1660 cm^{-1} relativo à carbonila conjugada. Portanto, ficou evidente que a carbonila cetônica não conjugada de CA (absorção em 1701 cm^{-1}) não foi mais observada, restando apenas a carbonila conjugada em 1660 cm^{-1} . Com base nos dados espectrométricos do infravermelho foi possível sugerir que com o desaparecimento da carbonila não conjugada haveria o provável surgimento de uma nova hidroxila, indicando que o fungo *R. stolonifer* teria promovido uma reação de redução no substrato CA.

Figura 19 - Espectro de absorção na região do infravermelho (IV) do produto de biotransformação do substrato CA por *R. stolonifer*.

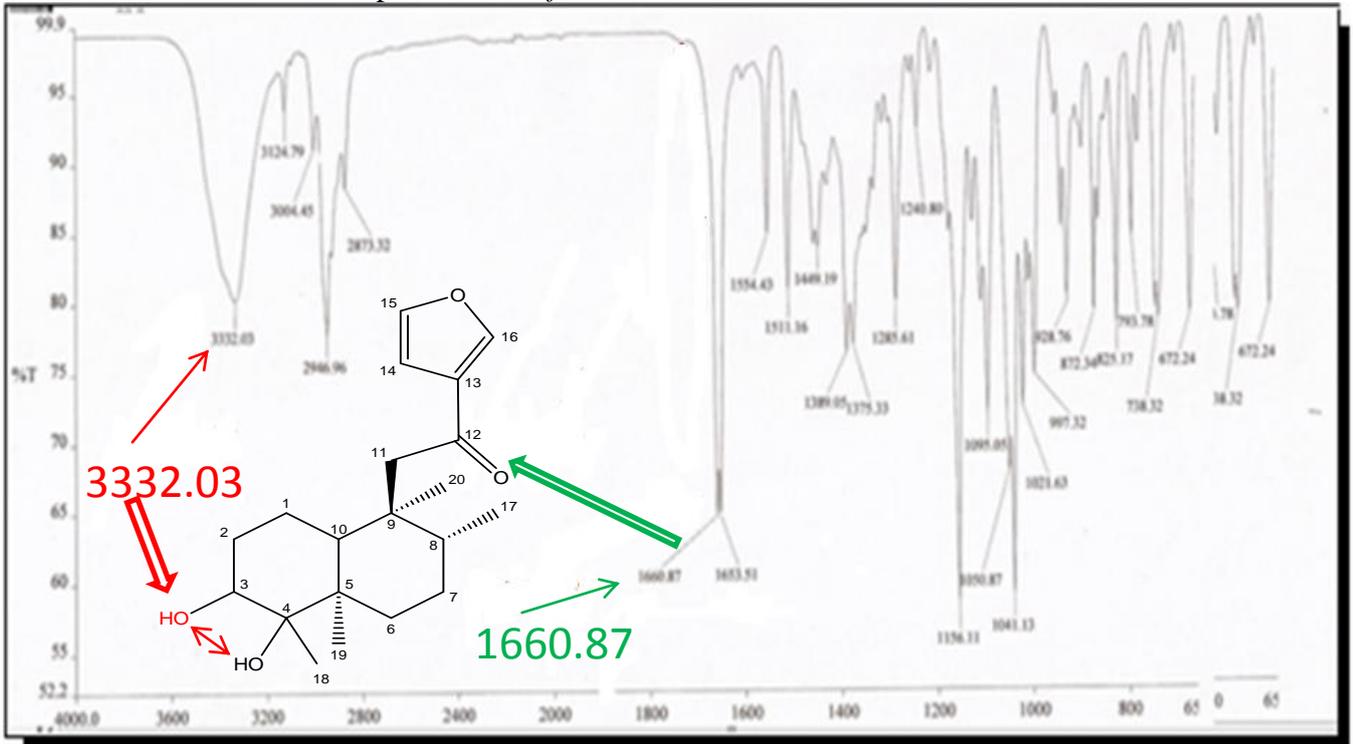
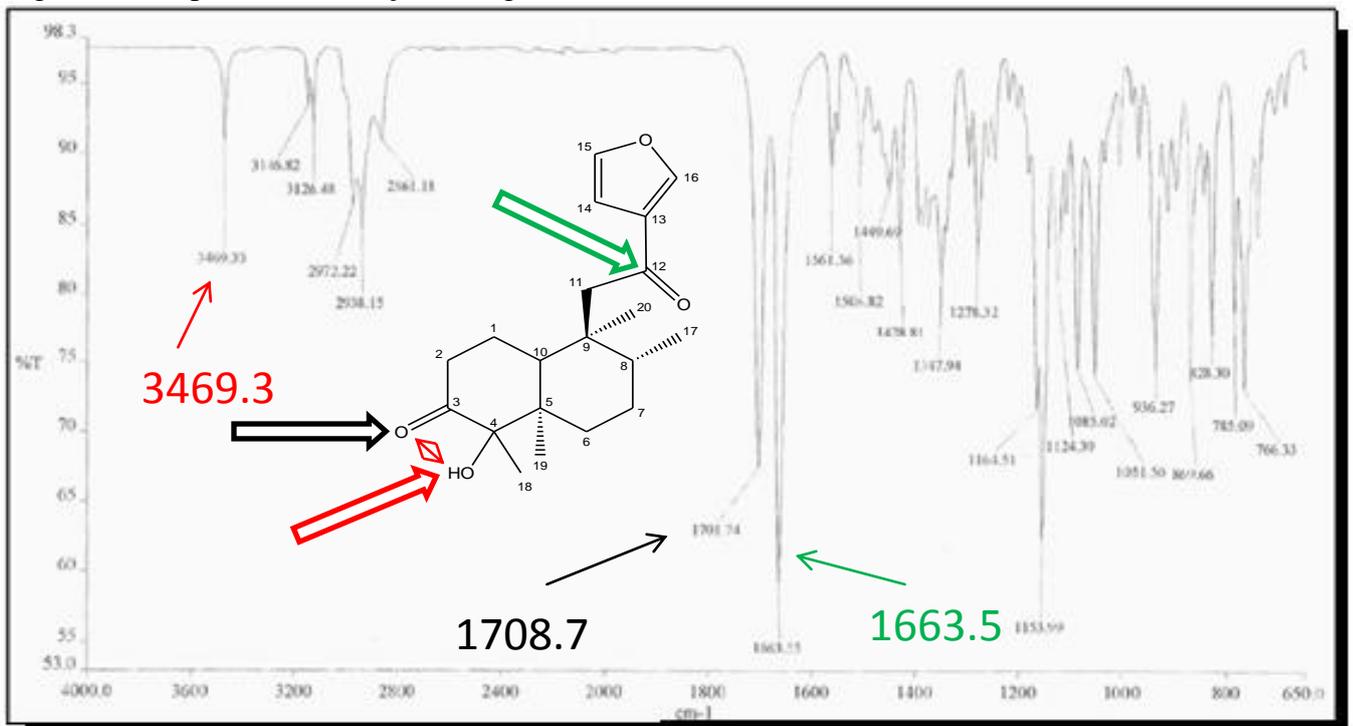


Figura 20 - Espectro de absorção na região do infravermelho (IV) do substrato CA.



O espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) do produto de biotransformação de CA (Figura 21) apresentou sinais intensos em δ 0,8 (3H-19, s), 1,052 (3H-20, s), 1,23 (3H-18, s) referentes a grupos metilas ligados a carbono sp^3 não hidrogenados e outro sinal em δ 0,88 (3H-20, d, $J = 8,75$ Hz) referente a um grupo metila ligado a carbono sp^3 mono-hidrogenado. Foram observados ainda, sinais em δ 8,02 (1H-16, s), 7,47 (1H-15, dd, $J = 1,20$ Hz) e 6,78 (1H-14, dd, $J = 1,15$ Hz), típicos de um anel furânico monossustituído. Uma série de sinais também foi observada em δ 1,30 - 3,00, relativos a hidrogênios de grupos CH e CH_2 . Um sinal típico de hidrogênio carbinólico foi observado em δ 4,5 (m). No espectro de RMN ^1H do substrato CA (Figura 22), não é observada a presença de nenhum sinal relativo a hidrogênio carbinólico.

Figura 21 - Espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) do produto de biotransformação do substrato CA por *R. stolonifer*.

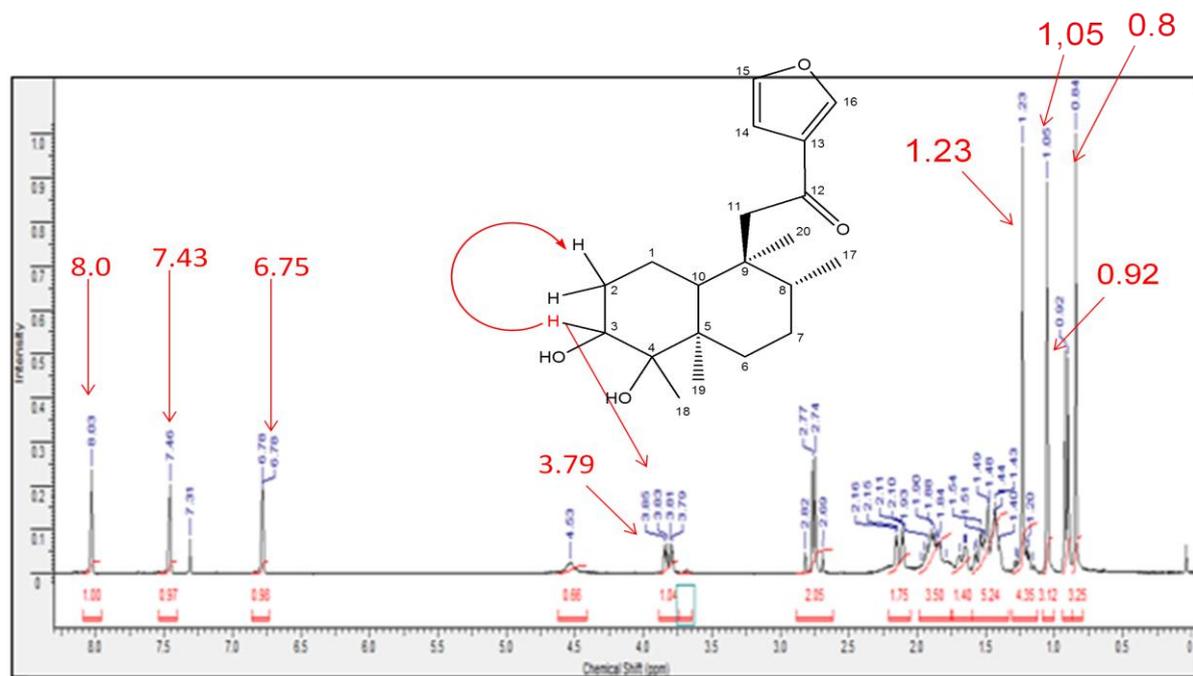
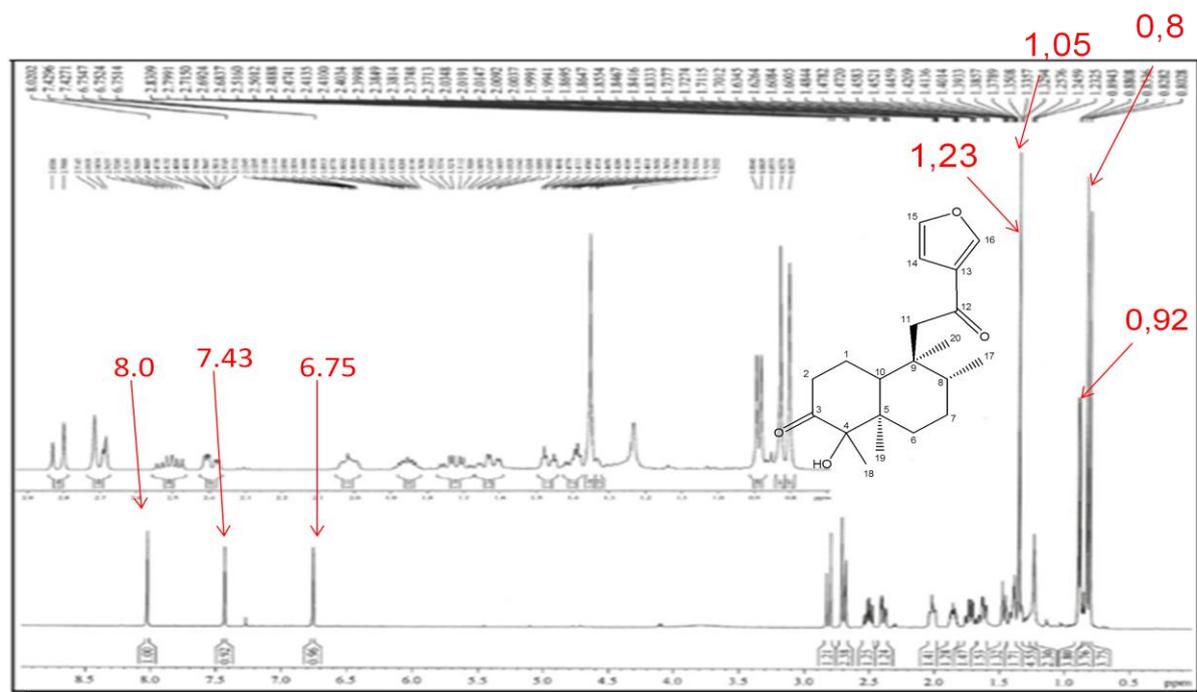


