

UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PRODUTOS NATURAIS
E SINTÉTICOS BIOATIVOS

CAROLINE DUARTE SIQUEIRA

BIOTRANSFORMAÇÃO DE DITERPENOS UTILIZANDO CULTURAS DE
FUNGOS ENDOFÍTICOS E FILAMENTOSOS

João Pessoa – PB
2016

CAROLINE DUARTE SIQUEIRA

**BIOTRANSFORMAÇÃO DE DITERPENOS UTILIZANDO CULTURAS DE
FUNGOS ENDOFÍTICOS E FILAMENTOSOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Paraíba, em cumprimento às exigências para obtenção do título de Doutor em Farmacoquímica de Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos.

**João Pessoa – PB
2016**

S618b Siqueira, Caroline Duarte.

Biotransformação de diterpenos utilizando culturas de
fungos endofíticos e filamentosos / Caroline Duarte
Siqueira. - João Pessoa, 2016.

235 f. : il.

Orientação: Marcelo Sobral da Silva.

Coorientação: Josean Fachine Tavares.

Tese (Doutorado) - UFPB/CCEN.

1. Farmacoquímica. 2. Biotransformação - Diterpenos. 3.
Fungos endofíticos. 4. Fungos filamentosos. 5.
Metabolismo microbiano - diterpenos. I. Silva, Marcelo
Sobral da. II. Tavares, Josean Fachine. III. Título.

UFPB/BC

CAROLINE DUARTE SIQUEIRA

**BIOTRANSFORMAÇÃO DE DITERPENOS UTILIZANDO CULTURAS DE
FUNGOS ENDOFÍTICOS E FILAMENTOSOS**

Tese aprovada em: 15/12/2017

COMISSÃO EXAMINADORA

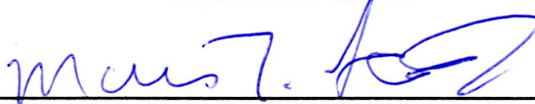


Prof. Dr. Marcelo Sobral da Silva
(Universidade Federal da Paraíba)
Orientador



Dr. Vicente Carlos de Oliveira Costa
(Universidade Federal da Paraíba)
Examinador externo

Prof. Dr. Harley da Silva Alves
(Universidade Estadual da Paraíba)
Examinador externo



Prof. Dr. Marcus Tullius Scotti
(Universidade Federal da Paraíba)
Examinador interno

Prof. Dr. Emídio Vasconcelos Leitão da Cunha
(Universidade Federal da Paraíba)
Examinador interno

À melhor parte de mim: Fágner e Júlia

AGRADECIMENTOS

À minha família, em especial minha mãe, **Egilda Guedes** e meu pai, **Ivandelson Siqueira**, por todo o suporte e dedicação ao longo da minha vida. Meus irmãos **Carine Siqueira** e **Caio Siqueira**, por todas as palavras de apoio.

Ao meu marido e maior incentivador **Fágner Araruna**, por ter me apoiado e por ter estado sempre presente, mesmo distante, me fornecendo forças para suportar a sua ausência e da nossa filha.

Ao meu orientador **Prof. Marcelo Sobral** e coorientador **Prof. Josean Fechine Tavares** pelo aprendizado, apoio e incentivo nesses quase sete anos de convivência, pela imensurável contribuição proporcionada no nosso trabalho em conjunto.

A todas as amigas que pude construir durante toda a pós-graduação na UFPB, em especial a **Rafaela, Élida, Hellane, Madalena, Sara, Clarice, Ana Silvia, Camila, Jacqueline, Jessica e Paula**. Muito grata por todos os bons momentos.

Ao meu supervisor no doutorado sanduíche, **Prof. Isidro Collado**, pela oportunidade e ensinamentos adquiridos e por todo o suporte, compreensão e carinho dados na minha instância na *Universidad de Cádiz*.

Aos meus colegas na *Universidad de Cádiz*. Me alegro mucho de tenerlos conocido.

A minha supervisora na Universidade de São Paulo (USP-RP), Profa. **Mônica Talarico Puppo**, sem a qual seria impossível a realização desse trabalho. Sou extremamente grata, tanto pela oportunidade de trabalhar ao lado de uma profissional extremamente competente, como por ter conhecido uma pessoa tão incrível.

Aos meus amigos de Ribeirão Preto: **Luís, Edgar, Cláudia, Fernanda, Maurício, Rafael, Taís, Carla, Weilan, Ana Morotti, Rita, “Ariel”, Talita, Ana Hartman, Susi, Paulo**. Estando longe da minha família, eles preencheram um espaço necessário.

A todos os professores do PgPNSB, por contribuírem para minha formação acadêmica.

À **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)** e ao **Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)** pelo apoio financeiro concedido.

RESUMO

SIQUEIRA, C. D. **Biotransformação de diterpenos utilizando culturas de fungos endofíticos e filamentosos.** 2016. Tese. Universidade Federal da Paraíba- UFPB, João Pessoa, PB.

Biotransformações são reações de compostos orgânicos realizadas por microorganismos, plantas ou enzimas isoladas. A transformação de um composto em particular pode ser realizada em grupos funcionais com ou sem degradação de seu esqueleto. Os microorganismos são amplamente utilizados em estudos de metabolismo, uma vez que catalisam reações químio-, régio- e estereoespecíficas, que muitas vezes são semelhantes às catalisadas pelos seres humanos. Neste contexto, este trabalho teve o objetivo de estudar o metabolismo microbiano de três diterpenos com esqueletos estemodano, traquilobano e latirano, utilizando fungos endofíticos e filamentosos. Foram realizados experimentos de biotransformação da afidicolina com os fungos *Cunninghamella echinulata* ATCC 8688^a, *Chaetomium globosum* ATCC 56726, *Beauveria bassiana* ATCC 7159 e o endofítico *Penicillium crustosum* VR4. Dos microorganismos utilizados, apenas *Chaetomium globosum* ATCC 56726 originou um derivado 3-ceto, já conhecido e principal produto de metabolização *in vivo*. Na incubação do *ent-7 α* -acetoxitraquiloban-18-oico, utilizou-se o fungo *Mucor rouxii* NRRL 1894, a qual originou um C-17 hidroxiderivado. Para o terceiro substrato em estudo, o (2S*,3S*,4R*, 5R*,9S*, 11R*, 15R*) -3,5,15-triacetoxi-14-oxolatira-6 (17), (12E)-dieno, utilizou-se duas linhagens de fungos endofíticos: *Botrytis cinerea* UCA 996 e *Mucor circinelloide* NRRL 3631 (+). Apenas a fermentação com a espécie de *Mucor* originou um derivado C-8 α hidroxilado. Os dois hidroxiderivados foram relatados como inéditos na literatura.

Palavras-chave: diterpenos, biotransformação, fungos.

ABSTRACT

SIQUEIRA, C. D. **Biotransformation of diterpenes using cultures of endophytic and filamentous fungi.** 2016. Tese. Universidade Federal da Paraíba- UFPB, João Pessoa, PB.

Biotransformations are reactions of organic compounds carried out by isolated microorganisms, plants or enzymes. The transformation of a particular compound can be carried out in functional groups with or without degradation of its skeletons. Microorganisms are widely used in metabolism studies, since they catalyze chemo-, regio- and stereospecific reactions, which are often similar to those catalyzed by humans. In this context, this work had the objective of studying the microbial metabolism of three diterpenes with estemodane, trachylobane and latirane skeletons, using endophytic and filamentous fungi. Biotransformation experiments of aphidicolin with fungi *Cunninghamella echinulata* ATCC 8688^a, *Chaetomium globosum* ATCC 56726, *Beauveria bassiana* ATCC 7159 e o endofítico *Penicillium crustosum* VR4. Among the microorganisms used, only *Chaetomium globosum* ATCC 56726 gave a known 3-keto derivative and the major *in vivo* metabolising product. An incubation of the *ent-7 α -acetoxitrichiloban-18-oic*, was used the fungus *Mucor rouxii* NRRL 1894, which gave C-17 hydroxylated derivative. For the third substrate under study, (2S*,3S*,4R*, 5R*,9S*, 11R*, 15R*) -3,5,15-triacetoxy-14-oxolatirane-6 (17), (12E)-diene, two endophytic fungi strains were used: *Botrytis cinerea* UCA 996 e *Mucor circinelloide* NRRL 3631 (+). Only the fermentation with the species of *Mucor* gave a C-8 hydroxylated derivative.

Key words: diterpenes, biotransformation, fungi.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE ESQUEMAS

LISTA DE TABELAS

1 INTRODUÇÃO	26
2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	32
2.1 Diterpenos: definição, biossíntese e atividade biológica	32
2.2 Biotransformação	37
2.3 Marcos históricos da biotransformação e obtenção de importantes fármacos usados na terapêutica	40
2.4 Diterpenos como substrato de biotransformação microbiológica	44
2.4.1 Pimaranos	45
2.4.2 Abietanos	52
2.4.3 Cauranos	60
2.4.4 Beieranos	72
2.4.5 Traquilobanos	79
2.4.6 Estemodanos	82
2.4.7 Labdanos	86
2.4.8 Clerodanos	104
2.5 Diterpenos utilizados no estudo como substratos de biotransformação	107
3. OBJETIVOS	112
3.1 Objetivo geral	112
3.2 Objetivos específicos	112
4. MATERIAIS E MÉTODOS	114
4.1 Materiais	114
4.1.1 Materiais e equipamentos cromatográficos	114
4.1.2 Vidrarias e demais equipamentos de laboratório	116
4.1.3 Meios de cultura	116
4.2 Métodos	118

4.2.1 Obtenção dos substratos de biotransformação	118
4.2.2 Procedimentos gerais de biotransformação	120
4.2.3 Experimentos de biotransformação da afidicolina	123
4.2.3.1 Experimentos de biotransformação da afidicolina em pequena escala pelos fungos <i>Cunninghamella echinulata</i> ATCC 8688 ^a , <i>Beauveria bassiana</i> ATCC 7159 e <i>Chaetomium globosum</i> ATCC 56726	124
4.2.3.2 Experimentos de biotransformação em pequena escala da afidicolina pelo fungo endofítico <i>Penicillium crustosum</i> VR4	125
4.2.3.3 Procedimentos de biotransformação da afidicolina em escala ampliada	125
4.2.4 Experimentos de biotransformação do ácido <i>ent</i> -7 α -acetoxitraquiloban-18-oico (T-360) pelo fungo <i>Mucor rouxii</i> NRRL 1894	126
4.2.5 Experimentos de Biotransformação do (2S*, 3S*, 4R*, 5R*, 9S*, 11R*, 15R*)-3,5,15-triacetoxi-14-oxolatira-6(17),(12E)-dieno (EBOE-12)	127
4.2.5.1 Experimentos de Biotransformação do (2S*, 3S*, 4R*, 5R*, 9S*, 11R*, 15R*)-3,5,15-triacetoxi-14-oxolatira-6(17),(12E)-dieno (EBOE-12) pelo fungo <i>Mucor circinelloide</i> NRRL 3631 (+)	127
4.2.5.2 Experimentos de Biotransformação do (2S*, 3S*, 4R*, 5R*, 9S*, 11R*, 15R*)-3,5,15-triacetoxi-14-oxolatira-6(17), (12E)-dieno (EBOE-12) pelo fungo <i>Botrytis cinerea</i> UCA996	128
4.3 Avaliação dos perfis químicos dos extratos de biotransformação	128
4.4 Isolamento dos metabólitos de biotransformação	129
4.4.1 Fracionamento do Extrato Bruto obtido da Biotransformação da afidicolina com o fungo <i>Chaetomium globosum</i> ATCC 56726	129
4.4.2 Fracionamento do Extrato Bruto obtido da biotransformação do <i>ent</i> -7 α -acetoxitraquiloban-18-oico (T-360) com o fungo <i>Mucor rouxii</i> NRRL 1894	131
4.4.3 Fracionamento do Extrato Bruto obtido da biotransformação do diterpeno EBOE-12 com o fungo <i>Mucor circinelloide</i> NRRL 3631 (+)	132
5. RESULTADOS	135
5.1 Afidicolina	135
5.1.1 Biotransformação da afidicolina com o fungo <i>Cunninghamella echinulata</i> ATCC 8688 ^a	135

5.1.2 Biotransformação da afidicolina com fungo <i>Chaetomium globosum</i> ATCC 56726	137
5.1.3 Identificação estrutural da substância de partida afidicolina	139
5.1.4 Identificação estrutural do produto de biotransformação da afidicolina com o fungo <i>Chaetomium globosum</i> ATCC 56726 – SUBSTÂNCIA 1	146
5.2 Ácido <i>ent</i> -7 α -acetoxytraquiloban-18-oico (T-360)	157
5.2.1 Identificação estrutural da substância de partida ácido <i>ent</i> -7 α -acetoxytraquiloban-18-oico (T-360)	159
5.2.3 Identificação estrutural do produto de biotransformação do T-360 com o fungo <i>Mucor rouxii</i> NRRL 1894 – SUBSTÂNCIA 2	163
5.3 (2S*,3S*,4R*,5R*,9S*,11R*,15R*) -3,5,15- triacetoxi- 14-oxolatira-6(17),(12E)-dieno (EBOE-12)	176
5.3.1 Identificação estrutural da substância de partida (2S*,3S*,4R*, 5R*,9S*,11R*, 15R*) -3,5,15- triacetoxi-14- oxolatira-6(17), (12E)-dieno (EBOE-12)	176
5.3.2 Identificação estrutural do produto de biotransformação de EBOE-12 com o fungo <i>Mucor circinelloide</i> – SUBSTÂNCIA 3	181
6. CONCLUSÕES	196
REFERÊNCIAS	198

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E FÓRMULAS

AcOEt	Acetato de Etila
ATCC	American Type culture collection
CC	Cromatografia em Coluna
CCDA	Cromatografia em Camada Delgada Analítica
CCDP	Cromatografia em Camada Delgada Preparativa
CDCl ₃	Clorofórmio deuterado
CD ₃ OD	Metanol Deuterado
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
<i>d</i>	Dubleto
<i>dd</i>	Duplodubleto
DMAPP	Dimetilalil difosfato
EEB	Extrato Etanólico Bruto
ESI	Electrospray Ionization
EtOH	Etanol
GGPP	Geranilgeranil difosfato
COSY	Correlation Spectroscopy
NOESY	Nuclear Overhauser Enhancement Spectroscopy
Hex	Hexano
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Correlation
HMQC	Heteronuclear Multiple Quantum Coherence
HSQC	Heteronuclear Single Quantum Coherence
IPP	Isopentinilalil Difosfato
<i>J</i>	Constante de acoplamento
MeCN	Acetonitrila
<i>m</i>	Multiplete
PDA	<i>potato dextrose ágar</i>
PDB	<i>potato dextrose both</i>
ODS	octadecilsilanol
ppm	Partes por milhão

RMN ^{13}C	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono-13
RMN ^1H	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio-1
UCA	Universidad de Cádiz
s	Singleto
δ	Deslocamento químico

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1.	Produtos naturais derivados de plantas utilizados na terapêutica.....	26
FIGURA 2.	Fármacos de origem natural utilizados na terapia anti-câncer.....	27
FIGURA 3.	Produtos naturais de origem microbiana utilizados na terapêutica	29
FIGURA 4.	Principais tipos estruturais de diterpenos, associados ao seu número de ciclos (Dev and Misra, 1985)	35
FIGURA 5.	Derivados bioativos da cortisona.	42
FIGURA 6.	Estereoisômeros naturais dos diterpenos pimaranos	45
FIGURA 7.	Diversidade estrutural de diterpenos abietanos.....	52
FIGURA 8.	Reações de hidroxilação catalisadas por diferentes fungos na estrutura do ácido dihidroabiético (83).....	56
FIGURA 9.	Estruturas da tanxinona IIA (85), sorbicilinol (115) e tanxisorbicina (116), bem como as correlações de HMBC (meia seta) e COSY (ligação) de (116).....	58
FIGURA 10.	Exemplos de fungos capazes de hidroxilar tanto a face α quanto a face β do mesmo carbono nos diterpenos caurânicos.....	62
FIGURA 11.	Estrutura química dos derivados caurânicos β , β (129-131) e β , α (132) diois vicinais, obtidos pelo fungo <i>Gibberella fujikuroi</i>	64
FIGURA 12.	Produtos dihidroxilados nos carbonos C-11 e C-13	65
FIGURA 13.	Ácido 15 α -hidroxi-grandiflorenico (159) e seus produtos de biotransformação resultantes da incubação com o fungo <i>Fusarium fujikuroi</i>	69
FIGURA 14.	Ácido 15 α -hidroxi- <i>ent</i> -cauran-9 (11),16-dien-19-oico (166) e seus produtos de biotransformação resultantes da incubação	

	com o fungo <i>Fusarium fujikuroi</i>	70
FIGURA 15.	7-oxo-ent-cauran-16-eno (176) e seus produtos de rearranjo formados na incubação com o fungo <i>Gibberella fujikuroi</i>	71
FIGURA 16.	Ácido <i>ent</i> -traquiloban-18-oico e seus produtos de biotransformação obtidos pela fermentação com o fungo <i>Rhizopus stolonifer</i>	80
FIGURA 17.	Estrutura química da Estemodina (263) e Afidicolina (264).....	82
FIGURA 18.	Estrutura química da Estemodina (263) e seus derivados hidroxilados, obtidos por biotransformação utilizando diferentes espécies de fungos.....	83
FIGURA 19.	Estruturas químicas de substratos e produtos estemodanos, com diferentes padrões de hidroxilação, obtidos pela fermentação com o fungo <i>Rhizopus oryzae</i>	85
FIGURA 20.	Metabólitos predominantemente produzidos na biotransformação do Esclareol (296) por diversas espécies de microorganismos	87
FIGURA 21.	Estereoisômeros naturais do Manoil óxido	91
FIGURA 22.	Semelhança estrutural entre a Forscolina (312) e alguns derivados do Manoil óxido: Jhanol (313), Jhanidiol (321) e 1-oxo-jhanol (326).....	92
FIGURA 23.	Ribenona (346) e metabólitos obtidos da sua biotransformação pelos fungos <i>Curvularia lunata</i> , <i>Fusarium moniliforme</i> , <i>Gibberella fujikuroi</i> e <i>Mucor plumbeus</i>	98
FIGURA 24.	Ribenol (349) e metabólitos obtidos de sua biotransformação pelos fungos <i>Gibberella fujikuroi</i> , <i>Curvularia lunata</i> e <i>Fusarium moniliforme</i>	99
FIGURA 25.	Varodiona (405) e seus derivados, obtidos por biotransformação com diferentes espécies de fungos.....	103
FIGURA 26.	Comparativo envolvendo microorganismos utilizados em Biotransformação.....	106
FIGURA 27.	Estutura química da Afidicolina.....	107

FIGURA 28.	Estrutura química do ácido <i>ent-7α-acetoxitraquiloban-18-oico</i> (T-360).....	108
FIGURA 29.	Estrutura química do (2S*, 3S*, 4R*, 5R*, 9S*, 11R*, 15R*) 3, 5, 15-triacetoxi -14 -oxolatira- 6(17), (12E) -dieno (EBOE-12) ...	109
FIGURA 30.	Esquema geral das etapas de biotransformação dos substratos	122
FIGURA 31.	Metodologia utilizada para experimentos de biotransformação. a) retirada de plugs contendo o micélio do fungo para inóculo em meio de cultura pré-fermentativo próprio; b) incubação dos frascos testes e controles contendo meio pré-fermentativo, em shaker rotativo; c) crescimento micelial observado; d) transferência do micélio para meio fermentativo próprio e adição de substrato, em ambiente asséptico; e) filtração do micélio e partição dos caldos das culturas em funil de separação.....	123
FIGURA 32.	Cromatograma da afidicolina pura (CLAE-ELSD).....	135
FIGURA 33.	Sobreposição dos Cromatogramas da afidicolina pura (preto), teste (azul) e controle (vermelho) nos tempos de a) 24 horas; b) 48 horas; c) 72 horas; d) 96 horas; e) 120 horas; f) 144 horas; g) 166 horas. h) escala ampliada no tempo de 96 horas.....	136
FIGURA 34.	Sobreposição dos Cromatogramas da afidicolina pura (preto), teste (azul) e controle (verde) nos tempos de a) 24 horas; b) 48 horas; c) 72 horas; d) 96 horas; e) 120 horas; f) 144 horas; g) 166 horas. h) escala ampliada no tempo de 48 horas.....	138
FIGURA 35.	Espectro de RMN ¹ H (500 MHz, CD ₃ OD) da afidicolina.....	141
FIGURA 36.	Espectro de RMN ¹³ C (125 MHz, CD ₃ OD) da afidicolina	142
FIGURA 37.	Mapa de contorno de HMBC (500MHz, CD ₃ OD) da afidicolina..	143
FIGURA 38.	Mapa de contorno HMQC (500MHz, CD ₃ OD) da afidicolina.....	144

FIGURA 39.	Espectro de COSY (500 MHz, CD ₃ OD) da afidicolina.....	145
FIGURA 40.	Espectro de RMN ¹ H (500 MHz, CDCl ₃) da substância 1	148
FIGURA 41.	Expansão do espectro de RMN ¹ H (500 MHz, CDCl ₃) da substância 1 (0,7-3.7 ppm).....	149
FIGURA 42.	Mapa de contorno de HMBC (500 MHz/125 MHz, CDCl ₃) da substância 1	150
FIGURA 43.	Expansão de HMBC (500 MHz/125 MHz, CDCl ₃) da substância 1 (0-4,2)	151
FIGURA 44.	Mapa de contorno de HMQC (500 MHz/125 MHz, CDCl ₃) da substância 1.....	152
FIGURA 45.	Expansão de HMQC (500 MHz/125 MHz, CDCl ₃) da substância 1 (5-75/0-4,0).....	153
FIGURA 46.	Espectro de COSY (500 MHz/125 MHz, CDCl ₃) da substância 1	154
FIGURA 47.	Expansão do espectro de COSY (500 MHz MHz, CDCl ₃) da substância 1 (0-4,0).....	155
FIGURA 48.	a) Cromatograma obtido em CLAE reciclante da purificação da fração proveniente da reunião dos extratos de biotransformação do T-360 com o fungo <i>M. rouxii</i> NRRL 1894; b) ampliação 1 (25-275 min); c) ampliação 2 (275-525 min); d) ampliação 3 (575- 925 min).....	158
FIGURA 49.	Espectro de RMN ¹³ C BB (125 MHz, CDCl ₃ do ácido <i>ent</i> -7 α -acetoxitraquiloban-18-oico (T-360)	161
FIGURA 50.	Espectro de RMN ¹ H (500 MHz, CDCl ₃) do ácido <i>ent</i> -7 α -acetoxitraquiloban-18-oico (T-360).....	162
FIGURA 51.	Espectro de ¹ H RMN (500 MHz, CD ₃ OD) da substância 2.....	165
FIGURA 52.	Expansão do espectro de ¹ H RMN (500 MHz, CD ₃ OD) da substância 2 (0.8-2.2 ppm).....	166
FIGURA 53.	Espectro de ¹³ C RMN (125 MHz, CD ₃ OD) da substância 2	167
FIGURA 54.	Expansão do espectro de ¹³ C RMN (500 MHz, CDCl ₃) da	

	substância 2 (15.0-80.0 ppm).....	168
FIGURA 55.	Mapa de contorno de HMBC (500 MHz/ 125 MHz, CD ₃ OD) da substância 2.....	169
FIGURA 56.	Expansão de HMBC (500 MHz/125 MHz, CD ₃ OD) da substância 2 (15-60/1,4-3,8 ppm).....	170
FIGURA 57.	Mapa de contorno de HMQC (500 MHz, CD ₃ OD) da substância 2	171
FIGURA 58.	Expansão de HMQC (500 MHz/ 125 MHz, CD ₃ OD) da substância 2 (1,9-5,0/ 10-120 ppm)	172
FIGURA 59.	Espectro de correlação COSY (500 MHz, CD ₃ OD) da substância 2 (0.9-2.3ppm)	173
FIGURA 60.	Expansão do espectro de correlação COSY (500 MHz, CD ₃ OD) da substância 2 (0.6-2.4ppm).....	174
FIGURA 61.	Espectro de RMN ¹ H (500 MHz, CDCl ₃) de EBOE-12.....	179
FIGURA 62.	Espectro de RMN ¹³ C (125 MHz, CDCl ₃) de EBOE-12.....	180
FIGURA 63.	Espectro de RMN ¹ H (500 MHz, CDCl ₃) da substância 3.....	183
FIGURA 64.	Expansão do espectro de RMN ¹ H (500 MHz, CDCl ₃) da substância 3 (4,0-6,6 ppm).....	184
FIGURA 65.	Expansão do espectro de RMN ¹ H (500 MHz, CDCl ₃) da substância 3 (0.8-3.6 ppm).....	185
FIGURA 66.	Espectro de RMN ¹³ C (125 MHz, CDCl ₃) da substância 3.....	186
FIGURA 67.	Expansão do espectro de RMN ¹³ C (125 MHz, CDCl ₃) da substância 3 (75-205 ppm).....	187
FIGURA 68.	Expansão do espectro de RMN ¹³ C (125 MHz, CDCl ₃) da substância 3 (12-70 ppm).....	188
FIGURA 69.	Mapa de contorno de HMQC (500 MHz/125 MHz, CDCl ₃) da substância 3	189
FIGURA 70.	Expansão de HMQC (500 MHz/ 125 MHz, CDCl ₃) da substância 3 (35-90/2,1-4,5).....	190
FIGURA 71.	Espectro de COSY (500 MHz, CDCl ₃) da substância 3.....	191

FIGURA 72.	Expansão do espectro de COSY (500 MHz, CDCl_3) da substância 3 (0,5-5,5).....	192
FIGURA 73.	Espectro de NOESY (500 MHz, CDCl_3) da substância 3.....	193
FIGURA 74.	Expansão do espectro de NOESY (500 MHz, CDCl_3) da substância 3 (3,6-6,8).....	194

LISTA DE ESQUEMAS

ESQUEMA 1.	Formação dos esqueletos diterpenos por ciclização a partir da cauda da molécula de GGPP.....	33
ESQUEMA 2.	Formação do intermediário tipo labdano bicíclico, a partir da ciclização do pirofosfato de geranilgeranila (GGPP) catalizada por ácido.....	34
ESQUEMA 3.	Acilação enzimática regiosseletiva da ribavirina (20)	38
ESQUEMA 4.	Biotransformação enantiosseletiva de 2-bromo-4-fluoro-fenil acetofenona.....	39
ESQUEMA 5.	Aplicação histórica da bioatransformação na síntese da (-)-efedrina (28)	40
ESQUEMA 6.	Conversão sintética do ácido desoxicólico (29) em cortisona (30) , através de uma reação envolvendo várias etapas.....	41
ESQUEMA 7.	Biotransformação da desoxicorticosterona (31) em corticosterona (32)	41
ESQUEMA 8.	Bioconversão da progesterona (33) em 11 α -progesterona (34)	42
ESQUEMA 9.	Bioconversão da cortexolona (38) em hidrocortisol (39) , por diferentes espécies de fungos.....	43
ESQUEMA 10.	Processos industriais na síntese da L-DOPA (41) catalisada por enzimas de fungos.....	44
ESQUEMA 11.	Biotransformação do 2 α -19-dihidroxi-9-epi- <i>ent</i> -pimaran-7,15-dieno (42) e do 18-hidroxi-9-epi- <i>ent</i> -pimaran-7,15-dieno (43) por <i>Gibberella fujikuroi</i>	47
ESQUEMA 12.	Biotransformação do 9,13-epi- <i>ent</i> -pimaran-7,15-dieno (56) pelo fungo <i>Gibberella. fujikuroi</i>	48
ESQUEMA 13.	Biotransformação do ácido 13-epi- <i>ent</i> -pimaran-9(11)-dieno-19-oico (58) e 19-hidroxi-13-epi- <i>ent</i> -pimaran-9(11),15-dieno (59) por <i>Gibberella fujikuroi</i>	49

ESQUEMA 14.	Biotransformação do ácido <i>ent</i> -pimaran-8(14),15-dien-19-oico (68) e do <i>ent</i> -8(14),15-pimarandieno (72) , por diferentes espécies de fungos.....	50
ESQUEMA 15.	Biotransformação do ácido <i>ent</i> -pimaran-dienoico (78) pelo fungo <i>Aspergillus niger</i>	51
ESQUEMA 16.	Biotransformação do metil-dehidroabietano (86) e 7-oxo-metil-dehidroabietano (89) pelo fungo <i>Corticum sasakii</i>	53
ESQUEMA 17.	Biotransformação do dehidroabietol (92) e teideadiol (93) por <i>Mucor plumbeus</i>	54
ESQUEMA 18.	Biotransformação do ácido dehidroabiético (83) , pelos fungos <i>Trametes Versicolor</i> e <i>Phlebiopsis gigantea</i>	55
ESQUEMA 19.	Biotransformação do ácido carnósico (84) pela bactéria <i>Nocardia sp.</i> , e via proposta para formação dos produtos (112) , (113) e (114)	57
ESQUEMA 20.	Biotransformação da Criptotanxinona (117) pelo fungo <i>Cunningamella elegans</i>	59
ESQUEMA 21.	Biotransformação do 15 α -hidroxi-3-oxo- <i>ent</i> -cauran-16-eno (121) pelo fungo <i>Gibberella fujikuroi</i>	63
ESQUEMA 22.	Biotransformação do 7-oxo- <i>ent</i> -caur-16-eno (123) pelo fungo <i>Gibberella. Fujikuroi</i>	63
ESQUEMA 23.	Biotransformação do ácido <i>ent</i> -15 β -hidroxicauran-9 (11),16-dien-19-oico (127) pelo fungo <i>Fusarium Fujikuroi</i>	64
ESQUEMA 24.	Exemplos de hidroxilação estereosseletiva no carbono metínico C-9, utilizando diferentes espécies de fungos.....	66
ESQUEMA 25.	Biotrasformação de 15 α ,18-dihidroxi- <i>ent</i> -cauran-16-eno (144) e 15 α , 19-dihidroxi- <i>ent</i> -cauran-16-eno (151) pelo fungo <i>Mucor plumbeus</i>	68
ESQUEMA 26.	Produtos de rearranjo formados na Biotransformação do esteviol-16 α ,17-epóxido (182) pelos fungos <i>Cunninghamella baineri</i> e <i>Streptomices griseus</i>	72

ESQUEMA 27.	Biotransformação do isosteviol oxima (221) pelos fungos <i>Aspergillus niger</i> e <i>Absidia. pseudocylindrospora</i>	76
ESQUEMA 28.	Biotransformação do <i>ent</i> -beieran-15-en-18-ol (241) e <i>ent</i> -beieran-15-en-19-ol (242) pelo fungo <i>Mucor plumbeus</i>	78
ESQUEMA 29.	Biotransformação do traquinodiol (246) pelo fungo <i>Mucor plumbeus</i>	80
ESQUEMA 30.	Biotransformação do ácido <i>ent</i> -traquiloban-18-oico (257) pelo fungo <i>Rhizopus arrhizus</i>	81
ESQUEMA 31.	Biotransformação do Traquinol acetato (264) pelo fungo <i>Gibberella fujikuroi</i>	82
ESQUEMA 32.	Biotransformação do Esclareol (296) pelos fungos <i>Rhizopus stolonifer</i> , <i>Fusarium lini</i> e <i>Botrytis cinerea</i>	88
ESQUEMA 33.	Biotransformação do Ácido Isocuprêssico (306) pelos microorganismos <i>Nocardia aurantia</i> , <i>Cunninghamella elegans</i> e <i>Mucor mucedo</i>	90
ESQUEMA 34.	Biotransformação dos derivados de Manoil óxido: Jhanol (313) , Jhanidiol (321) e 1-oxo-jhanol (327) pelo fungo <i>Mucor plumbeus</i>	95
ESQUEMA 35.	Biotransformação dos derivados de Manoil óxido: Jhanol (313) , Jhanidiol (321) e 1-oxo-jhanol (327) pelo fungo <i>Gibberella fujikuroi</i>	96
ESQUEMA 36.	Biotransformação do 3-acetil,12-ceto Varodiol (391) pelos fungos <i>Curvularia lunata</i> e <i>Gliocladium roseum</i>	101
ESQUEMA 37.	Biotransformação do 12-ceto varodiol (396) pelos fungos <i>Fusarium moniliforme</i> e <i>Rhizopus nigricans</i>	101
ESQUEMA 38.	Biotransformação do clerodano-lactona (420) pelo fungo <i>Rhizopus stolonifer</i>	104
ESQUEMA 39.	Biotransformação do clerodano-metil éster (423) pelo fungo <i>Rhizopus stolonifer</i>	105

ESQUEMA 40.	Metodologia utilizada para obtenção do T-360 a partir das raízes de <i>Xylopi</i> <i>langsdorffiana</i>	119
ESQUEMA 41.	Metodologia utilizada para obtenção de EBOE-12 a partir do extrato acetato de <i>Euphorbia boetica</i>	120
ESQUEMA 42.	Fracionamento do Extrato Bruto obtido da Biotransformação da afidicolina com o fungo <i>Chaetomium globosum</i> em escala ampliada.....	131
ESQUEMA 43.	Fracionamento do Extrato Bruto obtido da Biotransformação de T360 com o fungo <i>Mucor rouxii</i>	132
ESQUEMA 44.	Fracionamento do Extrato Bruto obtido da Biotransformação do EBOE-12 com o fungo <i>Mucor circinelloide</i>	133

LISTA DE TABELAS

TABELA 1.	Exemplos de fungos capazes de hidroxilar esqueletos caurânicos, bem como a posição e esteoquímica das hidroxilações.....	61
TABELA 2.	Produtos de biotransformação do Isoesteviol (192).....	75
TABELA 3.	Produtos de biotransformação do isoesteviol lactona (230).....	77
TABELA 4.	Particularidades do experimento de biotransformação em pequena escala para os fungos <i>C. echinulata</i> , <i>B. bassiana</i> e <i>C. globosum</i>	124
TABELA 5.	Dados de RMN ^1H (500 MHz), ^{13}C (125 MHz), HMQC, HMBC e COSY, obtidos em CD_3OD referentes à substância de partida afidicolina	140
TABELA 6.	Dados de RMN ^1H (500 MHz), ^{13}C (125 MHz), HMQC, HMBC e COSY, obtidos em CDCl_3 referentes a substância 1.....	147
TABELA 7.	Dados de RMN ^1H (500 MHz), ^{13}C (125 MHz), HMQC, HMBC e COSY, obtidos em CD_3OD referentes à substância de partida <i>ent-7α-acetoxitraquiloban-18-oico</i> (T-360)	160
TABELA 8.	Dados de RMN ^1H (500 MHz), ^{13}C (125 MHz), HMQC, HMBC e COSY, obtidos em CD_3OD referentes a substância 2.....	164
TABELA 9.	Dados de RMN ^1H (500 MHz), ^{13}C (125 MHz), HMQC, HMBC e COSY, obtidos em CDCl_3 , referentes à substância de partida (2S*,3S*,4R*,5R*,9S*,11R*,15R*)-3,5,15-triacetoxi-14-oxolatira-6(17), (12E)-dieno (EBOE-12)	178
TABELA 10.	Dados de RMN ^1H (500 MHz), ^{13}C (125 MHz), HMQC, HMBC e COSY, obtidos em CDCl_3 , referentes a substância 3.....	182

INTRODUÇÃO

INTRODUÇÃO

Por milhares de anos, a natureza foi fonte de agentes medicinais importantes no tratamento e prevenção de doenças humanas (BAKER, 2007; CHIN, 2006), principalmente as plantas, que tiveram seu uso, muitas vezes, baseado na medicina tradicional (CRAGG; NEWMAN, 2012).

Atualmente, os produtos naturais constituem a estratégia de maior sucesso na obtenção de novos fármacos. De acordo com Cragg e colaboradores (2016), cerca da metade de todos os fármacos utilizados na terapêutica, são produtos naturais ou planejados a partir de seus metabólitos secundários, que por apresentarem ampla diversidade estrutural e importante função biológica para seus organismos produtores, assumem papel dominante na descoberta e planejamento de novos agentes farmacologicamente ativos.

Estudos clínicos, farmacológicos e químicos de plantas utilizadas na medicina popular, resultaram em fármacos importantes na terapêutica, como o antiinflamatório aspirina **(1)**, o analgésico opióide morfina **(2)**, o antimalárico quinina **(3)**, o alcaloide pilocarpina **(4)**, utilizado no tratamento de glaucoma, além do cardiotônico digitoxina **(5)** (BUTLER, 2004) (figura 1, pág. 26).

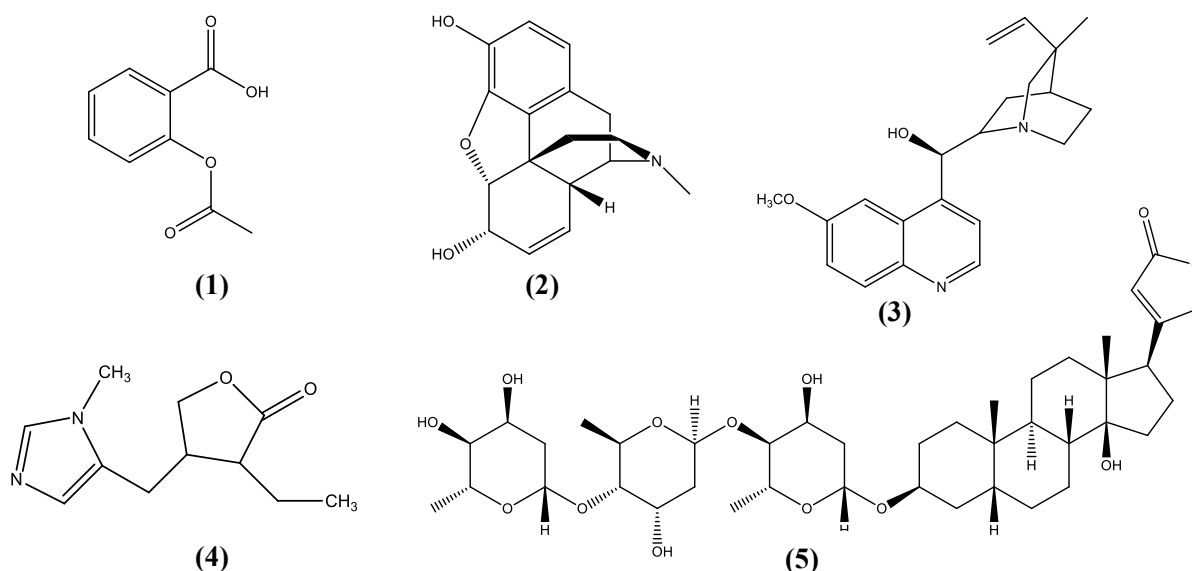


Figura 1. Produtos naturais derivados de plantas utilizados na terapêutica.

Muitas dessas substâncias, ainda constituíram modelos para o desenvolvimento de medicamentos sintéticos modernos, tais como procaína, cloroquina, tropicamida (KINGHOM; O'NEIL, 1996), ou de fármacos imprescindíveis na terapia anti-câncer como, vimblastina (Velban®) **(6)**, vincristina (Oncovin®) **(7)**, podofilotoxina e os análogos etoposídeo (VP-16-213; Vepeside®) **(8)** e teniposídeo (VM-26; Vumon®) **(9)**, taxol (Paclitaxel; Taxol®) **(10)** e mais recentemente camptotecina **(11)** e seus derivados, com participação num mercado que movimenta cerca de 50 bilhões de dólares anualmente (figura 2, pág. 27).

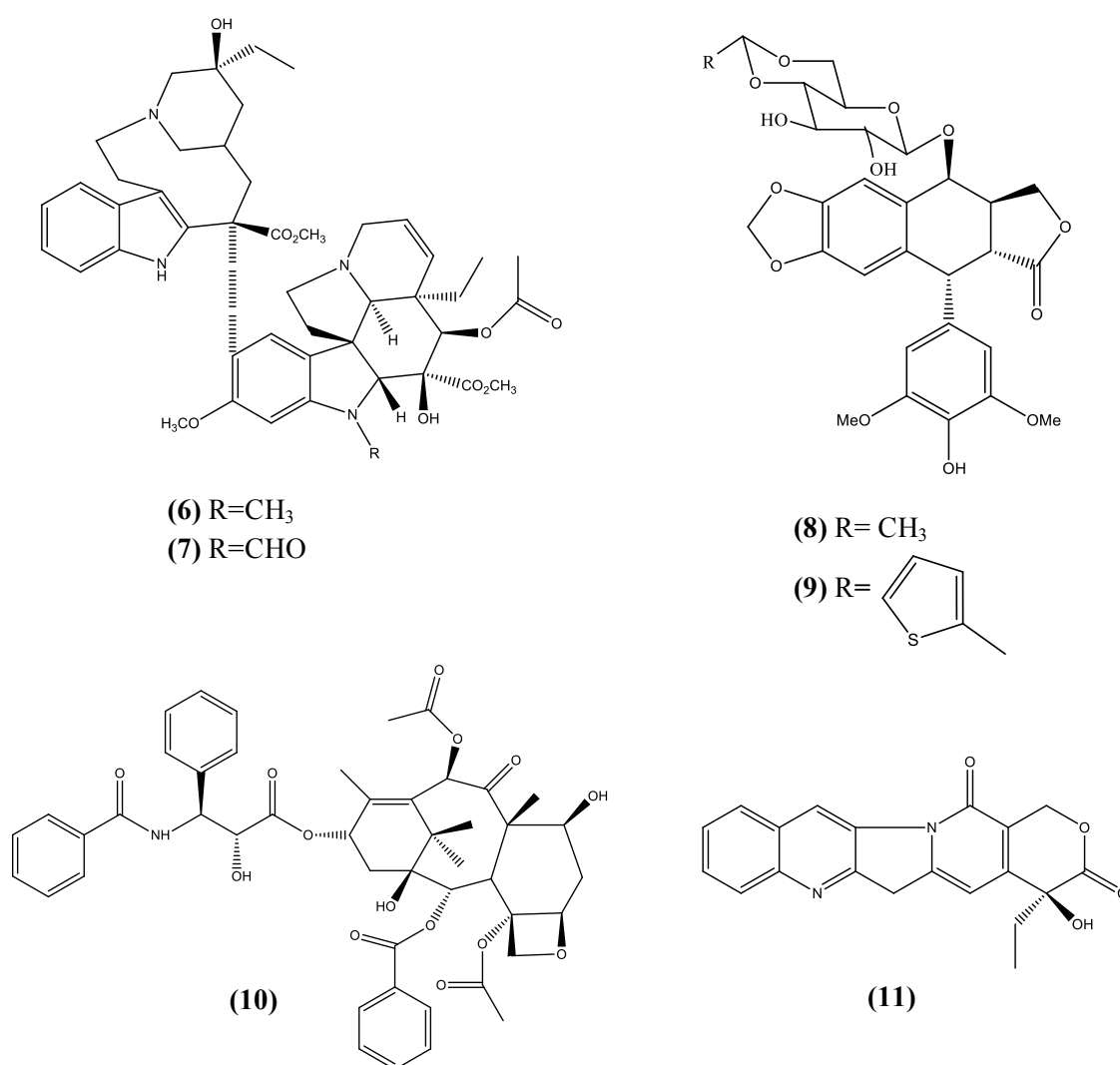


Figura 2. Fármacos de origem natural utilizados na terapia anti-câncer.

A busca por compostos produzidos por microorganismos possui um histórico mais recente que a dos produtos derivados de plantas. Os produtos naturais microbianos também representam uma apreciável fonte de estruturas químicas únicas que têm sido otimizadas durante a sua própria evolução, sendo produzidas por comunicação e em resposta a mudanças no hábitat microbiano, incluindo estresse ambiental (GUNATILAKA, 2006). Dessa forma, esse compostos possuem importante papel no processo de descoberta de fármacos (GROSS, 2009; HERTWECK, 2009; NEWMAN; CRAGG, 2016).