Figura 22 - Espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) do substrato CA.



O espectro de RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) do produto biotransformado de CA (figura 23) revelou 20 linhas espectrais, sendo que foram observados sinais em δ 79,31 e 72,47 referentes a carbonos sp^3 oxigenados. Comparação com o espectro RMN ^{13}C do substrato CA (figura 24) revelou que neste só há um sinal em δ 81,6 (C-4), referente a um carbono sp^3 oxigenado. Já com relação a sinais característico de grupos carboxílicos observou-se que no produto de biotransformação havia apenas um sinal em δ 195,16, característico de cetona conjugada. Entretanto, no espectro RMN ^{13}C do substrato CA havia sinais em δ 215,32 (C-3) e 195,22 (C-12) referentes a dois grupos carbonílas de cetonas não conjugada e conjugada, respectivamente. Todos os demais sinais, inclusive, os sinais em δ 146,72 (C-16), 144,23 (C-15), 129,59 (C-13) e 108,73 (C-14) relativos aos carbonos sp^2 do anel furânico se mostraram semelhantes, conforme mostra a Tabela 4.

Figura 23 - Espectro RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) do produto de biotransformação do substrato CA por *R. stolonifer*.

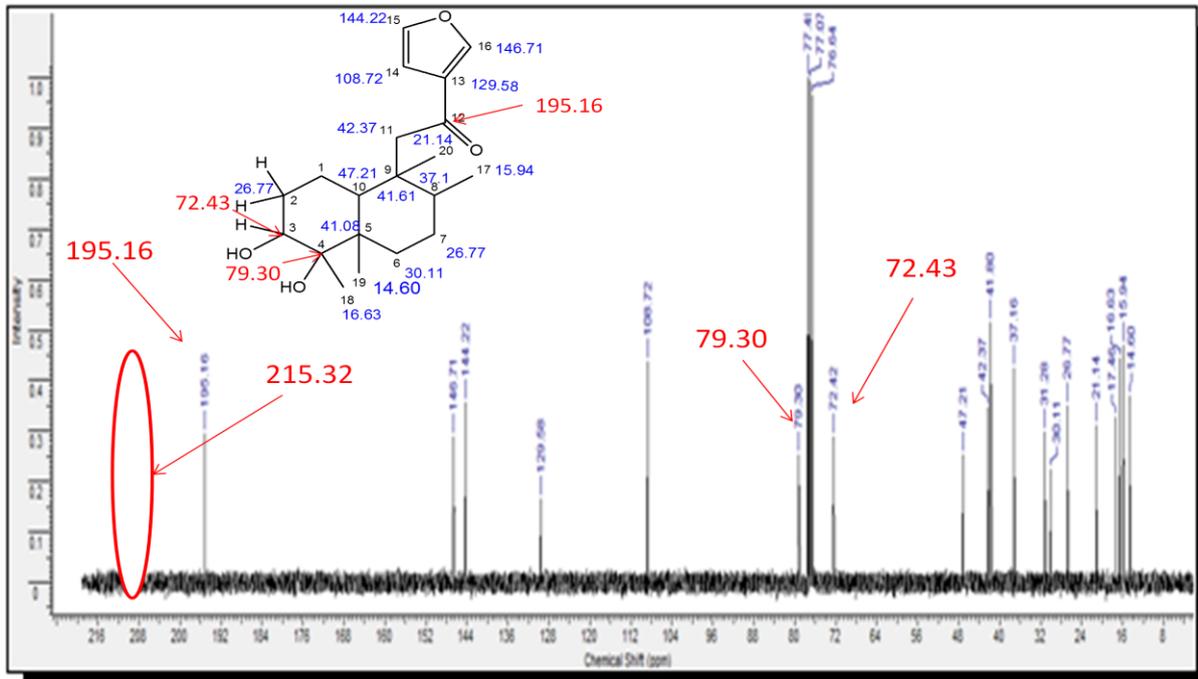


Figura 24 - Espectro RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) do substrato CA.

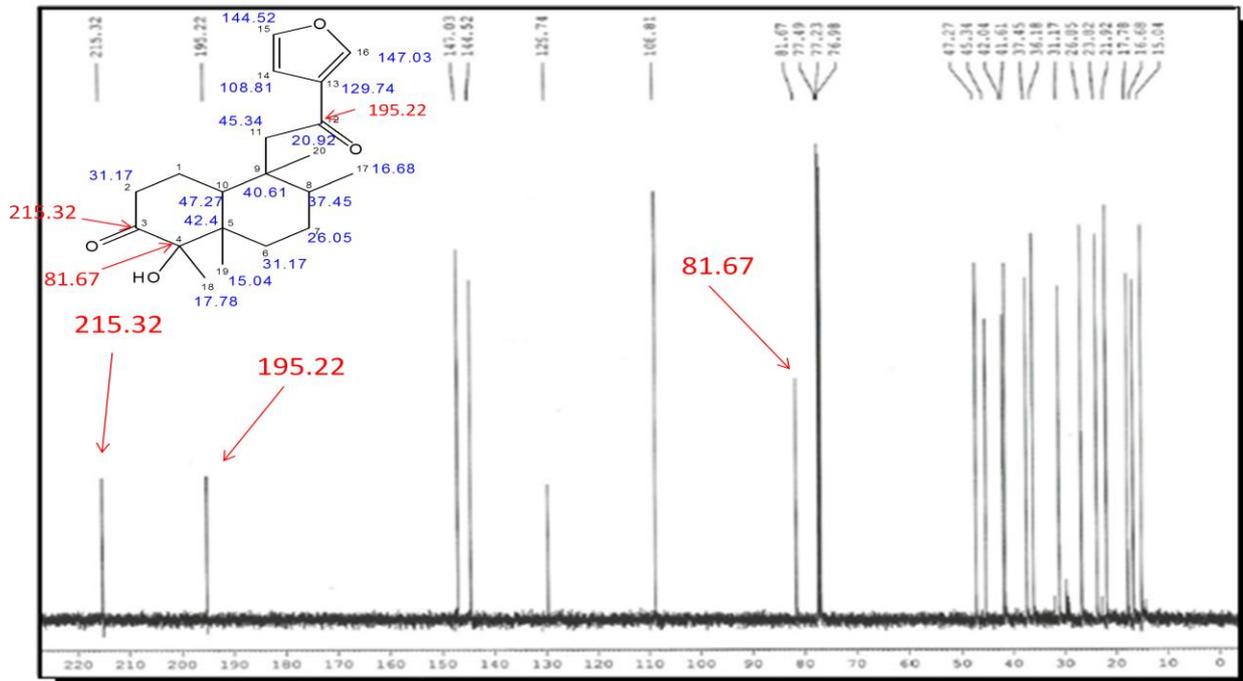


Tabela 4 - Dados de deslocamentos químicos de RMN C-13 (125 MHz, CDCl₃) do CA e o seu produto de biotransformação por *R. stolonifer*.

Deslocamentos químicos (RMN C-13)		
Carbonos	δ_C Substrato CA	δ_C Produto de biotransformação
C1	23,82	17,46
C2	31,17	26,77
C3	215,32	72,42
C4	81,67	79,30
C5	42,04	41,08
C6	31,17	30,11
C7	26,05	26,77
C8	37,45	37,16
C9	41,61	41,04
C10	47,27	47,21
C11	45,34	42,37
C12	195,22	195,16
C13	129,74	129,58
C14	108,81	108,72
C15	144,52	144,22
C16	147,03	146,71
C17	16,68	15,94
C18	17,78	16,63
C19	15,04	14,60
C20	21,92	21,14

O espectro de RMN ¹³C-DEPT 135°(125 MHz, CDCl₃) permitiu confirmar a presença do carbono carbinólico na estrutura do produto de biotransformação do substrato CA, através do sinal em δ 72,42 (figura 25). Além disso, foram observados: quatro carbonos metílicos, cinco carbonos metilênicos, seis carbonos metínicos e cinco carbonos não hidrogenados que mais uma vez condiz com a redução da carbonila em δ 215,32 (C-3). Analisando o espectro de RMN ¹³C-DEPT 135° (125 MHz, CDCl₃) do substrato CA (figura 26). Portanto, os dados de RMN confirmaram que houve uma alteração estrutural no carbono 3 do substrato CA, referente a redução da carbonila com sinal em δ 215,32, resultando no composto 12-oxo-15,16-epoxi-3,4-dihidrocicleroda-13(16),14-dieno (Esquema 5).

Figura 25 - Espectro RMN ^{13}C -DEPT 135° (125 MHz, CDCl_3) do produto de biotransformação do CA por *R. stolonifer*.