Dentre os medicamentos de maior repercussão para doenças infecciosas, destacam-se os antibióticos penicilinas **(12)** e cefalosporinas **(13)**, ácido clavulânico **(14)**, carbapeninas e monobactamas, tetraciclina, aminoglicosídeos, macrolídeos, lincosaminas, estreptograminas e peptídeos cíclicos; os utilizados na terapia anti-câncer, como bleomicinas, actinomicina D, mitomicina C **(15)**, antraciclina e pentostatina **(16)**; imunomoduladores ciclosporina A, rapamicina **(17)**, tacrolimus, ascomicina **(18)**, ácido micofenólico; o vasoconstrictor ergometrina **(19)**. Entretanto, entre os mais interessantes produtos naturais microbianos já descobertos estão os agentes redutores de colesterol. Esses fármacos antihiperlipidêmicos, conhecidos como estatinas, estão entre os mais vendidos no mundo, movimentando cerca de U\$12-14 bilhões por ano e incluem mevastatina **(20)** e lovastatina **(21)** de origem natural, e análogos sintéticos, como atorvastatina e sinvastatina (NEWMAN; CRAGG, 2016) (figura 3, pág. 29).

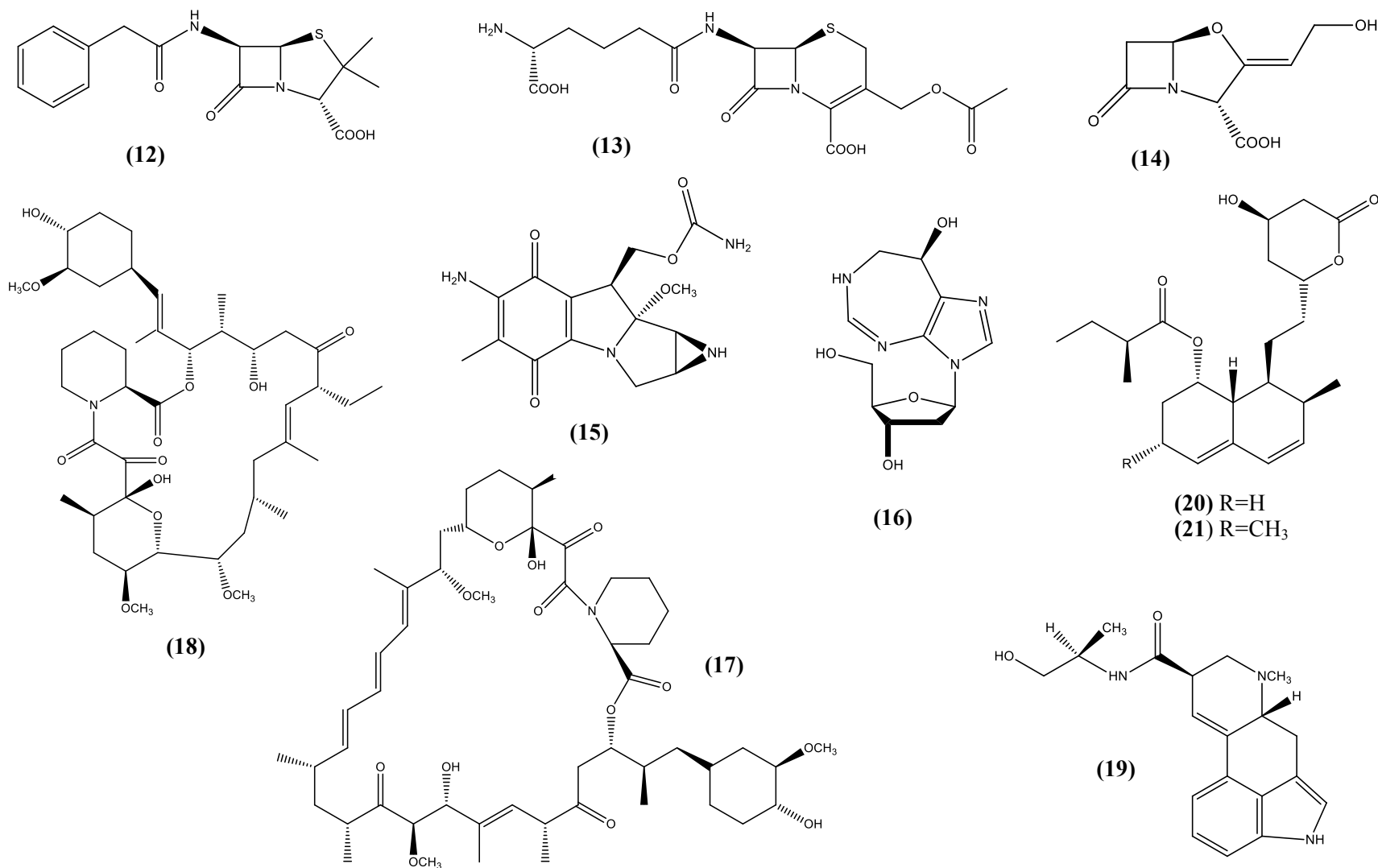


Figura 3. Produtos naturais de origem microbiana utilizados na terapêutica.

Uma vez que a natureza está continuamente desenvolvendo a sua própria versão de química combinatória, fornecendo estruturas ricas em estereoquímica, anéis concatenados e grupos funcionais reativos, a busca e aprimoramento de novos produtos, tornou-se um processo de contínua otimização (PATERSON; ANDERSON, 2005). Atrélada à pesquisa moderna relacionada à descoberta de novos fármacos e otimização de protótipos existentes, alguns métodos têm sido utilizados como estratégias de modificação molecular, a fim de aumentar a diversidade estrutural dos produtos naturais, bem como suas potencialidades biológicas. Dentre eles, a biotransformação tem se destacado no cenário da pesquisa atual (BORGES, 2009). Uma das propriedades mais importantes dos microorganismos utilizados nessas biorreações, em especial dos fungos, está associada à sua capacidade metabólica de produzir uma grande diversidade de micromoléculas bioativas, constituindo, dessa forma, metodologia extremamente importante na busca e desenvolvimento de novas entidades farmacologicamente ativas.

Diante da indiscutível diversidade química e propriedades *drug-like* (semelhantes a drogas) dos produtos naturais, associadas ao grande número de compostos derivados de fontes naturais já aprovados para uso na terapêutica, torna-se evidente que produtos naturais são uma importante fonte de estruturas chaves no processo de desenvolvimento de fármacos, e que buscar metodologías que aumentem ainda mais a sua diversidade estrutural e potencialidade terapêutica, consiste estratégia importante no âmbito da pesquisa atual.

__FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

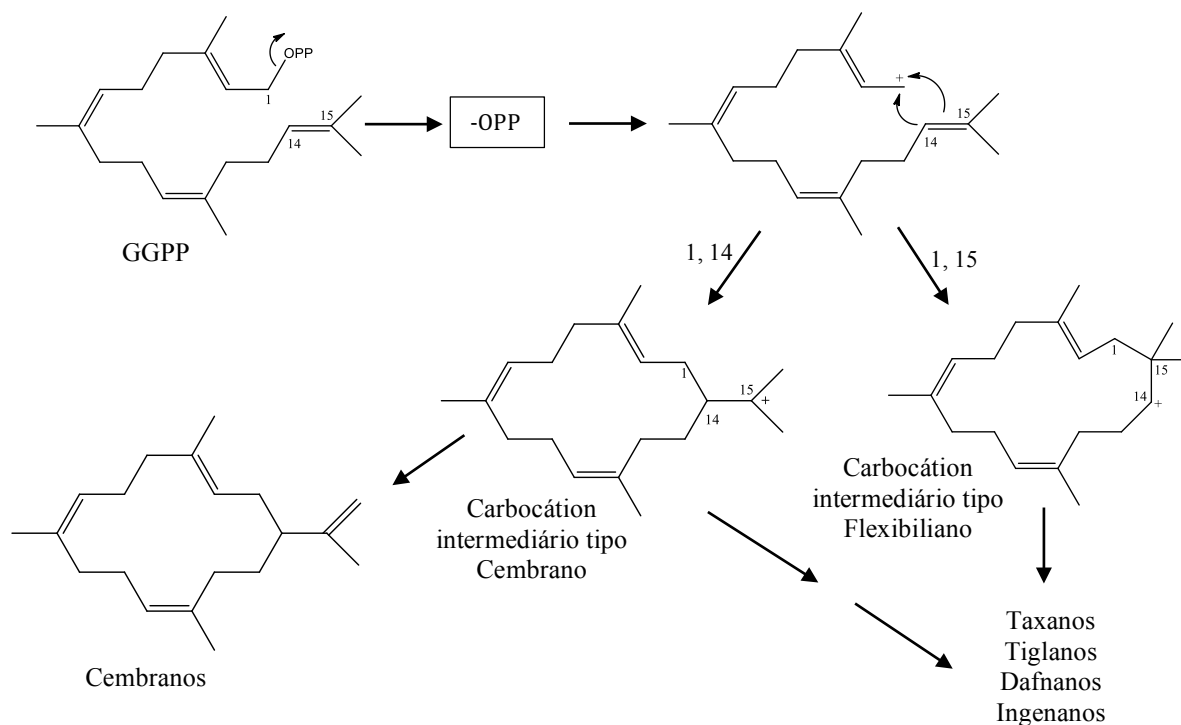
1. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 Diterpenos: definição, biossíntese e atividade biológica

Os diterpenos são uma ampla e diversificada classe de produtos naturais biosintetizados a partir do ácido mevalônico, através do pirofosfato de 2E, 6E, 10E- geranilgeranila (GGPP) (DEWICK, 2009). De acordo com o número de anéis e o padrão de ciclização de suas estruturas químicas, os diterpenos são divididos em acíclicos, bicíclicos, tricíclicos, tetracíclicos, macrocíclicos e mistos (GARCÍA, 2007; HANSON, 2006). Em termos biosintéticos, a ciclização pode ocorrer por meio de dois processos de condensação distintos, podendo ser iniciados em partes diferentes da molécula de GGPP (cabeça ou cauda).

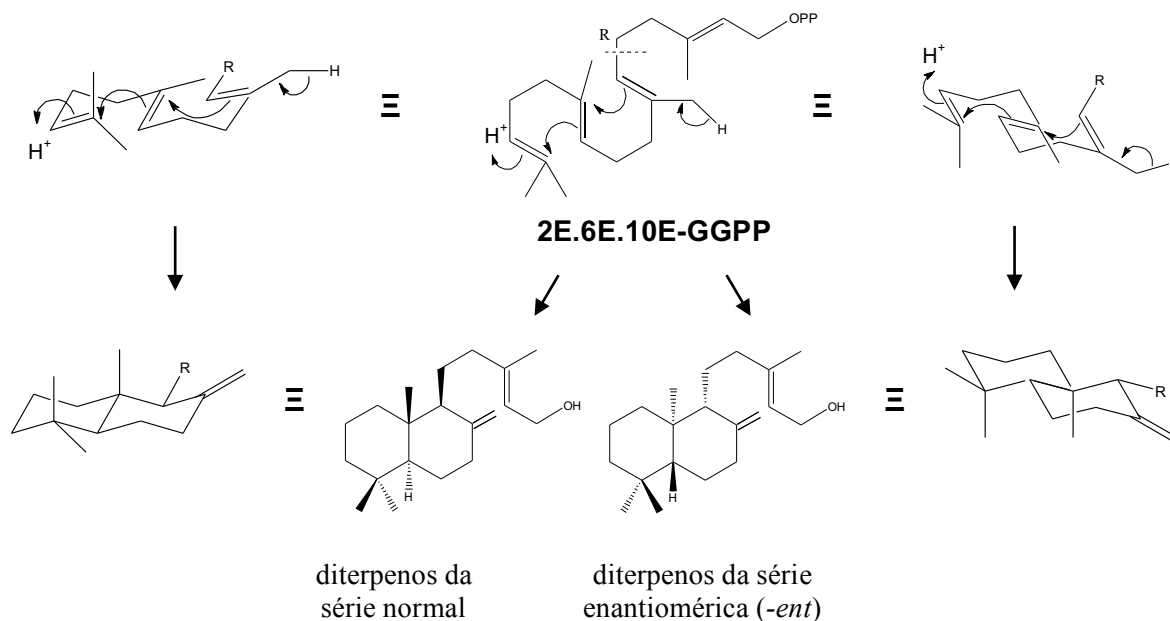
Na ciclização a partir da cauda, o grupo pirofosfato (-OPP) terminal atua como grupo abandonador, segundo um mecanismo do tipo E1, gerando um carbocátion que pode sofrer o ataque nucleofílico da nuvem π de elétrons. Uma vez que a molécula de GGPP apresenta três duplas ligações passíveis de adição, seis possíveis cátions intermediários podem ser formados a partir deste mecanismo. Apesar de todas estas possibilidades, nota-se que na natureza ocorre preferencialmente adição do carbocátion à ligação dupla da porção isopropilidênica da cabeça da molécula. No caso de ligação ao carbono C-14, ocorre formação do carbocátion intermediário tipo cembrano, originando os diterpenos do tipo cembrano após estabilização por perda de um próton. Já a adição junto ao carbono C-15 leva à formação do carbocátion intermediário tipo flexibilano, que pode ser estabilizado por substituições nucleofílicas intramoleculares, originando diterpenos policíclicos correlatos, como os taxanos, tiglanos, dafnanos e ingenanos (esquema 1, pág. 33) (GARCIA, 2007).

O principal tipo de ciclização acontece a partir da cabeça e é também designada ciclização catalisada por ácido. Esta ocorre quando dupla ligação entre os carbonos C-14 e C-15 ataca a molécula de GGPP, podendo desencadear a formação de intermediários monocíclicos, bicíclicos ou tricíclicos.



Esquema 1. Formação dos esqueletos diterpenos por ciclização a partir da cauda da molécula de GGPP.

Apesar destas possibilidades, observa-se que é o intermediário tipo labdano (bicíclico) quem desempenha um papel central na biosíntese da maioria dos diterpenos bi, tri, tetra e pentacíclicos. Um aspecto a ser ressaltado neste tipo de ciclização é a protonação inicial que ocorre na porção isopropilidênica da cabeça da molécula de GGPP, podendo originar duas séries que se distinguem enantiomericamente um do outro pela configuração dos carbonos C-5, C-9 e C-10. Convencionalmente, a série de diterpenos, cuja estereoquímica segue a dos esteroides, é denominada série “normal”, enquanto que sua imagem especular é conhecida como série “enantiomérica” (indicada como “*ent-*”). Os diterpenos da série enantiomérica são muito mais predominantes que os demais (esquema 2, pág. 34) (DEV; MISRA, 1985)



Esquema 2. Formação do intermediário tipo labdano bicíclico, a partir da ciclização do pirofosfato de geranilgeranila (GGPP) catalizada por ácido.

Invariavelmente, um novo diterpeno pode ser nomeado com base em sua fonte biológica. Entretanto, é desejável, sempre que possível, que sejam utilizados nomes semi-sistemáticos baseados em um número menor de estruturas aparentadas (DEV; MISRA, 1985). Usualmente, categorias mais gerais baseadas no número de anéis do esqueleto diterpênico são subdivididas em várias outras, de acordo com diversos tipos de esqueletos (HANSON, 2006). A figura 4 (pág. 35, 36) apresenta os principais tipos de diterpenos da série “normal” associados ao seu número de ciclos. É válido ressaltar que, a partir dos diterpenos bicíclicos é necessário inverter a configuração dos carbonos C-5, C-9 e C-10 para a obtenção dos diterpenos correspondentes da série “*enantiomérica*” (HANSON, 2006).

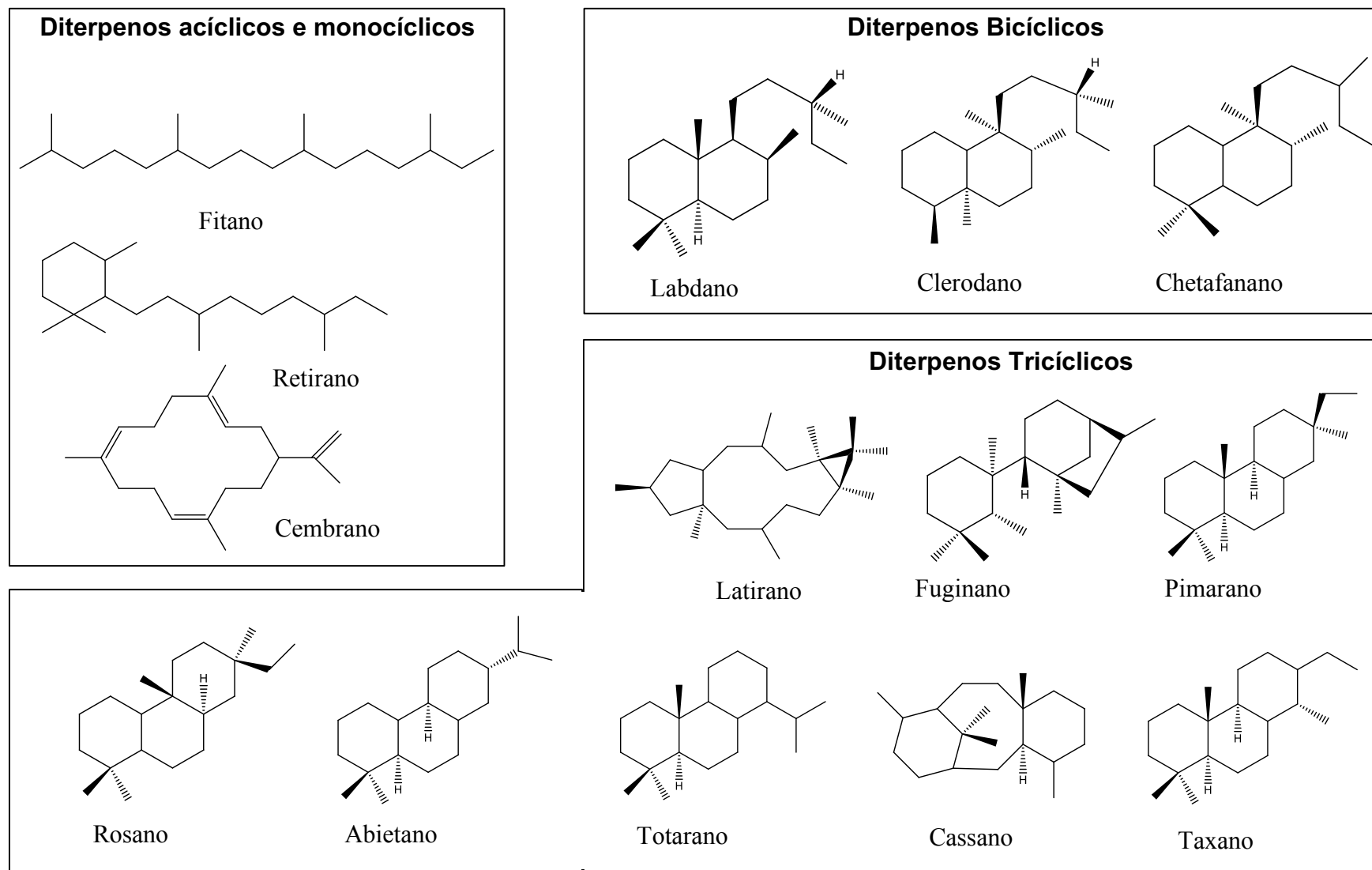


Figura 4. Principais tipos estruturais de diterpenos, associados ao seu número de ciclos (DEV; MISRA, 1985).

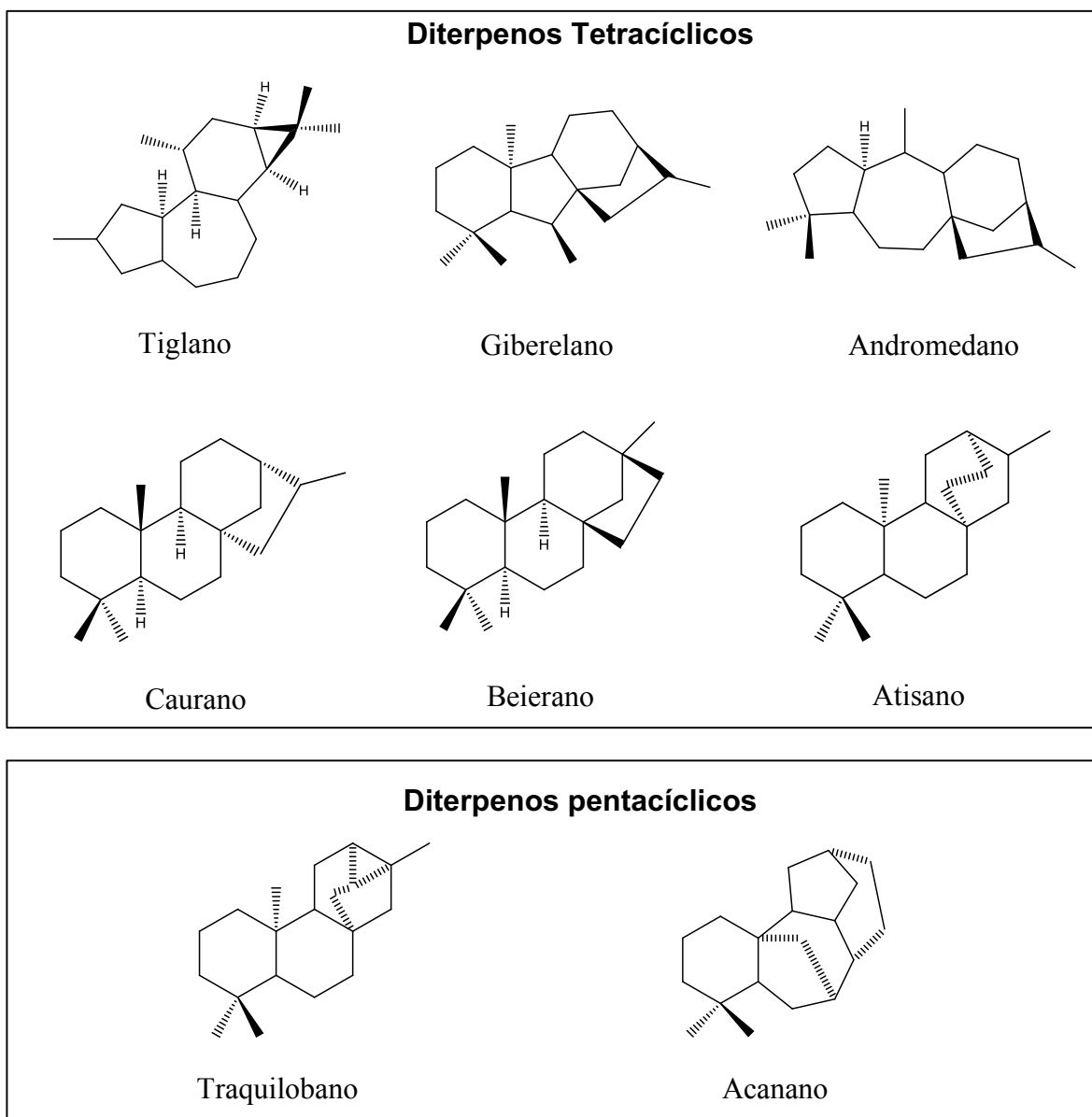


Figura 4. Cont. Principais tipos estruturais de diterpenos, associados ao seu número de ciclos (DEV; MISRA, 1985).

Por apresentarem uma grande diversidade de estruturas e funções químicas, os diterpenos possuem uma gama de atividades biológicas atribuídas na literatura. Um amplo espectro de importantes atividades biológicas é atribuído aos diterpenos, tais como antiparasitária (SEBISUBI, 2010), cardiovascular (ULUBELEN, 2002; TIRAPELLI, 2008), anti-inflamatória (KHAN, 2010; ZHENG, 2010); fitotóxica (BISIO, 2009); anticâncer (PFISTERER, 2010); antifúngica

(BECERRA, 2002); hormonal (TORRENEGRA, 2001); antioxidante (RAVEN, 2007); antiviral (WU, 1996), entre outras (WONG, 2010; ARECHE, 2009). Dentre todas as atividades, a literatura científica vem demonstrando extensivamente que muitas classes de diterpenos apresentam ação antimicrobiana significativa frente a bactérias gram positivas (TSIRI, 2009; KUZMA, 2007).

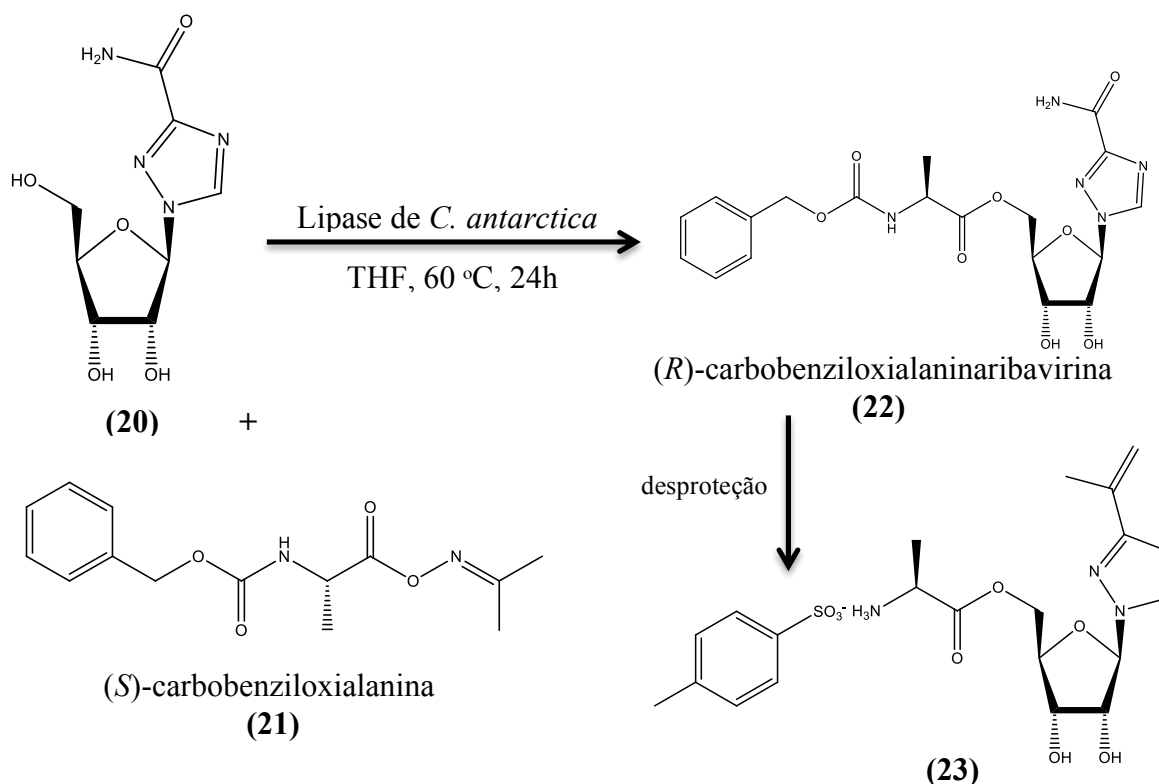
2.2 Biotransformação

Biotransformações são alterações químicas catalisadas por organismos em substâncias que não seus substratos naturais, reações essas conhecidas como metabolizações (HANSON, 1995; BARREIRO; FRAGA, 2008). Fundamenta-se na incubação do substrato com um sistema biológico enzimático, seja na forma de células íntegras (leveduras, fungos ou bactérias) ou enzimas isoladas, permitindo que as enzimas destes sistemas ajam nas substâncias para produzirem moléculas modificadas (ADRIO; DEMAÏN, 2003). As modificações químicas dão origem a novas estruturas e compostos que são difíceis de serem obtidos através da química convencional, e geralmente apresentam atividade biológica melhorada (BORGES, 2009). A molécula orgânica pode ser modificada através de transformação funcional com degradação ou não do esqueleto carbônico (FERBER, 2004).

O uso de células íntegras de microrganismos vivos, cultivados em meios apropriados, onde toda a maquinaria enzimática está disponível, pode gerar uma mistura de produtos biotransformados (GIRI, 2001). No entanto, esta metodologia é frequentemente mais barata que o uso de sistemas enzimáticos isolados (FABER, 2007). Dentre todos os sistemas de células integrais existentes, os fungos têm sido tradicionalmente os mais empregados em biotransformações (ALEU; COLLADO, 2001).

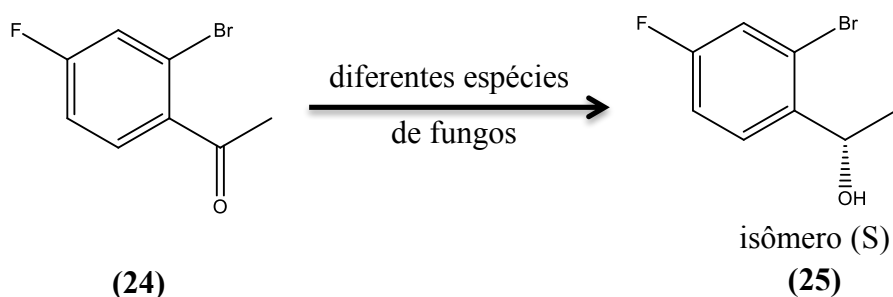
As biorreações apresentam vantagens em relação às reações químicas em que se utilizam reagentes puramente químicos, como, por exemplo, serem ecologicamente mais seguras (BOAVENTURA, 2004) e apresentarem quimio-, regio- e estereosseletividade fornecendo produtos quirais a partir de misturas racêmicas, em posições totalmente inacessíveis para reagentes comuns (GIRI,

2001). A regioseletividade de uma reação de biotransformação pode ser observada na acilação enzimática regioseletiva, empregando lipase de *Candida antarctica*, realizada na produção do éster alanina da ribavirina (**23**), um pró-fármaco desenvolvido com o objetivo de melhorar o perfil farmacocinético e diminuir os efeitos colaterais apresentados pela ribavirina (**20**), fármaco antiviral usado para tratamento da hepatite C. Nesta transformação, o isômero (S)-carbобензилoxialanina (**21**) é convertido ao isômero (R)-carbобензилoxialanina-ribavirina (**22**) pela enzima fúngica com rendimento quantitativo (esquema 3, pág. 38) (PATEL, 2008).



Esquema 3. Acilação enzimática regioseletiva da ribavirina (**20**).

No tocante a enantiosseletividade, o intermediário quiral (S)-1-(2-bromo-4-fluoro fenil) etanol **(25)**, um importante intermediário na síntese de fármacos anti-Alzheimer, foi preparado por redução microbiana enantiosseletiva da 2-bromo-4-fluoro acetofenona **(24)**. Microrganismos dos gêneros *Candida*, *Hansenula*, *Pichia*, *Rhodotorula*, *Saccharomyces* e *Sphingomonas* reduziram **(24)** em **(25)** com rendimento superior a 90% e excesso enantiomérico de 99% (esquema 4, pág. 39) (PATEL, 2008).



Esquema 4. Biotransformação enantiosseletiva de 2-bromo-4-fluoro-fenil acetofenona.

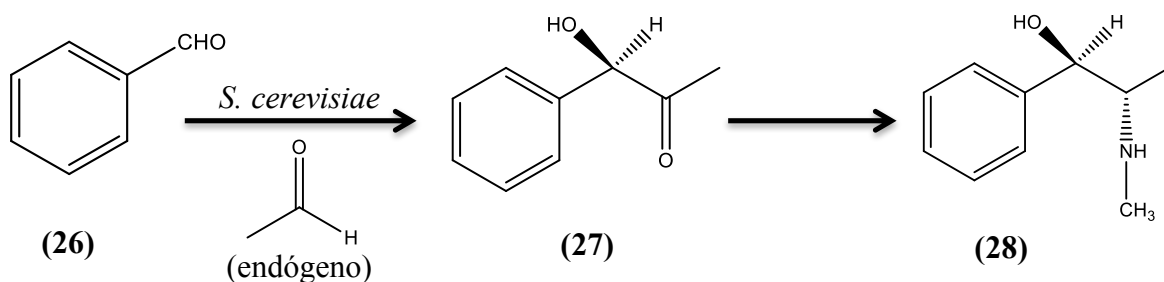
Outras vantagens das biotransformações estão relacionadas à velocidade das reações, condições de realização dos ensaios e versatilidade que estas se apresentam como catalisadores. Geralmente, as reações catalisadas por enzimas microbianas são mais rápidas do que aquelas realizadas por catálise química, as condições de reação são brandas, isto é, acidez do meio é ajustado entre pH 5 e 8, os experimentos são desenvolvidos a temperaturas entre 20 e 40°C e solventes aquosos são utilizados frequentemente (OLIVEIRA, 2012).

Além disso, as enzimas apresentam a capacidade de minimizar reações indesejáveis como decomposição, isomerização, racemização ou rearranjos inoportunos que interferem frequentemente nas metodologias químicas (HU, 1995). A principal desvantagem das reações microbianas é o rendimento, usualmente baixo (HANSON, 1995).

2.3 Marcos históricos da Biotransformação e obtenção de importantes fármacos usados na terapêutica

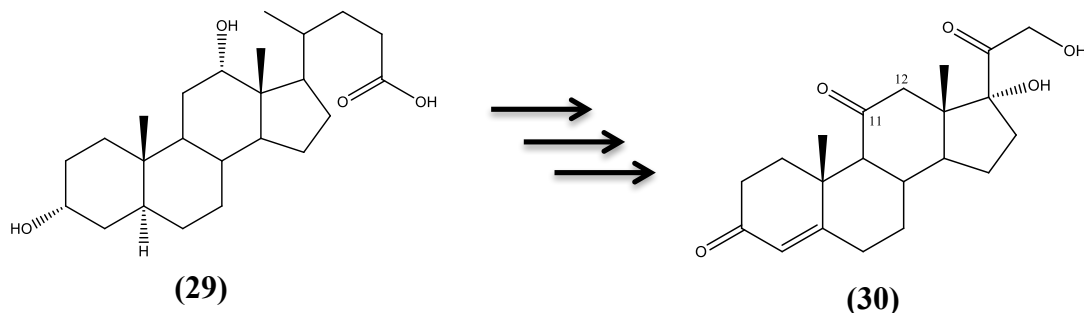
As biotransformações têm sido utilizadas desde os tempos de Pasteur e despontaram no final do século XIX com o desenvolvimento crescente de experimentos utilizando a levedura *Saccharomyces cerevisiae* (fermento de pão). (LEGRAS, 2007).

(-)-efedrina. O primeiro processo industrial combinando síntese microbiológica e química foi desenvolvido em 1921, no qual o benzaldeído (**26**) foi adicionado a um meio contendo *S. cerevisiae*, originando o cetol intermediário (**27**) por condensação com acetaldeído endógeno. Este produto apresentou aplicação industrial na síntese comercial do alcalóide (-) -efedrina (**28**), em 1934. (esquema 5, pág. 40) (VIEIRA, 2000).



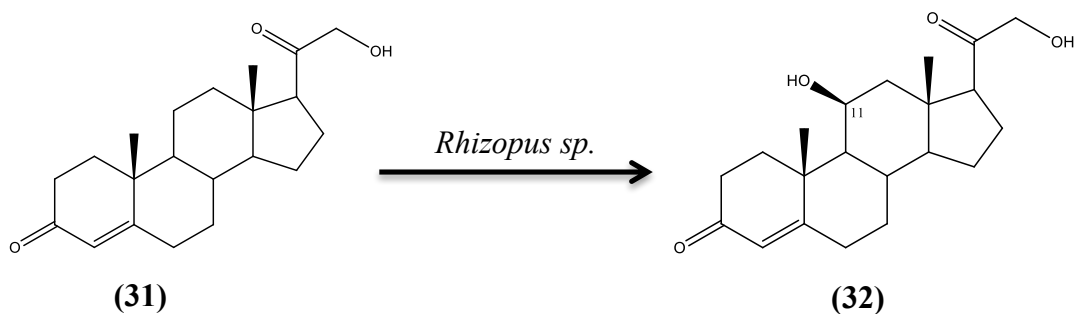
Esquema 5. Aplicação histórica da bioatransformação na síntese da (-)-efedrina (**28**).

Corticosterona. Em 1949, Hench e colaboradores anunciaram os notáveis efeitos antiinflamatórios da cortisona (**30**) no tratamento da artrite reumatoide (FRAGA, 2007). Sinteticamente, eles a produziram a partir do ácido desoxicólico (**29**) utilizando uma rota que compreendia 31 etapas, tendo como processo “crítico” a introdução de uma hidroxila na posição 11 do esqueleto esteroidal, o que tornava o preço do produto final extremamente alto e inacessível (esquema 6, pág. 41) (RUIZ, 2008).



Esquema 6. Conversão sintética do ácido desoxicólico (29) em cortisona (30), através de uma reação envolvendo várias etapas.

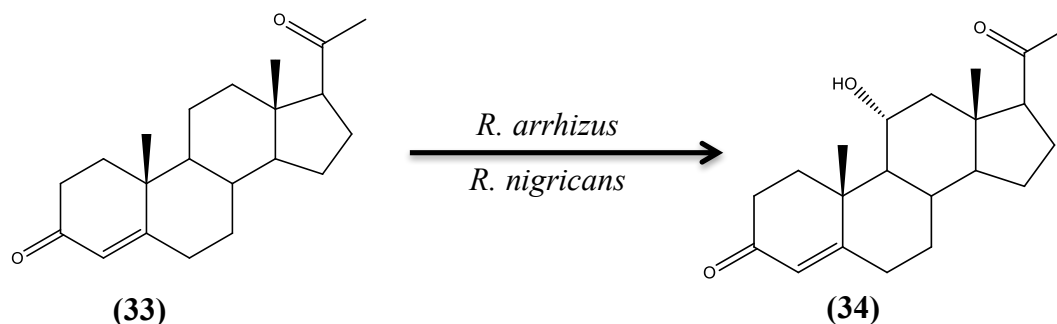
Alguns anos depois, o mesmo grupo de pesquisadores desenvolveu uma alternativa para resolver o problema, funcionalizando o carbono C-11 do esqueleto esteroidal de maneira mais simples do que a proposta sintética inicial. Utilizando o fungo *Rhizopus sp.*, a corticosterona (32), derivado da cortisona que exibiu a mesma ação antiinflamatória, foi produzida a partir da desoxicorticosterona (31) (esquema 7, pág. 41). Este processo foi utilizado pelas indústrias farmacêuticas Merck (1949) e a Schering (1951) (MUZART, 1989).



Esquema 7. Biotransformação da desoxicorticosterona (31) em corticosterona (32).

Progesterona e hormônios adrenocorticoides. Outro grande avanço na busca por alternativas à síntese química de esteroides ocorreu em 1952, quando se conseguiu funcionalizar o C-11 do esqueleto esteroidal da progesterona (33) a partir da sua conversão a 11 α -progesterona (34) pelo fungo *Rhizopus arrhizus* (MUZART, 1989; RUIZ, 2008) (esquema 8, pág. 42). Posteriormente, este fungo

foi substituído por *Rhizopus nigricans*, que elevou o rendimento da hidroxilação microbiana. A inversão da configuração 11α para 11β , essencial para uma atividade ótima da progesterona, é realizado facilmente por meios químicos (RUIZ, 2008).



Esquema 8. Bioconversão da progesterona (33) em 11α -progesterona (34).

Esta reação simplificou a síntese de hormônios adrenocorticóides como a cortisona e corticosterona, sendo decisiva para sua obtenção de forma economicamente viável, fornecendo interessantes possibilidades na preparação de derivados bioativos como a prednisona (35), prednisolona (36) e triancinolona (37) (figura 5, pág. 42).

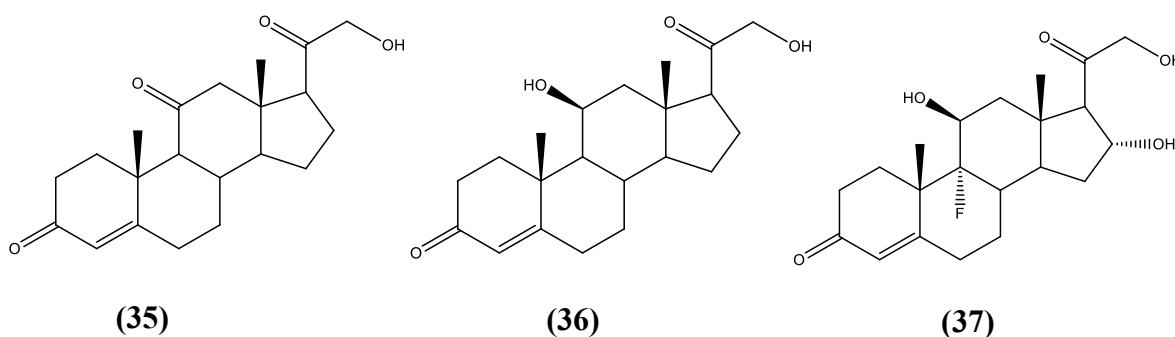
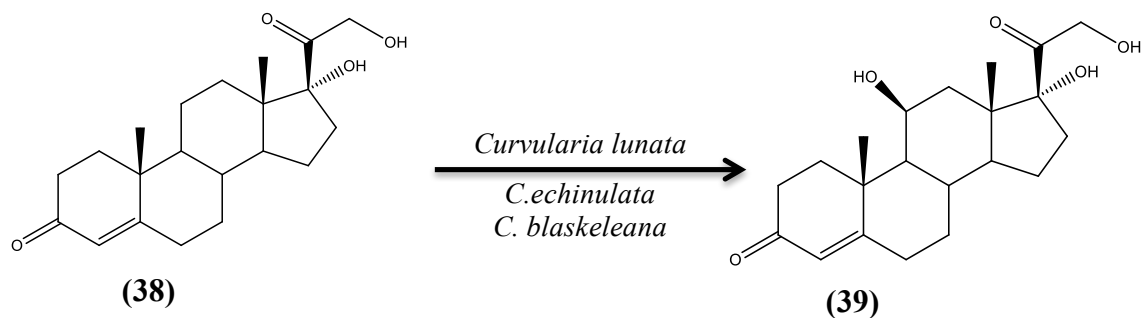


Figura 5. Derivados bioativos da cortisona.

Atualmente, várias posições não funcionalizadas do núcleo esteroidal podem ser hidroxiladas, *estereoespecificamente*, pelo uso de diferentes microrganismos (FOUSTERIS, 2006). Cerca de 200 processos que empregam a metodologia de hidroxilação esteroidal pela via microbiana estão em uso pela indústria químico-

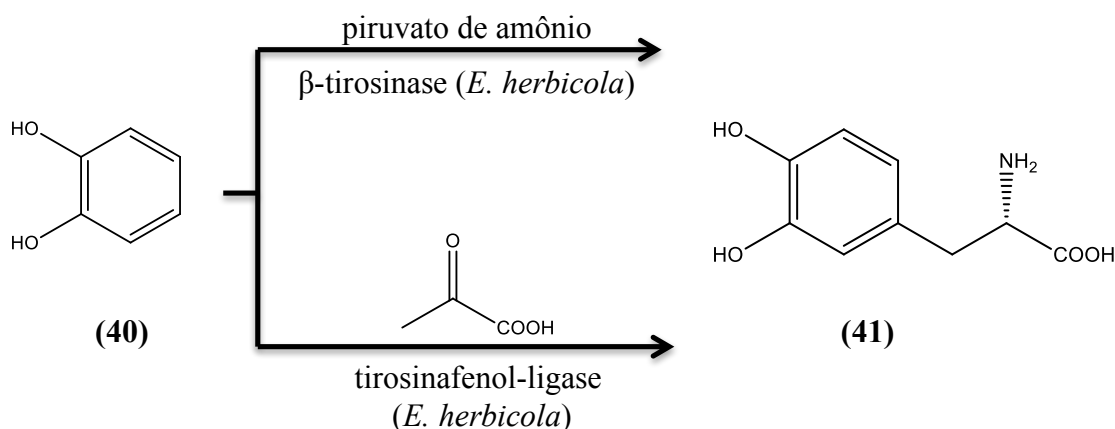
farmacêutica (GIRI, 2001).

Conversões de derivados glicocorticosteróides como a da cortexolona **(38)** a hidrocortisol **(39)** (esquema 9, pág. 43) são realizadas atualmente empregando diferentes espécies de fungos (*Curvularia lunata*, *Cunninghamella blaskoleana* e *Cunninghamella echinulata*) para introduzir diretamente o grupamento hidroxila na posição 11-β do esqueleto esteroidal.



Esquema 9. Bioconversão da cortexolona **(38)** em hidrocortisol **(39)**, por diferentes espécies de fungos.