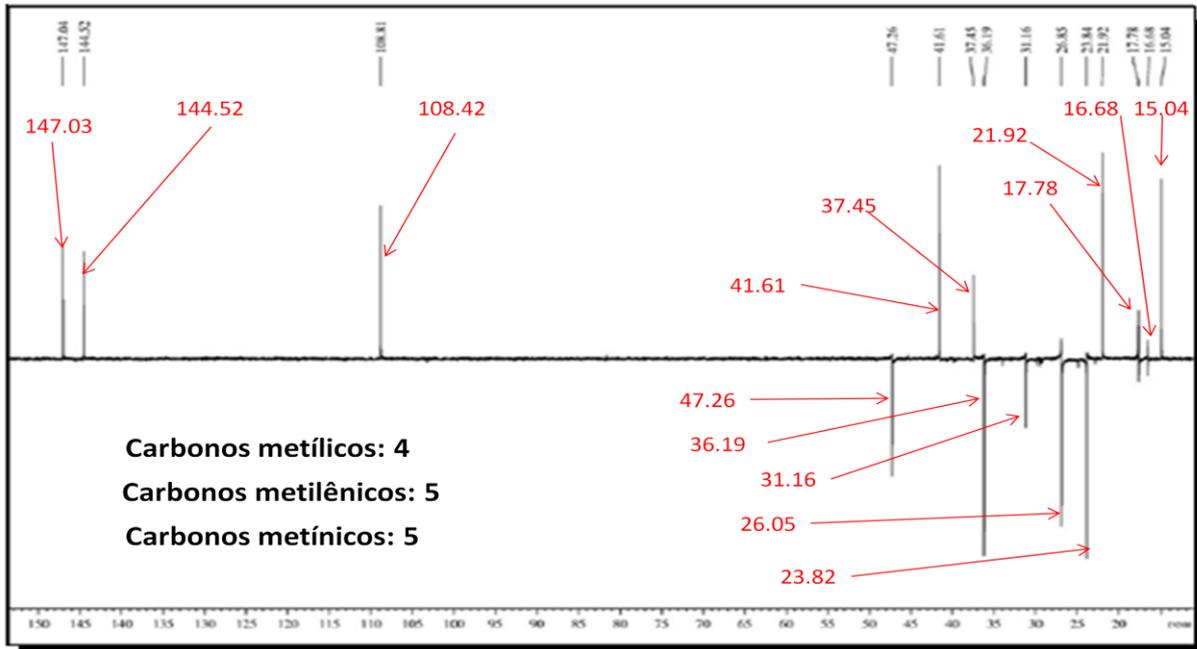
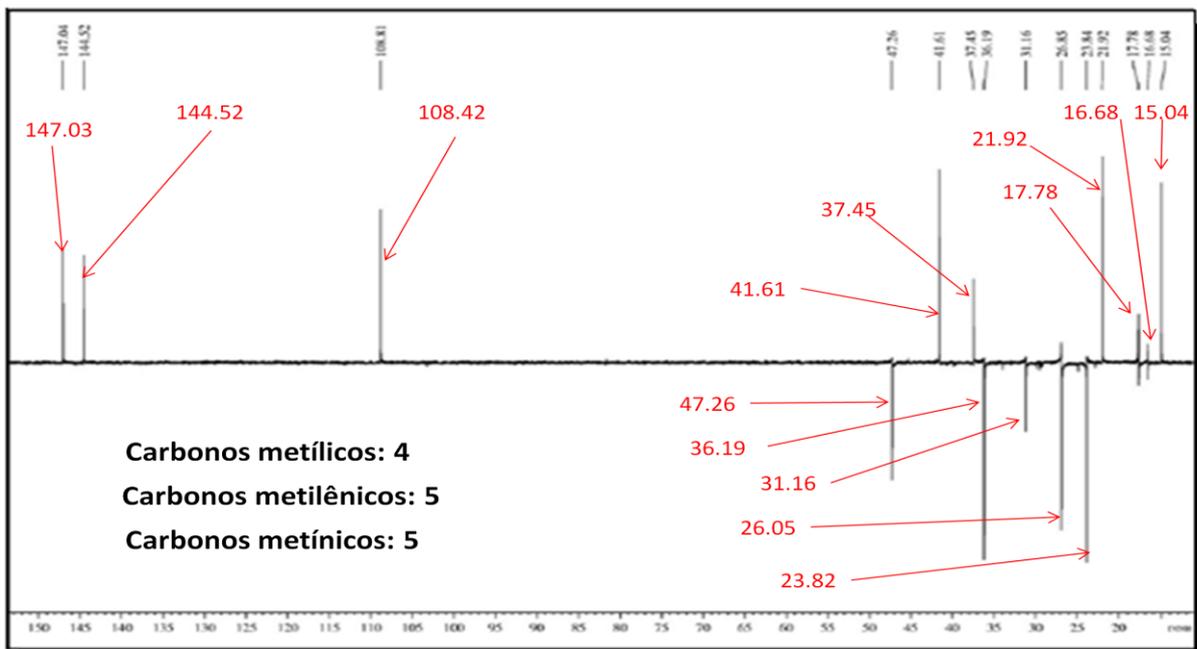
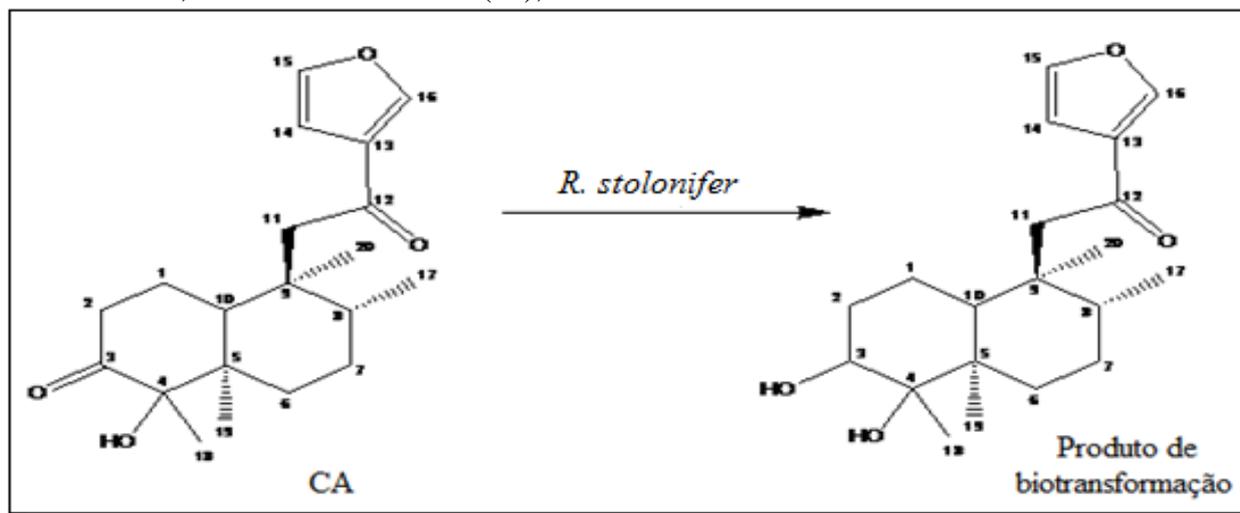


Figura 26 - Espectro RMN ^{13}C -DEPT 135° (125 MHz, CDCl_3) do substrato CA.



Esquema 5 - Reação de biotransformação de 3,12-dioxo-15,16-epoxi-4-hidroxicleroda-13(16),14-dieno (CA) por *R. stolonifer* tendo como produto o composto 12-oxo-15,16-epoxi-3,4-di-hidroxicleroda-13(16),14-dieno.



Com base nos resultados foi possível verificar que o complexo enzimático do fungo *R. stolonifer* foi capaz de reduzir seletivamente a carbonila não conjugada do substrato CA, o que sugere uma quimiosseletividade.

4.5.2 Determinação estrutural do produto de biotransformação do 6-gingerol por *R. stolonifer*

O tratamento cromatográfico em CLAE do extrato proveniente da biotransformação do substrato 6-gingerol por *R. stolonifer* forneceu um composto pastoso de coloração alaranjada, conforme descrito no Item 5.7.2.1, p. 59.

O espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) do produto de biotransformação do 6-gingerol por *R. stolonifer* (Figura 27), revelou sinais referentes aos hidrogênios oximetínicos em δ 3,89 (H-3 e H-5) sobrepostos pelo singlete dos hidrogênios da metoxila em δ 3,87; que em comparação com o espectro de RMN ^1H do 6-gingerol (Figura 28) revelou que há apenas um hidrogênio oximetínico em δ 4,02 (H-5) no substrato. Esse fato indicou que o carbono (C-3) referente à carbonila no 6-gingerol foi reduzido, gerando mais um hidrogênio oximetínico no produto de biotransformação. Nos outros hidrogênios, praticamente, não houve modificação, e foi observado um tripleto em δ 0,89 referente à metila da cadeia terminal e um conjunto de sinais em δ 1,20-1,52 integrados para oito hidrogênios metilênicos (H-6, H-7, H-8, H-9), um multiplete em δ 2,52-2,73 integrado para quatro hidrogênios que condiz com metilênicos benzílicos (H-1) e metilênicos homobenzílicos (H-2). Assim como, no 6-gingerol, também foi observado um singlete

intenso em δ 3,87 de metoxila e sinais relativos à região dos hidrogênios aromáticos em δ 6,6-6,9 integrados para três hidrogênios.

Figura 27 - Espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) do 6-gingerdiol relativo ao produto de biotransformação do Gingerol por *R. stolonifer*.

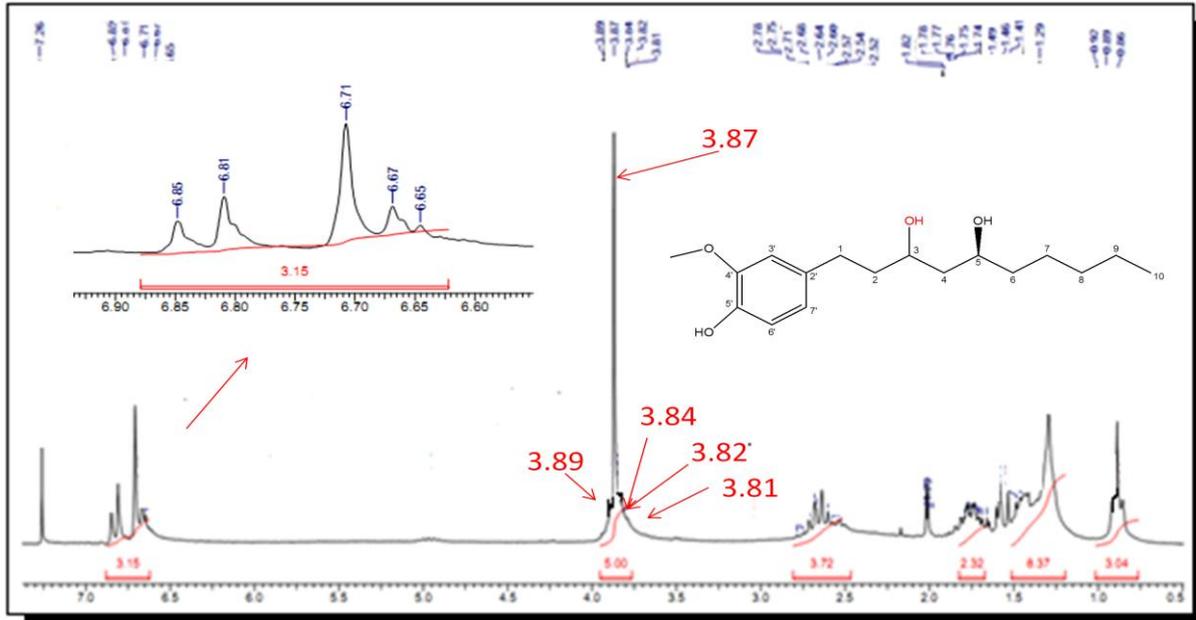
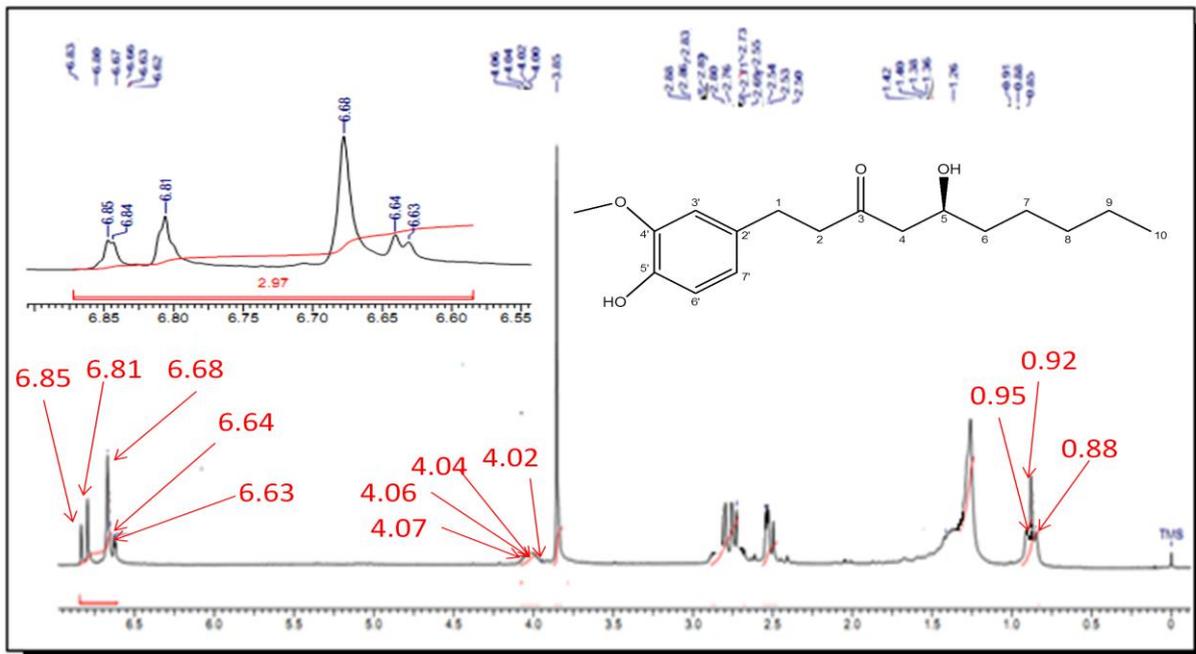


Figura 28 - Espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) do substrato 6- gingerol.



No espectro de RMN ^{13}C (500 MHz, CDCl_3) do produto de biotransformação do substrato 6-gingerol (Figura 29) foram observadas 17 linhas espectrais, que é o mesmo número de linhas espectrais observadas para o RMN ^{13}C do 6-gingerol (Figura 30). Foram observados dois sinais em δ 65,3-65,7 típicos de carbonos sp^3 mono-oxigenados que em comparação com o espectro do substrato 6-gingerol havia apenas um carbono sp^3 mono-oxigenado em δ 66,3. Além disso, no espectro do substrato existia um sinal em δ 210,8 relativo à carbonila cetônica não conjugada. Este sinal não foi observado no espectro de RMN ^{13}C do produto de biotransformação, que apresentou um novo sinal na região de carbono sp^3 mono-oxigenado, como verificado anteriormente no espectro de RMN ^1H . Os sinais dos demais carbonos do produto de biotransformação pouco variaram em comparação com os sinais do substrato. Foram observados, sinais em δ 30,1-32,1-38,2-40,0-43,0 relativos a carbonos sp^3 não oxigenados. Já os sinais em δ 22,8-23,2 estão praticamente sobrepostos por sinais de carbonos sp^3 metilênicos muito semelhantes, apresentando também o mesmo sinal em δ 56,2 da metoxila do 6-gingerol. Por fim, foram observados sinais em δ 113,6-116,7-121,9-132,3-142,9-151,2, onde os dois últimos são típicos sinais de carbonos aromáticos oxigenados. A Tabela 5 apresenta os dados de RMN ^{13}C do substrato 6-gingerol em comparação com os dados de ^{13}C do produto de biotransformação.

Figura 29 - Espectro de RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) do 6-gingerdiol (produto de biotransformação do 6-gingerol por *R. stolonifer*).

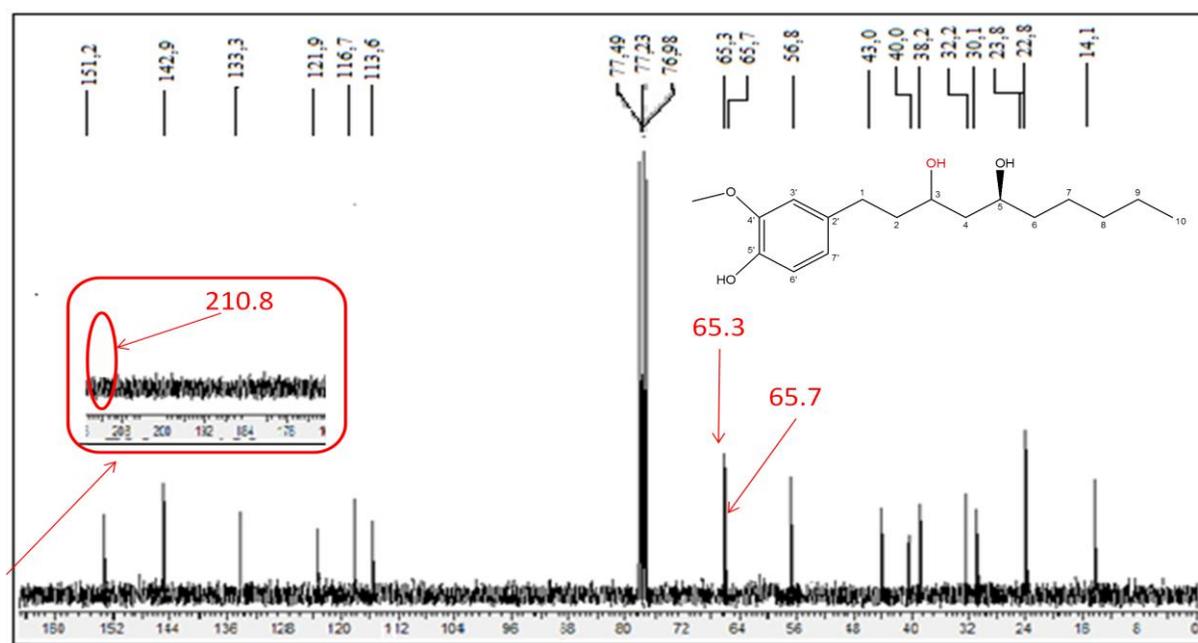
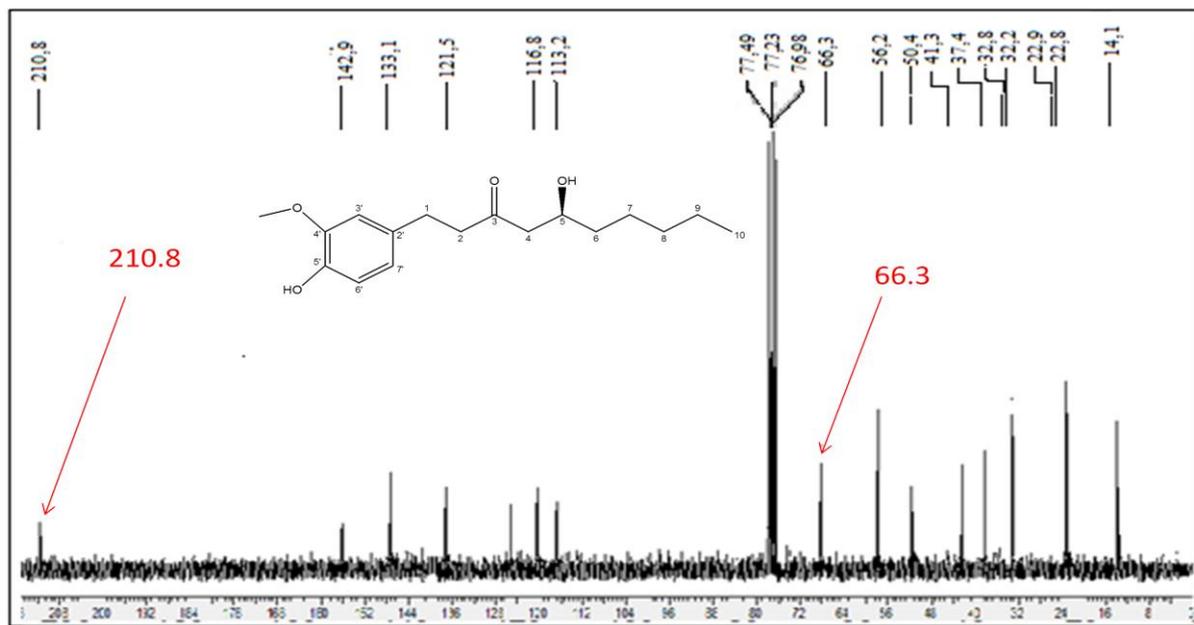


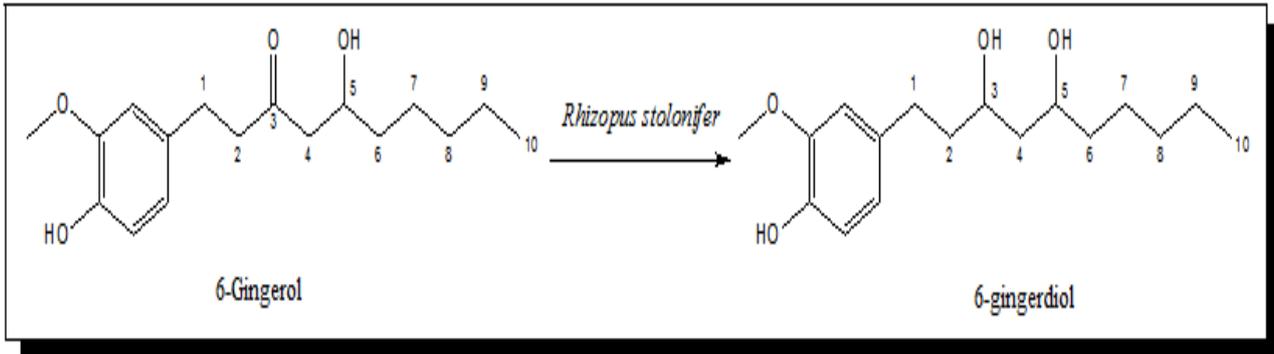
Figura 30 - Espectro de RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) do substrato 6-gingerol.Tabela 5 - Dados de deslocamentos químicos de RMN C-13 do 6-gingerol e o seu produto de biotransformação por *R.stolonifer*.