L-DOPA. Em um dos processos de obtenção da L-DOPA **(41)**, substância com atividade contra a Síndrome de Parkinson, reage-se o catecol **(40)** com piruvato de amônio na presença da enzima β-tirosinase do fungo *Erwinia herbicola*. Em outro processo, emprega-se como catalisador, a tirosinafenol-ligase de *E. herbicola* (CLAYDEN, 2001) (esquema 10, pág. 44), enzima capaz de formar ligações C-N. Através desses dois processos, mais de 250 toneladas de L-DOPA são produzidas por ano usando biotransformações microbianas (KOYANAGI, 2005).



Esquema 10. Processos industriais na síntese da L-DOPA (41) catalisada por enzimas de fungos.

2.4 Diterpenos como substratos de biotransformação microbiológica

Os diterpenos são um grupo versátil de substâncias biologicamente ativas presentes em diversos fitoextratos. A modificação estrutural desses compostos, a fim de melhorar a sua relevância farmacêutica, pode ser eficazmente levada a cabo pela aplicação de processos de biotransformação utilizando, tanto microorganismos, quanto enzimas isoladas (FRAGA, 2010).

Ao longo de duas décadas, a biotransformação de terpenos vem ganhando crescente popularidade na pesquisa mundial e, nos últimos anos, uma atenção especial tem sido dada para a transformação microbiológica de diterpenos por permitirem a produção de compostos enantiomericamente puros, intermediários de semi-síntese, auxiliares e sintons quirais de interesse comercial, usando processos limpos e ecologicamente amigáveis. Uma ampla gama de microorganismos já foram utilizados em procesos de biotransformações, produzindo resultados encorajadores e inovadores.

O presente trabalho destaca os mais significativos avanços descritos na literatura publicados nos últimos 30 anos, envolvendo reações de transformação microbiológica utilizando diversas classes de diterpenos como substrato.

2.4.1 Pimaranos

Pimaranos são diterpenos tricíclicos de ocorrência frequente em plantas superiores, que apresentam um esqueleto hidrofenantreno e duas ligações duplas, uma endocíclica e outra como grupo vinílico. Exibem, em sua grande maioria, o carbono C-8 oxigenado ou fazendo parte da dupla endocíclica (DEV; MISRA, 1985). Além disso, possuem duas possíveis configurações no carbono C-13, apresentando-se sob duas formas epiméricas: pimarano e iso-pimarano, nas quais, quando as configurações dos grupos 13-vinil e 13-metil são β e α orientadas, denominam-se pimaranos e *ent*-pimaranos, respectivamente. Ao contrário, quando os grupos 13-vinil e 13-metil são α e β orientados, designam-se isopimaranos e *ent*-isopimaranos, nesta ordem (GARCÍA-GRANADOS, 2007) (figura 6, pág 45).

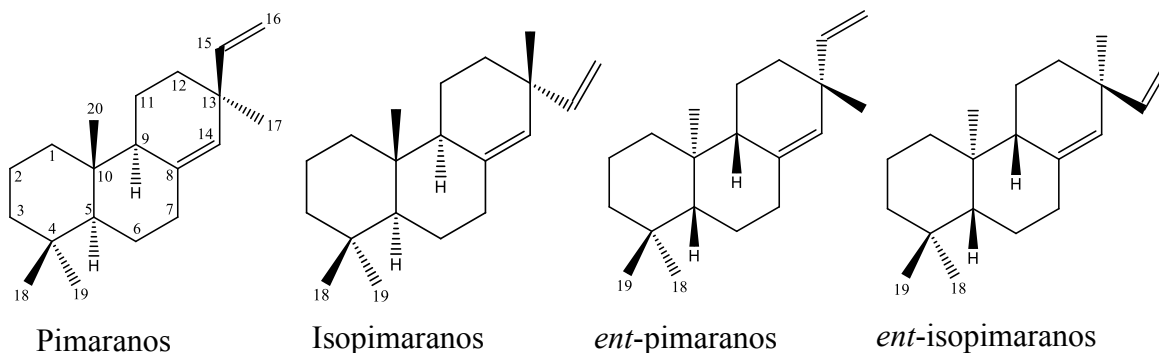


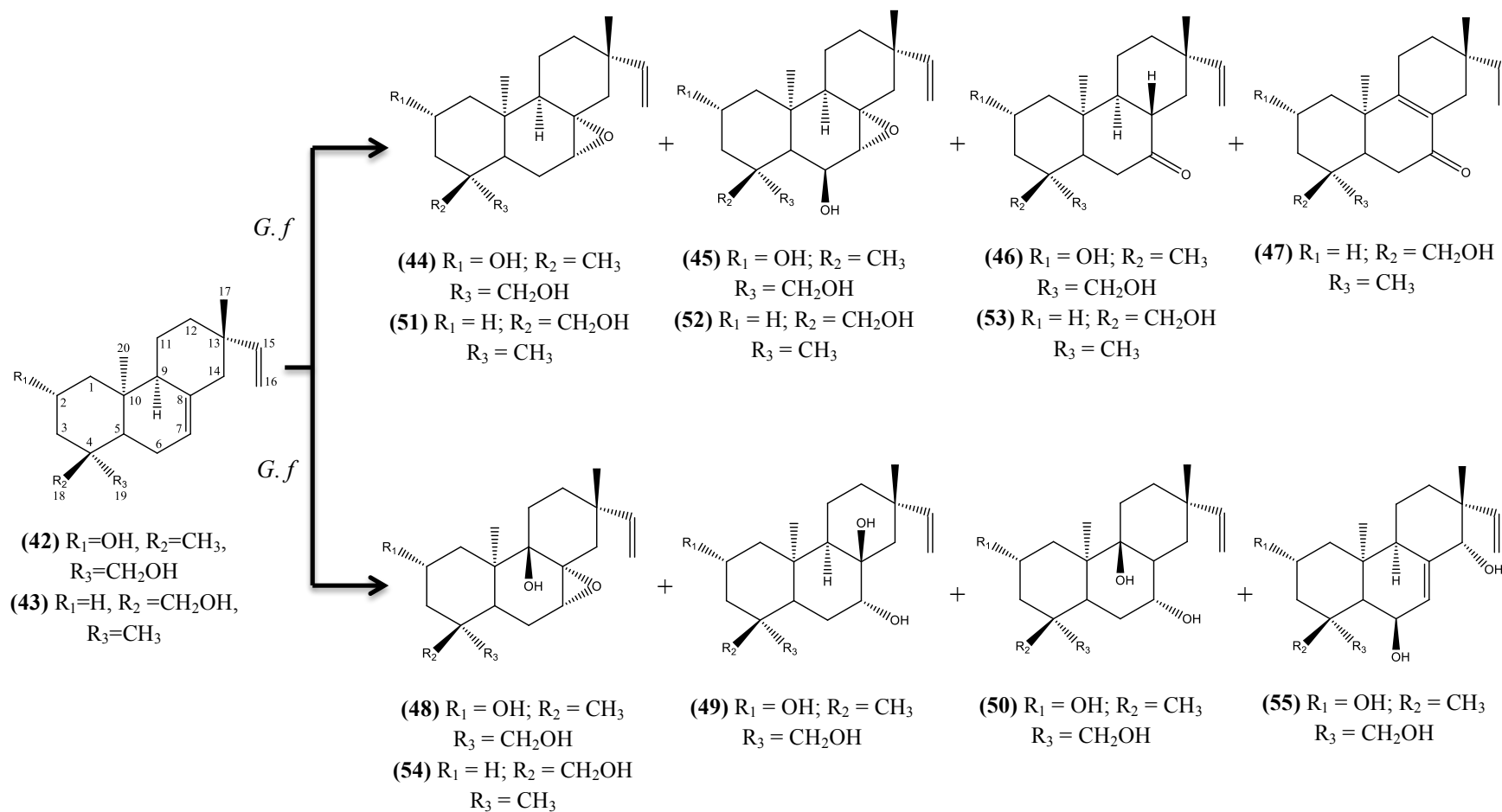
Figura 6. Estereoisômeros naturais dos diterpenos pimaranos.

Nos recentes anos, importantes atividades biológicas destes diterpenos tem sido relatadas. Apresentam ação antimicrobiana (WOLDEMICHAEL, 2003), tripanocida (AMBROSIO, 2008), antiesquistossomal (PORTO, 2012), bem como ação antiinflamatória por inibição de ciclo-oxigenase-2 (AMBROSIO, 2006).

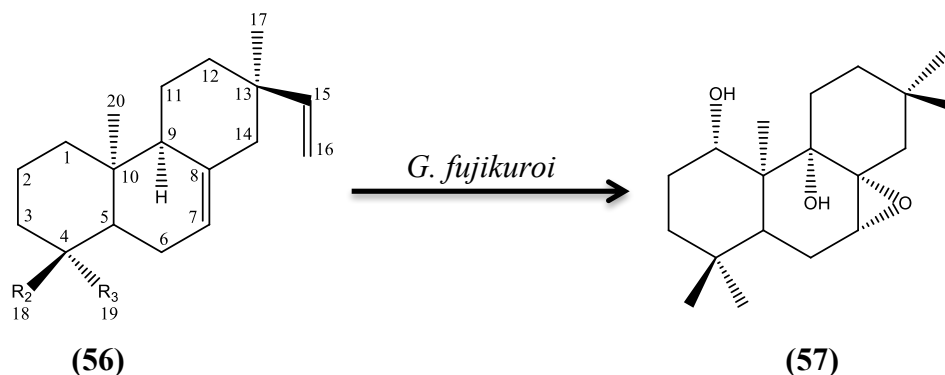
Alguns estudos de biotransformação microbiológica foram conduzidos utilizando diterpenos pimaranos como substratos. Fraga e colaboradores (1998) utilizaram o fungo *Gibberella fujikuroi* para biotransformar dois diterpenos do tipo *ent*-pimarano-7,15-dieno: **(42)** e **(43)**. A principal reação observada em ambas as fermentações foi a epoxidação da dupla ligação entre os carbonos C-7 e C-8,

seguida por rearranjos que deram origem 7-oxo-derivados: **(44, 12,5%)**, **(45, 23,2%)**, **(46, 1,7%)**, **(47, 5%)** e **(48, 10,7%)**, a partir de **(42)**, e **(51, 13%)**, **(52, 3,9%)**, **(53, 5,2%)** e **(54, 4,5%)**, provenientes da fermentação de **(45)**. A fermentação de **(42)** ainda originou dois derivados dihidroxilados, um nos carbonos C-7 α /C-8 β **(49, 1,07%)** e outro em C-7 α /C-9 β **(50, 2,5%)**. Um C-6 β **(55, 8,5%)** hidróxi-derivado também foi formado na biotransformação de **(43)**. As reações observadas em ambos os substratos foram semelhantes, implicando que localização da função álcool nos carbonos C-19 **(43)** ou C-20 **(42)**, não exerce influência significativa na formação dos produtos, o que indica baixa especificidade das enzimas envolvidas. (esquema 11, pág 47).

Em trabalhos posteriores, Fraga e colaboradores (2009) utilizaram o mesmo fungo *Gibberella fujikuroi* na incubação de um pimarano com estrutura bastante semelhante a **(42)** e **(43)**, anteriormente descritos: o 9,13-epi-*ent*-pimarano-7,15-dieno **(56)**. Porém, os resultados obtidos foram muito diferentes. A fermentação de **(56)** originou apenas um derivado: o 1 α , 9 α -dihidroxi-7 α -epoxi-13-epi-*ent*-pimarano-15-dieno **(57, 5,2%)**. A principal diferença entre a biotransformação do hidrocarboneto e do correspondente 18-álcool é que, no primeiro caso, o rearranjo do grupo epóxi para se obter os 7-oxoderivados não foi observado. No entanto, a sequência de reações 7 α , 8 α -epoxidação, hidroxilação no carbono C-9 α e subsequente hidroxilação em C-1 α , ocorreu em ambas as biotransformações, embora esta última tenha sido mais eficiente, pois apenas o produto **(57)** foi isolado (esquema 12, pág. 48).



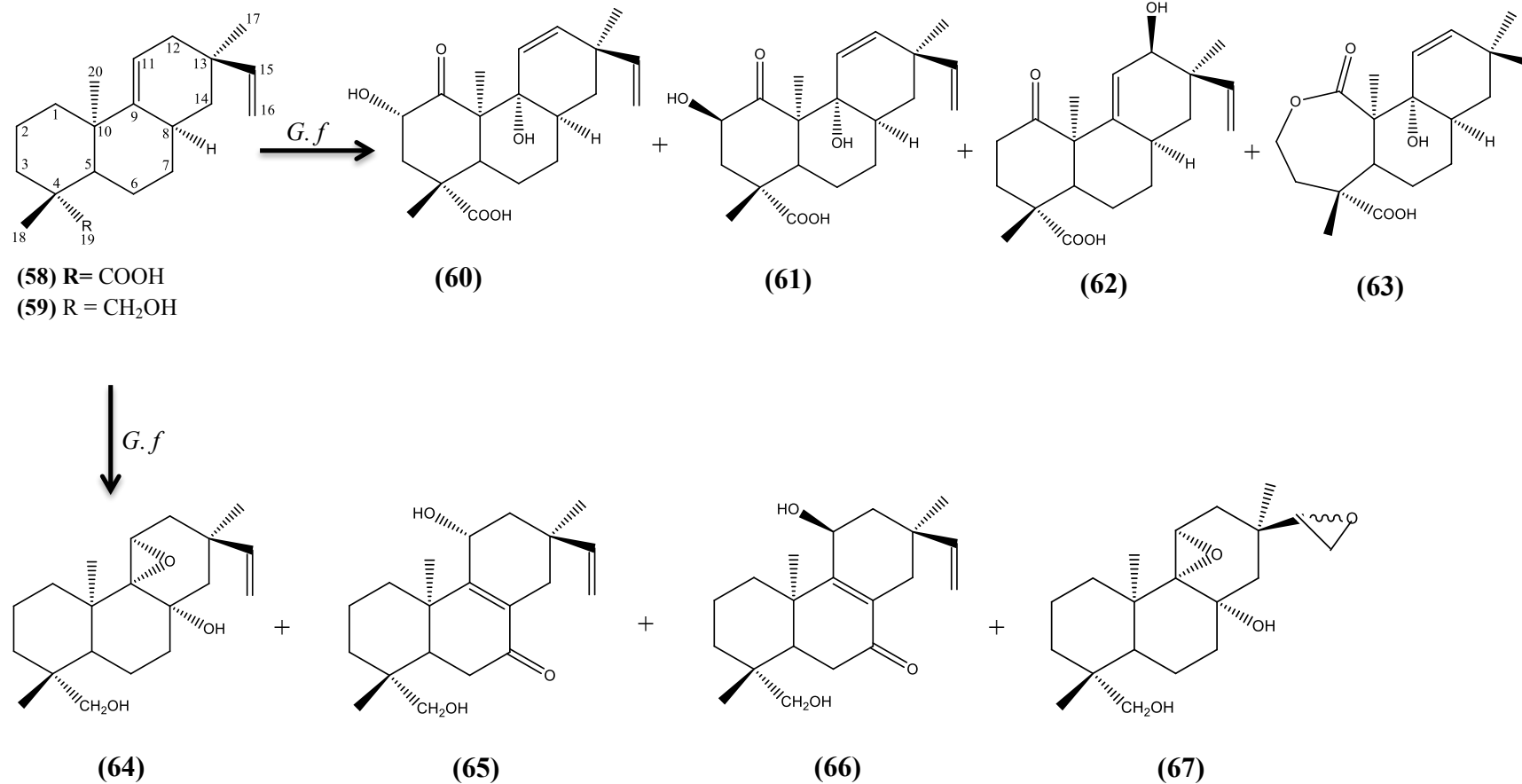
Esquema 11. Biotransformação do 2 α -19-dihidroxi-9-*ent*-pimaran-7,15-dieno **(42)** e do 18-hidroxi-9-*ent*-pimaran-7,15-dieno **(43)** por *Gibberella fujikuroi*.



Esquema 12. Biotransformação do 9,13-*epi-ent*-pimarane-7,15-dieno **(56)** pelo fungo *Gibberella fujikuroi*.

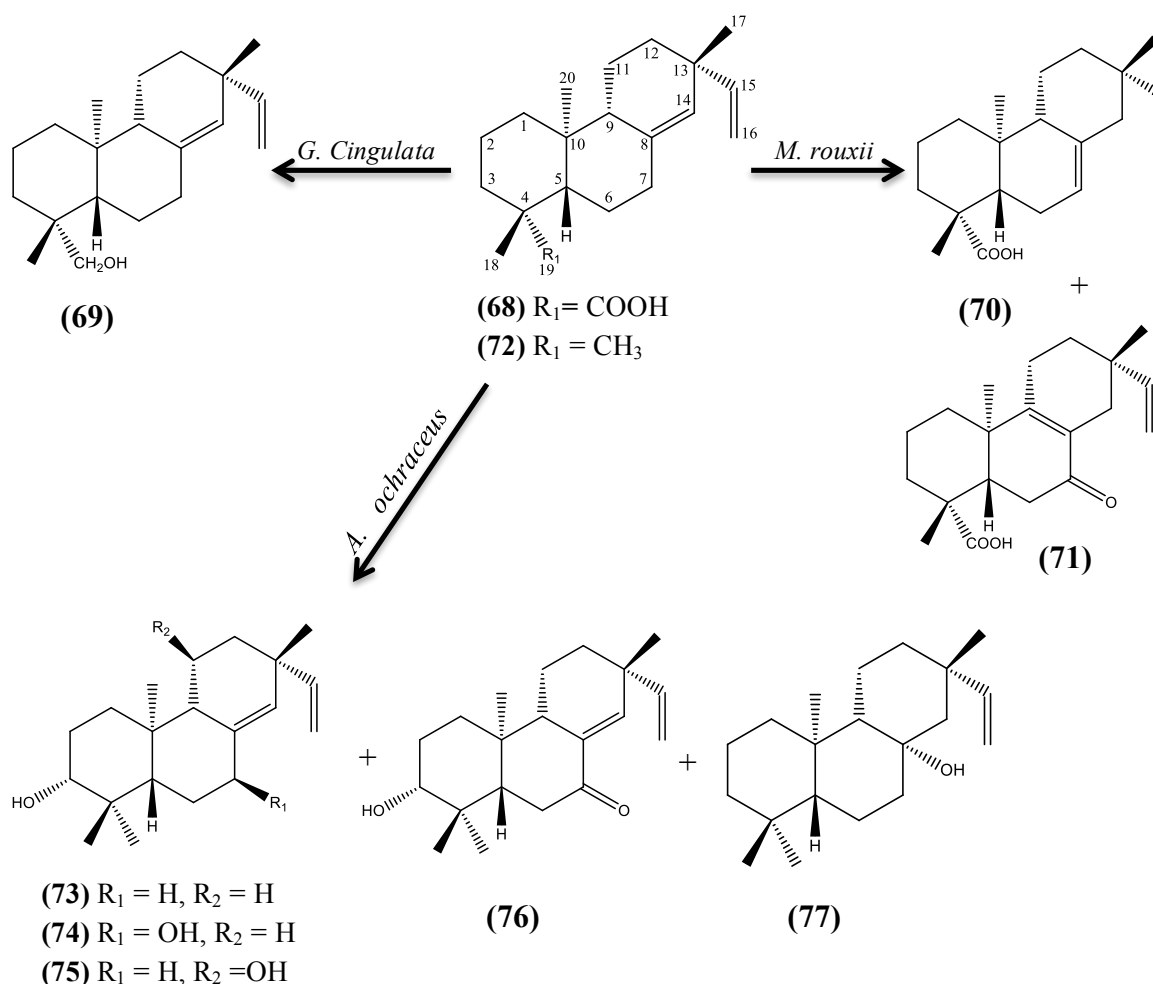
Em trabalho distinto, a mesma equipe (FRAGA, 2000) utilizou o mesmo fungo na incubação de dois outros diterpenos do tipo *ent*-pimara-7,15-dieno. Na fermentação do ácido 13-*epi-ent*-pimarane-9(11),15-dieno-19-oico **(58)**, uma dupla oxidação foi realizada no carbono C-1, formando um grupo oxo, seguida pela hidroxilação dos carbonos C-2 α , C-2 β e C-12 β para formar as hidroxicetonas **(60, 0,2%)**, **(61, 0,3%)** e **(62, 0,3%)**, respectivamente, ou por uma oxidação do tipo Baeyer-Villiger para originar a lactona **(63, 0,5%)**. A formação dessa lactona, representou a primeira vez que uma oxidação desse tipo é observada em transformação microbológica com o fungo *Gibberella fujikuroi*. Nas reações com o 19-hidroxi-13-*epi-ent*-pimarane-9(11),15-dieno **(59)**, quatro oxo-derivados foram obtidos **(64, 3%)**, **(65, 1,3%)**, **(66, 0,6%)** e **(67, 2%)** (esquema 13, pág. 49).

Severiano e colaboradores (2010) descreveram a biotransformação de dois *ent*-pimarandienos: o ácido *ent*-pimarane-8(14),14-dien-19-oico **(68)** e o *ent*-8(14),15-pimarandieno **(72)**. A incubação de **(68)** com *Glomerella cingulata* deu origem a um só produto **(69, 9,1%)**, por redução do ácido carboxílico a um grupo álcool, enquanto que a fermentação com o fungo *Mucor rouxii*, promoveu uma isomerização da dupla endocíclica **(70, 1,4%)**, e oxidação no carbono C-7 **(71, 1,0%)** (esquema 14, pág. 50).



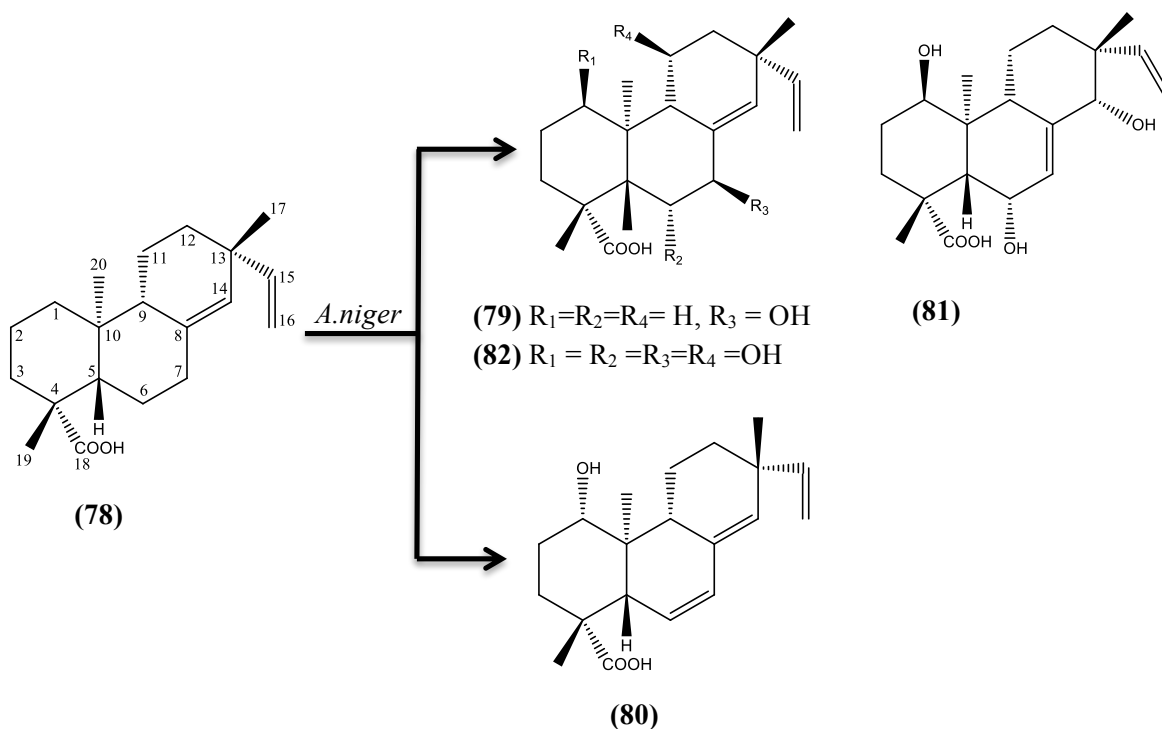
Esquema 13. Biotransformação do ácido 13-*epi-ent*-pimaran-9(11)-dieno-19-oico **(58)** e 19-hidroxi-13-*epi-ent*-pimaran-9(11),15-dieno **(59)** pelo fungo *Gibberella fujikuroi*.

A incubação do *ent*-8(14),15-pimarandieno (**72**), um derivado sem o ácido carboxílico em C-19, foi realizada com o fungo *Aspergillus ochraceus*, na qual cinco derivados hidroxilados foram obtidos. A principal biorreação observada foi a hidroxilação estereosseletiva nos carbonos C-3 pela face α e C-7 e C-11, pela face β (esquema 14, pág. 50). Os derivados (**73**), (**74**), (**75**), (**76**) e (**77**) apresentaram, respectivamente, rendimentos de 7,3%, 3,5%, 12%, 3,4% e 3,5%, e foram testados, juntamente com o substrato (**72**), quanto a sua capacidade antimicrobiana frente a um grande número de patógenos. O produto (**74**) apresentou-se mais eficiente dentre todos os biotransformados, sendo, inclusive, mais efetivo que o seu precursor (**72**) (SEVERIANO, 2010).



Esquema 14. Biotransformação do ácido *ent*-pimarandien-8(14),15-dien-19-oico (**68**) e do *ent*-8(14),15-pimarandieno (**72**), por diferentes espécies de fungos.

Em 2013, Severiano e colaboradores realizaram experimentos de transformação microbiológica com o ácido *ent*-pimaran-dienoico (**78**), utilizando *Aspergillus niger* como microorganismo catalizador. O fungo em questão deu origem a quatro metabólitos, sendo um C-7 β monohidroxilado (**79**, 8%), um derivado C-1 α monohidroxilado, desidrogenado nos carbonos C-6 e C-7 (**80**, 16,7%), um produto C-1 β /C-6 α dihidroxilado, no qual houve transmigração da dupla dos carbonos C-8/C-14 para C-7/C-8 (**81**, 6,9%) e um tetrahidroxilado nos carbonos C-1, C-7 e C-11 pela face β e em C-6 pela face α , (**82**, 5,6%) (esquema 15, pág 51). Os produtos (**80**), (**81**) e (**82**) foram descritos como inéditos na literatura. De acordo com os autores, *Aspergillus niger* promoveu a hidroxilação de carbonos ditos não ativados na estrutura química do substrato (**78**), principalmente nos carbonos C-1, C-6, C-7, C-11 e C-14 o que é difícil de acontecer utilizando metodologias sintéticas clássicas, representando, dessa forma, uma importante estratégia para introduzir centros reativos no esqueleto da substância de partida.



Esquema 15. Biotransformação do ácido *ent*-pimaran-dienoico (**78**) pelo fungo *Aspergillus niger*.

2.4.2 Abietanos

Presume-se que os diterpenos abietanos são formados a partir de reações de rearranjo dos pimaranos, que se iniciam com a protonação do carbono C-15 da dupla ligação para originar, nos abietanos simples, como o ácido dehidroabiético (**83**) e o ácido carnósico (**84**), o característico grupo isopropila no carbono C-13, o qual pode ainda apresentar-se com diferentes padrões de hidrogenação e oxigenação, como na Tanxinona II A (**85**) (GU, 2010) (figura 7, pág. 52).

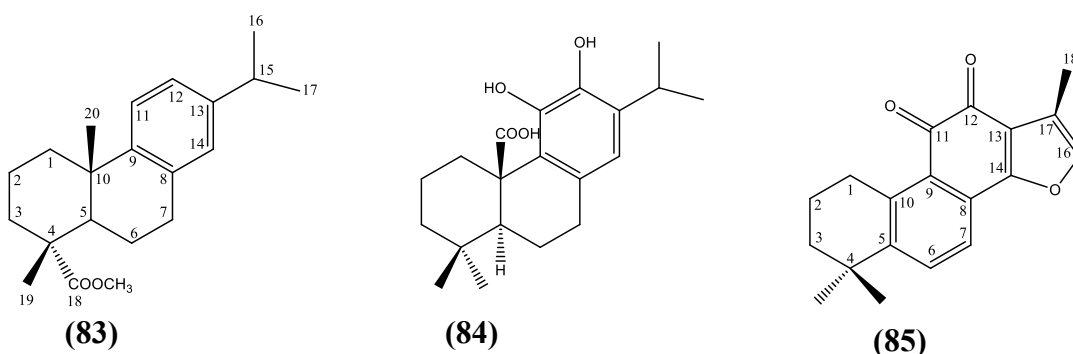


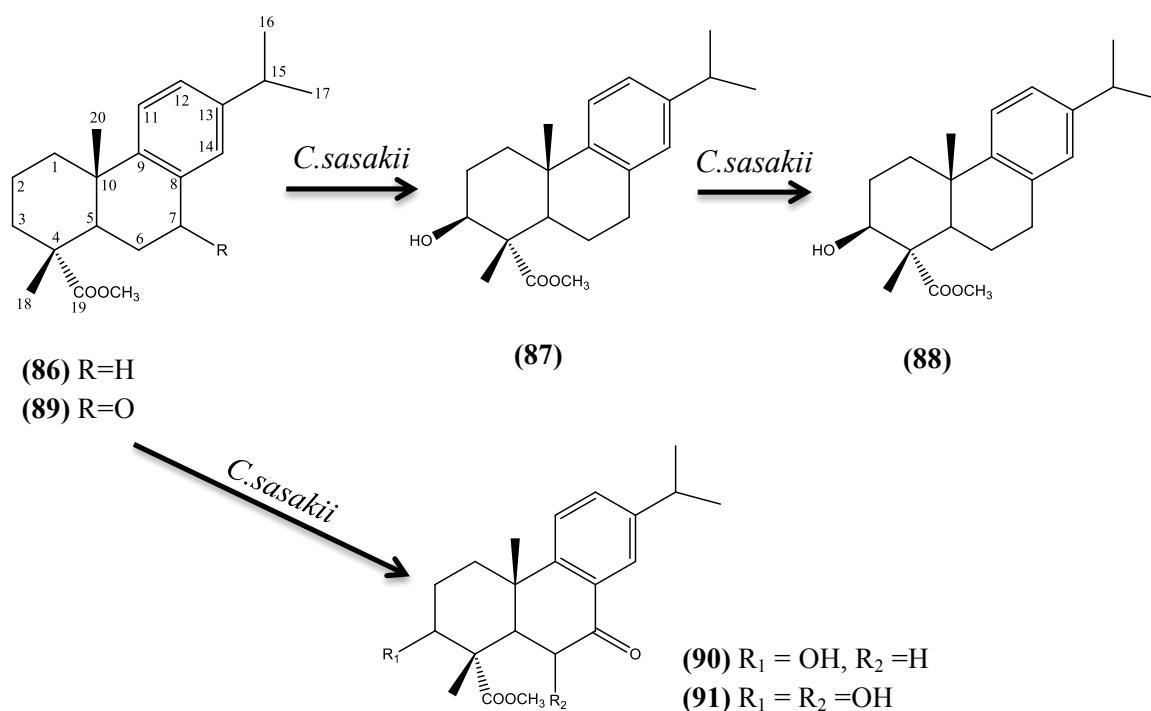
Figura 7. Diversidade estrutural de diterpenos abietanos.

• Ácido dehidroabiético e derivados

O ácido dehidroabiético (**83**), constituinte majoritário das resinas de pinheiro, possui uma gama de atividades terapêuticas atribuídas, tais como antiulcerogênica (SEPÚLVEDA, 2005), antimicrobiana (GIGANTE, 2002), ansiolítica (WOLDMICHAEL, 2003), antiviral (GU; WANG, 2010), antitumoral (KINOCHI, 2000), antiinflamatória (PRINZ, 2002) e citotóxica (ZAIDI, 2006). Estudos recentes demonstraram que, além dessas atividades, (**83**) e alguns de seus derivados, agem como moduladores químicos, particularmente abrindo canais de cálcio do tipo BK, o que o constitui um forte aliado no tratamento do AVC agudo, epilepsia, hiper mobilidade gástrica e psicoses (OHWADA, 2003).

A degradação microbiológica desses compostos tem sido pouco relatada devido a sua instabilidade química durante as biorreações (MARTIN; MOHN, 2012). O primeiro estudo envolvendo fermentação de dehidroabietanos por fungos foi realizado em 1968 por Brannon e colaboradores. A incubação do metil-

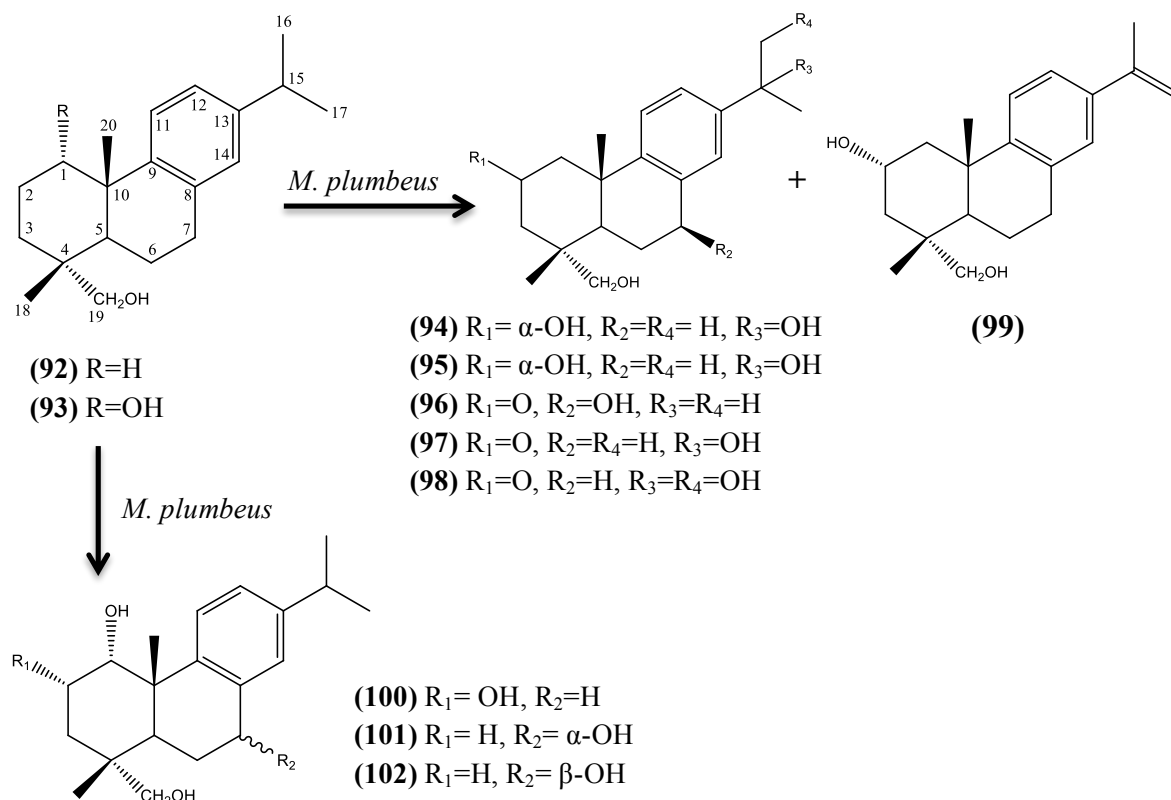
dehidroabietano (**86**) com o fungo *Corticum sasakii*, originou um derivado 3 β -hidroxiabietano (**87**), que foi posteriormente incubado com o mesmo fungo, sob as mesmas condições, resultando em um derivado dihidroxilado com nova hidroxilação no carbono C-7, também pela face β (**88**). Da mesma forma, procedeu-se a incubação de (**89**), um 7-ceto análogo de (**86**), resultando na formação de dois metabólitos biotransformados, um monohidroxilado em C-3 β (**90**) e outro dihidroxilado em C-3 β /C-7 β (**91**). Os rendimentos dos produtos isolados não foram fornecidos (esquema 16, pág. 53) (BRANON, 1968).



Esquema 16. Biotransformação do metil-dehidroabietano (**86**) e 7-oxo-metil-dehidroabietano (**89**) pelo fungo *Corticum sasakii*.

Fraga e colaboradores (2003) utilizaram o *Mucor plumbeus*, um fungo reconhecido pela sua alta capacidade de funzionalizar esqueletos, a fim de obter análogos a partir de dois abietatrienos: dehidroabietol (**92**) e teideadiol (**93**). Como resultado de ambos os experimentos, eles obtiveram a maioria dos produtos com hidroxilações em C-2 α e C-7 β . A principal diferença entre os dois foi uma hidroxilação no carbono C-15, que ocorreu no substrato (**92**) e não foi observada

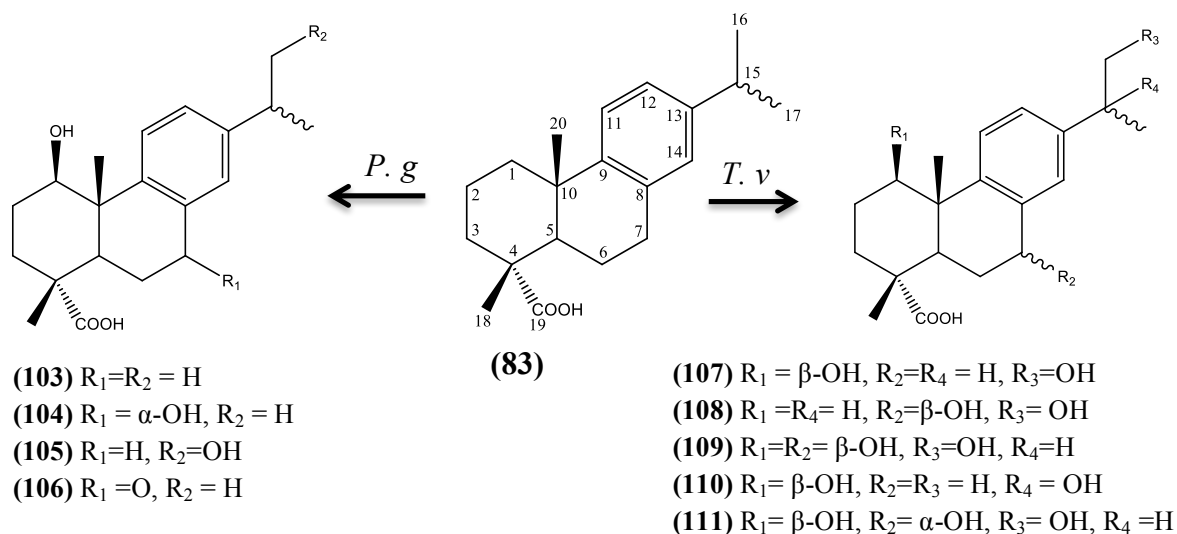
no **(93)**, mesmo com a grande semelhança estrutural entre os dois. Tal fato pode ter ocorrido devido a localização do álcool na posição C-1 α em **(93)**, que pode ter inibido a funcionalização de C-15. Os rendimentos dos produtos **(94)** a **(99)** foram de 7,2%, 1,68%, 1,36%, 0,4% e 0,24%, respectivamente, e dos metabólitos **(100)** a **(102)**, 11,5%, 1,2% e 0,7%, nesta ordem (esquema 17, pág. 54) (FRAGA, 2003).



Esquema 17. Biotransformação do dehidroabietol **(92)** e teideadiol **(93)** por *Mucor plumbeus*.

Em 2007, Van Beek e colaboradores, testaram a incubação do ácido dehidroabiético **(83)** com duas cepas de fungos ditas não convencionais para experimentos de biotransformação: *Trametes Versicolor* e *Phlebiopsis gigantea*. Foram isolados nove metabólitos, sendo grande maioria produtos hidroxilados. Na cultura de *P. gigantea*, foram identificados quatro derivados: 1 β -hydroxy-AD **(103)**, 1 β , 7 α -dihidroxi-AD **(104)**, 1 β ,16-dihidroxi-AD **(105)** e 1 β -hidroxi-7-oxo-AD **(106)**. Já no experimento com *T. vesicolor*, seis análogos foram isolados: 1 β ,16-

dihidroxi-AD **(105)**, também isolado no experimento com *P. gigantea*, 7 β ,16-dihidroxi-AD **(107)**, 1 β ,7 β ,16-trihidroxi-AD **(108)**, 1 β ,16-dihydroxy-7-oxo-AD **(109)**, 1 β ,15-dihidroxi-AD **(110)**, e 1 β ,7 α ,16-trihidroxi-AD **(111)**. Os compostos **(104)**, **(108)**, **(109)** e **(111)** foram descritos como inéditos na literatura (esquema 18, pág. 55).



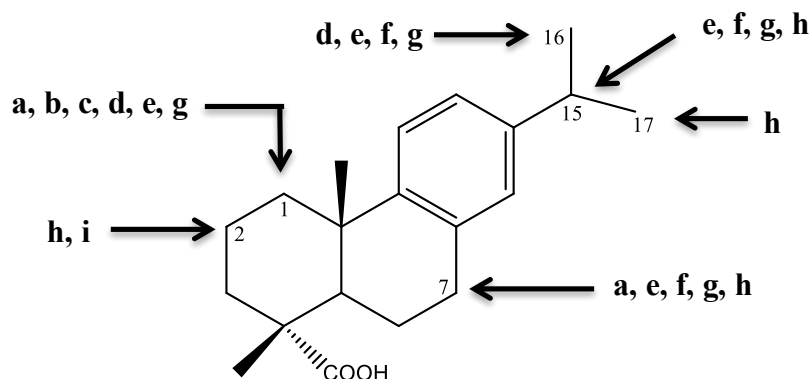
Esquema 18. Biotransformação do ácido dehidroabiético **(83)**, pelos fungos *Trametes Versicolor* e *Phlebiopsis gigantea*.

De acordo com os autores, a hidroxilação estereoseletiva no carbono C-1, parece ser a primeira etapa na degradação do ácido dihidroabiético **(83)**. Existem evidências indicativas de que este tipo de reação é um mecanismo dominante na degradação de resinas ácidas por fungos, constituindo um padrão típico de detoxificação de compostos orgânicos (SPAKOWICZ; STROBEL, 2015).

Este tipo de reação de hidroxilação em C-1, também foi observada com a incubação de **(83)** com os fungos *Fusarium oxysporum* e *Fusarium moniliforme* (TAPIA, 1997). As hidroxilações nos carbonos C-7 e/ou C-16, produzidas pela incubação de **(83)** com *Trametes Versicolor* e *Phlebiopsis gigantea*, também foram observadas em experimentos com os fungos *Chaetomium cochliodes* (LISS, 1997), *Aspergillus niger* (GOUIRIC, 2004), *Fomes annosus* (LEKMAN; SJOHOLM, 1979) e *Mortierella isabellina* (KUTNEY, 1988). Hidroxilações no carbono C-2 foram observadas na incubação do substrato com os fungos *Mucor*

circinelloide (MITSUKURA, 2005) e *Mortierella isabellina* (SINGH, 1981).