Deslocamentos químicos (RMN C-13)

Carbonos	δ_{C} 6-gingerol	δ_{C} Produto de biotransformação
C1	32,2	30,1
C2	41,3	40,0
C3	210,8	65,3
C4	50,4	43,0
C5	66,3	65,7
C6	37,4	38,2
C7	22,9	23,8
C8	32,8	32,2
C9	22,8	22,8
C10	14,1	14,1
C1'	133,1	133,3
C2'	113,2	113,6
C3'	151,3	151,2
C4'	142,9	142,9
C5'	116,8	116,7
C6'	121,5	121,9
Metoxila	56,2	56,8

Conforme mostra a Tabela 5, a mudança estrutural sofrida pelo substrato 6-gingerol ocorreu com a redução da carbonila (C-3) produzindo um carbono oximetínico e gerando o 6-gingerdiol (LEE *et al.*, 2011; JOLAD *et al.*, 2005), (Esquema 6).

Esquema 6 - Reação de biotransformação do 6-gingerol por *R. stolonifer* tendo como produto o composto 6-gingerdiol.



Capítulo 5

Parte

Experimental

5. PARTE EXPERIMENTAL

5.1 Material e métodos

5.1.1 Cromatografia em camada delgada (CCD)

As análises cromatográficas em camada delgada (CCD) foram realizadas sobre cromatofolhas de alumínio cobertas com gel de sílica 60 F254 – MERCK® (espessura de 0,2 mm).

Após eluição das substâncias nas cromatoplaças, as mesmas foram reveladas através de imersão em solução de vanilina ($C_8H_8O_3$, 5,0 g) e ácido perclórico ($HClO_4$, 0,75 mol/L, 100 mL) em etanol (C_2H_5O , 100 mL) seguida de aquecimento a 100°C com pistola aquecedora da marca Steinel® modelo HL500, por aproximadamente 1 minuto e através da exposição a uma lâmpada ultravioleta UVSL – 25 da MINERAL LIGHT®, em dois comprimentos de onda (254 e 365 nm).

5.1.2 Cromatografia líquido de alta eficiência (CLAE)

As análises por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) foram realizadas em equipamento da SHIMADZU® constituído de uma bomba ternária de alta pressão SHIMADZU LC-20AT, detector UV Visível com arranjo de diodo SHIMADZU SPD-M20A e um forno termostático para acomodação da coluna. A coluna empregada e as condições de injeção encontram-se descritos nos Itens 5.7.1.2 e 5.7.2.1, páginas 64 e 69.

5.1.3 Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG/EM)

A análise do produto de biotransformação do 6-gingerol pelo fungo *R. stolonifer* foi realizada também por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG/EM) em aparelho da marca SHIMADZU® modelo QP2010, equipado com coluna capilar DB-5, utilizando hélio como fase móvel a um fluxo de 1,0 mL/min. Inicialmente, a temperatura da coluna foi de 60 °C, aumentando-se para 150 °C a 15 °C/min, permanecendo nessa temperatura por 3 minutos. Nesse ponto, a velocidade de aquecimento foi reduzida para 10 °C/min até atingir 250 °C e em seguida aumentada para 290 °C a 15 °C/min.

5.2 Métodos espectroscópicos

5.2.1 Ressonância magnética nuclear (RMN)

Os espectros de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN ^1H) e de carbono-13 (RMN ^{13}C) foram obtidos em espectrômetros Bruker[®], modelo Avance DPX-300 e/ou modelo Avance DRX-500, pertencentes ao Centro Nordestino de Aplicação e Uso da Ressonância Magnética Nuclear (CENAUREMN).

Os solventes utilizados nas dissoluções das amostras para obtenção dos espectros foram clorofórmio deuterado (CDCl_3) e metanol deuterado (CD_3OD), comercializado pela companhia Cambridge Isotope Laboratories.

5.2.2 Espectroscopia de absorção na Região do infravermelho (IV)

Os espectros de absorção na região do infravermelho (faixa de 4000 a 400 cm^{-1}) foram obtidos em espectrômetro Perkin-Elmer[®], modelo SPECTRUM 100 FT-IR usando o aparato UATR (universal attenuated total reflectance), pertencente a central analítica do Departamento de Química Orgânica e Inorgânica da Universidade Federal do Ceará (DQOI/UFC).

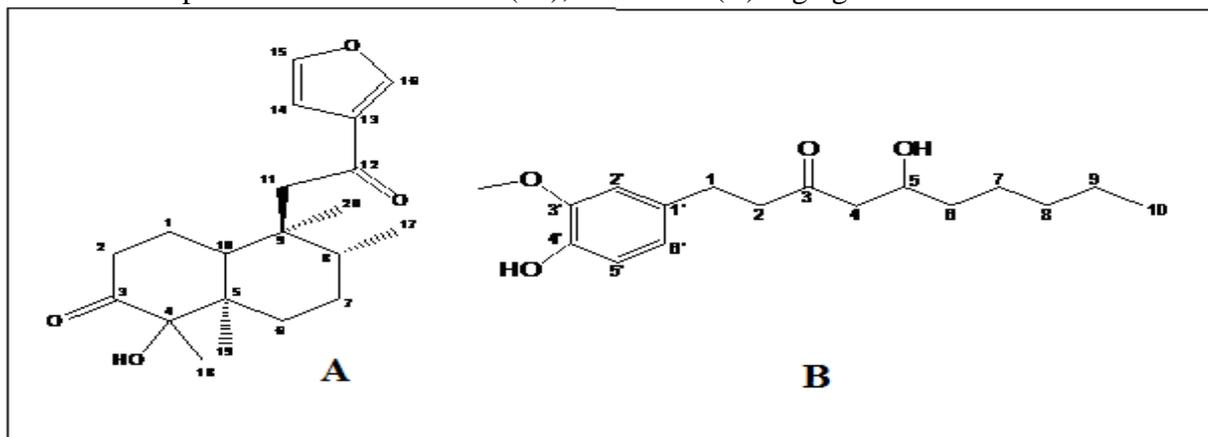
5.3 Solventes

Os solventes utilizados nos processos de separação por cromatografia em coluna, de qualidade PA, de procedência comercial Synth[®]. As análises por CLAE foram realizadas com solventes grau CLAE da marca Tedia[®] e foram devidamente filtrados através de membrana de nylon com poros de 0,45 μm . As amostras foram dissolvidas nas fases móveis e filtradas através de membrana de teflon com poros de 0,45 μm .

5.4 Substratos

Os substratos utilizados nesse trabalho foram o diterpeno 3,12-dioxo-15,16-epoxi-4-hidroxicleroda-13(16),14-dieno (Figura 31-A) denominado de CA, e que foi fornecido pelo Laboratório de Análise Fitoquímica de Plantas Medicinais (LAFIPLAM-3) e o 6-gingerol (Figura 31-B), que foi isolado a partir dos rizomas da espécie *Zingiber officinale*, descrito no próximo item.

Figura 31 - Substratos utilizados nas biotransformações por *R. stolonifer*: (A) 3,12-dioxo-15,16-epoxi-4-hidroxicleroda-13(16),14-dieno e (B) 6-gingerol.



5.4.1 Isolamento do substrato 6-gingerol

Uma massa de 3,0 Kg dos rizomas de gengibre fresco (*Z. officinale*) foi adquirida no comércio local de Fortaleza e processada em triturador da marca TWEENY[®]. A massa triturada foi seca a uma temperatura de 50°C por 12 horas em estufa digital da marca Sterilifer[®]. Em seguida, a massa dos rizomas, triturada e seca, foi submetida à extração com etanol a frio em dois intervalos de 48 horas. Após destilação do solvente sob pressão reduzida, em evaporador rotativo, foi obtido um extrato de coloração amarelada. Vinte gramas desse extrato foram submetidas a um fracionamento cromatográfico em coluna utilizando-se uma coluna de vidro (20 x 8 cm) preenchida com gel de sílica 60 comum (70-230 mesh). Na eluição foram utilizados 600 mL de hexano, obtendo-se uma fração rica em sesquiterpenos. Em seguida, utilizou-se uma mistura de hexano/acetato de etila (1:1) (800 mL), obtendo-se quatro frações de 200 mL (fração: 1, 2, 3 e 4) de coloração amarelada. Os gingeróis estavam concentrados nas frações 3 e 4, que logo foi concentrada em evaporador rotativo, obtendo-se uma fração rica em gingeróis de massa 1,5 g. Os gingeróis foram separados por CLAE (método isocrático) utilizando uma coluna semi-preparativa de fase reversa (C18, 10 μ , 30 x 1,0 cm) e absorção máxima em $\lambda = 282$ nm, eluída com uma fase móvel de metanol/água (75:25) e fluxo 6,0 mL/min com injeções de 400 μ L (SILVA, 2011). A partir das análises por CLAE foram isolados 120 mg do composto 6-gingerol.

5.5 Esterilização e preparação de meios de cultura

A esterilização de vidrarias e meios de culturas foi realizada no Laboratório de Biotecnologia e Síntese Orgânica (LABS) da UFC.

Os procedimentos de esterilização foram realizados em autoclave vertical, PHOENIX[®] AV 75 e Soc. FABBE[®] 103 e a repicagem nos meios de cultura em capela de fluxo laminar LABCONCO[®] MOD # 8089000.

5.5.1 Preparo dos meios de cultura

Para o cultivo do fungo *R. stonifer* foram utilizados os meios líquidos caldo de batata e BD (batata-dextrose) sintético da marca HIMEDIA[®], preparados conforme procedimentos descritos a seguir.

5.5.2 Meio de caldo de batata (BD)

O caldo de batata utilizado na preparação do meio líquido foi obtido pelo cozimento de 240 g de batata inglesa descascada em 1 L de água destilada. Após o cozimento realizou-se uma filtração, seguida da adição de 24 g de dextrose. Depois de distribuído em cinco frascos de Erlenmeyers de 250 mL, o meio de cultura foi autoclavado a 120°C por 15 minutos.

5.5.3 Meio batata-dextrose sintético (BD)

O meio líquido foi preparado pela dissolução de 24 g do meio BD sintético da marca HIMEDIA[®] em 1 L de água destilada. Em seguida o meio de cultura foi distribuído em cinco frascos de Erlenmeyers de 250 mL e autoclavado a 120 °C por 15 minutos.

5.5.4 Meio batata-dextrose-agar (BDA)

Aos meios líquidos BD que foram preparados como descrito anteriormente (tanto o sintético como o de batata), adicionou-se o equivalente de 1,5% do volume do meio líquido de Agar para solidificar o meio e obter-se o meio semi-sólido para cultivo do fungo.

5.5.5 Preparação de tampão fosfato pH 7,0

Para o preparo da solução tampão, adicionou-se 1,74 mg de fosfato de sódio bibásico P.A ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$) e 0,93 mg de fosfato de sódio monobásico anidro P.A (NaH_2PO_4), ambos de procedência comercial da Vetec[®], em 1 L de água destilada.

5.6 Microorganismo

O fungo *Rhizopus stolonifer* (isolado da semente de trigo) foi fornecido pela Profa. Dra. Nenmaura G. Pessoa do Laboratório de Micologia e Patologia de Sementes (LAMPS) da UFC.

5.7 Biotransformações dos substratos por *R. stolonifer*

5.7.1 Biotransformação do diterpeno 3,12-dioxo-15,16-epoxi-4-hidroxicleroda-13(16),14-dieno (CA) por *R. stolonifer*

Em quatro frascos de Erlenmeyers de 250 mL contendo 100 mL do meio líquido BD, adicionou-se um disco da cultura fúngica de *R. stolonifer* em BDA e manteve-se em condição de cultivo estático por 10 dias. Após esse período, o micélio foi separado do caldo de cultura por filtração a vácuo, sob condições assépticas, utilizando-se água destilada como solvente de lavagem.