As hidroxilações são as reações mais catalizadas na estrutura do ácido dehidroabiético, mesmo utilizando diferentes fungos e condições distintas de fermentação. A figura 8 (pág. 56) apresenta os centros mais hidroxilados de **(83)** relatados na literatura, bem como os respectivos fungos catalisadores.



a= *A. niger*; b= *F. oxysporum*; c= *F. moniliforme*; d= *P. gigantea*; e= *T. vesicolor*; f= *C. cochliodes*; g= *F. annosus*; h= *M. isabellina*; i= *M. circinelloides*

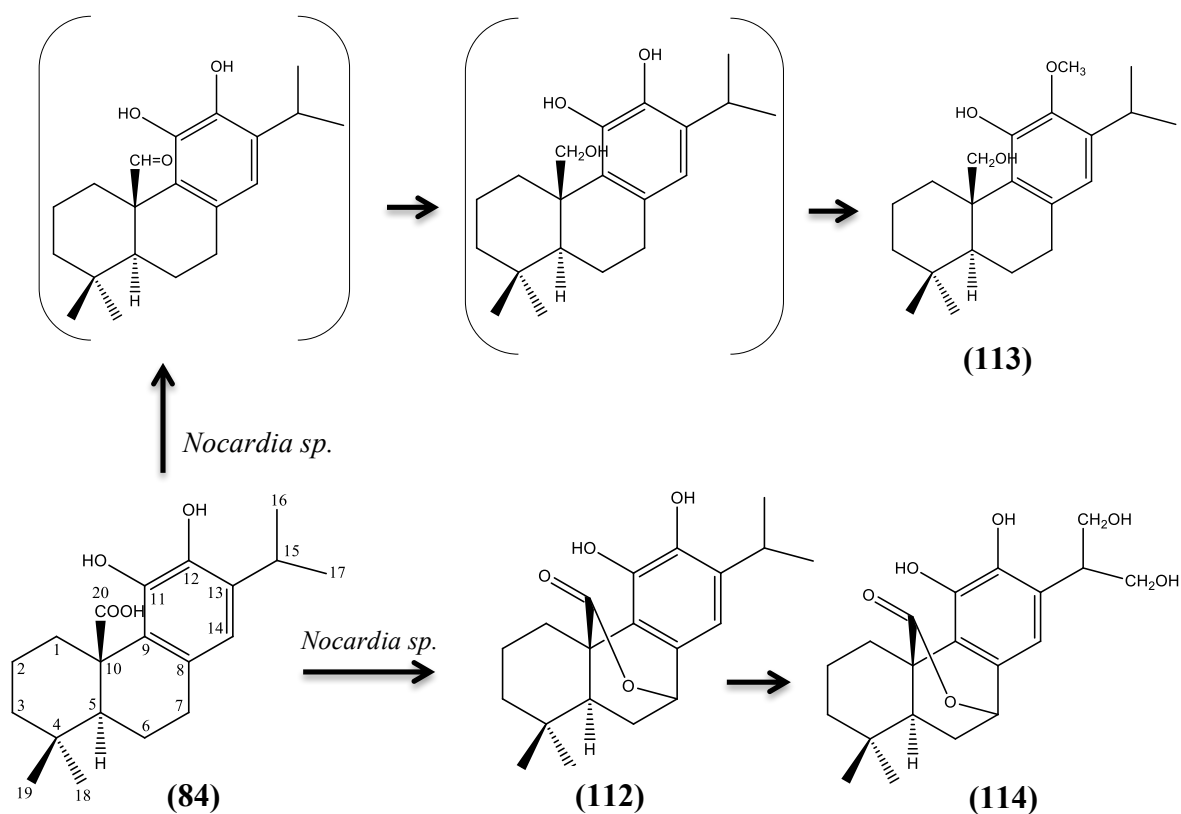
Figura 8. Reações de hidroxilação catalisadas por diferentes fungos na estrutura do ácido dihidroabiético **(83)**.

• Ácido carnósico e Carnosol

O ácido carnósico **(84)** é um diterpeno abietano O-difenólico, precursor de diversos metabólitos, dentre eles o carnosol **(112)**. Esses dois compostos já possuem vários relatos descritos na literatura de importantes atividades biológicas, tais como: antioxidante (BASAPPA MAHESWARAPPA, 2013), antimicrobiana (BERNARDES, 2010) e potente atividade antiinflamatória e anticarcinogênica (BAUER, 2012).

Com a finalidade de encontrar microorganismos capazes de biotransformar o ácido carnósico **(84)**, Hosny e colaboradores (2002) realizaram um screening com 49 microorganismos, fungos e bactérias, no qual apenas a bactéria *Nocardia* sp., mostrou-se eficiente na degradação do substrato, dando origem a três análogos. Dos três metabólitos produzidos, o 11,20-dihidroxi-12-metoxiabietan-

8,11,13-trieno (**113**, 10,5%) e 11,12,16,17-tetrahidroxi-7,10-(epoximetano) abietan-8,-11,13-trieno-20-ona (**114**, 8%) foram descritos como inéditos e o (**112**, 38%), identificado como o produto natural carnosol (11,12-dihidroxi-7,10-(epoximetano)abietan-8,11,13-trieno-20-ona). De acordo com os autores, a redução do grupo funcional ácido carboxílico em C-20, seguida de uma metilação biológica no carbono C-11 do fenol, deu origem a (**113**) e uma ciclização oxidativa gerou (**112**), que foi posteriormente dihidroxilado na fração isopropil, dando origem a (**114**) (esquema 19, pág. 57).



Esquema 19. Biotransformação do ácido carnósico (**84**) pela bactéria *Nocardia* sp, e via proposta para formação dos produtos (**112**), (**113**) e (**114**).

• Tanxinonas

Quimicamente, tanxinonas são 20-norditerpenos com um esqueleto abietano e um cromóforo *orto* ou *para*-naftoquinona no anel C (figura 7, pág 50). Possuem várias atividades biológicas descritas na literatura, tais como inibidores do crescimento de tumores de câncer de mama (LIN, 2013), tratamento da aterosclerose (LIN, 2006), efeitos neuroprotectivos (LAM, 2003), indução de apoptose (MOSADDIK, 2003), atividade leishmanicida e antiplasmodial (SAIRAFIANPOUR, 2001).

Com base nessas evidências, He e colaboradores (2016) realizaram experimentos de biotransformação da Tanxinona IIA (**85**) com o fungo *Hypocrea* sp. (AS 3.17108) e obtiveram a Tanxisorbicina (**116**, 50,4%), um derivado inédito com atividade antimicrobiana significativamente maior que o seu precursor. A formação desse metabólito envolveu uma reação de cicloadição 4+2 (Diels-Alder) com um produto produzido pelo fungo: o sorbicillinol (**115**). A partir da análise das correlações do HMBC, foi possível confirmar que as subunidades A e C estavam ligadas através de ligações entre os carbonos C-1/C-7 e C -4/ C- 8. (figura 9, pág 58).

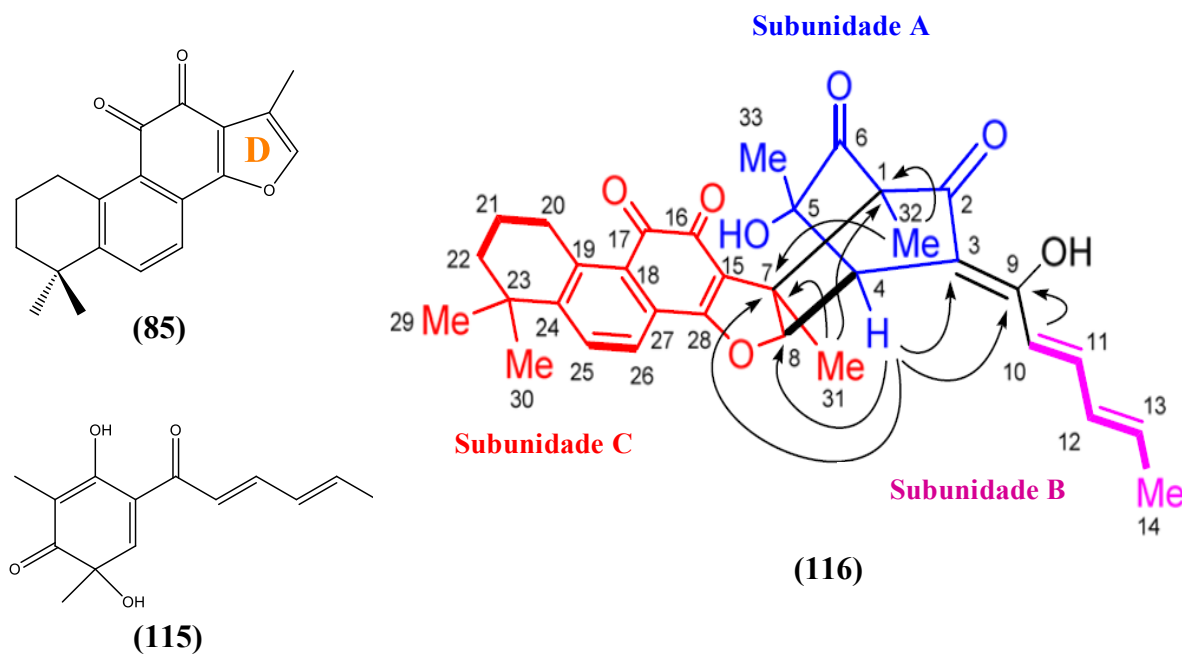
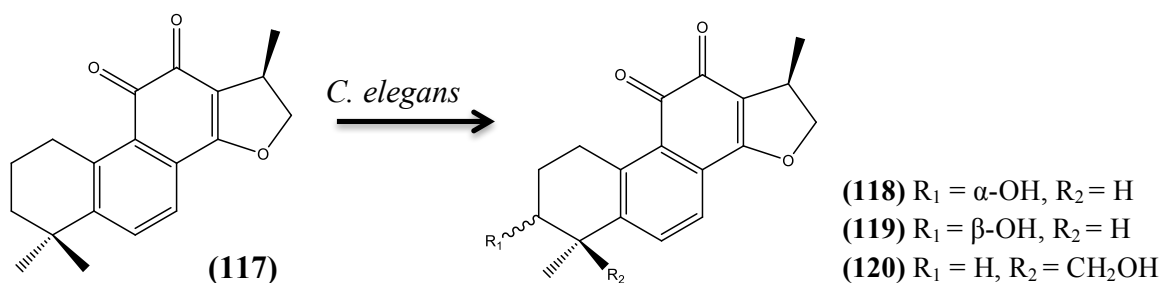


Figura 9. Estruturas da tanxinona IIA (**85**), sorbicillinol (**115**) e tanxisorbicina (**116**), em como as correlações de HMBC (meia seta) e COSY (ligação) de (**116**).

Este foi o primeiro relato de reação do tipo Diels-Alder em experimentos de Biotransformação, no qual um substrato sofreu cicloadição com um metabólito produzido pelo fungo de rastreio. De acordo com os autores, as tentativas para caracterizar ainda mais o mecanismo da reação de cicloadição estão em andamento (HE, 2016).

Outra tanxinona que tem despertado interesse pelos pesquisadores por suas potentes atividades biológicas é a criptotanxinona (**117**). Caracteriza-se como um produto natural extraído de uma erva medicinal muito usada na medicina popular, que possui a maior atividade antimicrobiana dentre todas as tanxinonas; inibe o crescimento andrógeno-independente em linhagens de células de câncer de próstata, *in vitro* e em ratos (GONG, 2011) e exibe significativa toxicidade contra diversas linhagens de células tumorais humanas (RYU, 1997).

Diante da inegável potencialidade da criptotanxinona (**117**), Sun e colaboradores (2013) realizaram experimento de transformação microbiológica utilizando o fungo *Cunningamella elegans*. As biorreações produziram dois álcoois epiméricos em C-3: (**118**) e (**119**), hidroxilados pela face α e β , respectivamente, e um terceiro produto, no qual o grupo metila no carbono C-18 foi oxidado (**120**) (esquema 20, pág. 59). Tais metabólitos foram identificados como os mesmos formados *in vivo* em cobaias, após a administração intravenosa de (**117**), o que confere ao sistema de biotransformação fúngica a capacidade de mimetizar o metabolismo humano, podendo ser utilizado para prever e sintetizar metabólitos de drogas utilizadas em mamíferos (ZHANG, 1996).



2.4.3 Cauranos

Os Cauranos representam um importante grupo de diterpenos tetracíclicos. Quimicamente, possuem uma unidade peridrofenantreno (aneis A, B e C), fundida com uma unidade ciclopentano (anel D), formada por uma ponte entre C-8 e C-13. Os cauranos são substâncias muito ativas, apresentam cerca de 20 atividades biológicas descritas na literatura, tais como: ação antimicrobiana (AMBROSIO, 2008), imunomoduladora (OHKOSHI, 2004), citotóxica e genotóxica *in vitro* (CAVALCANTI, 2006), antiinflamatória e analgésica (CHAVAN, 2011), antialérgica (CHEENPRACHA, 2006), antidiabético e antiobesidade (KIM, 2006), anti-HIV (CHANG, 1998), anti-Parkinson (GUILLOPÉ, 2009), entre outras.

Uma pesquisa realizada com mais de 200 artigos evidenciou que os diterpenos cauranos são extensivamente utilizados como substratos em biotransformações com fungos e bactérias. A partir da análise desses artigos, foi possível observar que a reação mais comum, e também mais atraente, realizada por microorganismos na estrutura de Cauranos é a hidroxilação. Esse tipo de reação possui um grande valor agregado, pois já foi demonstrado em diversos trabalhos relacionando estrutura-atividade de compostos orgânicos, que hidroxilas adicionais no esqueleto podem levar a uma melhoria na atividade biológica, devido ao aumento de interação com os receptores através de ligações químicas (FUJITA, 1976; LIN, 2012). No caso específico dos Cauranos, Nagao e colaboradores (1982) reportaram que estes diterpenos, quando polihidroxilados possuem atividade antitumoral contra células leucêmicas P388 em ratos, e que a adição de hidroxilas nos compostos está associada com o aumento expressivo desta atividade.

A adição de hidroxilas em diterpenos Cauranos pode ser observada em vários sítios da molécula: carbônos metilênicos, metínicos e metílicos, tanto do peridrofenantreno, como no anel D. Algumas das mais comuns ocorrem nos carbonos C-7 e C-11, isoladas ou simultâneas, quer sob as orientações α ou β , sendo mais frequentes as hidroxilações em C-7 β . A preferência de orientação β pode ocorrer por um impedimento estérico causado pelas metilas 18 e 20, que estão ambas na face α da molécula (TAKAHASHI, 2014).

A Tabela 1 (pág. 61) apresenta uma grande variedade de fungos utilizados na funcionalização de esqueletos caurânicos, o local de hidroxilação e a estereoquímica do grupo OH introduzido na molécula. É possível observar que a maioria destas hidroxilações são regioseletivas.

Tabela 1. Exemplos de fungos capazes de hidroxilar esqueletos caurânicos, bem como a posição e estereoquímica das hidroxilações.

Fungos	Posição e estereoquímica da hidroxilação	Referências
<i>Aspergillus niger</i>	3 α , 7 β , 11 α	10, 174, 250
<i>Aspergillus ochraceus</i>	6 β , 7 α , 13	26, 122
<i>Absidia blakesleeana</i>	11 α , 13	233
<i>Cephalosporium aphidicola</i>	3 α , 11 β	31, 134, 189
<i>Fusarium fujikuroi</i>	3 α , 3 β , 6 β , 7 β	108
<i>Gibberella fujikuroi</i>	3 β , 6 α , 6 β , 9, 11 β , 13	4, 18, 19, 23, 24, 58, 77-83, 85-92, 101-103, 107, 121, 135, 136, 220, 242-244
<i>Fusarium moniliforme</i>	11 β	191
<i>Psilocybe cubensis</i>	11 β	196
<i>Cunninghamella bainieri</i>	9	45
<i>Mucor plumbeus</i>	6 α , 9, 11 β	32, 100, 105
<i>Mucor recurvatus</i>	11 α , 11 β	250
<i>Rhizopus stolonifer</i>	7 β , 9, 11 β	32, 221, 240
<i>Rhizopus oligosporus</i>	7 β , 9	233
<i>Rhizopus nigricans</i>	3 α , 7 α , 7 β , 13	26, 113, 114, 122
<i>Verticillium lecanii</i>	7 α , 7 β , 11 β	241

De acordo com a literatura, alguns fungos também são capazes de adicionar hidroxilas pelas faces α e β de um mesmo carbono (figura 10, pág. 62).

Os microorganismos possuem o seu próprio papel na hidroxilação de carbonos metilênicos. Por exemplo, os carbonos C-1 e C-11 são espacialmente próximos e, assim sendo, estão sujeito às mesmas interações espaciais, teoricamente. No entanto, o C-11 é muito mais comumente hidroxilado que C-1. Um dos fatores que explicam essa hidroxilação preferencial em C-11, pode estar relacionado com

o fato desta reação ser um passo da biossíntese de alguns triterpenos e esteroides, os quais possuem semelhanças estruturais com alguns esqueletos diterpênicos (DEWICK, 2009).

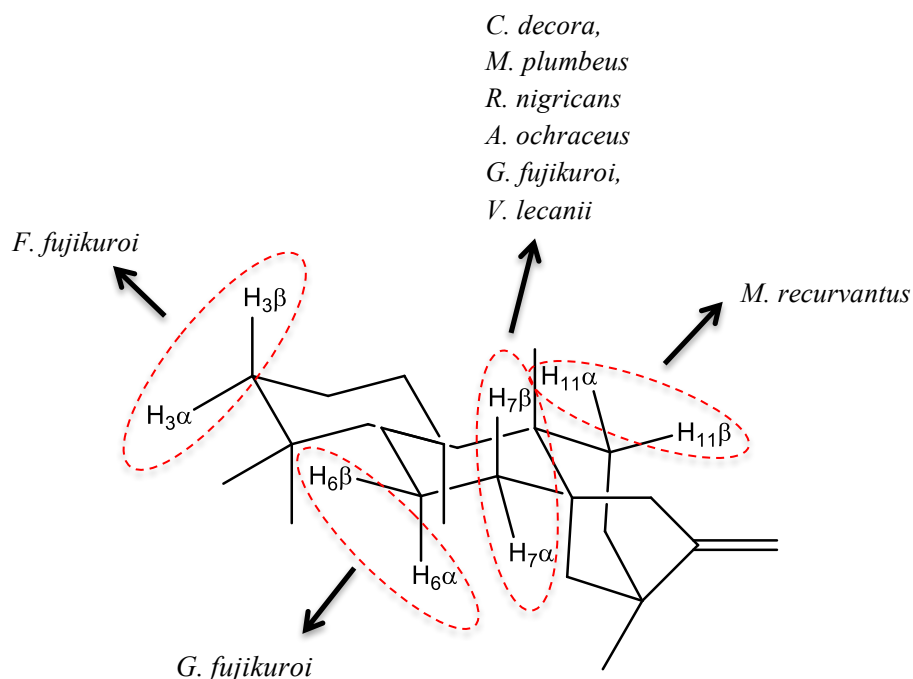
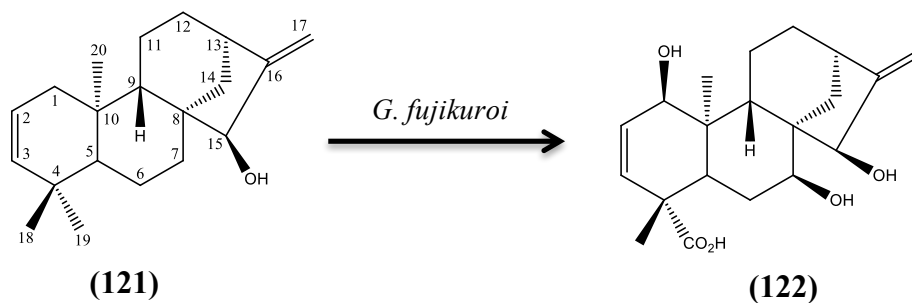


Figura 10. Exemplos de fungos capazes de hidroxilar tanto a face α quanto a face β do mesmo carbono nos diterpenos caurânicos.

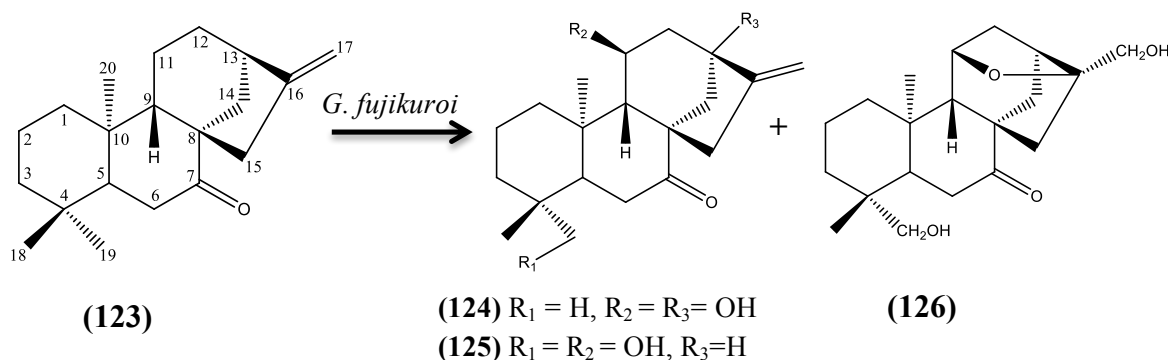
O fungo *Gibberella fujikuroi* é uma espécie reconhecida por introduzir grupos OH nos diterpenos cauranos em diversos carbonos, tais como C-3 (FRAGA, 2005), C-6 (FRAGA, 2007), C-7 (BARRERO, 1999), C-9 (VIEIRA, 2000), C-11 (FRAGA, 2007) e C-13 (GARCÍA-GRANADO, 1990). Fraga e colaboradores (2004), em estudo com o 15 α -hidroxi-3-oxo-ent-cauran-16-eno (121), relataram pela primeira vez a hidroxilação no carbono C-1, sítio de reação reconhecidamente não convencional (esquema 21, pág. 63). De acordo com os autores, a presença da dupla ligação entre os carbonos C-2/C-3, direcionou a hidroxilação no carbono C-1, pela face β . (FRAGA, 2004).

Em estudos posteriores, Fraga e colaboradores (2005) e Taveepanich e colaboradores (2010), também relataram hidroxilações em C-1 de cauranos.

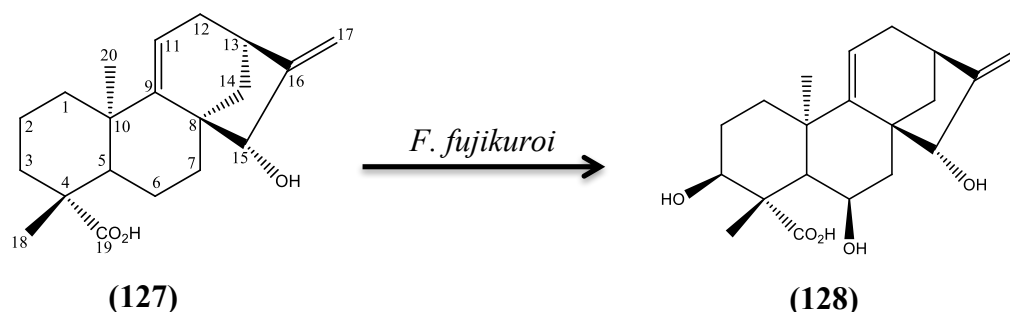


Esquema 21. Biotransformação do 15 α -hidroxi-3-oxo-*ent*-cauran-16-eno (**121**) pelo fungo *Gibberella fujikuroi*.

Alguns fungos possuem a habilidade de produzirem mais de uma hidroxilação em diferentes posições do substrato. Fraga e colaboradores (2005) utilizaram o fungo *Gibberella fujikuroi* na biotransformação do 7-oxo-*ent*-cauran-16-eno (**123**) e obtiveram quatro metabólitos, três deles dihidroxilados (**124**, 0,4%), (**125**, 3,6%) e (**126**, 0,68%) (esquema 22, pág. 63). Em outro experimentos, o mesmo grupo de pesquisa, utilizou o fungo *Fusarium fujikuroi* na transformação microbiológica do ácido *ent*-15 α -hidroxicauran-9 (11),16-dien-19-oico (**127**) e obtiveram 5 derivados, sendo um deles 3 β , 6 β - dihidroxilado (**128**, 20%) (esquema 23, pág. 64) (FRAGA, 2013). O Fungo *Gibberella fujikuroi* também foi utilizado por alguns grupos de pesquisa na produção dióis com configuração β , β (**129**), (**130**) e (**131**) (COOK, 1975; GASKIN, 1984; FRAGA, 1993) e β , α (**132**, 2,08%) (FRAGA, 1996b), em hidroxilações vicinais nos carbonos C-6 e C-7 (figura 11, pág. 64).



Esquema 22. Biotransformação do 7-oxo-*ent*-caur-16-eno (**123**) pelo fungo *Gibberella fujikuroi*.



Esquema 23. Biotransformação do ácido *ent*-15 β -hidroxicauran-9 (11),16-dien-19-oico (127) pelo fungo *Fusarium fujikuroi*.

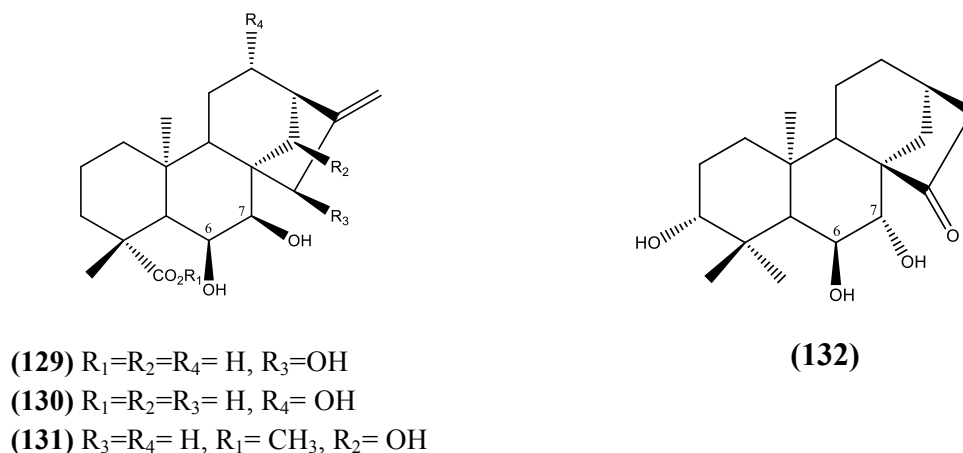
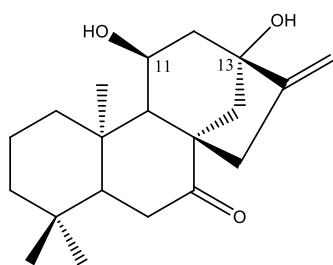


Figura 11. Estrutura química dos derivados caurânicos β , β (129-131) e β , α (132) diois vicinais, obtidos pelo fungo *Gibberella fujikuroi*.

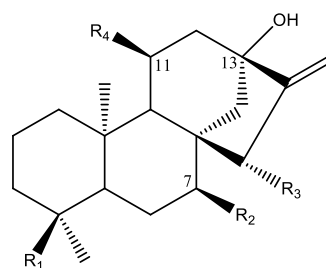
Embora as hidroxilações mais comuns em diterpenos cauranos sejam observadas nos carbonos metilênicos, os carbonos metínicos C-9 e C-13 também já foram ativados por biotransformação. Em contrapartida, não há relatos na literatura de funcionalização de C-5 por microorganismos, até o momento. (TAKAHASHI, 2014).

A hidroxilação no carbono C-9 foi relatada por Hanson e Oliveira (1990), na incubação do esteviol metil éster (133) com o fungo *Rhizopus stolonifer*, originando (134, 12,5%); por Vieira e colaboradores (2000) na incubação do metil

ent-17-hidroxi-16 β -cauran-19-oato (**135**) com o mesmo fungo, produzindo (**136**, 12,4%); por Fraga e colaboradores (2003) em experimentos com *Mucor plumbeus* e o candicandiol (**137**), dando como produto o composto (**138**, 1%); e mais recentemente, por Taveepanich e colaboradores (2010) na incubação do ácido ent-cauran-16-eno-19-oico (**139**) com o fungo *Rhizopus oligospora*, originando um composto dihidroxilado em C-7/C-9 (**140**, 6,6%). Todas as hidroxilações realizadas foram estereosseletivas e ocorreram pela face β do carbono C-9. (esquema 24, pág. 66). Os produtos (**136**) e (**140**) foram relatados como novos na literatura. Em relação à hidroxilação do C-13, é comum observar que esta reação é geralmente acompanhada de hidroxilação de outros carbonos. Fraga e colaboradores (1992), utilizando o fungo *Gibberella fujikuroi*, isolaram um produto de biotransformação com hidroxilação em C-11 e C-13 (**141**, 5,7%). No ano de 2005, o mesmo grupo de pesquisa, utilizando o mesmo fungo, isolou outro diol com hidroxilação também em C-11 e C-13 (**142**, 0,7%). Taveepanich e colaboradores (2010), em experimentos de biotransformação com o fungo *Absidia blakesleeana*, relataram que a hidroxilação em C-11 foi acompanhada pela introdução de uma 7 α -OH (**143**, 13%) (figura 12, pág. 65).

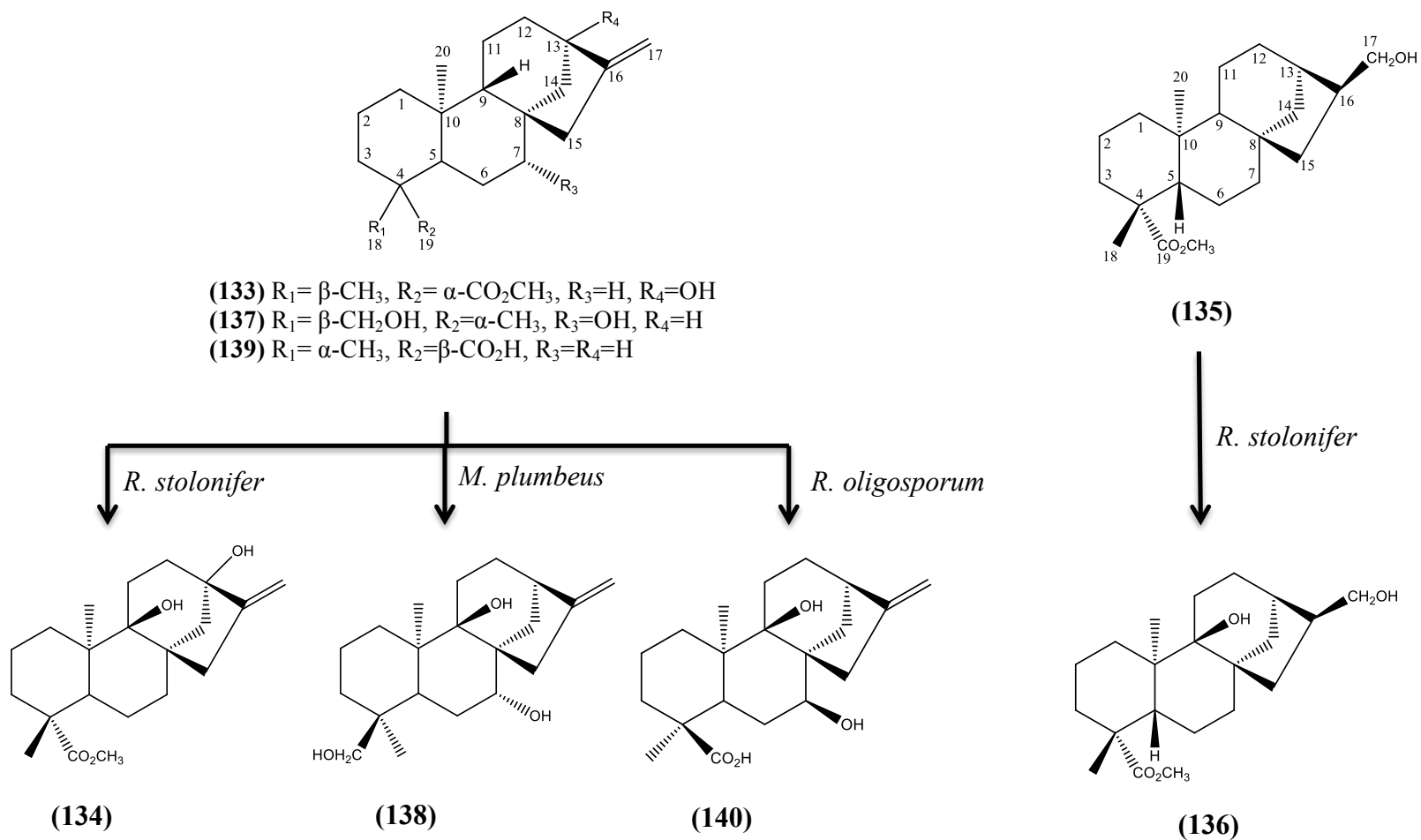


(141)


 (142) R₁ = CH₃; R₂ = H; R₃=R₄= OH

 (143) R₁ = CO₂H, R₂ = OH; R₃=R₄= H

Figura 12. Produtos dihidroxilados nos carbonos C-11 e C-13.

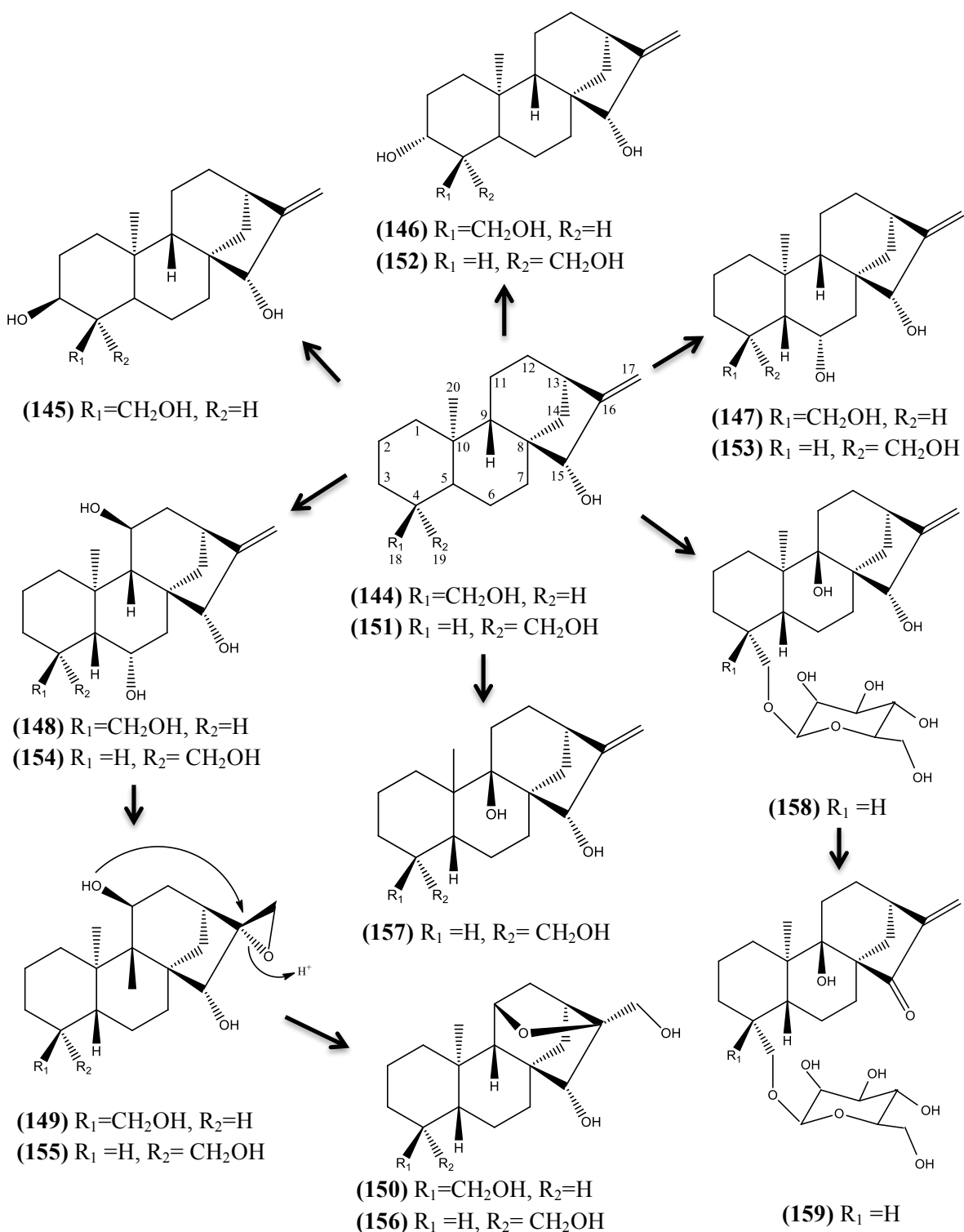


Esquema 24. Exemplos de hidroxilação estereosseletiva no carbono metínico C-9, utilizando diferentes espécies de fungos.

Embora as hidroxilações sejam as reações mais comumente catalizadas por diversas espécies de fungos no esqueleto de diterpenos cauranos, a capacidade desses microorganismos de modificarem a estrutura da molécula é bem mais ampla. Há relatos de reações envolvendo rearranjo de anel para formação de Giberelinas (HANSON, 1992; FRAGA, 1994; FRAGA, 1995; FRAGA, 2007) e diterpenos Beiranos (CHANG, 2006; YANG, 2007), formação de lactonas (FRAGA, 2005; FRAGA, 2010; FRAGA, 2013), epoxidação (FRAGA, 2013), glicosilação (FRAGA, 2010), desidrogenação de alceno (FRAGA, 2004), abertura do anel (FRAGA, 2007), descarboxilação (FRAGA, 2013), isomerização da dupla exocíclica (FRAGA, 2003) e formação de alcenos (CHANG, 2006).

Fraga e colaboradores (2010) utilizaram o fungo *Mucor plumbeus* na incubação de dois diterpenos cauranos epiméricos no carbono C-4: 15 α ,18-dihidroxi-*ent*-cauran-16-eno (**144**) e 15 α , 19-dihidroxi-*ent*-cauran-16-eno (**151**), nas quais foi possível observar a formação de produtos com diferentes modificações estruturais. A fermentação de (**144**), originou cinco metabólitos hidroxilados (**145**, 5,5%), (**146**, 0,8%), (**147**, 8%), (**148**, 1,9%) e (**150**, 0,6%). Enquanto que os experimentos com (**151**), resultaram em 7 hidróxi-derivados (**152**, 1,4%), (**153**, 0,6%), (**154**, 0,6%), (**155**, 1,4%), (**156**, 0,8%), (**157**, 2,9%) e (**158**, 0,3%), sendo (**157**) e (**158**) metabólitos C-19-glicosilados. Hidroxilações em C-3 α , C-6 α e C-11 β , foram observadas em produtos de ambos os substratos, significando que a mudança na orientação espacial do carbono metilênico C-4, de equatorial em (**144**), para axial em (**151**), de nada altera na maneira como esses *ent*-cauranos se ligam às enzimas oxidativas (esquema 25, pág. 68).

Um C-9 β hidroxilado foi formado na incubação de (**150**), reação também observada na incubação de um caurano 7 α -18-dihidroxi (FRAGA, 2003). Isso significa que um 15 α -19 diol é equivalente a um 7 α -18 diol no reconhecimento molecular do substrato pelas enzimas (FRAGA, 2010). Glicosídeos foram formados na incubação de (**151**) (α -CH₂-OH), mas não na incubação de (**144**) (β -CH₂-OH), sendo essa primeira vez que esse tipo de metabólito foi formado em biotransformação com *Mucor plumbeus*.



Esquema 25. Biotransformação de 15 α ,18-dihidroxi-*ent*-cauran-16-eno (144) e 15 α , 19-dihidroxi-*ent*-cauran-16-eno (151) pelo fungo *Mucor plumbeus*.

Estudo realizado com a incubação dos ácidos 15 α -hidroxi-grandiflorenico (**160**) e 15 α -hidroxi-*ent*-cauran-9 (11),16-dien-19-oico (**166**) com o fungo *Fusarium fujikuroi*, forneceu derivados com diversas modificações estruturais não usuais (FRAGA, 2013). A fermentação de (**160**), originou cinco produtos, dentre eles um derivado lactônico (**161**, 4,8%), um epóxi-derivado com hidroxilação adicional em C-3 α (**162**, 0,8%), um metabólito majoritário dihidroxilado nos carbonos C-3/C-6, ambos pela face β (**163**, 20%), um 6-ceto derivado com hidroxilação em C-3 β (**164**, 0,8%) e um produto derivado de descarboxilação oxidativa, com uma dupla exocíclica entre os carbonos C-4 e C-18 e dihidroxilado em C-3/C-6, ambos pela face β (**165**, 3,2%) (figura 13, pág. 69).

Na degradação de (**166**), nove produtos foram formados. Quatro derivados monohidroxilados nos carbonos C-3 β (**167**, 1,3%), C-6 β (**168**, 0,6%), C-7 α (**169**, 0,6%) e C-12 β (**170**, 0,6%); dois produtos com dihidroxilação em C-6/C-18, ambas β orientadas (**171**, 0,6%) e C-16 β /C-17 α (**172**, 2%), um derivado trihidroxilado nos carbonos C-12 β /C-16 β /C-17 α (**173**, 0,6%) e dois 16-epóxi-derivados, um simples (**174**, 2,7%) e outro com hidroxilação adicional em C-12 β (**175**, 1,3%) (figura 14, pág. 70).

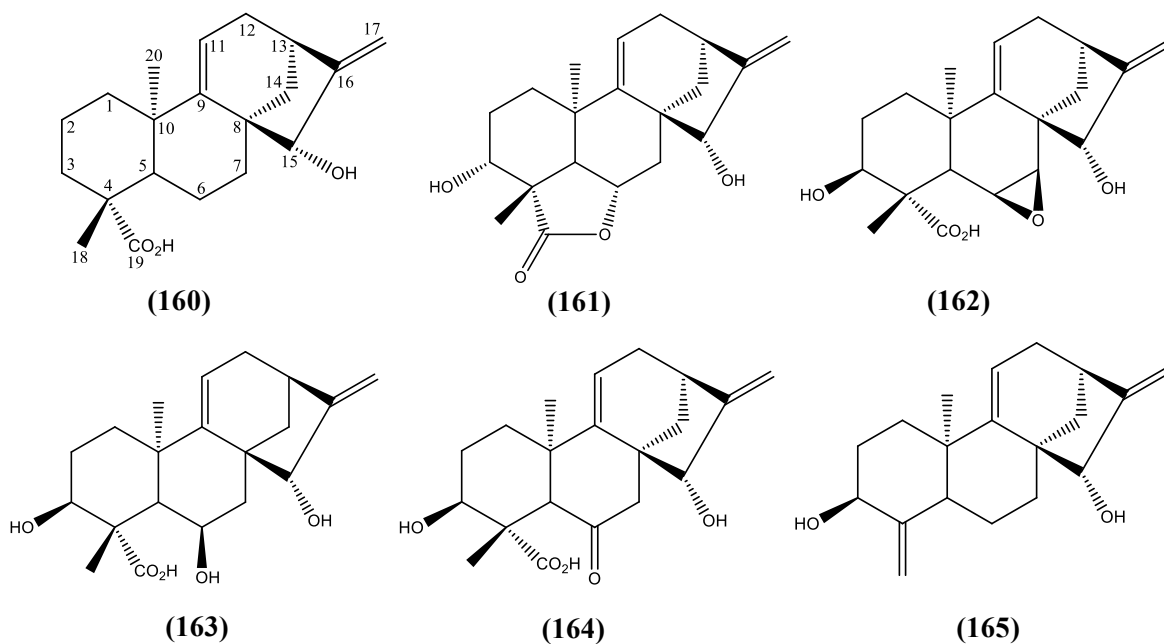
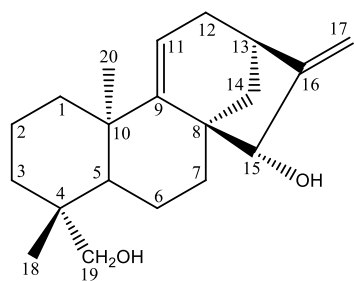
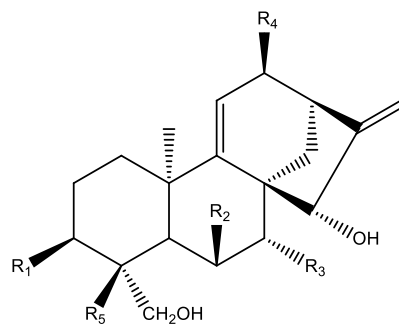


Figura 13. Ácido 15 α -hidroxi-grandiflorenico (**159**) e seus produtos de biotransformação resultantes da incubação com o fungo *Fusarium fujikuroi*.



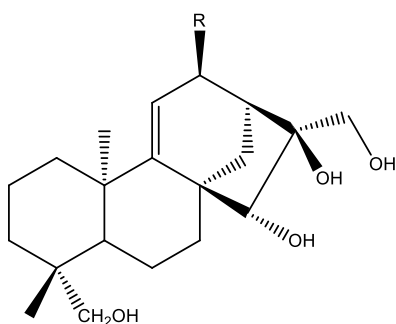
(166)

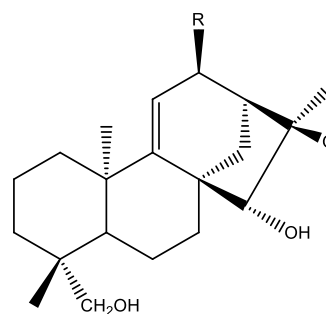

 (167) $R_1=OH$, $R_2=R_3=R_4=H$, $R_5=CH_3$

 (168) $R_2=OH$, $R_1=R_3=R_4=H$, $R_5=CH_3$

 (169) $R_3=OH$, $R_1=R_2=R_4=H$, $R_5=CH_3$

 (170) $R_4=OH$, $R_1=R_2=R_3=H$, $R_5=CH_3$

 (171) $R_2=OH$, $R_1=R_3=R_4=H$, $R_5=CH_2OH$

 (172) $R=H$

 (173) $R=OH$

 (174) $R=H$

 (175) $R=OH$

Figura 14. Ácido 15 α -hidroxi-*ent*-cauran-9 (11),16-dien-19-oico **(166)** e seus produtos de biotransformação resultantes da incubação com o fungo *Fusarium fujikuroi*.

Ademais de todas as modificações nos esqueletos caurânicos já discutidas, modificações estruturais que dão origem a outras classes de diterpenos já foram relatadas na literatura. Por exemplo, o *ent*-15-oxo-cauran-16-eno **(176)**, quando incubado com o fungo *Gibberella fujikuroi*, originou 5 metabólitos rearranjados: **(177, 1,2%)**, **(178, 0,9%)**, **(179, 0,6%)**, **(180, 3,2%)** e **(181, 0,6%)**, todos pertencentes à classe das giberelinas (figura 15, pág. 71), conhecidos fitohormônios que possuem funções relacionadas ao crescimento e regulação nas plantas (LAVAGNINI, 2014).

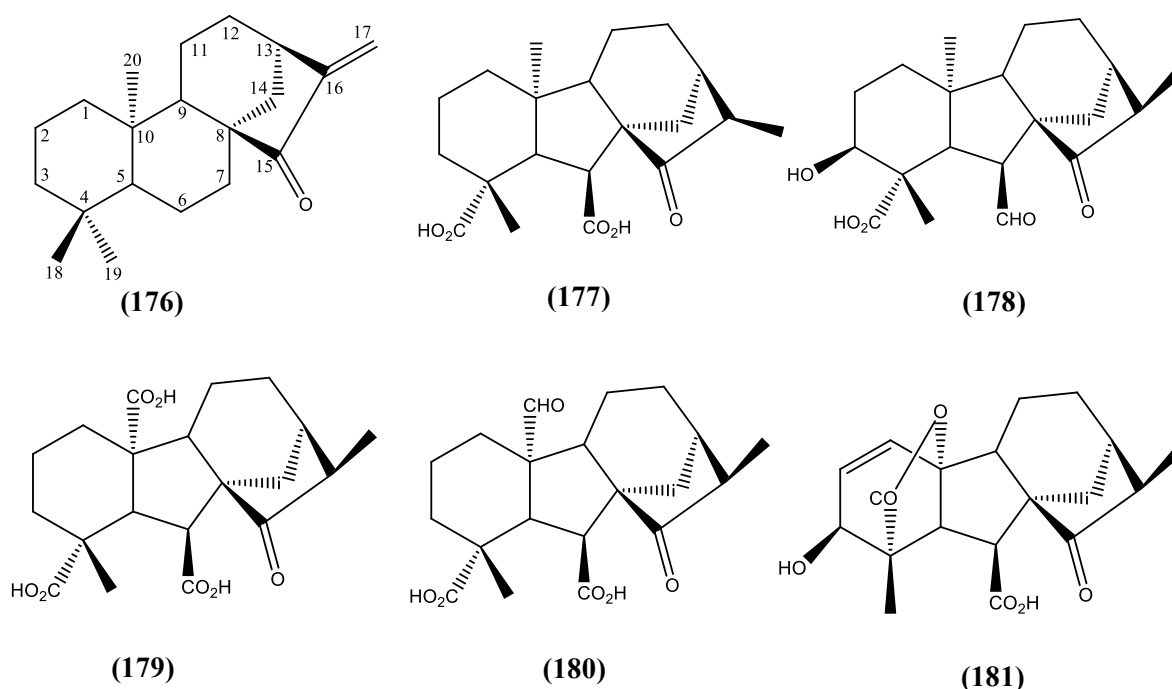
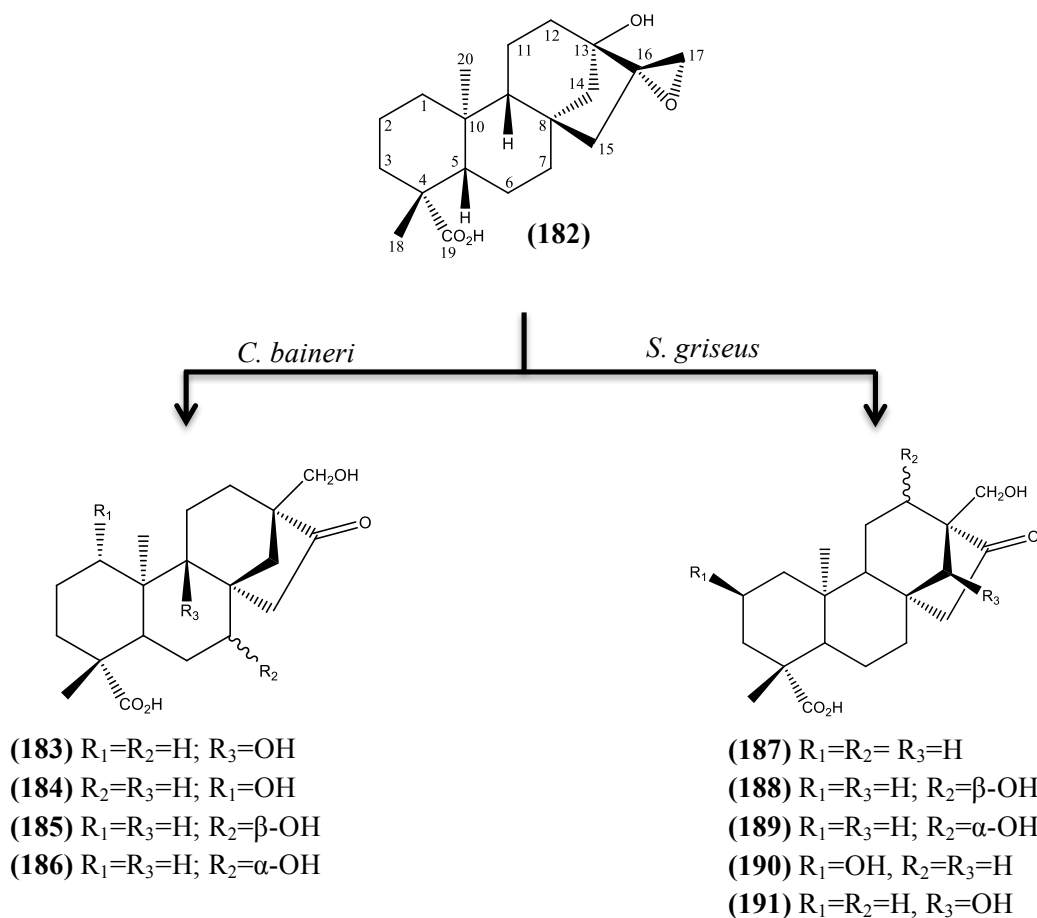


Figura 15. 7-oxo-ent-cauran-16-eno (**176**) e seus produtos de rearranjo formados na incubação com o fungo *Gibberella fujikuroi*.

Outro tipo de rearranjo interessante dos diterpenos cauranos pode ser exemplificado pela biotransformação do esteviol-16 α ,17-epóxido (**182**) na fermentação com os fungos *Cunninghamella baireri* e *Streptomyces griseus*, que deram origem produtos com esqueleto do tipo beierano (CHANG, 2006). A degradação de (**182**) com *C. baireri* deu origem a quatro metabólitos: ácidos *ent*-9 α ,17-dihidroxi-16-cetobeieran-19-oico (**183**, 2,7%), *ent*-1 β , 17-dihidroxi-16-cetobeieran-19-oico (**184**, 1,2%), *ent*-7 α ,17-dihidroxi-16-cetobeieran-19-oico (**185**, 2,5%) e *ent*-7 β ,17-dihydroxy-16-cetobeieran-19-oico (**186**, 1,4%). E a fermentação com *S. griseus* produziu cinco distintos derivados beieranos: ácidos *ent*-17-hidroxi-16-cetobeieran-19-oico (**187**, 2,4%), *ent*-12R,17-dihidroxi-16-cetobeieran-19-oico (**188**, 2,1%), *ent*-12 α ,17-dihidroxi-16-cetobeieran-19-oico (**189**, 0,9%), *ent*-2R,17-dihidroxi-16-cetobeieran-19-oico (**190**, 0,4%) e *ent*-14R,17-dihidroxi-16-cetobeieran-19-oico (**190**, 3,3%) (esquema 26, pág. 72). Dos produtos obtidos, apenas (**185**) e (**187**) já haviam sido isolados.



Esquema 26. Produtos de rearranjo formados na Biotransformação do esteviol-16 α ,17-epóxido (182) pelos fungos *Cunninghamella baineri* e *Streptomyces griseus*.

2.4.4 Beieranos

Os Beieranos são diterpenos que possuem estrutura química semelhante a dos Cauranos. A principal diferença entre os dois grupos é o rearranjo espacial dos anéis C e D. O isoesteviol (192) é um diterpeno desta classe que apresenta várias atividades biológicas descritas: ação antialimentar sobre insetos, diminuição dos níveis de glicose no organismo, inibição do transporte da D-glicose e da D-frutose através da membrana celular e diminuição da pressão arterial em ratos por meio da abertura do canal de sódio e potássio (AKIHISA, 2004).

Existem alguns relatos de biotransformações realizadas com o isoesteviol (**192**), utilizando bactérias e fungos como catalisadores. Em 1996, Oliveira e Strapasson obtiveram, da fermentação de (**192**) com o fungo *Fusarium verticilloides*, dois monohidróxi-derivados nos carbonos C-6 α (**193**, 5,4%) e C-12 β (**194**, 6,8%). Três anos mais tarde, Oliveira e colaboradores (1999) isolaram três produtos de biotransformação de (**192**), dois na fermentação com o fungo *Aspergillus niger*, sendo um C-3 β monohidroxilado (**195**, 27,4%) e outro C-1 α /C-3 β dihidroxilado (**196**, 6,6%). Com o fungo *Rhizopus arrhizus*, obtiveram o mesmo C-3 β monohidroxilado, porém com maior rendimento (**195**, 38,6%), e utilizando o *Penicillium chrysogenum*, isolaram a substância (**197**, 27,4%) (tabela 2, pág. 75).

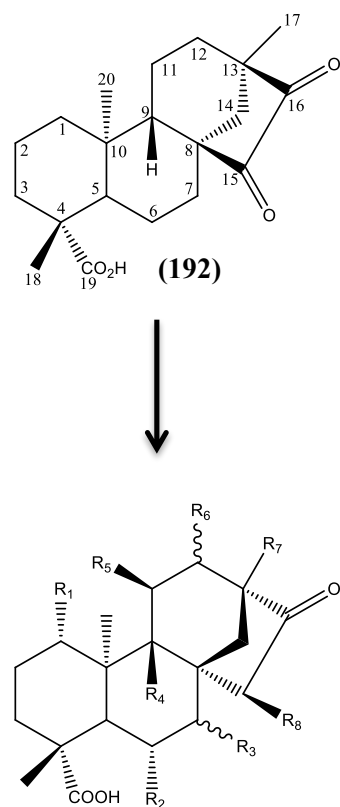
Hsu e colaboradores (2002), em experimentos de biotransformação obtiveram nove análogos de (**192**). Na fermentação com *Cunninghamella bairdii*, isolaram (**193**, 14,4%) e (**195**, 25,5%). Com a bactéria *Actinoplanes sp.*, formou-se um derivado dihidroxilado nos carbonos C-11 e C-12, ambos pela face β (**198**, 5,8%) e um trihidróxi-derivado em C-11 β /C-12 β e C-17 (**199**, 1,7%). Na degradação com o fungo *Mucor recurvatus*, dois novos produtos dihidroxilados foram formados em C-12 β /C-15 β (**200**, 4%) e C-7/C-15, ambos com hidroxilas β orientadas (**201**, 2,2%). Com *Cunninghamella blaksleeana*, obtiveram (**195**, 4,6%) e mais dois monohidróxi-derivados, com hidroxilações nos carbonos C-9 β (**202**, 8,4%) e C-12 β (**203**, 28,2%). De acordo com os autores, a espécie de fungo *C. bairdii* promoveu a funcionalização de (**192**) no carbono C-7, comumente relatada por outros microorganismos em esqueletos do tipo caurano e beirano, porém a hidroxilação no carbono metínico C-9 β foi realizada pela primeira vez em diterpenos com esqueleto beiranos. Os produtos (**198**), (**199**), (**200**), (**201**) e (**202**) foram relatados como novos na literatura (tabela 2, pág. 75).

Akihisa e colaboradores (2004) obtiveram quatro produtos de biotransformação do isoesteviol. Com o fungo *Aspergillus niger*, foram formados os metabólitos (**195**, 3,6%), (**203**, 4,5%) e um monohidroxilado em C-11 β (**204**, 2,2%). Com o fungo *Glomera cingulata* obtiveram (**205**, 8%), um derivado C-17 monohidroxilado. Com o fungo *Mortierella elongate*, formou-se (**195**, 15%) e um C-7 ceto-derivado (**206**, 6%). (tabela 2, pág. 75). Em 2008, Chang e

colaboradores obtiveram 18 produtos de biotransformação do isoesteviol (**192**); cinco usando o fungo *Mucor recurvatus*: (**193**, 0,6%), (**195**, 5,3%), (**200**, 3%), (**201**, 0,6%) e um C-15 β monohidroxilado (**207**, 0,5%); 6 resultantes da fermentação com o fungo *Absidia pseudocylindrospora*, sendo cinco dihidroxilados nos carbonos C-9 β /C-17 (**208**, 2,8%), C-12 β /C-17 (**209**, 13,8%), C-12 α /C-17 (**210**, 1,7%), C-7 α /C-17 (**211**, 2,3%) e C-7 α /C-12 β (**212**, 4%), e um trihidróxi-derivado em C-7 α /C-12 β /C-17 (**213**, 1,8%). Na fermentação com *Aspergillus niger*, formou-se 4 derivados hidroxilados nos carbonos C-1 α (**214**, 0,9%), C-1 α /C-7 (**215**, 0,6%), C-7 β /C-11 β (**219**, 0,9%) e C-1 α /C-6 α /C-7 β (**220**, 0,6%), dois 7-ceto derivados com hidroxilações adicionais em C-11 α (**216**, 0,9%) e C-1 α (**217**, 1,7%), e outro 1-ceto derivado com hidroxilação adicional em C-7 β (**218**, 0,9%) (tabela 2, pág. 75).

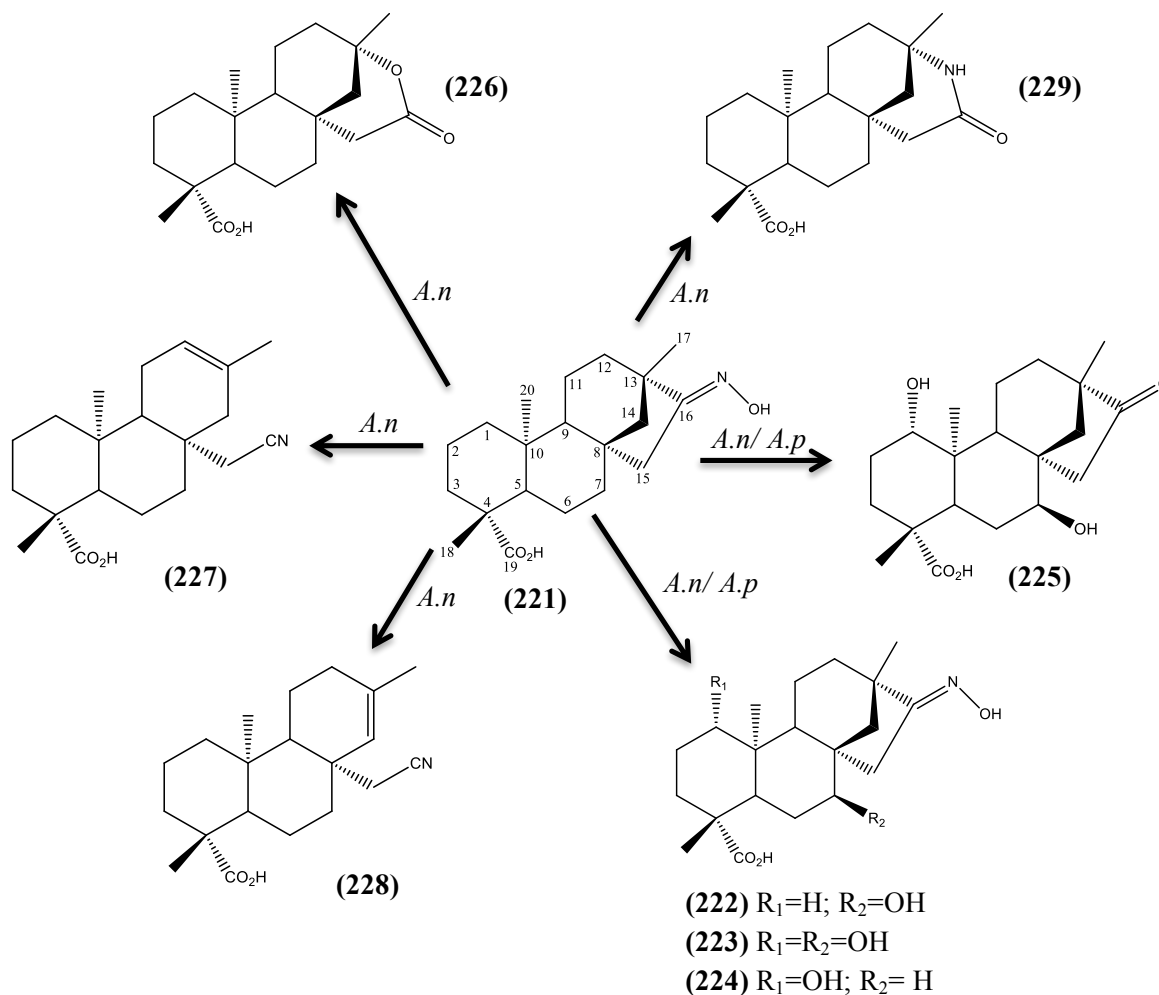
Em 2009, Chang e colaboradores, estudando a biotransformação do isoesteviol-16-oxima (ácido *ent*-16-E-hidroxiiminobeiran-19-oico) (**221**), com os fungos *Aspergillus niger* e *Absidia pseudocylindrospora*, obtiveram oito metabólitos, três deles com hidroxilações simples nos carbonos C-1 α (**224**, 1,6%), C-7 β (**222**, 9,8%) e C-1 α /C-7 β (**223**, 4%); um 16-oxo derivado com hidroxilação em C-1 α /C-7 β (**225**, 9,6%); um derivado lactâmico (**226**, 2%), um produto resultante de um rearranjo de Beckmann (**227**, 0,7%) e dois metabólitos originados a partir de rearranjo de Beckmann anormal (**228**, 3,2%) e (**229**, 1%) (esquema 27, pág. 76). As substâncias (**222**), (**223**), (**224**), (**228**) e (**229**) foram relatadas como inéditas na literatura. Todos os produtos obtidos foram testados quanto a sua ação antiinflamatória em linhagens de macrófagos RAW 267.4. Dentre os compostos, (**224**) e (**229**) inibiram significativamente a ativação de NF- κ β (fator nuclear kappa beta), apresentando a substância (**224**), efeitos semelhantes a dexametasona. Os análogos (**222**), (**225**), (**226**), (**227**) e (**228**), inibiram a ativação de AP-1 (ativador de proteína 1), particularmente (**227**), que apresentou atividade inibitória maior que a da dexametasona.

Tabela 2. Produtos de biotransformação do Isoesteviol (**192**).



Produto	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	R ₆	R ₇	R ₈	Referência
193	H	H	α-OH	H	H	H	H	H	46
194	H	H	H	H	H	β-OH	H	H	46
195	H	H	β-OH	H	H	H	H	H	3
196	α-OH	H	β-OH	H	H	H	H	H	46
197	H	H	H	H	H	H	CH ₂ OH	OH	46
198*	H	H	H	H	β-OH	β-OH	H	OH	46
199*	H	H	H	H	β-OH	β-OH	CH ₂ OH	H	46
200*	H	H	H	H	OH	β-OH	H	OH	46
201*	H	H	β-OH	H	H	H	H	OH	46
202*	H	H	H	OH	H	H	H	H	46
203	H	H	H	H	H	β-OH	H	H	3
204	H	H	H	H	β-OH	H	H	H	3
205	H	H	H	H	H	H	OH	H	46
206	H	H	=O	H	H	H	H	H	3
207	H	H	H	H	H	H	H	OH	46
208	H	H	H	OH	H	H	CH ₂ OH	H	46
209	H	H	H	H	H	β-OH	CH ₂ OH	H	46
210	H	H	H	H	H	α-OH	CH ₂ OH	H	46
211	H	H	α-OH	H	H	H	CH ₂ OH	H	46
212	H	H	α-OH	H	H	β-OH	H	H	46
213	H	H	α-OH	H	H	β-OH	CH ₂ OH	H	46
214	α-OH	H	H	H	H	H	H	H	46
215	α-OH	H	β-OH	H	H	H	H	H	46
216	H	H	=O	H	α-OH	H	H	H	46
217	α-OH	H	=O	H	H	H	H	H	46
218	=O	H	β-OH	H	H	H	H	H	46
219	H	H	β-OH	H	OH	H	H	H	46
220	α-OH	OH	β-OH	H	H	H	H	H	46

* produtos novos



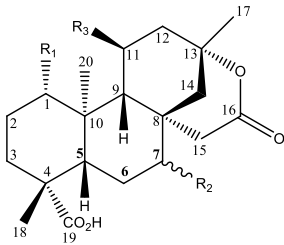
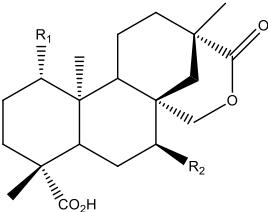
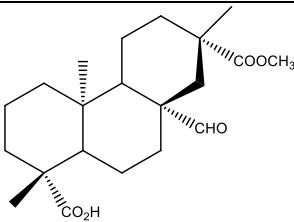
Esquema 27. Biotransformação do isosteviol oxima (221) pelos fungos *Aspergillus niger* e *Absidia pseudocylindrospora*.

Em 1990, Leuernberger publicou um artigo sobre como pequenas mudanças, realizadas sinteticamente na molécula do esteviol-lactona (230), causava alteração em sua atividade biológica. Dessa forma, alguns estudos de biotransformação foram conduzidos com esse derivado lactâmico do esteviol, com finalidade de se obter análogos com modificações distintas. Em 2008, Chou e colaboradores, realizaram uma triagem com 25 espécies de fungos, a fim de identificar os microorganismos capazes de metabolizar o isosesteviol-lactona (230). Dentre eles, *Cunninghamella baineri* e *Aspergillus niger* foram selecionados para realizar experimentos em escala preparativa.

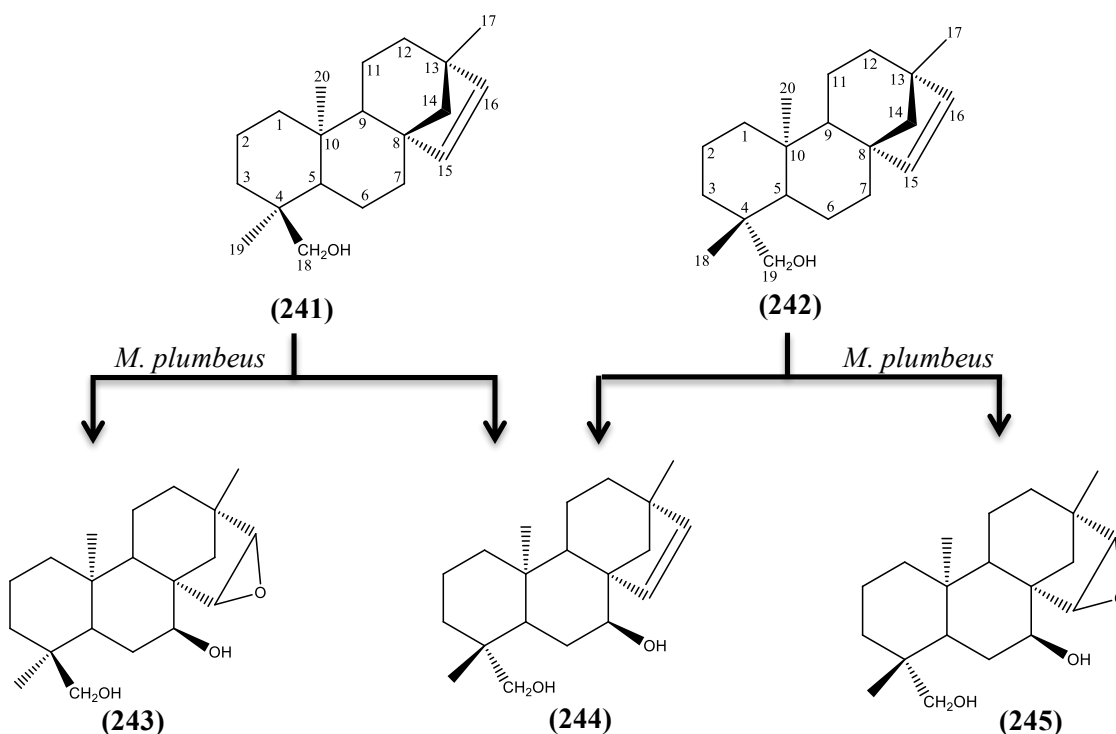
A fermentação com *C. baineri*, deu origem a um produto monohidroxilado no carbono C-7, pela face β (**231**, 0,5%), dois metabólitos funcionalizados por reações de isomerização das porções lactona (**236**, 0,3%) e (**237**, 0,5%), e um por clivagem do anel, seguida de oxidação e O-metilação seletiva (**240**, 0,6%). Enquanto que o fungo *A. niger*, apresentou não apenas a habilidade de isomerização do anel lactona para gerar (**236**, 0,5%) e outras duas distintas (**238**, 1%) e (**239**, 0,7%), como também a capacidade de mono, di e trihidroxilações regio- e estereosseletiva em C-1 α (**232**, 6%), C-7 β (**231**, 0,4%), C-1 α /C-7 β (**233**, 6,6%) e C-1 α / C-7 β / C-11 β (**235**, 1,4%), além da produção de um 7-oxo derivado (**234**, 0,6%) (tabela 3, pág. 77).

Todos os compostos, exceto (**232**) e (**234**), foram testados como agonistas andrógenos, por meio de um ERA (elemento de resposta para andrógeno). Os compostos (**237**), (**239**) e (**240**) foram significativamente ativos, possuindo o (**240**) maior atividade que a testosterona (CHOU, 2008).

Tabela 3. Produtos de biotransformação do isoesteviol lactona (**230**).

Estrutura	Substituição	Fungos	
		<i>C. baineri</i>	<i>A. niger</i>
	230 R ₁ =R ₂ =R ₃ =H		
	231 R ₂ = β -OH, R ₁ =R ₃ =H	X	X
	232 R ₂ =R ₃ =H, R ₁ =OH		X
	233 R ₂ = β -OH, R ₁ =OH, R ₃ =H		X
	234 R ₂ =O, R ₁ =R ₃ =H		X
	235 R ₂ = β -OH, R ₁ =R ₃ =OH		X
	236 R ₁ =R ₂ =H	X	X
	237 R ₁ =H, R ₂ =OH	X	
	238 R ₁ =OH, R ₂ =H		X
	239 R ₁ =R ₂ =OH		X
	240	X	

Em trabalho mais recente, Chamy e colaboradores (2013), utilizaram o fungo *Mucor plumbeus* na incubação de dois diterpenos beieranos epiméricos no carbono C-4: *ent*-beieran-15-en-18-ol (**241**) e *ent*-beieran-15-en-19-ol (**242**). Como resultado, obtiveram o mesmo monohidróxiderivado em C-7 β (**244**, 15 e 13,3%, nesta ordem), e seus respectivos epóxidos, também com hidroxilações nos carbonos C-7 β (**243**, 6,6%) e (**245**, 16,6%). (esquema 28, pág. 78). A partir dos resultados, os autores inferiram que a presença de um grupo hidroxila nos carbonos C-18 ou C-19, não alterou a via de hidroxilação com o fungo.



Esquema 28. Biotransformação do *ent*-beieran-15-en-18-ol (**241**) e *ent*-beieran-15-en-19-ol (**242**) pelo fungo *Mucor plumbeus*.

2.4.5 Traquilobanos

Diterpenos do tipo traquilobano são caracterizados por apresentarem um esqueleto pentacíclico, com um sistema de triciclo [3.2.1.0] octano, intimamente relacionado com a série *ent*-caurano. Tem sido demonstrado que compostos *ent*-

traquilobânicos possuem efeitos citotóxicos em células HeLa e HL-60 e iduzem apoptose em células humanas com leucemia promielocítica (BLOCK, 2005), além de possuírem atividade anti-microbiana, tripanocida e anti- HIV (MISTCHER, 1983; GHISALBERTI, 1977; FRAGA, 1994).

Em vários estudos envolvendo diterpenos, Fraga e colaboradores isolaram derivados *ent*-cauran-11-eno em conjunto com outros diterpenos do gênero *Sideritis*. Esses derivados caurânicos, que são raros na natureza, foram isolados apenas de plantas contendo diterpenos *ent*-tranquilobanos, o que fez com que os autores propusessem que diterpenos com um esqueleto *ent*-traquilobânico poderiam ser precursores biogênicos de derivados *ent*-cauran-11-eno. Com objetivo de obter alguma evidência sobre a hipótese, eles levaram a cabo a biotransformação do traquinodiol (**246**) pelo fungo *Mucor plumbeus*, na tentativa de obter o seu derivado *ent*-cauran-11-eno correspondente, o sicanatriol (**247**), o qual é difícil de preparar utilizando métodos químicos (FRAGA, 2011).

Como resultado, foram formados quatro metabólitos decorrentes de hidroxilações simples no esqueleto do traquinodiol nos carbonos C-1 α (**247**, 0,6%), C-2 α (**248**, 2%), C-3 α (**249**, 1,3%) e C-17 β (**250**, 3,3%). Originou-se também o derivado *ent*-cauran-11-eno esperado (**251**, 2%) (Esquema 29, pág. 80), o que fez com que os autores concluíssem que a biotransformação de (**246**) a (**251**) deveria ocorrer de um modo semelhante ao que postularam em trabalhos com plantas do gênero *Sideritis*, nos quais diterpenos *ent*-traquilobânico e *ent*-cauran-11-eno coexistem (FRAGA, 2003).

Em 2002, experimentos de biotransformação do ácido traquilobano-19-oico (**252**) realizados por Silva e colaboradores com o fungo *Rhizopus stolonifer*, renderam dois compostos traquilobanos, hidroxilados em C-7 β (**253**) e C-17 (**254**), e rearranjados do tipo *ent*-cauran-11-en-19-oico, hidroxilados em C-16 α (**255**) e C-9 β /C-16 α (**256**), corroborando o estudo de Fraga (figura 16, pág. 80).

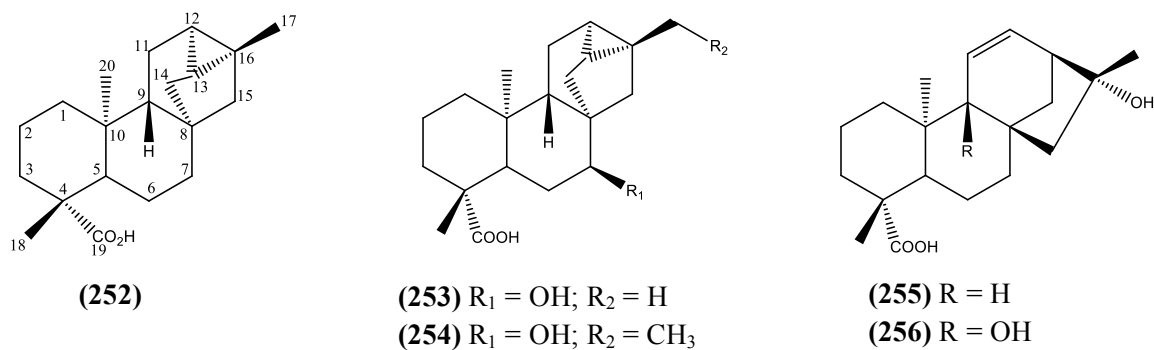
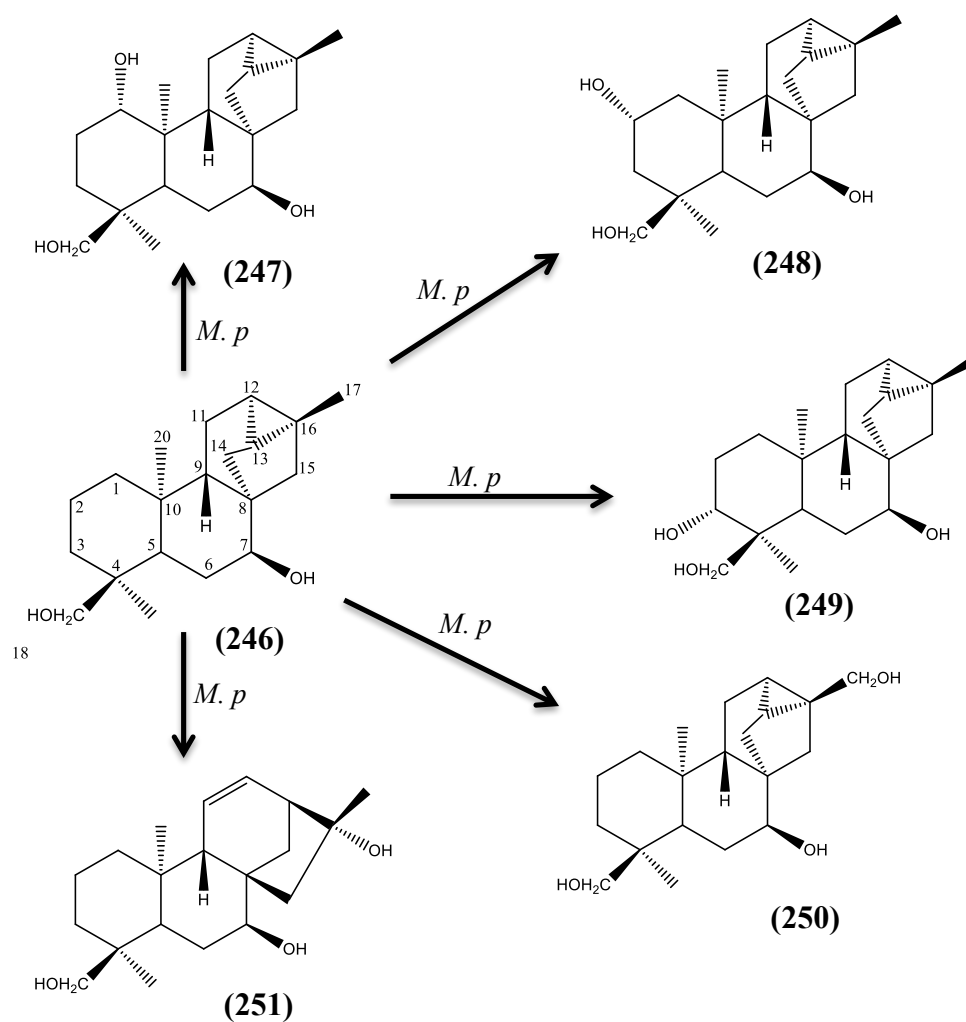
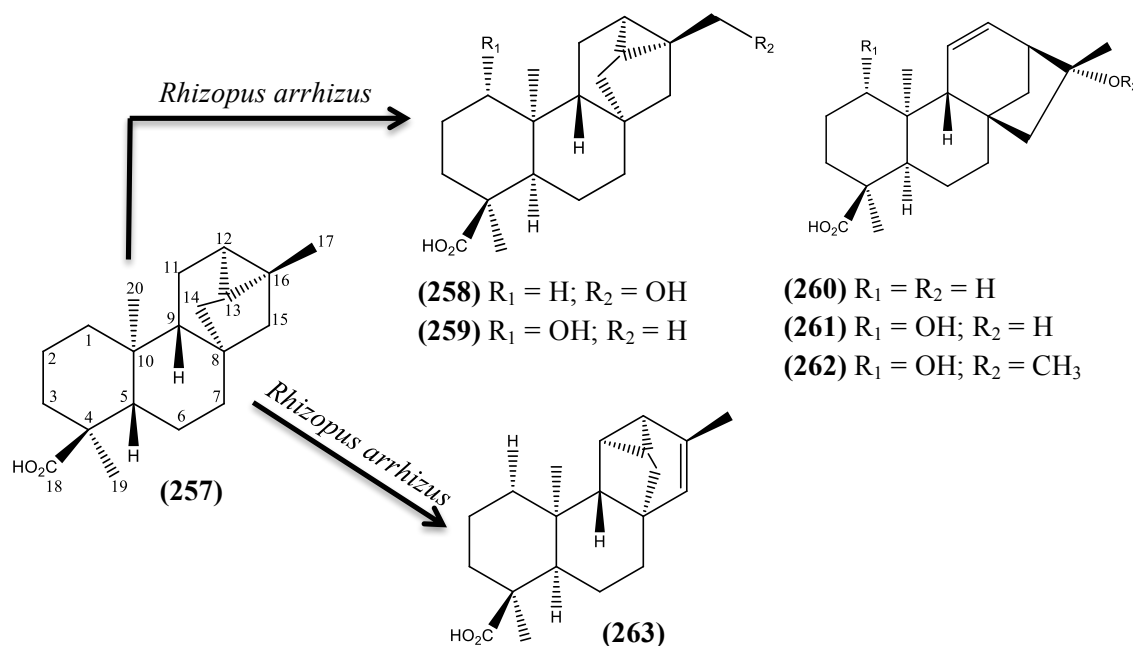


Figura 16. Ácido *ent*-traquiloban-18-oico e seus produtos de biotransformação obtidos pela fermentação com o fungo *Rhizopus stolonifer*.



Esquema 29. Biotransformação do traquinodiol (246) pelo fungo *Mucor plumbeus*.

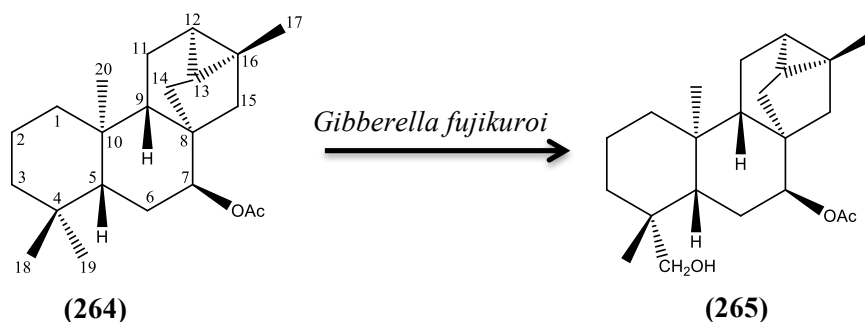
Em 2010, utilizando o fungo *Rhizopus arrhizus*, Leverrier e colaboradores obtiveram seis compostos oxidados a partir da biotransformação do ácido *ent*-traquiloban-18-oico (**257**). Os compostos (**258**, 2,8%) e (**259**, 3,7%) resultaram de hidroxilação enzimática direta de (**257**) nas posições C-1 α e C-17, nessa ordem. Três derivados foram gerados a partir de rearranjo pós-clivagem do anel ciclopropano, com posteriores hidroxilações nos carbonos C-16 (**260**, 4,2%), C-1 α (**261**, 9,6%) e C-16 com inserção de uma metoxila adicional α orientada no carbono C-17 α (**262**, 1,8%), respectivamente. O composto (**263**, 1%) foi produzido por rearranjo do esqueleto carbônico triciclo [3.2.1.0] octano, com mudança do anel ciclopropano para os carbonos C-11, C-12 e C-13. Todos os produtos foram descritos como novos na literatura (esquema 30, pág. 81).



Esquema 30. Biotransformação do ácido *ent*-traquiloban-18-oico (**257**) pelo fungo *Rhizopus arrhizus*.

O trabalho mais recente envolvendo biotransformação de traquilobanos foi publicado por Fraga e colaboradores (2012), no qual utilizaram o fungo *Gibberella fujikuroi* na degradação do Traquinol acetato (**264**). O experimento originou apenas um monohidroxiderivado no carbono C-19 (**265**, 1,3%) (esquema 31, pág. 82). De acordo com os autores, o fungo apresentou baixa eficiência em

biotransformar o substrato.



Esquema 31. Biotransformação do Traquinol acetato **(264)** pelo fungo *Gibberella fujikuroi*.

2.4.6 Estemodanos

Quimicamente, os diterpenos com esqueleto estemodano possuem uma estrutura tetracíclica única: uma transdecalina (aneis A/B), fundida com um biciclo [3.2.1] octano (aneis C/D). Tais estruturas representam um desafio sintético devido a sua conformação rígida. Dessa forma, modificações estruturais dessas substâncias e seus análogos, via transformações microbiológicas, representam uma alternativa ímpar na tentativa de obtenção de derivados com potencial atividade biológica. Ademais, diterpenos estemodanos, aqui representados pela Estemodina **(263)**, são bastante atrativos por possuírem estrutura semelhante a da afidicolina **(264)**, um potente agente antiviral e inibidor específico da DNA-polimerase, isolado do fungo *Cephalosporium aphidicola* (BUCKNALL, 1973) (figura 17, pág. 82).

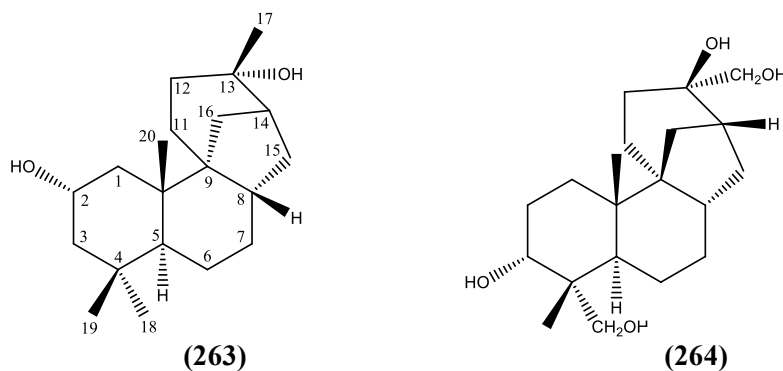
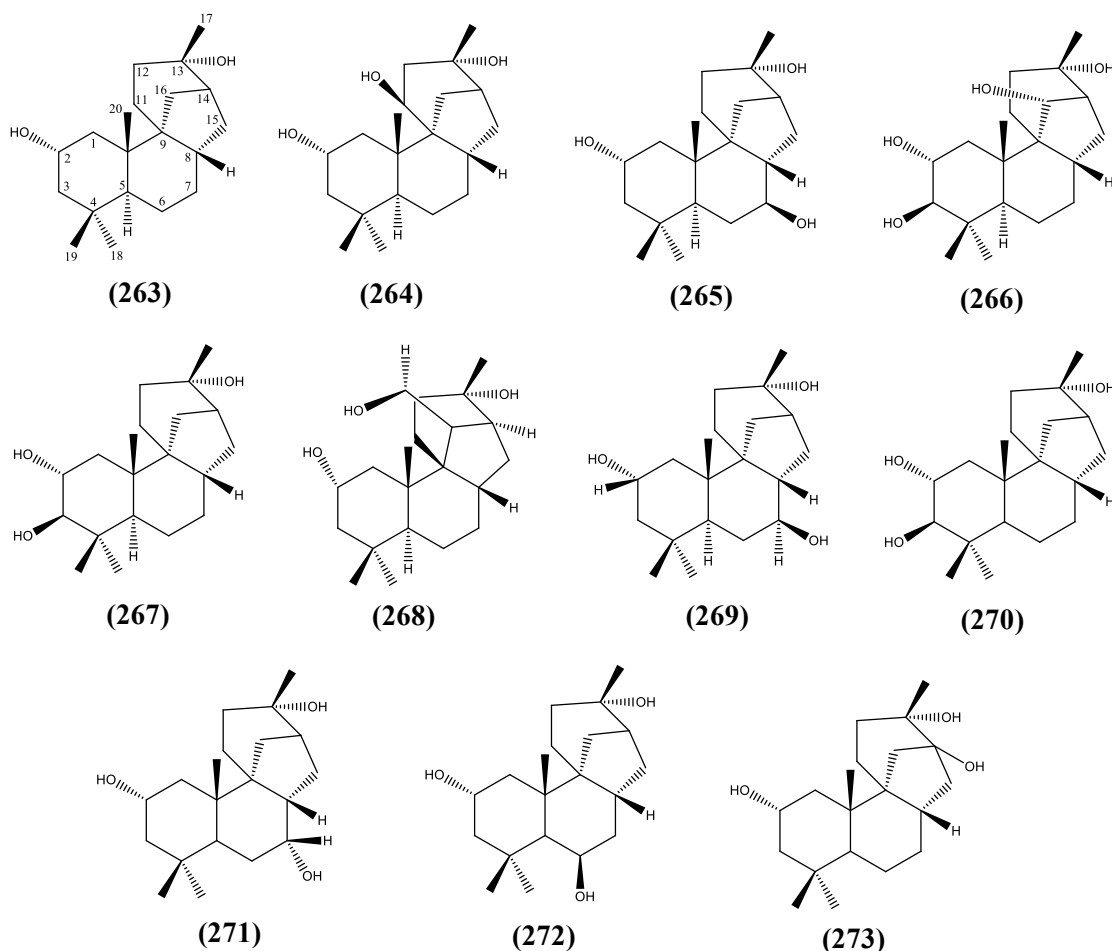


Figura 17. Estrutura química da Estemodina **(263)** e Afidicolina **(264)**.