O micélio do fungo *R. stolonifer* após lavagem com água destilada foi pesado, rendeu um micélio de massa 30 g que em seguida foi ressuscitado em solução tampão fosfato pH 7,0 juntamente com 30 mg de CA, previamente solubilizado em 100 μL de DMSO. O meio reacional foi mantido sob agitação por 14 dias a 170 rpm a temperatura de 23 °C. Após o tempo reacional a solução tampão foi saturada com cloreto de sódio e extraída através de partição líquido-líquido com 50 mL de acetato de etila. Finalmente, após evaporação do solvente sob pressão reduzida foi obtido o extrato do meio reacional. Todo esse procedimento foi realizado em triplicata, e o tampão fosfato contendo somente o substrato e o fungo, foi empregado como branco.

5.7.1.2 *Fracionamento cromatográfico por CLAE dos extratos da biotransformação de CA do meio líquido por R. stolonifer*

O extrato da biotransformação de CA por *R. stolonifer* foi submetido à análise por CLAE. Para o desenvolvimento do método cromatográfico utilizou-se uma coluna ODS analítica da marca Phenomenex[®] (250 mm x 4,6 mm, 5 µm) em um método gradiente acetonitrila: água variando a concentração de acetonitrila de 25 a 75% por 60 minutos com fluxo de 1,0 mL/min, a 40 °C. Foram injetados 20 µL da amostra em concentração de 1 mg/mL.

Por meio desta análise, foi possível se chegar a um método isocrático CH₃CN/Água (67:33) em uma coluna ODS semipreparativa da marca Phenomenex[®] (250 mm x 10 mm, 5 µm), com fluxo de 4,72 mL/min. Foram feitas injeções de 200 µL de amostra em concentração de 20 mg/mL. Para detecção das frações utilizou-se um faixa com comprimentos de onda que variavam de 200 a 380 nm.

5.7.1.3 *Análise qualitativa por cromatografia em camada delgada (CCD) da biotransformação de 3,12-dioxo-15,16-epoxi-4-hidroxicleroda-13(16),14-dieno (CA) por R. stolonifer*

Os extratos obtidos das triplicatas provenientes da biotransformação de CA pelo fungo *R. stolonifer* foram denominados de t₁, t₂ e t₃ e pesados, obtendo-se as seguintes massas: t₁ = 28,90 mg; t₂ = 29,21 mg e t₃ = 28,52 mg. Denominamos de “P” o extrato obtido da solução tampão mais o substrato (27,01 mg) e de “B” o extrato do branco, obtido do fungo mais a solução tampão (2,5mg). Nas análises por CCD utilizou-se uma mistura de solventes, acetato de etila/hexano (3:2), para eluições. A separação dos componentes do extrato através da migração diferencial sobre a camada delgada foi revelada em solução de vanilina. Onde foi acompanhada e comparada pelo o fator de retenção (R_f) dos componentes.

Foram reveladas três grupos de substâncias nos extratos. Um de R_f médio 0,87 que foi identificada como sendo metabolito do fungo, por comparação com o branco. O de R_f médio 0,62 como sendo o substrato 3,12-dioxo-15,16-epoxi-4-hidroxicleroda-13(16),14-dieno remanescente em comparação com o R_f 0,62 do padrão. Por ultimo, identificou-se uma substância de R_f médio 0,25 como sendo o produto de biotransformação. Os valores de R_f (t₁, t₂, t₃, B e P) são mostrados na Tabela 6.

Tabela 6 - Dados dos valores de R_f para análise em CCD (4cm x 4cm) dos extratos t_1 , t_2 , t_3 , P e B referentes a biotransformação de 3,12-dioxo-15,16-epoxi-4-hidroxicleroda-13(16),14-dieno (CA) por *R. stolonifer*.

Componentes	Produto	de Substrato	Metabolitos
Extratos	biotransformação		do fungo
T ₁	0,25	0,62	0,87
T ₂	0,25	0,62	0,87
T ₃	0,25	0,62	0,87
Branco (B)	---	---	0,87
Padrão do substrato (P)	---	0,62	---

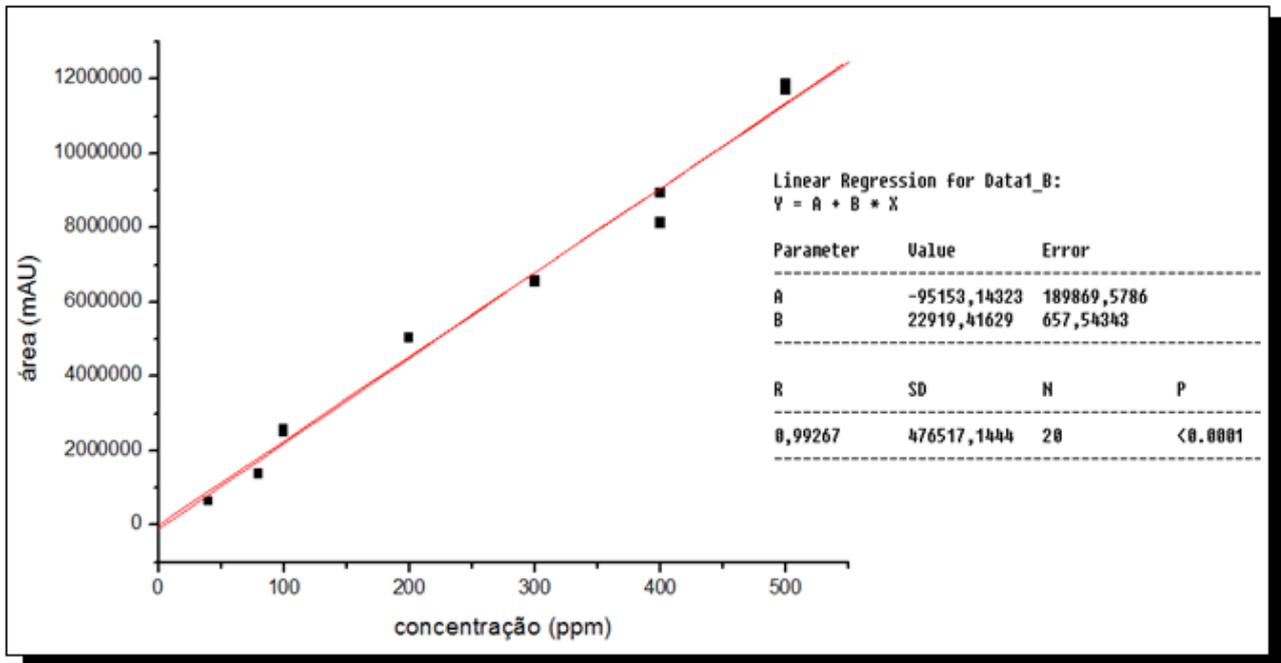
5.7.1.4 Estudo cinético da biotransformação de CA por *R. stolonifer*

O método desenvolvido para o estudo cinético foi o da curva de calibração, padrão externo, que apresenta a relação entre as concentrações presentes do produto (em ppm) e as áreas integradas dos picos cromatográficos correspondentes. A curva de calibração foi construída com o padrão do produto de biotransformação, isolado por CLAE, conforme descrito no Item 5.7.1.2, p. 64.

5.7.1.5 Construção da curva de calibração

A curva de calibração, para a análise do CA, foi desenvolvida com a preparação de sete soluções, utilizando-se metanol como solvente para as diluições em série de concentrações crescentes em ppm: 40, 80, 100, 200, 300, 400 e 500. As análises foram feitas por CLAE em triplicata com injeções de 20 μ L, utilizando uma coluna ODS analítica da marca Phenomenex[®] (250 mm x 4,6 mm, 5 μ m), com fluxo de 4,72 mL/min para cada concentração. Dessa forma, foram obtidos 21 pontos que originaram uma curva de calibração por regressão linear (Figura 32).

Figura 32 - Gráfico da curva de calibração das áreas dos picos cromatográficos do produto biotransformado de 3,12-dioxo-15,16-epoxi-4-hidroxicleroda-13(16),14-dieno por *R. stolonifer* versus a concentração em ppm desse produto. Ao lado são mostrados dados referentes à regressão linear.



5.7.1.6 Cálculo das concentrações do produto de biotransformação de CA por *R. stolonifer*

A partir dos dados da curva de calibração de calibração foi possível obter a equação da reta mostrada abaixo.

$$Y = -95153,14323 + 22919,41629.X$$

Onde Y é a área do pico cromatográfico relativo ao produto de biotransformação e X a concentração (em ppm) desse produto. Em seguida, todos os extratos das biotransformações (t_1 a t_{21}) obtidos em intervalos de 2, 4, 6, 8, 10, 12 e 14 dias foram dissolvidos em metanol (1mg/mL) e analisados por CLAE. As áreas dos picos cromatográficos referentes aos produtos de biotransformação, em seus referentes intervalos de tempo racional, encontram-se mostradas na tabela 7.

Tabela 7 - Áreas dos picos cromatográficos do produto de biotransformação em função do tempo de reação (Observação: Em cada triplicata os extratos foram numerados pela ordem crescente das áreas dos picos).

Extratos	Massa dos extratos (mg)	Área dos picos (mAU)	Médias das áreas dos picos
t ₁	5,9	1190996	2º dia
t ₂	5,1	6068702	2726519
t ₃	5,8	9198360	
t ₄	5,3	10217181	
t ₅	5,2	10883759	4º dia
t ₆	5,8	11726512	10942484
t ₇	5,4	12088253	
t ₈	5,4	12793023	6º dia
t ₉	5,3	12821168	12567481
t ₁₀	5,7	13427320	
t ₁₁	5,4	13732972	13968437
t ₁₂	5,4	14745020	
t ₁₃	5,5	15194276	
t ₁₄	5,3	15482693	10º dia
t ₁₅	5,5	17209409	15962126
t ₁₆	5,6	17290213	
t ₁₇	5,4	18275941	12º dia
t ₁₈	5,4	18602815	18056323
t ₁₉	4,3	22617463	
t ₂₀	4,5	22890307	14º dia
t ₂₁	5,2	29310539	24939436

A partir dos dados da tabela acima e utilizando-se a equação da reta é possível encontrar os valores das concentrações (ppm) do produto de biotransformação em cada extrato proveniente das triplicatas.

$$X = \frac{Y+95153,14323}{22919,41629}$$

A Tabela 8 contém as concentrações do produto de biotransformação de CA a cada dois dias de reação a partir das médias das triplicatas, nos seus respectivos dias.

Tabela 8 - Concentrações e médias das triplicata de biotransformação de 3,12-dioxo-15,16-epoxi-4-hidroxicleroda-13(16),14-dieno por *R. stolonifer* a cada dois dias.