A Estemodina (**263**) foi alvo de estudos de biotransformação realizados por diversos grupos de pesquisa, com diferentes fungos, os quais resultaram em uma grande variedade de análogos hidroxilados regio- e estereosseletivamente (figura 18, pág. 83).



Fungos	Substâncias	Ref.
<i>W. sclerotiorum</i>	264 (2,6%), 265 (18,9%)	51
<i>R. oryzae</i>	264 (7,6%), 266 (3,8%)	176
<i>A. niger</i>	267 (19,4%), 268 (ni), 269 (0,3%)	50
<i>C. echinulata</i>	269 (22,3%), 270 (8,8%), 271 (21%)	160
<i>P. chrysosporium</i>	264 (0,5%), 269 (8,5%), 270 (0,7%)	160
<i>M. plumbeus</i>	264 (4,6%), 270 (4%), 272 (4,4%), 273 (1,8%)	51

* ni= não isolado

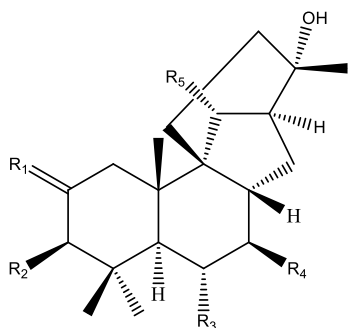
Figura 18. Estrutura química da Estemodina (**263**) e seus derivados hidroxilados, obtidos por biotransformação utilizando diferentes espécies de fungos.

O análogo da Estemodina mais produzido foi **(264)**, um derivado 11- β hidroxilado, apresentando maior rendimento (7,6%) na fermentação com o fungo *R. oryzae* (MARTIN, 2004b). O 7- β hidroxiderivado **(269)** foi produzido com maior rendimento (22,3%) em experimentos com o fungo *C. echinulata* (LAMM, 2006).

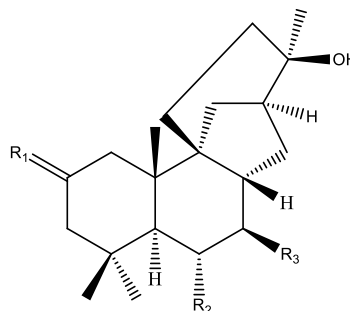
Com o bjetivo de estudar a importância da presença de função oxigenada no carbono C-2 e da estereoquímica de C-13 nos diterpenos estemodanos para a ocorrência da biotransformação, Martin e colaboradores realizaram dois trabalhos subsequentes (2004a e 2004b), com o fungo *Rhizopus oryzae* na incubação da estemodina **(263)** e treze de seus análogos, os quais foram divididos em quatro grupos: 13-OH (S) **(263, 274-276)**, 13-*epi*-OH (R) **(284-286)**, 12-eno **(291-293)** e 13-H **(295-298)**.

No grupo 13-OH (S), a incubação de **(263)**, deu origem ao monohidroxilado **(277, 7,6%)** e o dihidroxilado **(278, 3,8%)**, em C-7 β e C-3 β /C-16 α , respectivamente. O substrato **(274)** gerou **(279, 1,4%)**, com hidroxila adicional no carbono C-6 α , e **(275)** forneceu **(280, 5,3%)**, metabólito monohidroxilado no carbono C-7 β . No grupo 13-*epi*-OH (R), a fermentação de **(281)** deu origem a **(284, 88%)**, igualmente oxidado em C-7 β ; **(282)** gerou **(285, 12,8%)**, e **(286, 11,4%)**, com C-6 α OH e C-7 β OH, nessa ordem; enquanto que **(283)** forneceu **(287, 8%)**, monohidroxiderivado no carbono C-7 β . A mudança na estereoquímica do grupo funcional hidroxila de α para β em C-2, e a conversão desta função para cetona, resultaram em padrões diferentes de hidroxilações nos substratos, enquanto que a remoção completa da funcionalidade em C-2 **(276)**, fez com que a substância não fosse metabolizada pelo fungo. A mudança na estereoquímica de C-13 resultou em rendimentos mais altos dos metabólitos obtidos. Os produtos **(279)**, **(285)**, **(286)** e **(287)** forma relatados como inéditos na literatura.

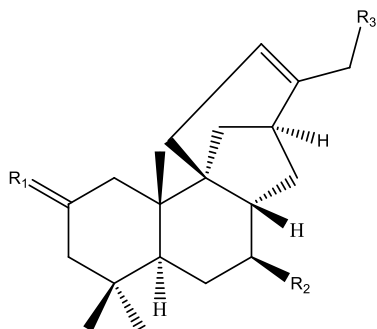
No grupo 12-eno, apenas a substância **(288)** gerou um dihidroxiderivado em C-7 β /C-17 **(291, 2,6%)**. E no grupo 13-H, no qual a função hidroxila estava ausente, nenhum metabólito foi formado, mesmo com os produtos de partidas tendo diferentes funcionalizações em C-2. (figura 19, pág. 85) Dessa forma, os autores inferiram que dois grupos de encaixe (hidroxila e/ou carbonila) seriam preferíveis para que ocorresse a bioconversão.



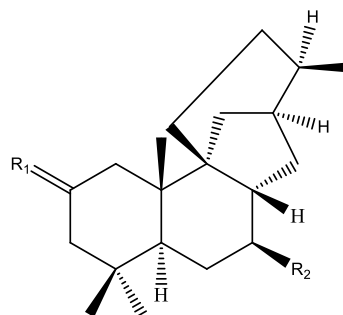
- (263) $R_1=\alpha\text{-OH}$, $R_2=R_3=R_4=R_5=\text{H}$
 (274) $R_1=\text{O}$, $R_2=R_3=R_4=R_5=\text{H}$
 (275) $R_1=\beta\text{-OH}$, $R_2=R_3=R_4=R_5=\text{H}$;
 (276) $R_1=\text{H}_2$, $R_2=R_3=R_4=R_5=\text{H}$
 (277) $R_1=\alpha\text{-OH}$, $R_2=R_3=R_5=\text{H}$; $R_4=\text{OH}$
 (278) $R_1=\alpha\text{-OH}$, $R_2=R_5=\text{OH}$, $R_3=R_4=\text{H}$
 (279) $R_1=\text{O}$, $R_2=R_4=R_5=\text{H}$, $R_3=\text{OH}$
 (280) $R_1=\beta\text{-OH}$, $R_2=R_3=R_5=\text{H}$, $R_4=\text{OH}$



- (281) $R_1=\alpha\text{-OH}$, $R_2=R_3=\text{H}$
 (282) $R_1=\text{O}$, $R_2=R_3=\text{H}$
 (283) $R_1=\beta\text{-OH}$, $R_2=R_3=\text{H}$;
 (284) $R_1=\alpha\text{-OH}$, $R_2=\text{H}$, $R_3=\text{OH}$
 (285) $R_1=\text{O}$, $R_2=\text{OH}$, $R_3=\text{H}$
 (286) $R_1=\text{O}$, $R_2=\text{H}$, $R_3=\text{OH}$
 (287) $R_1=\beta\text{-OH}$, $R_2=\text{H}$, $R_3=\text{OH}$



- (288) $R_1=\text{O}$, $R_2=R_3=\text{H}$
 (289) $R_1=\beta\text{-OH}$, $R_2=R_3=\text{H}$
 (290) $R_1=\text{H}_2$, $R_2=R_3=\text{H}$;
 (291) $R_1=\text{O}$, $R_2=R_3=\text{OH}$



- (292) $R_1=\alpha\text{-OH}$, $R_2=\text{H}$
 (293) $R_1=\text{O}$, $R_2=\text{H}$
 (294) $R_1=\beta\text{-OH}$, $R_2=\text{H}$
 (295) $R_1=\text{H}_2$, $R_2=\text{H}$

Figura 19. Estruturas químicas de substratos e produtos estemodanos, com diferentes padrões de hidroxilação, obtidos pela fermentação com o fungo *Rhizopus oryzae*.

2.4.7 Labdanos

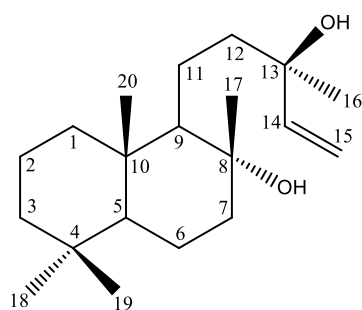
Os labdanos são diterpenos bicíclicos, que possuem um sistema trans-decalina ligado a um anel C-6, que pode ser aberto ou fechado com a presença de um átomo de oxigênio, como no manoil-óxido e seus derivados. Possuem várias atividades biológicas descritas, tais como: neuroprotetora (XU, 2011), antiviral (OLIVEIRA, 2012), antimicrobiana (GHOSH, 2013), antiinflamatória (ENDRINGER, 2014), cardioprotetora (CUADRADO-BERROCAL, 2015), citotóxica (DEMETZOS, 2001), entre outras.

- **Esclareol**

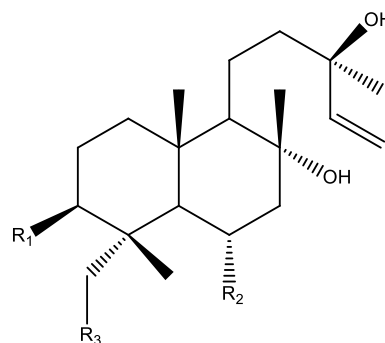
O esclareol (**296**) é um composto representativo da classe dos diterpenos labdanos que é largamente utilizado como aroma em produtos cosméticos e como aditivo na indústria de alimentos e bebidas. Possui também atividades biológicas atribuídas: podem induzir parada do ciclo celular e apoptose em células de câncer de mama humano e células leucêmicas (DIMAS, 2006; DIMAS 2007), ação antiinflamatória (HUANQ, 2012), citotóxica e antitumoral (HATZIANTONIOU, 2006), antifúngica (MENDOZA, 2015) e antimicrobiana (SOUZA, 2011).

O esclareol já foi amplamente utilizado como substrato de biotransformação por fungos e bactérias. A incubação deste diterpeno com os fungos *Aspergillus alliaceus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus ochraceus*, *Cunninghamella echinulata*, *Cunninghamella elegans*, *Cunninghamella sp.*, *Curvularia lunata*, *Mortierella ramanniana*, *Mortierella isabellina*, *Mucor plumbeus*, *Rhizopus arrhizus*, *Rhizopus stolonifer* e *Sporotrichum exile*, deram origem predominantemente aos metabólitos hidroxilados (**297**), (**298**) e (**299**) (figura 20, pág. 87). Os melhores rendimentos relatados foram de 74% de 18-hidroxysclareol (**299**), usando *Rhizopus stolonifer* (DIEZ, 2005), e 84% de 3β-hidroxiesclareol (**297**), usando *Mucor plumbeus* (ARANDA, 1991). *Cunninghamella sp.* também produziu (**297**) e (**299**) com bons rendimentos (50% e 36%, respectivamente) (ARANDA, 1991). O composto 6α-hidroxiesclareol (**298**) também foi um produto muito comum dentre os microrganismos relatados, com exceção dos ensaios com *Cunninghamella elegans*, *Cunninghamella sp* e

Fusarium lini, nos quais esse produto não foi produzido.



(296)



(297) $R_1=OH$, $R_2=R_3=H$

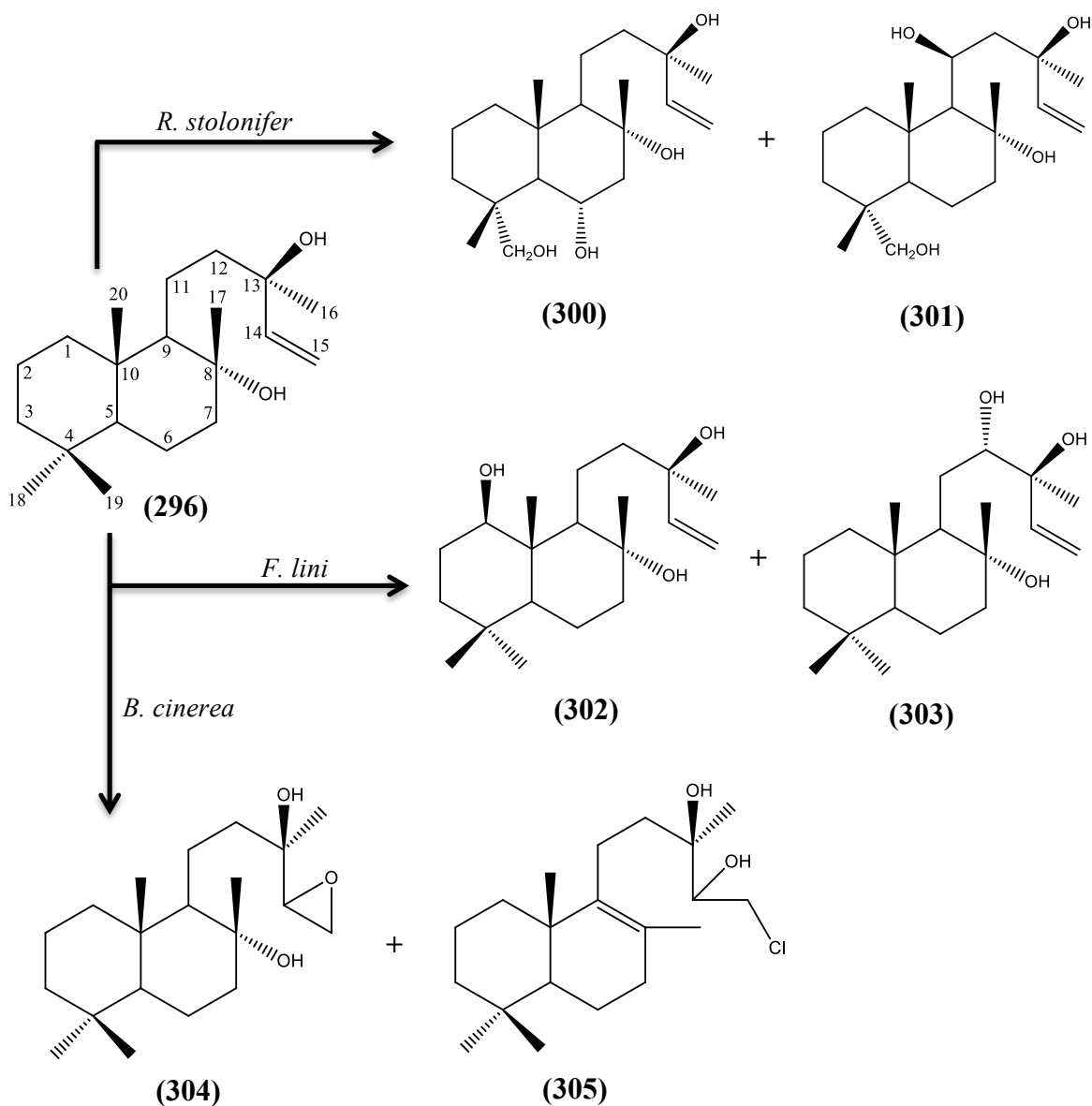
(298) $R_1=R_3=H$, $R_2=OH$

(299) $R_1=R_2=H$, $R_3=OH$

Figura 20. Metabólitos predominantemente produzidos na biotransformação do Escalareol (296) por diversas espécies de microorganismos.

No entanto, Choudhary e colaboradores (2013) realizaram a incubação do esclareol (296) também com o fungo *Rhizopus stolonifer* e *Fusarium lini*. Na incubação com o primeiro fungo, dois produtos distintos dos observados nos estudos anteriormente descritos: (6R)- 6,18-dihidroxi-esclareol (300, 3,5%) e (11S)-11,18-dihidroxi-esclareol (301, 4,6%). Na fermentação com *Fusarium lini*, houve formação de dois metabólitos diferentes: 1 β - hidroxi-esclareol (302, 1,3%) e (12S)-12-hidroxi-esclareol (303, 1%). Tais dados evidenciam que as condições de cultivo influenciam consideravelmente na condução das reações e, consequentemente, nos bioprodutos formados.

Farooq e Tahara (2000) utilizaram o fungo *Botrytis cinerea* na incubação de (296) e obtiveram dois produtos biotransformados: epoxi-esclareol (304, 64%) e o 8-deoxi-14,15-dihidro-15-cloro-14-hidroxi-8,9-dehidroesclareol (305, 7%), um metabólito novo e um raro exemplo de halogenação microbiana. (esquema 32, pág. 88).



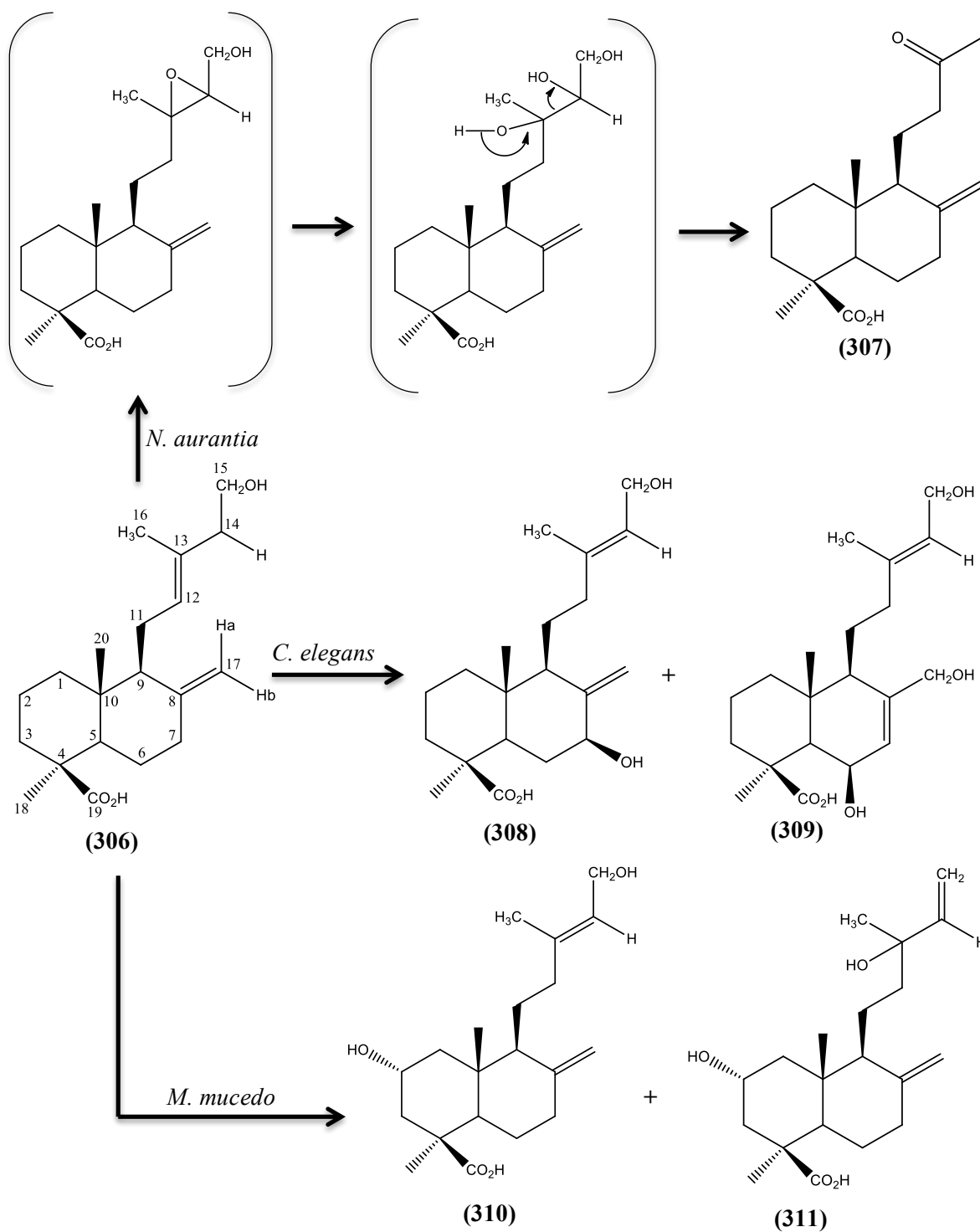
Esquema 32. Biotransformação do Escalareol (296) pelos fungos *Ryzopus stolonifer*, *Fusarium lini* e *Botrytis cinerea*.

- **Ácido Isocuprêssico**

O ácido Isocuprêssico (15-hidroxiabdan-8(17),13E-dien-19 oico, **306**) é um diterpeno labdano encontrado em espécies do gênero *Pinus*. Esse tipo de terpeno é transformado *in vivo* após a ingestão, podendo originar metabólitos potencialmente mais ou menos ativos, tóxicos, ou inativos em relação a substância de partida. Dessa forma, o estudo de Biotransformação desses compostos contituem uma ferramenta útil para prever sua biotransformação oxidativa nos mamíferos (LIN, 1998).

A pesquisa mais importante nesse âmbito foi realizada por Lin e Rosazza em 1998, na qual, após screening com 31 microorganismos, os autores selecionaram a bactéria *Nocardia aurantia* e os fungos *Cunninghamella elegans* e *Mucor mucedo* como “modelos xenobióticos de metabolismo” capazes de catalisar a biotransformação do Ácido Isocuprêssico (**306**).

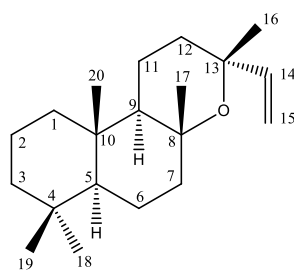
Na incubação com *N. aurantia*, apenas um metabólito marjoritário foi produzido: ácido 14,15-dinorlabdan-8(17)-en-13-on-19-oico (**307**, 18%), através de uma clivagem oxidativa na cadeia lateral de (**306**), possivelmente envolvendo uma epoxidação inicial da olefina entre os carbonos C-13 e C-15. A fermentação com *C. elegans* forneceu dois derivados hidroxiladoos: ácido 7β-hidroxi isocuprêssico (**308**, 3,5%) e ácido labdan-7,13 (E)-dien-6α,15,17- triol-19-oico (**309**, 1%). Dois metabólitos foram produzidos pela biotransformação com *M. mucedo*: ácido 2R-hidróxi isocuprêssico (**310**, 2,5%) e ácido labdan-8(17),14-dien-2R,13- diol-19-oico (**311**, 3%) (esquema 33, pág. 90). Estudos de transformação microbianas com Esclareol (**296**) e seus análogos indicam que hidroxilações geralmente ocorrem em posições 2R, 3α, e 18, padrões diferentes daqueles observados para o Ácido Isocuprêssico (**206**). Dessa forma, os autores concluíram que a presença de um grupo funcional de ácido carboxílico na posição C-19, provavelmente influencia os diferentes padrões de hidroxilações microbianas obtidos com o substrato (LIN, ROSAZZA, 1998).



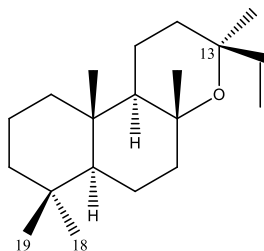
Esquema 33. Biotransformação do Ácido Isocupressico (306) pelos microorganismos *Nocardia aurantia*, *Cunninghamella elegans* e *Mucor mucedo*.

• Derivados do Manoil óxido

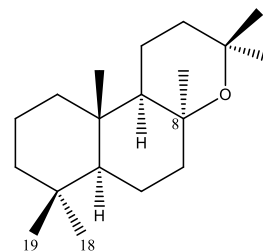
Os derivados do Manoil óxido são diterpenos labdanos tricíclicos, que possuem um anel tetrahidropirano e uma estrutura 8,13-epoxi-labdan-14-eno. Estes compostos diterpênicos foram isolados de várias famílias de plantas e a maioria deles pertencem à série normal, embora tenham sido encontrada na natureza uma grande variedade de derivados da série *enantio*. Além disso, alguns óxidos de manoil com diferentes configurações nos centros quirais C-8 e C-13 têm sido descritos, apresentando compostos com estrutura 8-*epi*, 13-*epi* ou 8,13-*diepi* Manoil óxido, e derivados *ent*-13-*epi* manoil óxido (GARCÍA-GRANADOS, 2007) (figura 21, pág. 91).



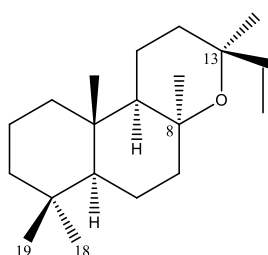
Manoilo óxido



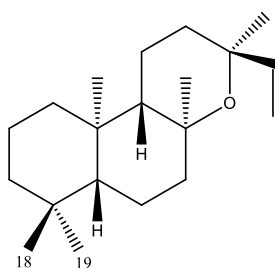
13-*epi*-Manoilo óxido



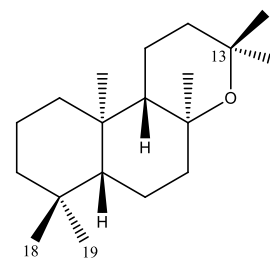
8-*epi*-Manoilo óxido



8,13-*diepi*-Manoilo óxido



ent-Manoilo óxido



ent-13-*epi*-Manoilo óxido

Figura 21. Estereoisômeros naturais do Manoil óxido.

Manoil óxido: Série normal

A Forscolina (**312**) é o composto de óxido de manoil mais estudado atualmente devido à sua capacidade de estimular diretamente AMPc a partir da Adenilato Ciclase (SEAMON; DALY, 1986). Algumas importantes atividades biológicas já foram atribuídas a esse diterpeno, tais como anti-hipertensiva (DE SOUZA, 1983) anti-trombótica (SETO, 1986), broncodilatadora (SEAMON, DALY, 1986), inotrópica positiva (SCHLEPPER, 1989), hipotensiva (HOSONO, 1990), propriedades estas que possuem aplicação terapêutica potencial no tratamento da asma brônquica, cardiomiopatia congestiva, e glaucoma (LI, 2000).

Alguns derivados do Manoil óxido, tais como 18-hidroximanoil óxido (Jhanol, **313**), 1-β,18-dihidroxi manoil óxido (Jhanidiol, **314**) e 1-oxo-18-hidroximanoil óxido (1-oxo-jhanol, **315**) possuem uma semelhança estrutural com a Forscolina (**312**). Dessa forma, a biotransformação destes derivados também podem conduzir à descoberta de novas moléculas com perfis farmacológicos potencialmente melhores (figura 22, pág 92).

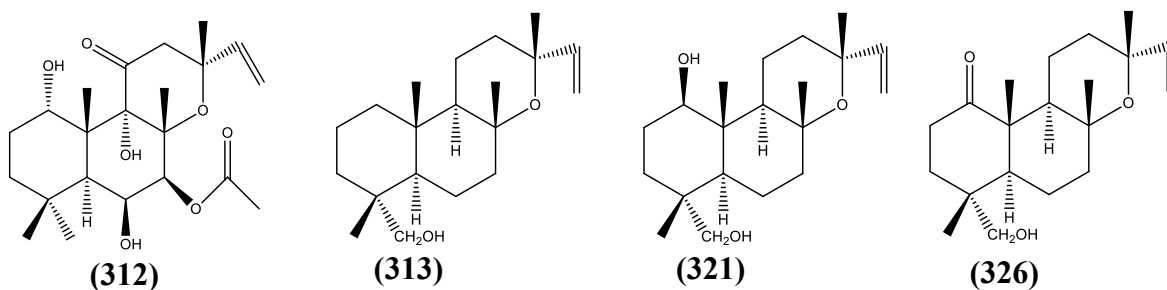


Figura 22. Semelhança estrutural entre a Forscolina (**312**) e alguns derivados do Manoil óxido: Jhanol (**313**), Jhanidiol (**321**) e 1-oxo-jhanol (**326**).

A partir da análise da literatura, foi possível verificar que a via mais comum de biotransformação de derivados do Manoil óxido envolve a adição de hidroxilas, porém, outras reações interessantes foram catalizadas, como a quebra da ligação dupla para dar origem a carbonos dihidroxilados ou uma função epóxi.

Com o objetivo de obterem compostos com funcionalização semelhante a da Forscolina (**312**), Fraga e colaboradores (1998) utilizaram o fungo *Mucor plumbeus* (esquema 34, pág. 95) e *Gibberella fujikuroi* (esquema 35, pág. 96) na incubação

dos análogos **(313)**, **(321)** e **(327)**. Os autores concluíram que a formação de produtos dihidroxilados foi realizada por *M. plumbeus*, mas não por *G. fujikuroi*, enquanto que a reação de epoxidação foi catalizada por ambos os microrganismos. O fungo *M. plumbeus* hidroxilou **(313)**, preferencialmente nos carbonos C-2 α e C-6 β para formar os compostos **(314, 1,6%)**, **(315, 0,6%)**, **(319, 0,6%)** e **(320, 3,3%)**, enquanto que *G. fujikuroi* incorporou hidroxilas preferencialmente em C-1 α , formando estruturas **(338, 1,6%)** e **(339, 9,1%)**, e C-11 β e α **(336, 2,9%)** e **(337, 2,5%)**, respectivamente. No caso de **(321)**, *G. fujikuroi* oxidou preferencialmente o grupo 1 β -hidroxil a um grupo oxo para formar os compostos **(340, 2%)**, **(341, 0,9%)** e **(342, 0,9%)**. No curso da incubação com **(327)**, os autores observaram que uma reação de hidroxilação exclusiva no carbono C-3 β **(345, 1,5%)** foi catalisada apenas quando o fungo *G. fujikuroi* foi utilizado.

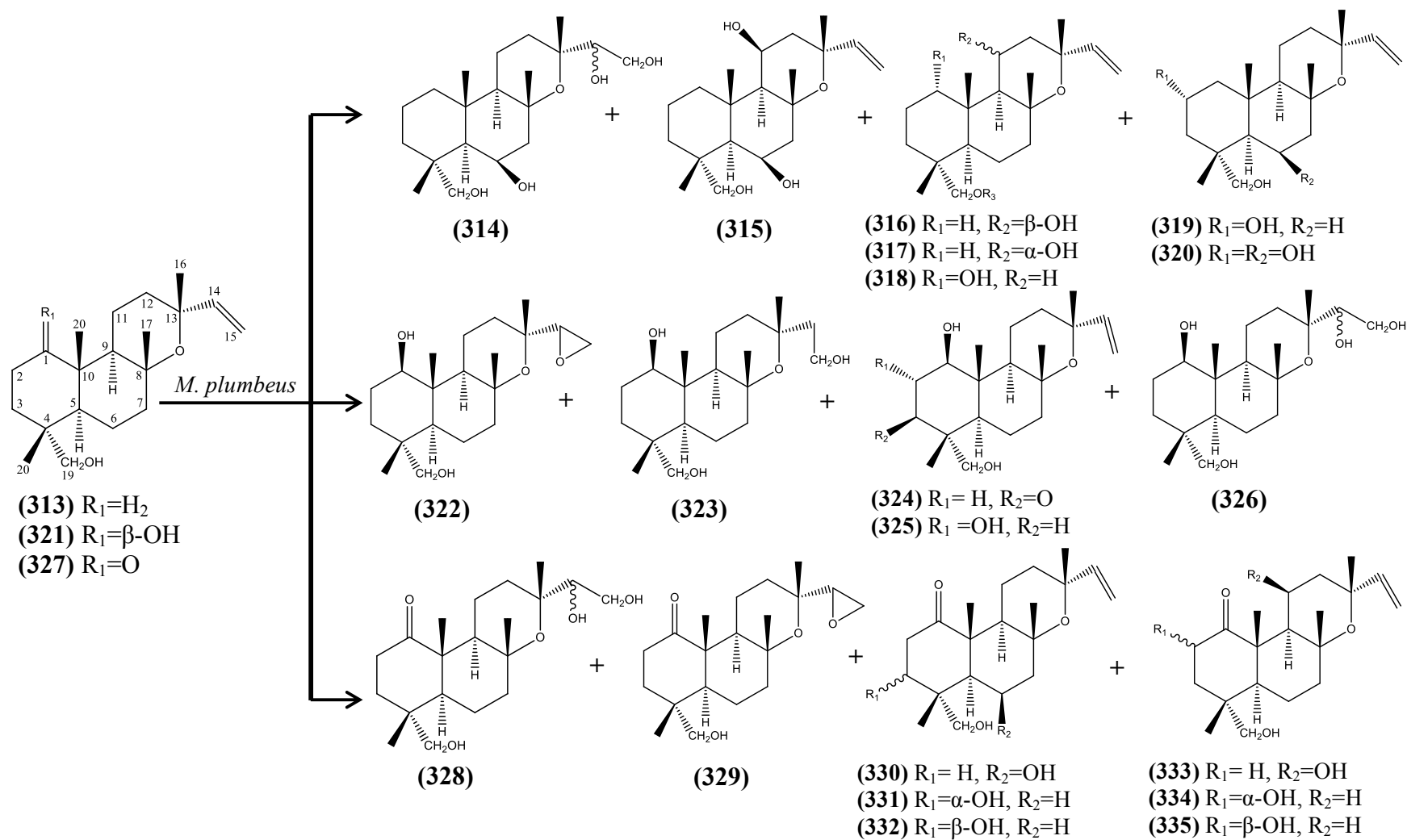
De acordo com os autores, as reações de óxido-redução que resultaram em epimerização em C-1 do 1 β -álcool de **(321)** para α -álcool em **(338, 1,6%)** e **(339, 9,1%)**, que ocorreu na fermentação com o fungo *Gibberella fujikuroi*, é um processo extremamente raro em transformações microbiológicas.

Manoil óxido: série *ent*-13-*epi*

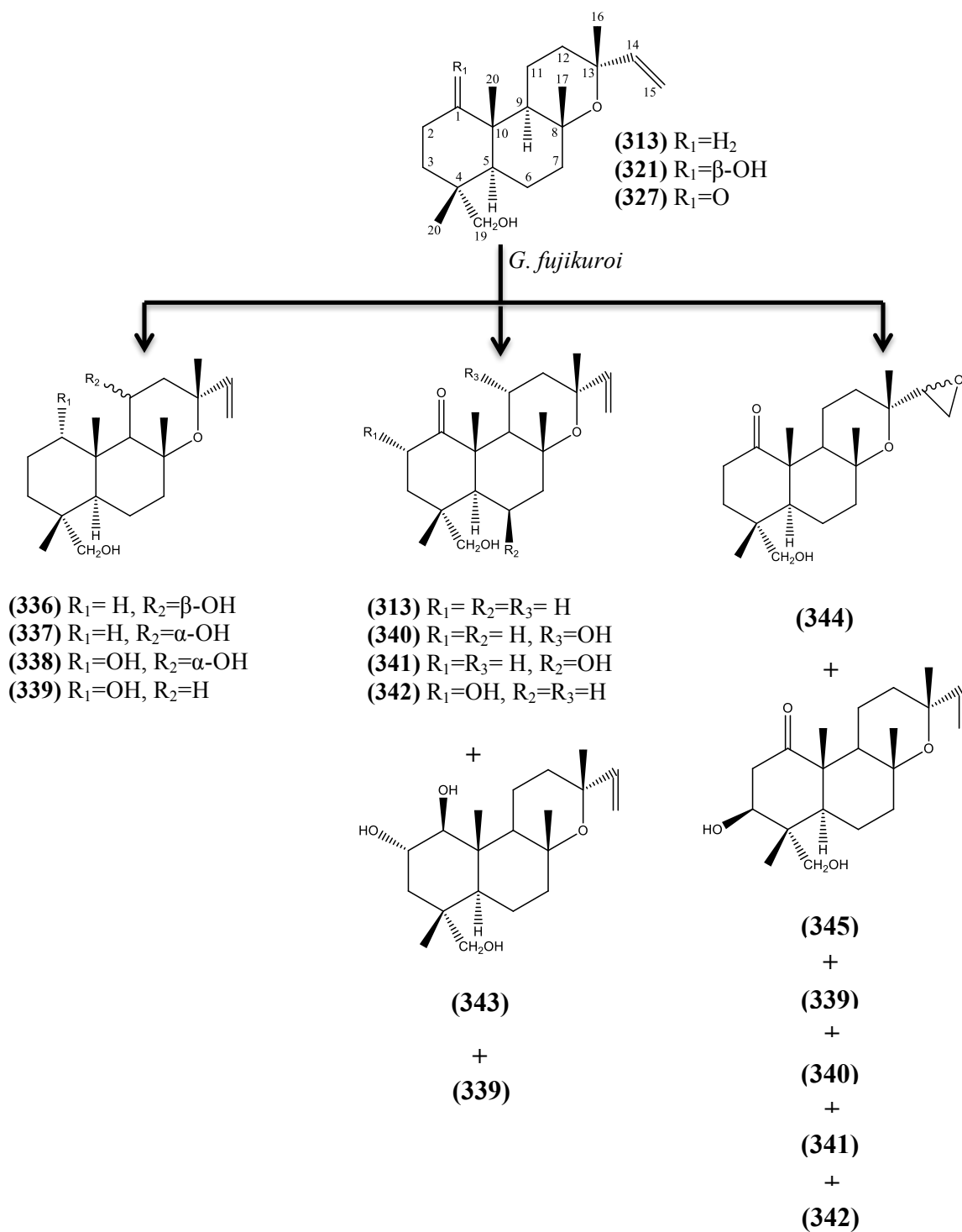
Outro derivado do Manoil óxido utilizado em procesos de biotransformação por possuir semelhanças com a Forscolina **(312)** é a Ribenona **(346)**, um análogo natural com estrutura *ent*-3-oxo-13-*epi*-manoil óxido. Em estudos distintos, esse diterpeno foi incubado com os fungos *Curvularia lunata* (GARCÍA-GRANADOS, 1994), *Fusarium moniliforme* (GARCÍA-GRANADOS, 1995), *Gibberella fujikuroii* (FRAGA, 1999) e *Mucor plumbeus* (FRAGA, 2001).

A incubação com *C. lunata* deu origem a seis metabólitos, dois monohidroxilados nas posições *ent*-6 β **(347, 6%)** e *ent*-1 α **(348, 2%)**, dois 1,2-desidro derivados **(349, 3%)** e **(350, 2%)**, sendo **(349)** possivelmente produzido pela desidratação de **(348)**, e **(350)** resultante da hidroxilação de **(349)** na posição *ent*-11- β , e dois derivados dihidroxilados, um *ent*-3 α , 6 β **(351, 2%)** e um *ent*-3 α , 11 β **(352, 1%)**. Enquanto que a transformação microbiológica da Ribenona

(**346**) com o *F. moniliforme*, produziu apenas um *ent*-1 β -hidroxi derivado (**353**, 5%) (figura 23, pág. 98). Testes biológicos foram realizados com a Ribenenona (**346**) e alguns de seus derivados. Como resultados, (**346**), (**347**) e (**349**) inibiram o crescimento patogênico do protozoário *Leishmania donovani* (GARCÍA-GRANADOS, 1997). Em outros estudos, (**346**), (**349**) e (**353**) exibiram forte atividade contra carcinoma gástrico (KATO-3) e atividade moderada contra outros tipos de carcinomas (ISHIKAWA, 2005).



Esquema 34. Biotransformação dos derivados de Manoil óxido: Jhanol (313), Jhanidiol (321) e 1-oxo-jhanol (327) pelo fungo *Mucor plumbeus*.



Esquema 35. Biotransformação dos derivados de Manoil óxido: Jhanol (313), Jhanidiol (321) e 1-oxo-jhanol (327) pelo fungo *Gibberella fujikuroi*.

A Biotransformação de **(346)** por *G. fujikuroi* originou novamente os metabólitos **(349, 3%)**, **(353, 1%)**, previamente isolados com *C. lunata* e *F. moniliforme*, respectivamente. Porém, foram produzidos novos metabólitos resultantes da mono e dihidroxilação pela face *ent-α* dos carbonos C-11 **(354, 2%)**, C-6 **(355, 4%)** e C-12 **(356, 6%)**, e C-11/C-12 **(357, 2%)** e C3/C-12 **(358, 2%)**. Este último metabólito foi resultante de uma redução estereoespecífica do grupo ceto no carbono C-3, também observada na biotransformação de **(346)** com *C. lunata*. Formou-se também nesse experimento, quatro metabólitos de uma série de ácidos 2,3-seco, resultantes da abertura do anel A, sendo um mais simples: ácido *ent-2,3-seco-13-epi-manoil* óxido 2,3-dioico **(359, 2%)** e três derivados hidroxilados em C-1 (*ent-β*, **360, 1%**), C-6 (*ent-α*, **361, 1%**) e C-11 (*ent-α*, **362, 2%**) (figura 22, pág. 97). A formação dos ácidos 2,3-seco é biossinteticamente interessante, não apenas em relação à especificidade do substrato das enzimas envolvidas no metabolismo de *G. fujikuroi*, e das características do receptor envolvido neste processo, mas também porque há um outro grupo importante de derivados *ent-* caurano que possuem um seco anel B, que apresentam potentes atividades antitumoral, antibacteriana e antialimentação em insetos (FUJITA, 1994).

Os experimentos de biotransformação de **(346)** com *M. plumbeus* originaram um grande número de metabólitos. Além da produção de **(349, 1%)**, **(353, 7%)**, **(354, 2%)**, **(355, 0,5%)**, **(356, 0,4%)** e **(358, 5%)**, previamente isolados nos estudos anteriormente descritos, a fermentação levou à formação de novos derivados monohidroxilados em *ent-7β* **(363, 0,6%)**, dihidroxilados em *ent-6α,12α* **(364, 0,4%)**, *ent-6β,12α* **(365, 0,8%)** e *ent-1β,12α* **(366, 6%)**, e um monohidroxilado 1,2-desidro em *ent-12α* **(367, 0,4%)**. Ademais das hidroxilações, uma série de epóxi-derivados também foi formada nesta fermentação, resultantes da epoxidação da dupla ligação entre os carbonos C-14 e C-15. Essas epoxidações não foram estereoespecíficas e produziram ambos os epímeros em C-14. Assim, 14S,15 e 14R,15 epóxi-derivados foram formados em *ent-11α* (14S, **368, 0,5%** e 14R, **369, 0,6%**), *ent-7β* (14S, **370, traços** e 14R, **371, 0,2%**) e *ent-12α* (14S, **372, 1%** e 14R, **373, 1%**). Porém, em alguns casos, como no estudo

realizado por Fraga e colaboradores (2001), apenas derivados 14S, 15 epóxidos foram isolados **(374, traços)**, **(375, 0,6%)**, **(376, 1%)**, **(377, 1%)** e **(378, 0,7%)** (figura 23, pág. 98).

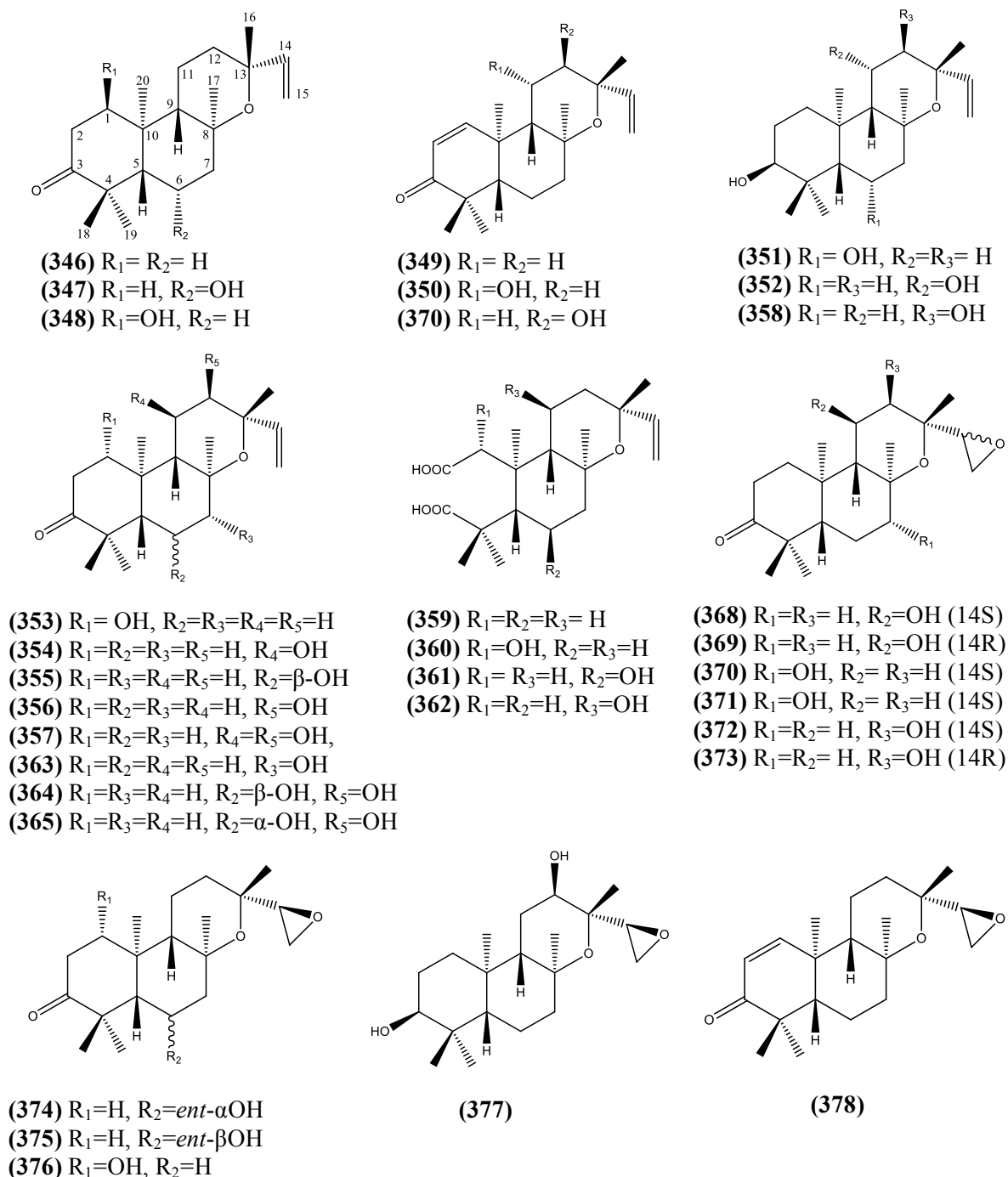


Figura 23. Ribenona **(346)** e metabólitos obtidos da sua biotransformação pelos fungos *Curvularia lunata*, *Fusarium moniliforme*, *Gibberella fujikuroi* e *Mucor plumbeus*.

O fungos *G. fujikuroi* (FRAGA, 1989), *C. lunata* (GARCÍA-GRANADOS, 1990b) e *F. moniliforme* (GARCÍA-GRANADOS, 1995) também foram utilizados na biotransformação do Ribenol (**379**), um *ent*-3 β -hidroxi-13-*epi*-manoil óxido, derivado que apresenta também notáveis propriedades biológicas (KALPOUTZAKIS, 2001). Nesses estudos de biotransformação, alguns metabólitos com funcionalização nos carbonos C-1, C-6, C-7 e C-11, assim como ocorre na Forscolina (**312**), foram produzidos. A biotransformação de (**379**) com o fungo *G. fujikuroi* deu origem a três metabólitos, sendo dois monohidroxilados em *ent*-12 α (Varodiol, **380**, 6%) e *ent*-11 α (**381**, 7%), e um dihidroxilado em *ent*-11- α , 12 α (**382**, 4%). Com o fungo *C. lunata*, houve formação de mais quatro produtos hidroxilados, um com monohidroxilação em *ent*-6 β (**383**, 14%), dois com duplas hidroxilações em *ent*-1 α ,6 β (**384**, 4%) e *ent*-6 β ,11 β (**385**, 2%) e um derivado *ent*-14(R),15-dihidroxilado (**386**, 4%). Enquanto que a fermentação com *F. moniliforme* originou dois derivados dihidroxilados, um em *ent*-7 β ,11 α (**387**, 1%) e outro em *ent*-7 β ,12 α (**388**, 11%), juntamente com seus correspondentes produtos de oxidação no carbono C-3 (**390**, 4%) e (**390**, 5%), respectivamente (figura 24, pág. 99).

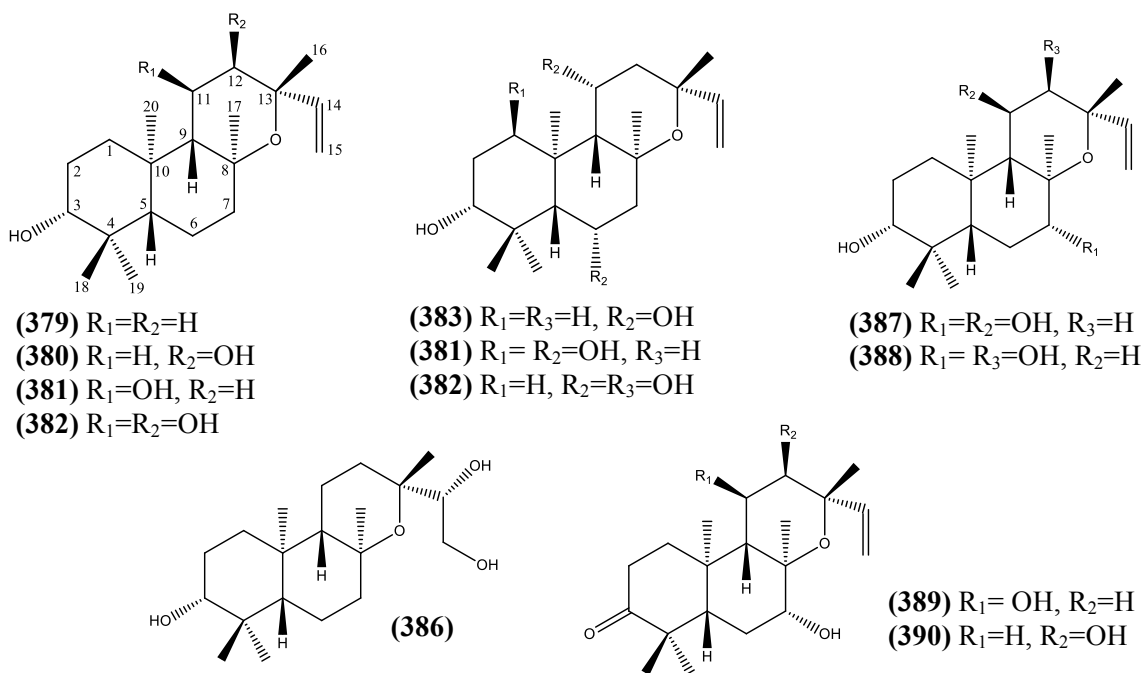
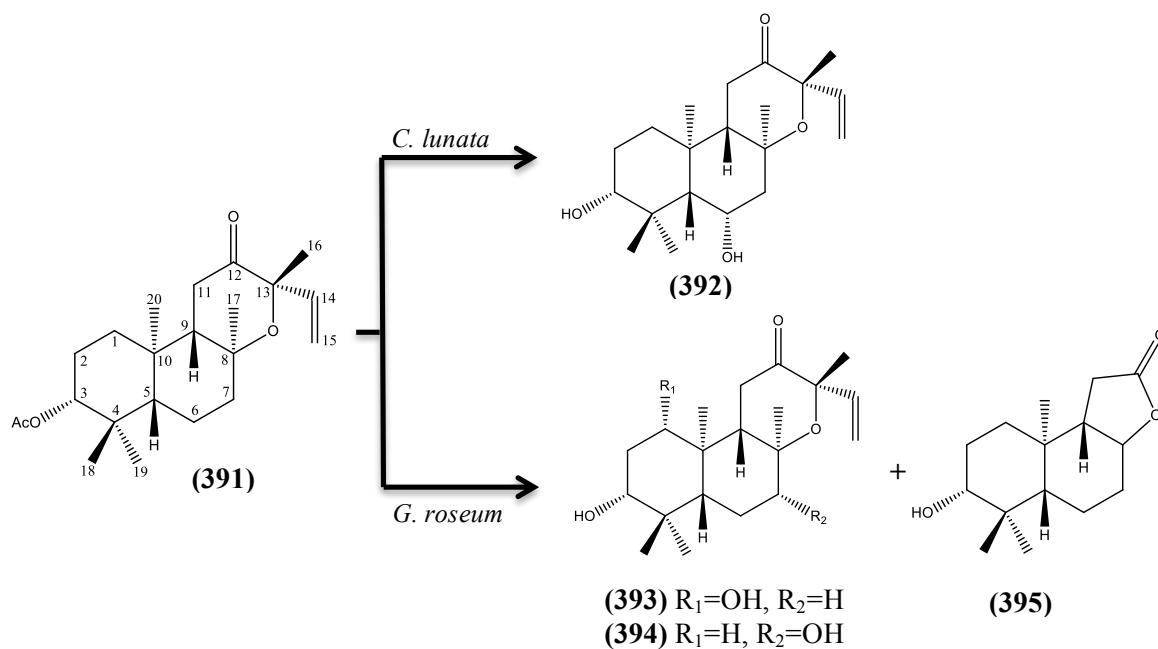


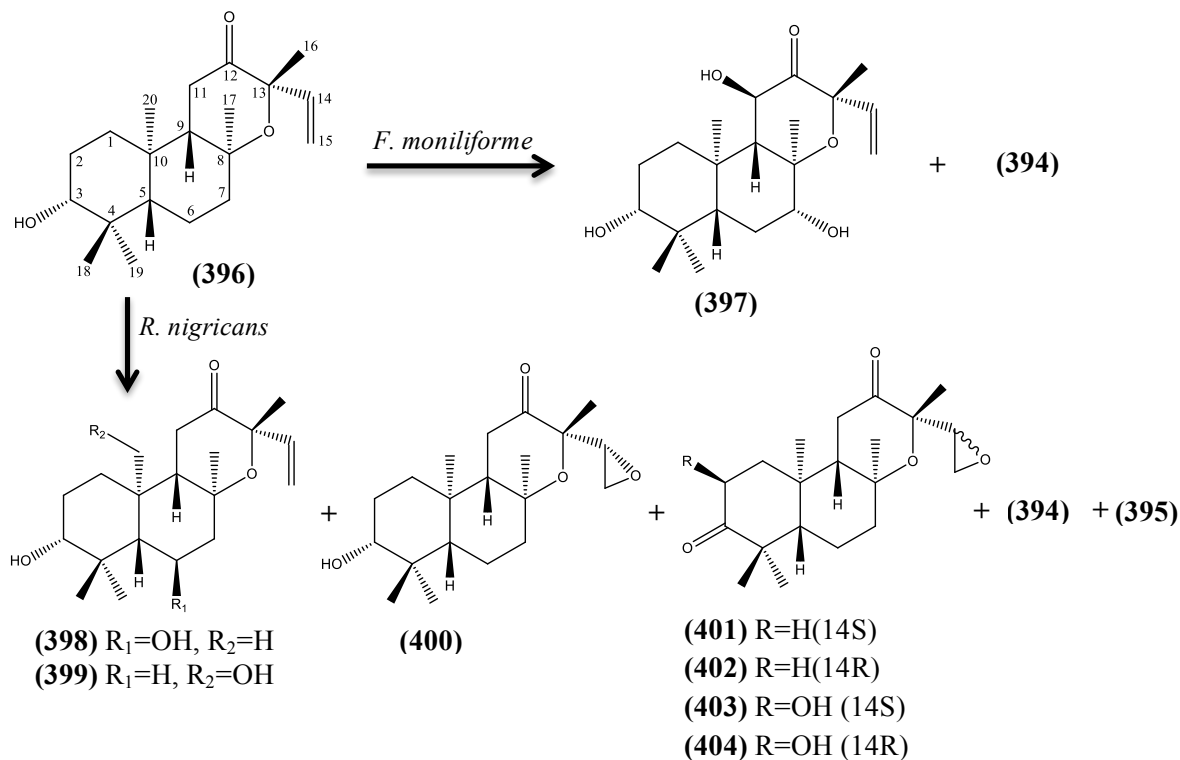
Figura. 24. Ribenol (**349**) e metabólitos obtidos de sua biotransformação pelos fungos *Gibberella fujikuroi*, *Curvularia lunata* e *Fusarium moniliforme*.

Em 2004, García-Granados e colaboradores, incubaram com o fungo *Fusarium moniliforme*, o Varodiol (**380**), um derivado *ent*-3 β -12- α -dihidroxi-13-*epi*-manoil óxido, isolado em estudos anteriores, a partir da degradação do Ribenol (**379**) pelo fungo *Gibberella fujikuroi*. A fermentação deu origem a dois metabólitos que foram previamente isolados: um derivado 3-ceto (**356**, 16%) (figura 22, pág. 97) e um *ent*-7 β hidroxilado (**390**, 35%) (esquema 35, pág. 95), porém os rendimentos foram 15 e 35% maiores, respectivamente, indicando que uma segunda função oxigenada no carbono C-12 parece acelerar a ação do microorganismo (GARCÍA-GRANADOS, 2007). A biotransformação de um derivado 3-acetil-12-ceto (**391**) do Varodiol com os fungos *Curvularia lunata* (GARCÍA-GRANADOS, 1994) e *Gliocladium roseum* (GARCÍA-GRANADOS, 1999) também foi descrita. Ambos os microorganismos produziram desacetilação do substrato. Subsequentemente, *C. lunata* introduziu um grupo hidroxila na posição *ent*-6 β (**392**, 9%), enquanto *G. roseum* originou dois *ent*-monohidróxi-derivados em C-1 (**393**, 27%) e C-7 (**394**, 6%), ambos pela face β , juntamente com um derivado 3 β -esclareolideo (**395**, 8%) (esquema 36, pág. 101)

Em 2004, García-Granados e colaboradores, submeteram o 12-ceto Varodiol (**396**) a biotransformação com o fungo *F. moniliforme* e *R. nigricans*. A fermentação com *F. moniliforme*, originou o metabólito (**394**, 8%), produzido em estudos anteriores, juntamente com um *ent*-7 β , 11 α dihidroxi derivado (**397**, 7%). A ação do *R. nigricans* com o substrato (**395**) foi menos seletiva, produzindo uma vez mais (**393**, 1%) e (**394**, 9%), e introduzindo novos grupos hidroxilas nas posições *ent*-6 α (**398**, 1%) *ent*-20 (**399**, 8%). Adicionalmente, *R. nigricans* também deu origem a uma série de epóxi derivados: 14R,15 (**400**, 6%), 14S,15 oxidados em C-3 (**401**, 6%), 14R,15 oxidado em C-3 (**402**, 5%), e dois derivados 3-oxo-14,15 com hidroxilação adicional na posição *ent*-2 α (14S, **403**, 11%) e (14R, **404**, 9%) (esquema 37, pág. 101).



Esquema 36. Biotransformação do 3-acetil, 12-ceto Varodiol **(391)** pelos fungos *Curvularia lunata* e *Gliocladium roseum*.



Esquema 37. Biotransformação do 12-ceto varodiol **(396)** pelos fungos *Fusarium moniliforme* e *Rhizopus nigricans*.

Outro derivado utilizado como substrato em experimentos de biotransformação foi a varodiona (**405**), um análogo *ent*-3-12-dioxo-13-*epi*-manoil óxido obtido pela oxidação do varodiol (**380**). Em diferentes experimentos, este diterpeno foi incubado com os fungos *Curvularia lunata*, *Cunninghamella elegans*, *Glicocadium roseum*, *Rhizopus nigricans*, *Fusarium moniliforme* e *Saccharomyces cerevisiae*. Na fermentação com *C. lunata* (GARCÍA-GRANADOS, 1994) e *C. elegans* (GARCÍA-GRANADOS, 1995), o mesmo metabólito polar foi produzido, resultante de uma 14R,15 dihidroxilação (**406**), com rendimentos de 21 e 11%, respectivamente. Com o fungo *F. moniliforme* (GARCÍA-GRANADOS, 1995), cinco derivados hidroxilados foram formados: *ent*-11 α (**407**, 7%), *ent*-1 β (**408**, 9%), *ent*-7 β -11 α (**409**, 9%), *ent*-6 α -11 α (**410**, 1%) e um *ent*-6 α -12 β -dihidroxi-11-oxo (**411**, 1%). Enquanto que os experimentos com *G. roseum* originaram dois monohidroxilados nos carbonos C-1 (**401**, 19%), previamente isolado e C-7 (**412**, 7%), ambos na face *ent*- β . A biotransformação com *R. nigricans*, gerou (**412**, 4%), um metabólito hidroxilado no carbono C-18 (**413**, 10%), juntamente com uma série de epóxi-derivados (**401**, 5%), (**402**, 6%), (**403**, 13%), (**404**, 14%), previamente isolados em experimentos de biotransformação do Varodiol (**380**), utilizando o mesmo fungo. Adicionalmente, originou-se um composto *ent*-3 α hidroxilado, resultante de uma redução regio e estereosseletiva do grupo ceto no carbono C-3 (**414**, 3%), bem como o seu *ent*-7 β hidróxiderivado (**415**, 2%). Na incubação com *S. cerevisiae*, três derivados foram formados: (**414**, 1%), que foi previamente isolado na fermentação com *R. nigricans* e o 3,12-*diepivarodiol* (**416**, 1%). *G. roseum* e *F. moniliforme* apresentaram a característica comum de não funcionalização da dupla ligação do substrato Varodiona (**405**), que foi observada com os fungos *R. nigricans*, *C. lunata* e *C. elegans*.

Posteriormente, García-Granados e colaboradores (2004), submeteram o derivado cetol (**414**), obtido em experimentos anteriores, à biotransformação com *R. nigricans* e *G. roseum*. Com *R. nigricans*, obtiveram a Varodiona (**405**, 7%), resultante da oxidação do carbono C-3 e os epóxi-derivados (**401**, 11%), (**402**, 9%), (**403**, 11%) e (**404**, 10%), previamente isolados. Enquanto que a fermentação com *G. roseum*, introduziu hidroxilas nos carbonos C-1 (**418**, 32%),

C-6 (**419**, 3%) e C-7 (**415**, 4%), todos na face *ent*- β (figura 25, pág. 103).

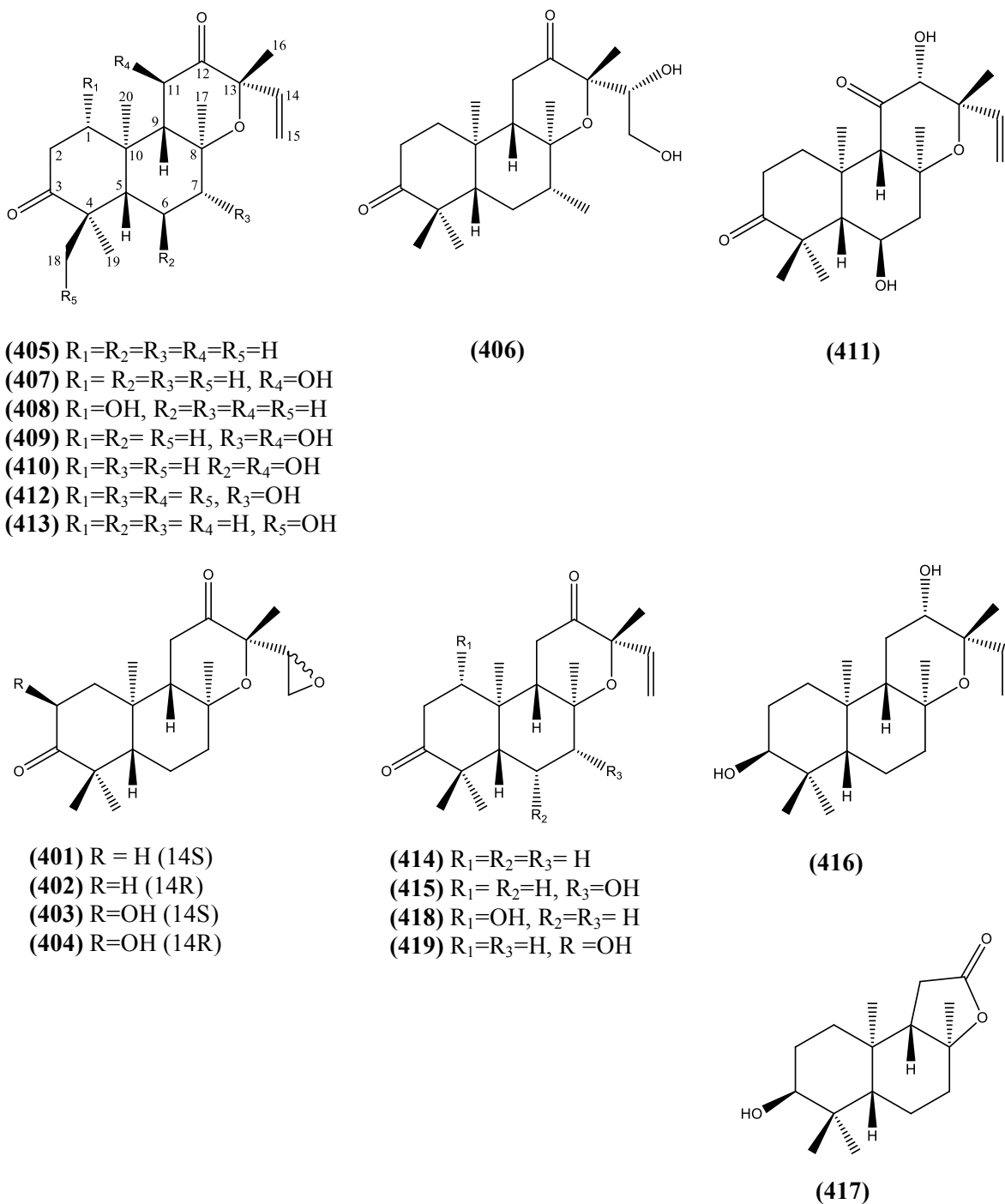


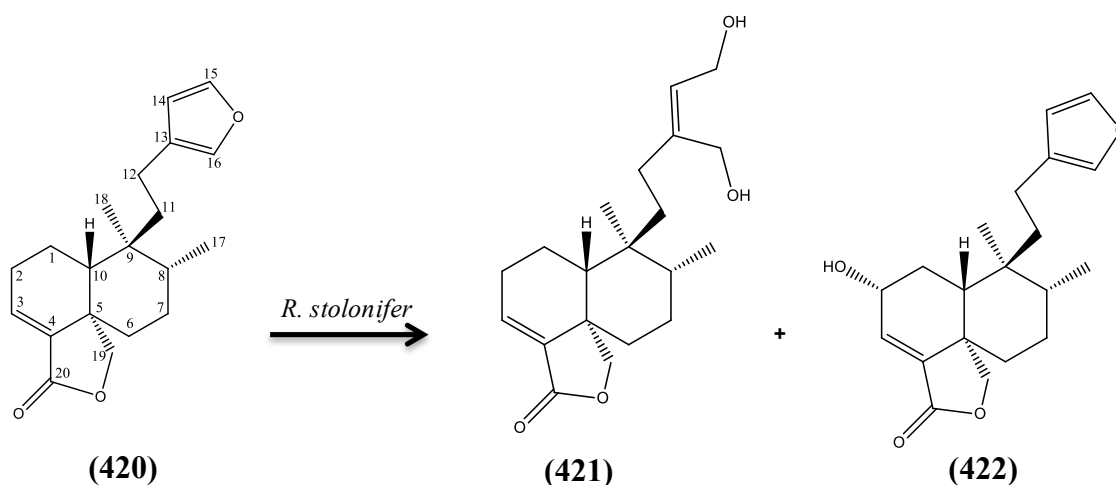
Figura 25. Varodiona (**405**) e seus derivados, obtidos por biotransformação com diferentes espécies de fungos.

2.4.8 Clerodanos

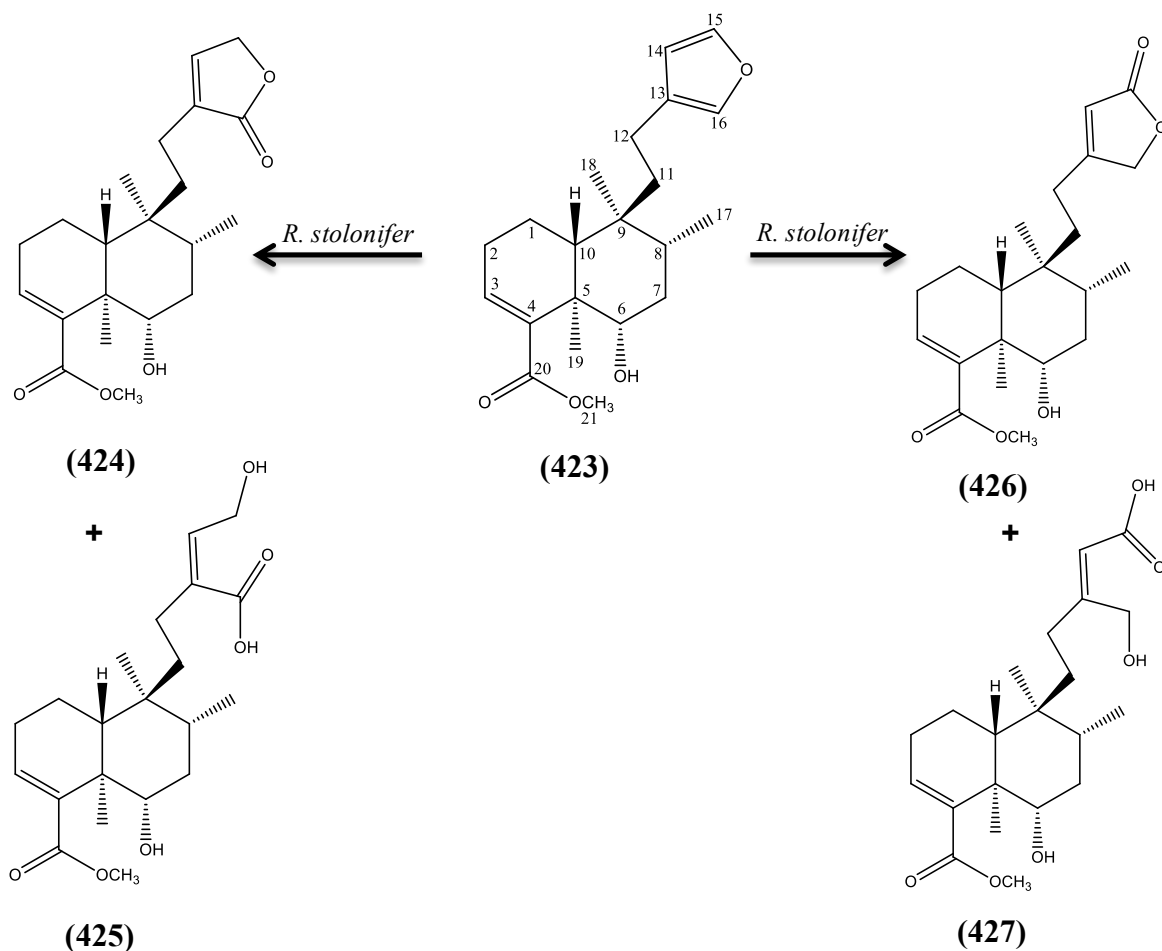
Muitos dos diterpenos com esqueleto tipo clerodano, especialmente os que possuem estrutura altamente oxigenada, exibem potente ação antifúngica (MERRIT; LEY, 1992), antibacteriana (GUO, 2011), anticâncer (WU, 2012), antiinflamatória (DEMETZOS, 2001), entre outras. As atividades biológicas e estruturas desafiantes do clerodanos têm estimulado muitos esforços na utilização dessas substâncias em biorreações com fungos.

Nesse contexto, Choudhary e colaboradores (2013) encubaram com o fungo *Rhizopus stolonifer*, dois diterpenos com esqueletos clerodânicos: um clerodano-lactona (**420**) e um clerodano-metil éster (**423**). A oxidação do composto (**420**), originou dois análogos hidroxilados (**421**, 2%) e (**422**, 0,6%) (esquema 38, pág 104). Enquanto que a degradação de (**423**), resultou na produção de quatro metabólitos (**424**, 2,8%), (**425**, 2,2%), (**426**, 1,4%) e (**427**, 1,4%) (esquema 39, pág. 105). Dos produtos biotransformados, (**422**), (**426**) e (**427**) foram descritos como inéditos na literatura. Em ambos os experimentos, os autores obtiveram os produtos por oxidação do anel furano, catalizada por enzimas do citocromo P-450, exceto o (**425**), no qual a ocorreu no anel A.

Os trabalhos de biotransformação com os diterpenos clerodanos ainda são poucos, devido as suas estruturas complexas e rígidas. (CHOUDHARY, 2013)



Esquema 38. Biotransformação do clerodano-lactona (**420**) pelo fungo *Rhizopus stolonifer*.



Esquema 39. Biotransformação do clerodano-metil éster (423) pelo fungo *Rhizopus stolonifer*.

Sem dúvida, Biotransformação é uma ferramenta alternativa com grande potencial, especialmente para o desenvolvimento de tecnologias sustentáveis para a produção de produtos químicos e medicamentos. Nesta revisão, foi possível observar que a principal reação catalizadas pelos microorganismos é a hidroxilação regio e estereosseletiva, e a posição na molécula onde essa reação ocorre, dependerá tanto do substrato quanto do microorganismo. Dentre os microorganismos mais utilizados, destacam-se *Gibberella fujikuroi*, *Mucor plumbeus* e *Rhizopus oryzae* (figura 26, pág. 106). O número de produtos resultantes das reações variam de acordo com os microorganismos utilizados e,

com algumas exceções, as transformações microbiológicas usualmente resultam na geração de múltiplos produtos, com baixos rendimentos.

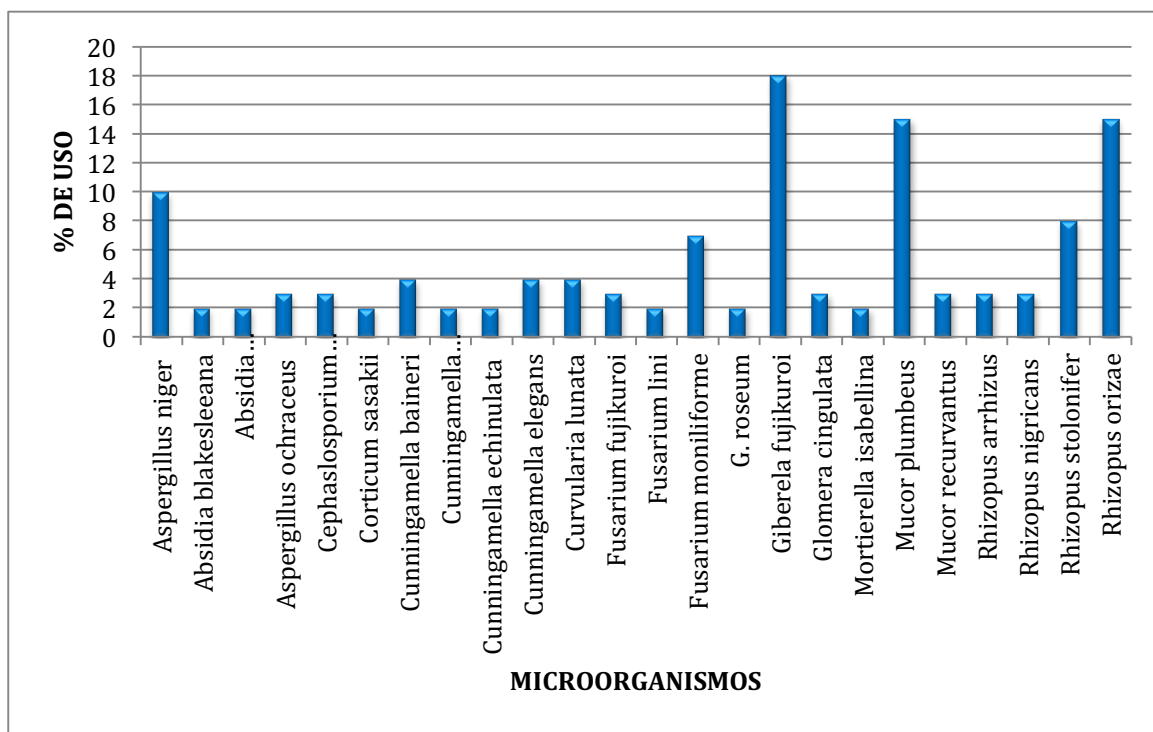


Figura 26. Comparativo dos microorganismos utilizados em biotransformação.

Além de ser uma classe de produtos naturais com amplo espectro de importantes atividades biológicas, hidróxiderivados em particular, possuem grande valor agregado e são de amplo interesse para a pesquisa, visto que, além de serem compostos mais solúveis, a inserção de hidroxilas numa molécula aumenta o número de sítios ativos e consequentemente, a interação com seus receptores biológicos, podendo, dessa forma, melhorar a sua atividade.

O presente trabalho de revisão, além de fornecer informações importantes sobre o uso de diterpenos em transformações microbiológicas, constitui um roteiro para obtenção de derivados, principalmente hidroxilados, a partir de qualquer classe desses metabólitos secundários.

2.4 Diterpenos utilizados no estudo como substratos de biotransformação microbiológica

• Afidicolina

A afidicolina é um diterpeno caracterizado pelo esqueleto biciclooctano nos anéis C/D, e foi isolado pela primeira vez das culturas do fungo *Cephalosporium aphidicola* em 1972 (BRUNDRET, 1972) (figura 27, pág. 107).

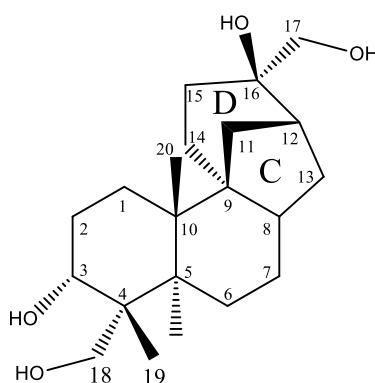


Figura 27. Estutura química da afidicolina.

A excelente atividade da afidicolina foi confirmada frente a quatro linhagens de células cancerígenas MDA-MB435 (mama), HCT-8 (colon), SF295 (cérebro) e HL-60 (leucemia promielocítica) (GALLO, 2009). Diversos estudos biológicos prévios demonstraram a atividade deste diterpeno contra vírus de DNA e diversas linhagens de células tumorais, sem toxicidade para as células humanas (BUCKNALL, 1973; SPADARI, 1985).

A afidicolina despontou como um potencial candidato a fármaco antineoplásico e antiviral. Entretanto, a afidicolina sofre rápida desativação in vivo através da ação de oxidase microsomal hepática, limitando seu potencial clínico (SPADARI, 1985). O principal produto de metabolização envolve a oxidação do álcool em C-3 ao derivado cetônico, inativo. Diversos estudos sintéticos foram realizados para a obtenção de análogos da afidicolina. Uma série de derivados foi obtida e os

resultados parecem indicar a importância dos grupamentos hidroxílicos em C-3 e C-16 para a atividade citotóxica (RIZZO; SMITH, 1991).

A atividade leishmanicida foi também relatada para afidicolina e seus derivados semi-sintéticos (KAYSER, 2001). Neste trabalho todos compostos semi-sintéticos derivados da afidicolina foram testados contra espécies intracelulares e extracelulares de *Leishmania*. Anfotericina B e miltefosina foram usados como fármacos para o controle positivo. A atividade leishmanicida foi expressa como 50% de concentração efetiva, (EC50s), como a concentração de um composto a qual causa 50% de redução na sobrevivência em comparação a culturas idênticas sem o composto (KAYSER, 2001). Os afidicolanos são de toxicidade moderada para células de mamíferos. É interessante destacar que o produto da metabolização in vivo da afidicolina, o derivado cetônico 3 oxo-afidicolina, com a baixa atividade citotóxica mantém a atividade leishmanicida (KAYSER, 2001).

- **Ácido *ent*-7 α -acetoxitraquiloban-18-oico (T-360)**

O ácido *ent*-7 α -acetoxitraquiloban-18-oico (figura 28, pág. 108), codificado como Traquilobano-360 (T-360), trata-se de um diterpeno com esqueleto traquilobânico, isolado da fase hexânica da planta *Xylopia langsdorffiana* (Annonaceae). Os diterpenos traquilobânicos são metabólitos secundários muito raros na natureza e até então, pouco estudados, principalmente no tocante à atividade biológica (SANTOS, 2012).

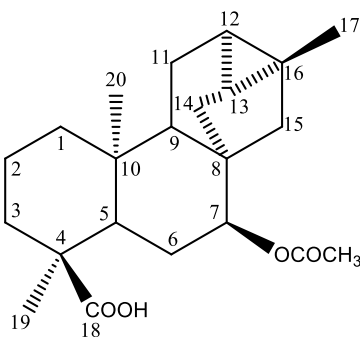


Figura 28. Estrutura química do ácido *ent*-7 α -acetoxitraquiloban-18-oico (T-360).

No entanto, tais compostos, isolados a partir de diferentes espécies vegetais, já tiveram suas atividades descritas na literatura: antitumoral (BLOCK, 2004; LI, 2005); vasorelaxante (BLOCK, 2005); antimicrobiano (LI, 2005), atividades antiosteoclastogênicas (MARTINSEN, 2009). Além destas, Block e colaboradores (2005) evidenciaram importante efeito apoptótico do ent-traquiloban-3 β -ol, isolado das folhas de *Croton zambesicus*, frente à células leucêmicas promielocíticas humanas, através da ativação da via das caspases 3. O traquilobano-360 possui algumas propriedades farmacológicas relatadas: efeito antitumoral em células leucêmicas (SILVA, 2005), bem como em células de sarcoma 180 (PITA, 2012); atividade moluscicida frente ao caramujo *Biomphalaria glabrata* (QUEIROGA, 2006); atividade antinoceptiva em modelo de contorção abdominal em camundongos *Swiss* (CUPERTINO-SILVA, 2006); atividade citotóxica sobre células V79 e hepatócitos de rato (TAVARES, 2006); inibição da proliferação das células leucêmicas HL60, U937 e K562 (CASTELLO-BRANCO, 2009) e atividade espasmolítica em íleo de cobaia (SANTOS, 2012).

- (2S*, 3S*, 4R*, 5R*, 9S*, 11R*, 15R*)- 3, 5, 15- triacetoxi-14-oxolatira-6 (17), (12E)- dieno (EBOE-12)

A substância codificada como EBOE-12, trata-se de um diterpeno tricíclico, que apresenta um macrociclo de 11 membros e um anel ciclopropano, isolado da fração acetato de *Euphorbia Boetica* (figura 29, pág. 109).

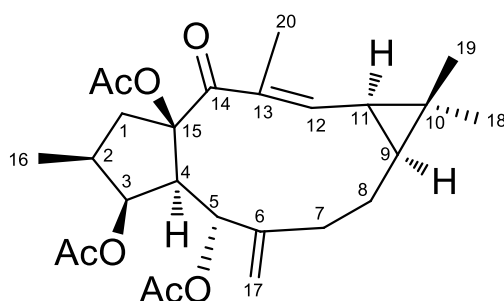


Figura 29. Estrutura química do (2S*, 3S*, 4R*, 5R*, 9S*, 11R*, 15R*) 3,5,15-triacetoxi-14-oxolatira-6(17),(12E)-dieno (EBOE-12).

Diterpenos macrocíclicos com esqueleto do tipo latirano apresentam várias atividades biológicas relatadas na literatura, tais como: moslusquicida (BALOCH, 2009), citotóxica (BALOCH; BALOCH, 2010), vasoconstrictora (MIRANDA, 1998), antineoplásica (COREA, 2009), agentes inibidores de prostaglandina E2 (RAVIKANTH, 2002) e anti-HIV-1 (AVILA, 2010), constituindo substratos com grande potencial para uso em biotransformação.

_____ **OBJETIVOS**

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Obter derivados dos diterpenos naturais bioativos da afidicolina, do ácido *ent-7 α -acetoxitraquiloban-18-oico* (T-360) e do (2S*, 3S*, 4R*, 5R*, 9S*, 11R*, 15R*)- 3, 5, 15- triacetoxi-14-oxolatira-6 (17), (12E)- dieno (EBOE-12), através de reações de biotransformação, utilizando cultura de fungos.

3.2 Objetivos específicos

- Realizar o isolamento do *ent-7 α -acetoxitraquiloban-18-oico* a partir folhas da planta *Xylopi langsdorffiana*;
- Isolar (2S*, 3S*, 4R*, 5R*, 9S*, 11R*, 15R*)- 3, 5, 15- triacetoxi-14-oxolatira-6 (17), (12E)- dieno a partir do extrato acetato da planta *Euphorbia Boetica*;
- Cultivar as linhagens *Cunninghamella echinulata* ATCC 8688^a, *Beauveria bassiana* ATCC 7159, *Chaetomium globosum* ATCC 56726, *Mucor rouxii* NRRL 1894, *Mucor circinelloide* NRRL 3631 (+), *Penicillium crustosum* VR4 e *Botrytis cinerea* UCA 996 em culturas simples;
- Realizar triagem com os fungos cultivados para experimentos de biotransformação dos substratos;
- Aumentar a escala dos experimentos de biotransformação mais promissores e assim otimizar as condições de cultura para a biotransformação dos substratos;
- Isolar os derivados de biotransformação, através de métodos cromatográficos;
- Caracterizar, através de métodos espectroscópicos, os análogos obtidos nos experimentos de biotransformação.

_____ MATERIAL E MÉTODOS

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Materiais

4.1.1 Materiais e equipamentos cromatográficos

- **Solventes utilizados**

Acetato de etila (Synth), 1-butanol (Vetec); etanol (Synth); acetonitrila, metanol, acetona, clorofórmio, hexano e dimetilsulfóxido grau cromatográfico das marcas: Mallinckrodt, J.T. Baker, Burdick & Jackson e Tedia; metanol e clorofórmio deuterados Cambridge Isotope Laboratories, Inc.

- **Cromatografia em Camada Delgada Analítica (CCDA)**

As análises cromatográficas em CCDA foram realizadas utilizando-se placas de alumínio de 20 cm x 20 cm cobertas por sílica gel (Whatman) com indicador de fluorescência, cortadas com estilete em tamanhos apropriados (2,5 x 5,0 cm). As amostras foram solubilizadas em solventes apropriados e aplicadas nas placas por meio de capilares de vidro. As placas foram eluídas em diferentes sistemas de fases móveis e as manchas referentes às substâncias foram detectadas por meio de luz UV em 254 nm e 320 nm, e em seguida por meio de reveladores químicos como anisaldeído-sulfúrico e iodo.