Extratos	Concentração do Produto (ppm)	Média das Concentrações (ppm)	Extratos	Concentração do Produto (ppm)	Média das Concentrações (ppm)	Extratos	Concentração do Produto (ppm)	Média das Concentrações (ppm)
T ₁	256,1	2 ^a Dia	T ₈	562,3	552,500	T ₁₅	755,0	700,600
T ₂	268,9	243,512	T ₉	563,6		T ₁₆	758,5	12 ^a Dia
T ₃	405,5		T ₁₀	590,0	8 ^a Dia	T ₁₇	801,6	792,000
T ₄	449,9	4 ^a Dia	T ₁₁	603,3	613,600	T ₁₈	815,8	
T ₅	479,0	481,600	T ₁₂	647,5		T ₁₉	991,0	14 ^a dia
T ₆	515,8		T ₁₃	667,1	10 ^a Dia	T ₂₀	1002,9	1092,300
T ₇	531,6	6 ^a Dia	T ₁₄	679,7		T ₂₁	1283,0	

5.7.2 Biotransformação do 6-gingerol por *R. stolonifer*

Adicionou-se um disco da cultura fúngica de BDA a quatro frascos de Erlenmeyers de 250 mL com 100 mL de meio líquido BD, permanecendo estático por 10 dias. Após esse período, o micélio foi separado do caldo de cultura por filtração a vácuo, sob condições assépticas e lavadas com água destilada.

O micélio do fungo *R. stolonifer* após lavagem com água destilada foi pesado, e rendeu uma massa de 30 g. Em seguida essa massa foi ressuspensa em solução tampão fosfato pH 7,0 juntamente com 30 mg de 6-gingerol, previamente solubilizado em 100 µL de DMSO. O meio reacional foi mantido sob agitação e analisado a cada dois dias por 14 dias a 170 rpm e temperatura de 23 °C. A solução tampão foi saturada com cloreto de sódio e extraída, três vezes de 50 mL, através de partição líquido-líquido com acetato de etila. Os extratos da biotransformação foram obtidos após evaporação do solvente sob pressão reduzida. Todo esse procedimento foi realizado em triplicata, o tampão contendo somente o substrato e o fungo, foi utilizado como branco.

5.7.2.1 *Fracionamento cromatográfico por CLAE dos extratos da biotransformação por R. stolonifer do 6-gingerol*

O extrato da biotransformação do 6-gingerol, obtido do particionamento líquido-líquido, foi submetido à análise por CLAE. Para o desenvolvimento do método cromatográfico utilizou-se uma coluna ODS analítica da marca Phenomenex[®] (250 mm x 4,6 mm, 5 µm) em um método gradiente metanol/água variando a concentração de metanol 30 a 70% por 60 min com fluxo de 1,0 mL/min, a 40 °C. Foram feitas injeções de 20 µL da amostra em concentrações de 1 mg/mL.

Por meio desta análise, foi possível se chegar a um método isocrático metanol/água (2:1) em uma coluna ODS semipreparativa da marca Phenomenex[®] (250 mm x 10 mm, 5 µm), com fluxo de 4,72 mL/min. Foram feitas injeções de 200 µL de amostra em concentrações de 20 mg/mL. Para detecção das frações utilizou-se um faixa com comprimentos de onda que variavam de 200 a 400 nm.

5.7.2.2 *Análise qualitativa por cromatografia em camada delgada (CCD) da biotransformação do 6-gingerol por R. stolonifer*

Os procedimentos utilizados aqui foram os mesmo do item 5.7.1.3, ou seja, denominados de t₁, t₂ e t₃ os extratos proveniente da biotransformação do 6-gingerol por *R. stolonifer* e de “B” o extrato proveniente da solução tampão mais fungo e por “P” o extrato obtido da solução tampão com o substrato, obtendo-se 27,1 mg; 25,30 mg; 28,12 mg; 3,210 mg e 28,34 mg, respectivamente.

Nos extratos foram identificados três grupos de substâncias. O primeiro grupo tinha R_f médio 0,73 e foi identificado como sendo metabolito do fungo, por comparação com o branco. Outro de R_f médio 0,53 como sendo o substrato 6-gingerol não consumido na reação, por comparação com o R_f (0,53) do padrão. O ultimo componente tinha R_f médio 0,18 e ficou caracterizado como sendo o produto de biotransformação (Tabela 9).

Tabela 9 - Dados dos valores de R_f para análise por CCD (4cm x 4cm) dos extratos t_1 , t_2 , t_3 , P e B referentes a biotransformação do 6-gingerol por *R. stolonifer*.

Componentes Extratos	Produto de biotransformação	Substrato	Metabólitos do fungo
T ₁	0,18	0,53	0,73
T ₂	0,18	0,53	0,73
T ₃	0,18	0,53	0,87
Branco (B)	---	---	0,73
Padrão do substrato (P)	---	0,53	---

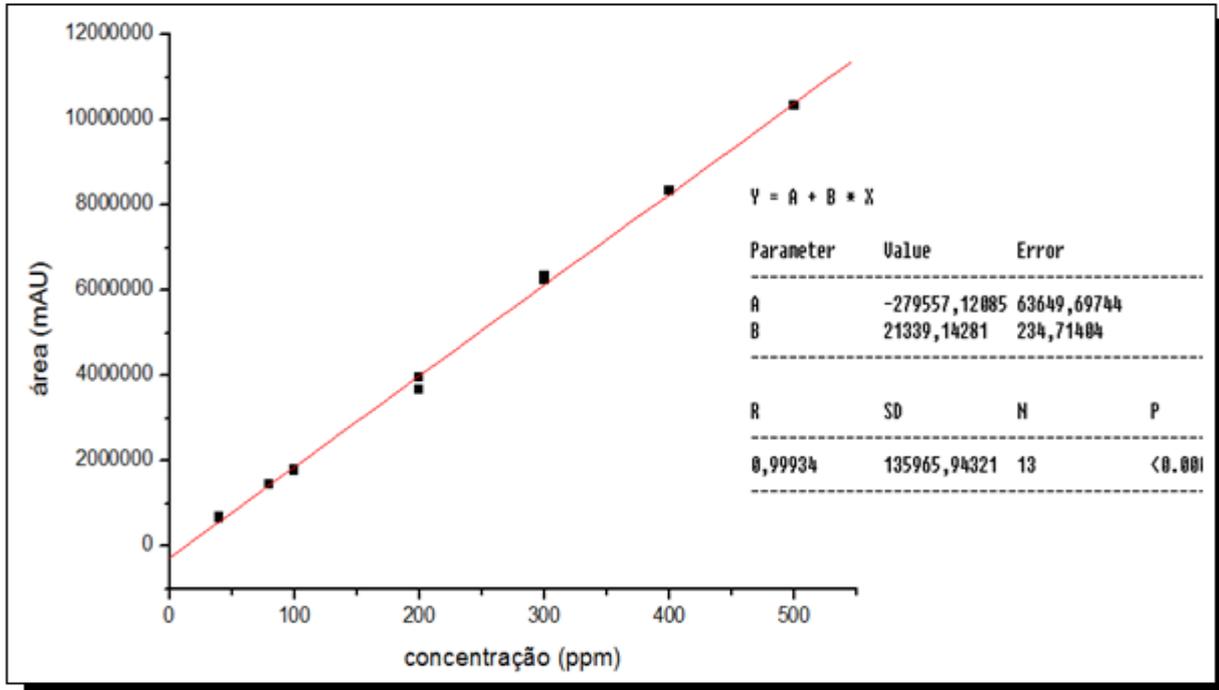
5.7.2.3 Estudo cinético da biotransformação do 6-gingerol por *R. stolonifer*

O método desenvolvido para o estudo cinético aqui foi o mesmo anteriormente citado (item 5.7.1.4, p. 65), da curva de calibração obtida por regressão linear, padrão externo, apresentando a relação entre as concentrações presentes do produto (em ppm) e as áreas integradas dos picos cromatográficos correspondentes. A curva de calibração foi obtida por injeções em CLAE do produto de biotransformação, isolado conforme descrito no Item 5.7.2.1.

5.7.2.4 Construção da curva de calibração

A curva de calibração foi desenvolvida com a preparação de sete soluções do padrão 6-gingerdiol, utilizando-se metanol como solvente para as diluições em série de concentrações crescentes em ppm: 40, 80, 100, 200, 300, 400 e 500. As análises foram feitas por CLAE em triplicata com injeções de 20 μ L, utilizando uma coluna ODS analítica da marca Phenomenex[®] (250 mm x 4,6 mm, 5 μ m), com fluxo de 1,0 mL/min para cada concentração. Dessa forma, foram obtidos 21 pontos que originaram uma curva de calibração por regressão linear (Figura 33).

Figura 33 - Gráfico da curva de calibração das áreas dos picos cromatográficos do produto biotransformado do 6-gingerol por *R. stolonifer* versus a concentração em ppm desse produto. Ao lado direito encontra-se os dados referentes a regressão linear



5.7.2.5 Cálculo das concentrações do produto de biotransformação do 6-gingerol por *R. stolonifer*.

A curva de calibração forneceu a equação da reta necessária para obtenção das concentrações do produto de biotransformação do 6-gingerol a cada dia analisado, equação abaixo.

$$Y = -279557,12085 + 21339,14281X$$

O Y é a área integrada do pico cromatográfico relativo ao produto de biotransformação e X a concentração (em ppm) desse produto. Os extratos das biotransformações (t_1 a t_{21}) obtidos em intervalos de 2, 4, 6, 8, 10, 12 e 14 dias foram dissolvidos em metanol (1mg/mL) e posteriormente analisados por CLAE. As áreas integradas dos picos cromatográficos, do produto de biotransformação, em seus respectivos dias reacionais podem ser mais bem visualizadas na tabela 10.

Tabela 10 - Áreas dos picos cromatográficos do produto de biotransformação do 6-gingerol em função do tempo de reação.

Extratos	Massa dos extratos(mg)	Área dos picos (mAU)	Média das Áreas dos picos
t ₁	6,5	7080875	2º dia 7403000
t ₂	6,9	8038546	
t ₃	6,7	7090120	
t ₄	6,8	10236868	4º dia 10338000
t ₅	6,9	10442427	
t ₆	6,4	10335070	
t ₇	7,1	13002310	6º dia 13039000
t ₈	6,8	12990880	
t ₉	6,9	13122310	
t ₁₀	7,0	14557788	8º dia 14815000
t ₁₁	7,2	14885380	
t ₁₂	6,9	15001011	
t ₁₃	7,5	17012360	10º dia 17186000
t ₁₄	7,2	17450640	
t ₁₅	7,1	17095330	
t ₁₆	7,2	18035045	12º dia 18198000
t ₁₇	7,7	18104350	
t ₁₈	6,9	18456020	
t ₁₉	7,8	20123340	14º dia 19839000
t ₂₀	8,1	20075332	
t ₂₁	7,9	19318633	

Com base nos dados listados na tabela 10 e utilizando-se a equação da reta é possível encontrar os valores das concentrações (ppm) do produto de biotransformação em cada extrato proveniente das triplicata.

$$X = \frac{Y + 279557,12085}{21339,14281}$$

Os valores de X referentes às concentrações (ppm) do produto de biotransformação do 6-gingerol a cada dois dias de reação a partir das médias das triplicata estão listados na tabela 11.

Tabela 11 - Concentrações e médias das triplicatas de biotransformação do 6-gingerol por *R. stolonifer* a cada dois dias

Extratos	Concentração do Produto (ppm)	Média das Concentrações (ppm)	Extratos	Concentração do Produto (ppm)	Média das Concentrações (ppm)	Extratos	Concentração do Produto (ppm)	Média das Concentrações (ppm)
T ₁	344,9263	2 ^a Dia	T ₈	621,8824	624,1140	T ₁₅	814,2261	818,4803
T ₂	389,8049		T ₉	628,0415		T ₁₆	858,2633	
T ₃	345,3596	360,0303	T ₁₀	695,3112	8 ^a Dia	T ₁₇	861,5110	865,9218
T ₄	492,8232		T ₁₁	710,6629		T ₁₈	877,9911	
T ₅	502,4562	4 ^a Dia	T ₁₂	716,0816	707,3519	T ₁₉	956,1254	14 ^a dia
T ₆	497,4252		T ₁₃	810,3379		T ₂₀	953,8757	
T ₇	622,4180	6 ^a Dia	T ₁₄	830,8767	10 ^a Dia	T ₂₁	918,4151	942,8054

5.8 Teste antitumoral

A atividade antitumoral nos produtos de biorredução, 3,12-dioxo-15,16-epoxi-4-hidroxicleroda-13(16),14-dieno (CA) e do 6-gingerol (tabela 12) foi avaliada no Laboratório de Oncologia Experimental da UFC, sob a coordenação da Profa. Dra. Letícia Veras Costa Lotufo.

Os ensaios de citotoxicidade *in vitro* das linhagens tumorais humanas OVCAR-8 (ovário); SF-295 (glioblastoma) e HCT-116 (colon) foram cedidas pelo Instituto Nacional do Câncer (EUA), tendo sido cultivadas em meio RPMI 1640, suplementados com 10 % de soro fetal bovino e 1 % de antibióticos, mantidas em estufa a 37 °C e atmosfera contendo 5% de CO₂.

As substâncias foram diluídas em DMSO puro estéril. As substâncias foram testadas em uma única concentração de 25µg/mL para avaliar o percentual de inibição do crescimento celular. As células tumorais foram plaqueadas nas concentrações de 0,1 x 10⁶ cél/mL para as linhagens OVACAR-8 e SF-295 e 0,7 x 10⁵ cél/mL para a linhagem HCT-116. As placas foram incubadas por 69 horas em estufa a 5% de CO₂ a 37°C. Ao término deste, as mesmas foram centrifugadas e o sobrenadante removido. Em seguida, foram adicionados 150 µL da solução de MTT (sal de tetrazolium), e as placas foram incubadas por 3h. A absorbância foi mensurada após dissolução do precipitado com 150 µL de DMSO puro em espectrofotômetro de placa a 595nm.

Tabela 12 - Percentual de inibição do crescimento celular em 3 linhagens de células tumorais humanas pelos produtos de biotransformação do 6-gingerol e CA-BIO*. Os dados estão apresentados em média \pm SD.

Amostras	Linhagens	OVCAR-8		SF-295		HCT-116	
		Média	SD	Média	SD	Média	SD
6-gingerdiol		91,83	4,78	70,90	7,96	78,56	3,51
CA-BIO*		16,14	3,39	26,09	0,67	23,99	1,90

*12-oxo-15,16-epoxi-3,4-di-hidroxicleroda-13(16),14-dieno; (Produto de biotransformação de CA).

Capítulo 6

Conclusão

6. CONCLUSÕES

Neste trabalho, pôde-se avaliar o potencial biocatalítico do fungo *Rhizopus stolonifer* em processos de biotransformação de produtos naturais. A utilização do 3,12-dioxo-15,16-epoxi-4-hidroxicleroda-13(16),14-dieno (CA) e do 6-gingerol, como substrato para as reações biocatalíticas, revelou o potencial do fungo em realizar a redução seletiva de grupos carbonilas não conjugados. Com a realização dos estudos cinéticos de biotransformação do substrato CA e 6-gingerol, verificou-se que já no segundo dia de reação havia a formação dos produtos de biotransformação em ambos os substratos e que no décimo dia praticamente todo o substrato CA já havia sido consumido, no entanto para o último dia de reação do 6-gingerol ainda havia 27,48% do substrato que não tinha sido consumido. Os testes de inibição da proliferação celular das amostras em três linhagens tumorais humanas (OVCAR-8, SF-295 e HCT-116), revelaram que o produto de biotransformação do 6-gingerol (6-gingerdiol) mostrou-se promissor na inibição do crescimento celular com as médias percentuais de 91,83 (OVCAR-8); 70,90 (SF-295) e 78,56 (CT-116). A biotransformação dos dois substratos pelo fungo *R. stolonifer* apresenta caráter inédito.

7. REFERÊNCIAS

BACON, C.; HINTON, D.; GLENN, A. Chapter for the Manual of Environmental Microbiology – Isolation, in Planta detection, and culture of Endophytic Bacteria and Fungi. 2 ed. Washington: American Society of Microbiology Publication, 2002.

BOAVENTURA, M. A. D.; *et al.* The Biotransformation of methyl *ent*-15-oxokaur-16-en-19-oate by *Rhizopus stolonifer* and *Mucor plumbeus*. **Phytochemistry**, v. 40, p. 1667-1669, 1995.

CARLILE, M. J.; *et al.* **The Fungi**. 2 ed. Elsevier, 588 p. 2001.

CARVALHO, P. O.; *et al.* Potencial de Biocatálise Enantiosseletiva de Lipases Microbianas. **Química nova**, v. 28, p. 60-75, 2005.

CHEN, H.; *et al.* Biodegradation mechanism of shogaols by *Aspergillus niger*. **Yakhak hoeji**. 29. v, 2012.

CHOUDHARY, M. I.; *et al.* Hydroxylation of the sesterterpene leucosceptrine by fungus *Rhizopus stolonifer*. **Phytochemistry**, v. 67, p. 439-443, 2006.

CHOUDHARY, M. I.; *et al.* New oxandrolone Derivatives by Biotransformation Using *Rhizopus stolonifer*. **Elsevier Science**, v. 74, 2009.

CHOUDHARY, M.I.; *et al.* Microbialtransformation and butyrylcholinesterase inhibitory activity of (-)-caryophyllene oxide and its derivates. **Journal of Natural Products**, v. 69, p. 1429-1434, 2006.

CHUNG, W. Y.; *et al.* Antioxidative and Antitumor Promoting Effects of 6-paradol and its Homologs. **Elsevier Science**, 496. v, p. 199-206, 2001.

DAVIES, H. G.; *et al.* **Biotransformations in Preparative Organic Chemistry**. London: Cademic Press, 1989. 650 p.

ERNST, E.; PITTLER, M. H. Efficacy of ginger for nausea and vomiting: a systematic review of randomized clinical trials. **British journal of Anaesthesia**, 84. v, p. 367-371, 2000.

ESQUICI, R. N.; *et al.* Investigação Comparativa da Atividade Antimicrobiana de *Mikania hirsutissima* DC (Compositae) e *Micrograma vacciniifolia* (Langsd. *et.* Fisch) Copel (Polipodiaceae). **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 70, p. 74 – 76, 1989.

FABER, KURT. **Biotransformations in Organic Chemistry**. 6. ed. New York: springer, 2011. 423 p.

GARCÍA-GRANADO, A. *et al.* Biotransformation of ent-13-epi-manoyl oxides difunctionalized at C-3 and C-12 by filamentous fungi. **Phytochemistry**, v. 65, p. 107-115, 2004.

HAGEDORN, CHARLES; BLANCH, ANICET, R.; HARWOOD, VALERIE, J. **Microbial Source Tracking: Methods, Applications, and Case Studies**. 1. ed. New York: springer, 2011. 642 p.

JEONG, C. H.; *et al.* 6-Gingerol Suppresses Colon Cancer Growth by Targeting Leukotriene A4 Hydrolase. **Cancer Research**, v. 69, p. 5585-5591, 2009.

LEE, H.; SEO, E.; KANG, N.; KIM, W. 6-Gingerol Inhibits Metastasis of MDA-MB-231 Human Breast Cancer Cells. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 19, p. 313-319, 2008.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX. M. M. **Princípios de Bioquímica**, 4 ed. Editora Artmed, 2006. 1274 p.

LIOU, GUEY-YUH.; *et al.* Polyphasic approach to the taxonomy of the *Rhizopus stolonifer* group. **Mycological Research III**, p. 196-203, 2007.

MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; PARKER, J. **Microbiologia de Brock**. 12. ed. São Paulo: Artmed, 2004. 1160p.

MARTINS, L. R. **Avaliação do Potencial Biotecnológico de Fungos Brasileiros em Reações de Biotransformação e Biorremediação**. 2009. Tese (Doutor em Ciências – Química) – Departamento de Química do Instituto de Ciências Exatas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2006.

MONTE, F. J. Q.; DANTAS, E. M. G.; BRAZ-FILHO, R. New diterpenoids from *Croton argyrophyloides*. **Phytochemistry**, v. 27, n. 10, p. 3209-3212, 1988.

MUSTAFA, T.; SRIVASTAVA, K.; Ginger (*zingiber officinale*) in migraine headache. **Journal of Ethnopharmacology**, 29. v, p. 267-273, 1990.

PARK, YON JUNG; *et al.* 6-Gingerol Induces Cell Cycle Arrest and Cell Death of Mutant - expressing Pancreatic Cancer Cells. **Yonsei Medical Journal**, v. 47, p. 688-697, 2006.

RAVEN, P. H. **Biologia Vegetal**. São Paulo: Guanabara, 2001. 297 p.

SANTOS, T. C.; TOMASSINI, T. C. B.; CABRAL, L. M. Estudos Preliminares Sobre a Constituição Química e Atividade Antimicrobiana de *Mikania glomerata* Sprengel. **Revista Brasileira de Farmacia**, v. 79, p. 54-55, 1998.

SCHIPPER, M. A. A. A Revision of the Genus *Rhizopus*. I. The Rh. Stolonifer-group and *R. oryzae*. **The Mycological Society of America, Lawrence**, p. 714–722, 2007.

SILVA, E. A.; *et al.* The biotransformation of ent-kaur-16-en-19-oic acid by *Rhizopus stolonifer*. **Phytochemistry**, v. 52, p. 397-400, 1999.

SILVA, J. A.; *et al.* Purification and differential biological effects of ginger-derived substances on normal and tumor cell lines. **Journal of Chromatography B**, 2012.

SILVA, J. A. **Busca de Inibidores da Catepsina K em Plantas Medicinais Utilizadas no Tratamento de Doenças Osteoarticulares**. 2011. Tese (Doutor em Ciências – Química Orgânica) – Departamento de Química do Instituto de Ciências Exatas e de Tecnologia Universidade de São Carlos departamento de química, universidade Federal de São Carlos, São Paulo, 2011.

TAKAHASHI, P.; *et al.* Biotransformation of 6-gingerol and 6-shogaol by *Aspergillus niger* . **Elsevier Science**, 34. v, p. 1497-1500 , 1993.

TALARO, A.; KATHLEEN, P. **Foundations in Microbiology**. 8 ed. McGraw-Hill College, 420 p. 2009.

Thermotolerant *Rhizopus* Fungi. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 106, p. 541-546, 2008.

VARGA, J.; *et al.* Degradation of ochratoxin A and other mycotoxins by *Rhizopus* isolates. **International Journal of Food Microbiology**, v. 99, p. 321-328, 2005.

VIEIRA, H.S.; TAKAHASHI, J. A. E.; BOAVENTURA, M. A. D.; Biotransformation of methyl ent-17-hydroxy-16 β -kauran-19-oate by *Rhizopus stolonifer*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 53, p. 601-604, 2000.

WANG, L. K.; *et al.* **Environmental Biotechnology**. 10. ed. New York: Humana Press, 2010. 794 p.