- **Cromatografia em Camada Delgada Preparativa (CCDP)**

Para as purificações por Cromatografia em Camada Delgada Preparativa (CCDP) foram utilizadas placas de vidro de 20 cm x 20 cm impregnadas com gel de sílica 60 PF 254, com 0,75 mm de espessura. As placas foram desenvolvidas em sistema solvente Hex:AcOEt em diversas proporções, de acordo com a polaridade de cada substância, previamente analisada por meio de CCDA.

- **Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência- CLAE Reciclante**

O cromatógrafo Shimadzu (Japão) acoplado a bomba de modelo LC-6AD Shimadzu e aos detectores UV-VIS SPD 20A (Shimadzu, Japão) e RID- 10A Shimadzu. O software utilizado foi LC Shimadzu Solution. Acoplado ao cromatógrafo, utilizou-se uma coluna preparativa Shodex Asahipak (GS-310 26) 500 mm x 15 mm.

- **Cromatografia Líquida a Vácuo (CLV)**

O equipamento consiste de um funil de vidro com placa sinterizada, com saída para adaptação e conexão à linha de vácuo, acoplado a um balão coletor. A fase estacionária utilizada foi sílica-gel 60H (70-230 mesh) (Merck).

- **Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência- CLAE analítico**

Cromatógrafo Shimadzu acoplado a duas bombas modelo Nexera XR LC-20AD Shimadzu, sistema de controle CBM-20A Shimadzu, detectores DAD SPD-M20A e ELSD-LTII, ambos da Shimadzu, injetor automático Nexera SIL-20A Shimadzu, forno CTO-20A Shimadzu, e software LabSolution. Utilizou-se coluna Gemini 5 µm, C6-Fenil 110 Å, 250x4,6 mm.

- **Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência- CLAE Semi-Preparativo.**

Cromatógrafo Shimadzu acoplado a duas bombas modelo Nexera XR LC-20AD Shimadzu, sistema de controle CBM-20A Shimadzu, detectores DAD SPD-M20A e ELSD-LTII, ambos da Shimadzu, injetor automático Nexera SIL-20A Shimadzu, forno CTO-20A Shimadzu, e software LabSolution. Utilizou-se coluna Gemini 5 µm, C6-Fenil 110 Å, 250x10 mm.

4.1.2 Vidrarias e demais equipamentos de laboratório

- **Vidrarias**

Colunas para cromatografia (Vidrolabor); Erlenmeyers de 250 mL e 500 mL (Pyrex); kitassatos (Pyrex); béqueres (Vidrolabor); funis de separação (Vidrolabor); Funis de placa porosa (Vidrolabor); Provetas (Vidrolabor); tubos de RMN Norell Standard Series 5mm NMR tubes (Sigma-Aldrich); tubos de RMN 8 mm Shigemi CDCl_3 código CMS-005TB; tubos de RMN 8 mm Shigemi CD_3OD código MMS-005TB.

- **Demais equipamentos**

Purificador de água Milli-Q Millipore; purificador de água por osmose reversa OS10LX Gehaka; pHmetro Corning pH meter 440; autoclave vertical (Phoenix AV-75); balanças analíticas Mettler Toledo Excellence, e Gehaka BG 400; incubadora BOD (biochemical oxygen demand) da Tecnal, bomba de vácuo Micronal BA525P; rotaevaporador Büchi R-114, rotaevaporador Büchi RII; sistema resfriador de água Büchi Recirculating Chiller B-740; capela de fluxo laminar (Pachane PA320); sonicador Branson1200 (Branson Ultrasonics Corporation).

4.1.3 Meios de cultura

- **PDA:** ágar dextrose batata (Himedia);
- **PDB:** caldo dextrose batata (Acumedia);
- **Meio de extrato de malte ágar:** 2,0% de extrato de malte (Himedia), 2,0% de glicose (Synth), 0,1% de peptona (Himedia), 1,8% de ágar (Himedia), pH 7,0 e água destilada q.s.p 1000 mL.

- **Ágar rico:** 4,0% de glicose, 0,2% de extrato de levedura, 3,0% de ágar (Synth), 0,4% de L-asparagina, 1,0% de KH_2PO_4 , 0,1% de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 2,0 mL de solução sutter (0,01% de tiamina, 2,0% de ácido cítrico, 0,015% de $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$, 0,01% de $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,003% de $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 0,0005% de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0,0005% de $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), 2,0 mL de solução cálcio sutter (0,28% de CaCl_2) e água destilada q.s.p 1000 mL.
- **Meio pré-fermentativo A:** 5,0% de triptona (Himedia), 10% de dextrose (Synth), 3,0% de extrato de levedura (Himedia), 10% g de extrato de malte (Himedia) e água destilada q.s.p 1000 mL. pH 6,2 a 6,4.
- **Meio pré-fermentativo B:** 0,25% de pó de milho (Veranita), 1,0% de glicose (Synth), 1,0% de farinha de aveia (Quaker), 4,0% de pasta de tomate (Quero), 1,0% de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Vetec) e 10,0 mL/L da solução com traços de elementos (0,1% de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (Vetec), 0,1% de $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (Vetec), 0,0025% de $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Vetec), 0,01% de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Vetec), 0,056% de H_3BO_3 (Vetec), 0,0019% de $(\text{NH}_4)_6\text{MoO}_7 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (Vetec), 0,02% de $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (Vetec) e água destilada q.s.p 1000 mL.
- **Meio Fermentativo Czapeck:** 3,0% de sacarose (Synth), 0,2% de NaNO_3 (Vetec), 0,1% de K_2HPO_4 (Vetec), 0,05% de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (Vetec), 0,05% de KCl (Vetec), 0,001% de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (Vetec) e água destilada q.s.p 1000 mL. pH 6,0.
- **Meio Fermentativo Czapeck modificado:** 1% de sacarose (Synth), 0,2% de NaNO_3 (Vetec), 0,1% de K_2HPO_4 (Vetec), 0,05% de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (Vetec), 0,05% de KCl (Vetec), 0,001% de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (Vetec) e água destilada q.s.p 1000 mL. pH 7,0.

- **Meio fermentativo Koch's K1:** 0,18% de glicose, 0,06% de peptona e 0,04% de extrato de levedura e água destilada q.s.p 1000 mL. pH 7,0.
- **Meio líquido rico:** 4,0% de glicose (Synth), 0,2% de extrato de levedura (Himedia), 0,4% de L-asparagina (Himedia), 1,0% de KH_2PO_4 (Vetec), 0,1% de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (Vetec), 2,0 mL de solução sutter (0,01% de tiamina, 2,0% de ácido cítrico, 0,015% de $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$, 0,01% de $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,003% de $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 0,0005% de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0,0005% de $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), 2,0 mL de solução cálcio sutter (0,28% de CaCl_2) e água destilada q.s.p 1000 mL. pH 7,0.

4.2 Métodos

4.2.1 Obtenção dos substratos de biotransformação

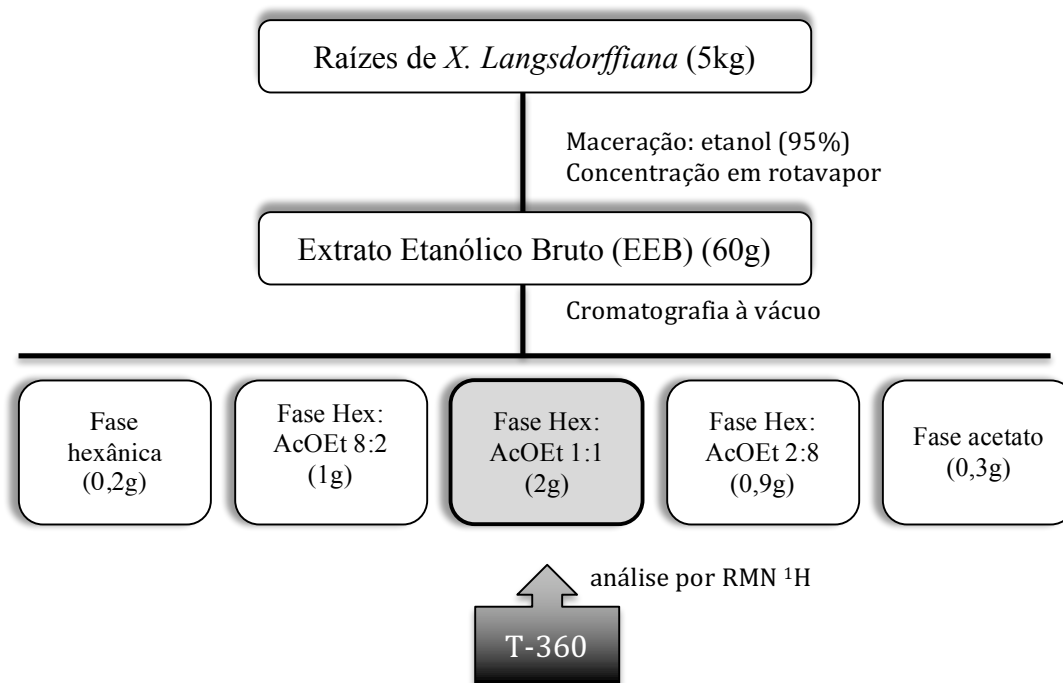
- **Obtenção da afidicolina**

O composto afidicolina foi previamente isolado do fungo *Nigrospora sphaerica* SS67, e cerca de 1g foi cedido pela Prof. Dra. Mônica T. Pupo, FCFRP- USP.

- **Obtenção do Ácido *ent*-7 α -acetoxitraquiloban-18-oico (T-360)**

O T-360 foi isolado a partir do Extrato Etanólico Bruto (EEB) obtido da planta *Xylopija langsdorffiana*. As raízes pulverizadas e secas (5kg), foram submetidas à maceração com etanol (95%) durante três dias consecutivos. A solução extrativa foi concentrada em evaporador rotativo, sob pressão reduzida e temperatura de 40 °C, obtendo-se 60g de EEB. Posteriormente, este extrato foi submetido a uma cromatografia à vácuo com funil de placa porosa, utilizando sílica gel 60 (70-230 mesh-ASTM, Merck) como fase estacionária, e como fase móvel, hexano e acetato de etila, puros e em misturas binárias e ordem crescente de polaridade, obtendo-se 5 fases.

A fase hexano-acetato de etila (1:1), que apresentou-se sob forma cristalina, foi purificada utilizando acetona. Posteriormente, foi analisada por CCDA e submetida à análise por RMN de ^1H , que confirmou o isolamento do T-360 (890mg) (esquema 40, pág. 119).



Esquema 40. Metodologia utilizada para obtenção do T-360 a partir das raízes de *Xylopi langsdorffiana*.

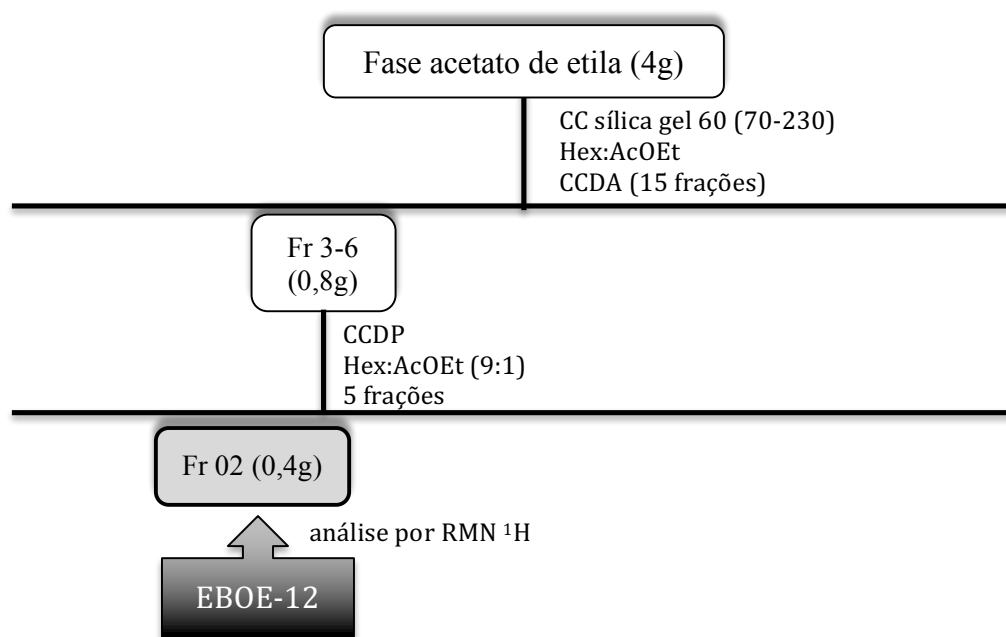
- **Obtenção do (2S*, 3S*, 4R*, 5R*, 9S*, 11R*, 15R*)- 3, 5, 15- triacetoxi-14-oxolatira-6 (17), (12E)- dieno (EBOE-12)**

A substância codificada como EBOE-12 foi isolada da fração acetato de etila da planta *Euphorbia Boetica*, cedida pelo Professor Dr. Isidro Collado Gonçalves, da *Universidad de Cádiz*, Espanha.

Cerca de 4g desta fase foram submetidos à cromatografia em coluna de sílica gel 60 (70-230 mesh-ASTM, Merck), utilizando como eluentes os solventes hexano e acetato de etila, puros e em misturas binárias, em ordem crescente de polaridade, obtendo-se 60 frações. Estas foram monitoradas por CCDA e reunidas em 15 subfrações, de acordo com seus perfis

cromatográficos.

A subfração 3-6 (0,8g) apresentou-se sob forma oleosa e foi posteriormente fracionada por Cromatografia em Camada Delgada Preparativa (CCDP), utilizando como fase móvel Hex:AcOEt (9:1). As 5 faixas obtidas foram raspadas e filtradas em funil de placa porosa, utilizando acetato de etila. A solução resultante, foi evaporada e as frações foram analisadas por CCDA e levadas para análise por RNM de ^1H . A substância EBOE-12 foi identificada na FR-02 (0,4g) (esquema 41, pág. 120).



Esquema 41. Metodologia utilizada para obtenção de EBOE-12 a partir do extrato acetato de *Euphorbia boetica*.

4.2.2 Procedimentos gerais de biotransformação

A maioria dos experimentos de biotransformação foi realizada em duas etapas: analítica e preparativa. Inicialmente, as cepas foram semeadas em placas de Petri, contendo meio adequado para reativação e crescimento de cada fungo. Em seguida, foi dado início ao procedimento analítico, no qual o

substrato é submetido à fermentação utilizando várias cepas, com a finalidade de observar se o fungo possui capacidade de biotransformá-lo e, se o faz, em quais condições e em qual tempo. Dessa forma, nessa primeira etapa, são selecionadas as melhores cepas, as condições de experimento e melhor tempo de extração, ou seja, o dia em que a produção de análogos for maior e mais eficaz.

Para tal, plugs de aproximadamente 6 mm de meio com o micélio (figura 31a, pág. 123) do fungo foram transferidos para erlenmeyers contendo o meio pré-fermentativo adequado e mantidos em shaker rotativo a 120 rpm e 30°C (figura 31b, pág. 123) até obtenção de uma quantidade satisfatória de massa micelial (figura 31c, pág. 123). Posteriormente, estes micélios foram filtrados e transferidos em ambiente asséptico (capela de fluxo laminar) para erlenmeyers contendo meio fermentativo adequado para cada fungo (figura 31d, pág. 123).

Em metade desses erlenmeyers contendo o meio fermentativo, foi adicionado o substrato, a outra metade foi utilizada como controle negativo, incubando-se apenas o fungo no meio de cultura, sem o substrato. Os experimentos controle indicaram os eventuais produtos naturais produzidos pelo micro-organismo, possibilitando a diferenciação dos produtos de biotransformação. O ensaio ainda dispunha de um erlenmeyer adicional, contendo apenas o substrato e o meio fermentativo, sem o fungo para avaliar a estabilidade da substância no meio.

Os experimentos foram conduzidos por 8 a 10 dias. Para identificar qual seria o melhor dia para realizar a extração dos metabólitos em escala ampliada, a cada de 24 horas, foram retirados dois erlenmeyers: um teste (substrato, meio e fungo) e um controle (meio e fungo). Ambos foram filtrados utilizando funil de Buckner sob vácuo, utilizando de papel de filtro com porosidade de 7,5 micras (figura 31e, pág. 123) e os caldos das culturas foram extraídos por partição com acetato de etila. Para verificar a estabilidade da substância no meio de cultura, ao final do experimento, o erlemeyer contendo apenas o substrato e o meio de cultura, também foi submetido à partição com acetato de etila.

Os extratos de biotransformação foram obtidos a partir da evaporação dos solventes e, após a análise por CLAE, foi selecionado o intervalo de tempo mais promissor para a extração, tomando por base os resultados dos cromatogramas.

A escala ampliada foi realizada da mesma maneira descrita anteriormente, porém, foram utilizadas apenas as cepas que foram capazes de biotransformar o substrato, testadas na escala analítica, e todos os erlemeyes do teste foram extraídos no melhor dia, dia de maior produção de metabólitos, de acordo com a análise dos cromatogramas dos experimentos em pequena escala (figura 30, pág. 122).



Figura 30. Esquema geral das etapas de biotransformação dos substratos.

Todos os meios de cultivo foram previamente autoclavados por 20 min a 121° C e as biotransformações foram realizadas em shaker, sob agitação de 120 rpm à 30 °C.

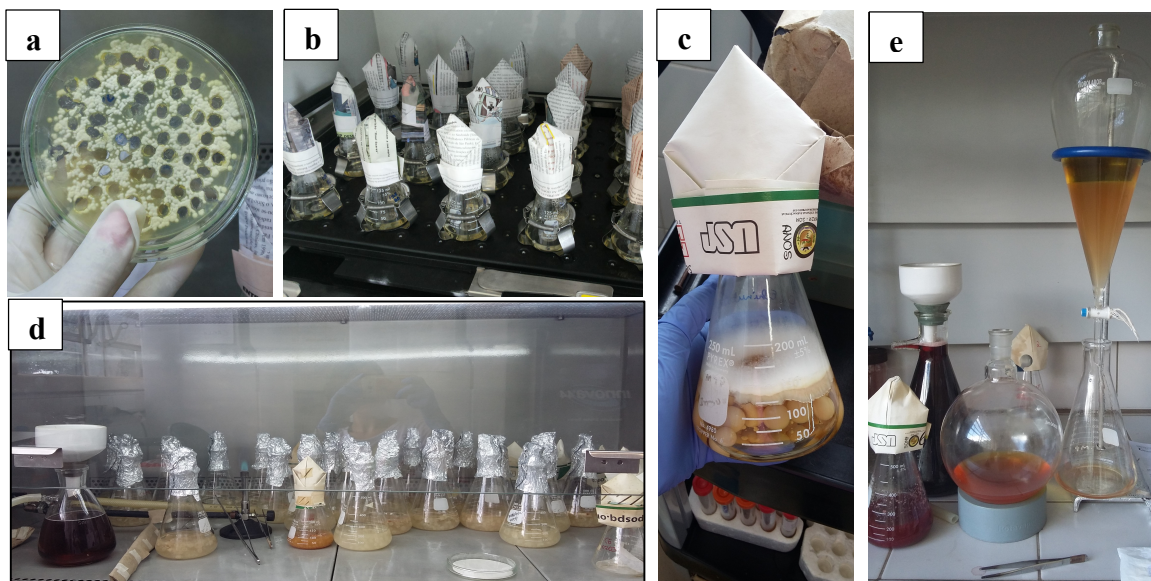


Figura 31. Metodologia utilizada para experimentos de biotransformação. **a)** retirada de plugs contendo o micélio do fungo para inóculo em meio de cultura pré-fermentativo próprio; **b)** incubação dos frascos testes e controles contendo meio pré-fermentativo, em shaker rotativo; **c)** crescimento micelial observado; **d)** transferência do micélio para meio fermentativo próprio e adição de substrato, em ambiente asséptico; **e)** filtração do micélio e partição dos caldos das culturas em funil de separação.

4.2.3 Experimentos de biotransformação da afidicolina

A afidicolina foi submetida a experimentos de biotransformação com os fungos *Cunninghamella echinulata* ATCC 8688^a, *Beauveria bassiana* ATCC 7159, *Chaetomium globosum* ATCC 56726, adquiridos da American Type Culture Collection (ATCC) e pelo fungo endofítico *Penicillium crustosum* VR4, todos pertencentes à coleção de micro-organismos do Laboratório de Química de Micro-organismos (LQMo) da FCFRP- USP, coordenado pela Prof^a. Dr^a. Mônica T. Pupo.

4.2.3.1 Experimentos de biotransformação da afidicolina em pequena escala pelos fungos *C. echinulata* ATCC 8688^a, *B. bassiana* ATCC 7159 e *C. globosum* ATCC 56726

Para cada um dos três fungos, foram realizados experimentos distintos, isolados, em tempos diferentes, seguindo o seguinte protocolo:

Os fungos foram primeiramente cultivados em placas de Petri contendo o meio PDA e encubados em estufa a 30 °C por 7 dias. Em seguida, três discos de aproximadamente 6 mm de meio contendo o micélio foram transferidos para erlenmeyers de 250 mL contendo 50 mL de meio pré-fermentativo específico para cada fungo. Após 7 dias, a massa micelial foi filtrada em ambiente asséptico e transferida para Erlenmeyers de 500 mL contendo 100 mL de meio fermentativo próprio para cada fungo (tabela 4, pág. 124).

Tabela 4. Particularidades do experimento de biotransformação em pequena escala para os fungos *C. echinulata*, *B. bassiana* e *C. globosum*.

Fungo	N° de erlens (250 mL)	Meio pré- fermentativo	N° de erlens (500 mL)	Meio fermentativo
<i>C.echinulata</i>	20	Pré-fermentativo A	20	Czapeck
<i>B. bassiana</i>	20	PDB	20	Czapeck
<i>C. globosun</i>	18	Pré-fermentativo A	18	Czapeck

Posteriormente, a afidicolina foi adicionada na concentração final de 0,1 mg.mL⁻¹ em metade dos Erlenmeyers contendo o micélio crescido no meio fermentativo, enquanto a outra metade foi utilizada como controles, e, por fim, todos os erlenmeyers foram mantidos em shaker sob agitação de 120 rpm, à 30°C. A cada 24 horas, dois erlenmeyers de cada experimento, um teste e um controle, foram retirados e os caldos das culturas foram separados dos micélios por filtração, extraídos com AcOEt (3x de 70 mL) e posteriormente analisados por CLAE.

4.2.3.2 Experimentos de biotransformação em pequena escala da afidicolina pelo fungo endofítico *P. crustosum* VR4

O fungo foi cultivado em placa de Petri contendo o meio PDA em estufa a 30°C por 7 dias. Após o crescimento do fungo por 7 dias, adicionou-se 6 fragmentos de ágar contendo micélio em 200mL de meio pré-fermentativo A, previamente autoclavado, em um Erlenmeyer de 1L. Este frasco foi incubado sob agitação a 120 rpm por 3 dias a 30° C. Após este período, a massa micelial foi filtrada assepticamente e transferida para outro Erlenmeyer de 1L contendo 200 mL do mesmo meio usado na pré-cultura, meio pré-fermentativo A, porém sem a glicose, de acordo com metodologia proposta por Almeida (2010), padronizada pela USP, para experimentos de biotransformação com *P. crustosum* VR4.

A afidicolina foi adicionada na concentração final de 0,1 mg. mL⁻¹. Este frasco foi incubado sob agitação a 120 rpm por 3 dias, a 30° C. Após este período o caldo da cultura foi separado do micélio por filtração e extraído com AcOEt (3x de 70 mL). Foram obtidos 22 mg de extrato bruto, que foi analisado por CLAE.

4.2.3.3 Procedimentos de biotransformação da afidicolina em escala ampliada

Para o fungo *C. echinulata* ATCC 8688^a, o qual foi cultivado conforme o item 4.4.1.1, foram preparados 22 Erlenmeyers, cada um contendo 20 mg de afidicolina. Os Erlenmeyers foram mantidos em shaker rotativo a 120 rpm e 30 °C por 192 horas. Após esse período, o micélio foi filtrado e o caldo da cultura, extraído por partição com acetato de etila (3x1,5 L).

Para o fungo *C. globosum* ATCC 56726, cultivado conforme ítem 4.2.2 foram utilizados 20 Erlenmeyers contendo 20 mg de afidicolina cada um, e foram mantidos em shaker à 120 rpm e 30 °C por 166h. Após esse período, o micélio foi filtrado e o caldo da cultura, extraído por partição com acetato de etila (3x1,5 L).

Para os fungos *B. bassiana* ATCC 7159 e *Penicillium crustosum* VR4, não foram realizados experimentos em escala ampliada.

4.2.4 Experimentos de biotransformação do ácido *ent*-7 α -acetoxitraquiloban-18-oico (T-360) pelo fungo *M. rouxii* NRRL 1894

O T-360 foi submetido à experimentos de biotransformação com o fungo de solo *Mucor rouxii* NRRL 1894, que foi gentilmente cedido pelo Dr. C. W. Hesseltine (Northern Utilization Research and Development Division, ARS, USDA, Peoria, IL, USA), também pertence à coleção de micro-organismos do Laboratório de Química de Micro-organismos (LQMo) da FCFRP-USP, coordenado pela Prof^a. Dr^a. Mônica T. Pupo.

O fungo foi cultivado em placas de petri contendo o meio extrato de malte e mantido em estufa a 30°C por 7 dias. Após esse período, foram adicionados 5 mL de água deionizada estéril para a coleta dos esporos, que foram raspados, contados em câmara de Neubauer e transferidos para 20 Erlenmeyers de 250 mL contendo 50 mL do meio pré-fermentativo B, obtendo-se a concentração final de 4×10^6 esporos/mL por Erlenmeyer. Após 48 horas de crescimento, a massa micelial foi filtrada e transferida em ambiente asséptico para outros 20 Erlenmeyers de 500 mL contendo 100 mL do meio fermentativo Koch's K1 (CAPEL, 2011). O T-360 foi adicionado na concentração final de 0,1 mg.mL⁻¹ em 10 Erlenmeyers, os outros 10 foram utilizados como controles e por fim, os Erlenmeyers foram mantidos em shaker sob agitação de 120 rpm, à 30 °C. Os extratos foram obtidos pela partição dos caldos das culturas com acetato de etila.

Não foi possível realizar experimento em escala ampliada com o fungo *Mucor rouxii* NRRL 1894. Seus extratos de biotransformação, que foram monitorados até 192 horas, foram reunidos em uma única fração e posteriormente submetidos à análise por CLAE e RMN de ¹H, e purificação, através de métodos cromatográficos.

4.2.5 Experimentos de Biotransformação do (2S*, 3S*, 4R*, 5R*, 9S*, 11R*, 15R*)-3,5,15-triacetoxi-14-oxolatira-6(17),(12E)-dieno (EBOE-12)

O diterpeno latirano codificado como EBOE-12 foi submetido a experimentos de biotransformação com os fungos *Mucor circinelloide* NRRL 3631 (+) e *Botrytis cinerea*, linhagens selvagens pertencentes à coleção de micro-organismos do Laboratório de Química Biológica, coordenado pelo Prof. Dr. Isidro Gonzáles Collado, da *Universidad de Cádiz*, Espanha.

4.2.5.1 Experimentos de Biotransformação do (2S*, 3S*, 4R*, 5R*, 9S*, 11R*, 15R*) -3,5,15-triacetoxi -14-oxolatira-6 (17),(12E)-dieno (EBOE-12) pelo fungo *Mucor circinelloide* NRRL 3631 (+)

O fungo foi primeiramente cultivado em placas de Petri contendo o meio ágar rico e mantido em estufa a 30 °C por 5 dias. Após esse período, foram adicionados 5 mL de água deionizada estéril para a coleta dos esporos, que foram raspados, contados em câmara de Neubauer e transferidos para 11 erlenmeyers de 500 mL contendo 100 mL do meio líquido rico, obtendo-se a concentração final de $1,8 \times 10^6$ esporos/mL por erlenmeyer. Após 48 horas de crescimento, o substrato foi inoculado ao meio de cultura na concentração final de $0,1 \text{ mg.mL}^{-1}$, em 10 Erlenmeyers, deixando 1 como controle. Por fim, todos os Erlenmeyers foram mantidos em shaker sob agitação de 120 rpm, à 25°C até o tempo de 168 horas. Após esse período, todos os Erlenmeyer contendo o teste, bem como seu respectivo controle, foram filtrados e os caldos das culturas foram extraídos por partição com acetato de etila (3x1,5 L), e posteriormente monitorados por CCDA.

Optou-se por realizar os experimentos já em escala ampliada devido à pequena quantidade de substância de partida disponível e extrair os caldos de cultura após 168 horas, pois, de acordo com a literatura, a maioria dos experimentos realizados com fungos do gênero *Mucor*, são conduzidos por cerca de 7 dias (ARANDA, 1991; FRAGA, 2010; CAPEL, 2011).

4.2.5.2 Experimentos de Biotransformação do (2S*, 3S*, 4R*, 5R*, 9S*, 11R*, 15R*)- 3,5,15-triacetoxi-14-oxolatira-6(17), (12E)-dieno (EBOE-12) pelo fungo *Botrytis cinerea* UCA996

O fungo foi primeiramente cultivado em placas de Petri contendo o meio ágar tomate e mantido em estufa a 30°C por 9 dias. Após esse período, foram adicionados 5 mL de água deionizada estéril para a coleta dos esporos, que foram raspados, contados em câmara de Neubauer, filtrados e transferidos para 11 Erlenmeyers de 500 mL contendo 100 mL do meio líquido Czapeck, obtendo-se a concentração final de $1,8 \times 10^6$ esporos/mL por Erlenmeyer. Após 7 dias de crescimento, o substrato foi inoculado ao meio de cultura na concentração final de $0,1 \text{ mg.mL}^{-1}$, em 10 Erlenmeyers, deixando 1 como controle. Por fim, todos os Erlenmeyers foram mantidos em shaker sob agitação de 120 rpm, à 25°C até o tempo de 168 horas. Após esse período, todos os Erlenmeyer contendo o teste, bem como seu respectivo controle, foram filtrados e os caldos das culturas foram extraídos por partição com acetato de etila (3x1,5L), e posteriormente monitorados por CCDA.

Optou-se por realizar os experimentos já em escala ampliada devido à pequena quantidade de substância de partida disponível e extrair os caldos de cultura após 168 horas, pois a maioria dos experimentos realizados pela equipe de pesquisa do Prof. Isidro Collado com esse fungo, são conduzidos por cerca de 7 dias (RIVILLA, 2009).

4.3 Avaliação dos perfis químicos dos extratos de biotransformação

Os extratos obtidos nos experimentos de biotransformação foram submetidos a análises por CLAE-DAD, CLAE-ELSD e RMN de ^1H . As análises por CLAE foram realizadas em coluna analítica CLC-ODS 250mm X 4,5mm, usando como fase móvel gradiente de acetonitrila em água (0-30min, 10% a 100% de acetonitrila; 30-32min, 100% de acetonitrila; 32-40min, 100% a 10% de acetonitrila), com tempo total de análise de 40 minutos. Foram injetados 10µL de

cada extrato, solubilizado em acetonitrila e/ou água na concentração de 1mg mL^{-1} , à vazão de 1mL min^{-1} . Devido a ausência de cromóforos na molécula do substrato, o melhor monitoramento foi realizado pelo detector de espalhamento de luz *light scattering* (ELSD).

4.4 Isolamento dos metabólitos de biotransformação

Para o substrato afidicolina, os fungos *Chaetomium globosum* ATCC 56726 e *Cunninghamella echinulata* ATCC 8688^a foram selecionados para ampliação da escala, porém com este último, o experimento de larga escala não foi reprodutível e nenhum metabólito de biotransformação foi identificado no extrato bruto, após análise por CLAE-ELSD e CLAE-DAD. Dessa forma, apenas o extrato bruto originado dos experimentos com o fungo *C. globosum*, foi submetido a métodos de isolamento e purificação.

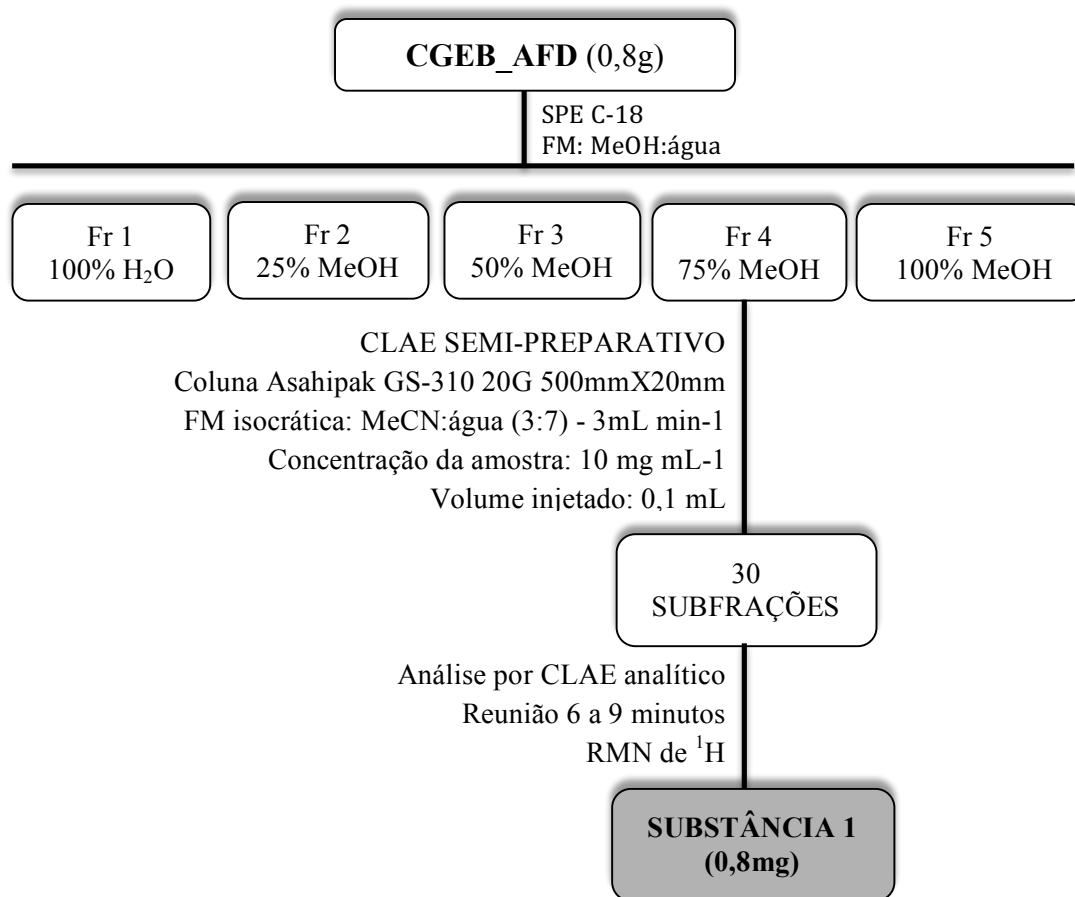
A partir da análise dos cromatogramas resultantes dos experimentos com o traquilobano T-360 e o latirado EBOE-12, foi possível verificar que para o primeiro, apenas o fungo *Mucor rouxii* NRRL 1894 produziu um possível análogo, e em relação ao diterpeno latirano, um provável análogo foi originado a partir da fermentação com o *Mucor circinelloide* NRRL 3631 (+).

4.4.1 Fracionamento do Extrato Bruto obtido da Biotransformação da afidicolina com o fungo *Chaetomium globosum* ATCC 56726

Primeiramente, o extrato bruto obtido da biotransformação afidicolina com o fungo *C. globosum* ATCC 56726 (CGEB_AFD, 800mg), foi submetido a uma Cromatografia rápida de extração em fase sólida (SPE) em cartuchos C-6 1000mg/6mL, utilizando metanol:água, puros ou em misturas binárias em ordem crescente de polaridade. Através do monitoramento das frações obtidas por CCDA e CLAE analítico, utilizando as mesmas condições descritas anteriormente, foi possível detectar o pico de interesse presente na fase metanol:água 75% (150mg) (figura 50, pág. 139). Esta fase foi submetida a uma nova cromatografia em CLAE semi-preparativo. Devido a ausência do detector *light scattering* para

esse equipamento, a coleta das frações foi realizada “às cegas”, a cada minuto durante 30 minutos, já que este foi o único detector que permitiu a visualização dos picos. As 30 frações obtidas foram monitoradas por CLAE analítico e as subfrações 6-7, as quais continham o pico de interesse, foram reunidas e posteriormente submetida a RMN de ^1H , sendo codificada como substância 1 (0,8mg) (esquema 42, pág. 131).

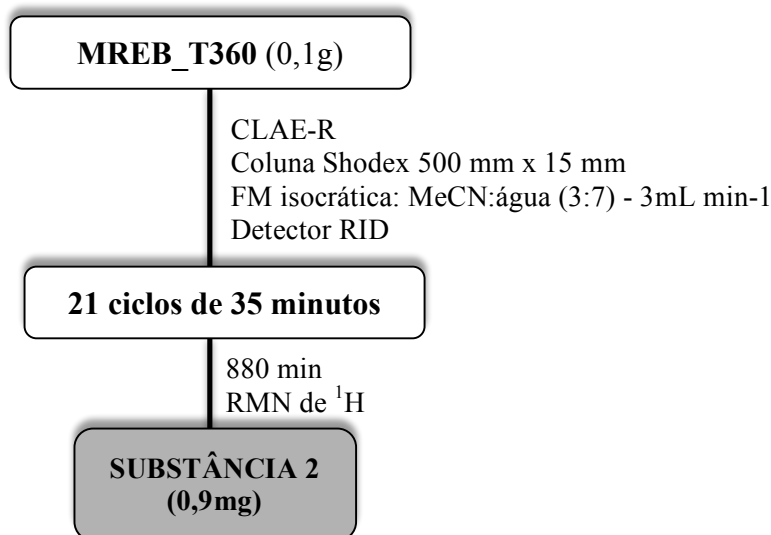
Os experimentos de incubação do diterpeno afidicolina em escala analítica com os fungos *Beauveria bassiana* ATCC 7159 e *Penicillium crustosum* VR4 foram monitorados por 168 horas, e nestes ensaios não foi observado o surgimento de picos nos extratos testes, diferentes dos seus respectivos controles, o que evidencia a possível não formação de produtos biotransformados. Dessa forma, os fungos não foram utilizados para ampliação de escala.



Esquema 42. Fracionamento do Extrato Bruto obtido da Biotransformação da afidicolina com o fungo *Chaetomium globosum* em escala ampliada.

4.4.2 Fracionamento do Extrato Bruto obtido da biotransformação do *ent-7 α -acetoxetraquiloban-18-oico* (T-360) com o fungo *Mucor rouxii* NRRL 1894

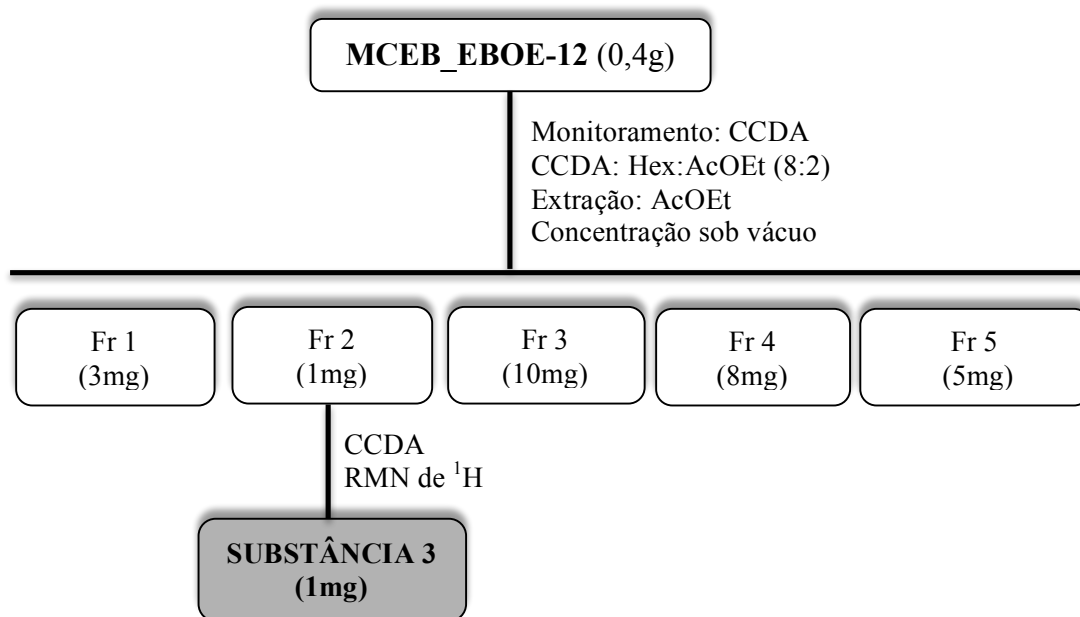
Os extratos obtidos nos experimentos de biotransformação do T-360 com o fungo *M. rouxii* NRRL 1894 (MREB_T360, 100mg) foram reunidos e submetidos à purificação em CLAE reciclante, utilizando coluna Shodex (500 mm x 15 mm), e como fase móvel acetonitrila:água (30%), com tempo total de análise de 925 minutos. Foram injetados 100 mg do extrato solubilizado em 1mL de acetonitrila:água, à vazão de 3mL min⁻¹, com detecção por RID. Após 21 ciclos de 35 minutos, o pico em 880 minutos foi coletado (0,9mg) e submetido a análise por RMN de ¹H, sendo codificado como substância 2 (esquema 43, pág. 132).



Esquema 43. Fracionamento do Extrato Bruto obtido da Biotransformação do T360 com o fungo *Mucor rouxii*.

4.4.3 Fracionamento do Extrato Bruto obtido da biotransformação do diterpeno EBOE-12 com o fungo *Mucor circinelloide* NRRL 3631 (+)

O extrato obtido nos experimentos de biotransformação do EBOE-12 com o fungo *M. circinelloide* NRRL 3631 (+) (MCEB_EBOE-12, 400mg) foi monitorado por CCDA e posteriormente submetido a Cromatografia em camada delgada preparativa (CCDP), utilizando como fase móvel Hex:AcOEt (8:2). As cinco faixas resultantes foram filtradas em funil de placa porosa, utilizando acetato de etila. As soluções resultantes foram evaporadas e as frações foram analisadas por CCDA e levadas para análise por RNM de ^1H . Na fração 2 (1mg), a qual apresentou-se sob forma oleosa, foi detectada um análogo do substrato de partida, sendo codificada como substância 3 (esquema 44, pág. 133).



Esquema 44. Fracionamento do Extrato Bruto obtido da Biotransformação do EBOE-12 com o fungo *Mucor circinelloide*.

__RESULTADOS E DISCUSSÃO

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Afidicolina

A afidicolina apresenta-se na forma de cristais brancos. Sua pureza foi inicialmente verificada por RMN de ^1H e CLAE-ELSD, em que esta substância apresentou um tempo de absorção de 10,03 minutos (figura 32, pág. 135).

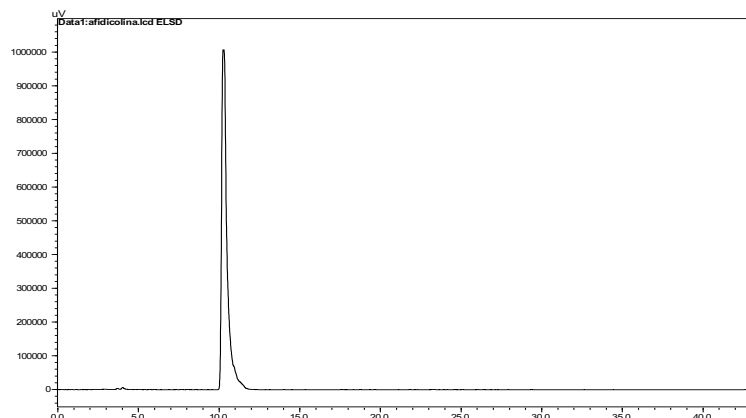


Figura 32. Cromatograma da afidicolina pura (CLAE-ELSD)

5.1.1 Biotransformação da afidicolina com o fungo *Cunninghamella echinulata* ATCC 8688^a

A partir da análise dos perfis químicos dos extratos de biotransformação referentes à escala analítica, através de CLAE-ELSD, foi possível verificar que o fungo *C. echinulata* foi capaz de biotransformar a afidicolina com formação de prováveis análogos, observados em azul no cromatograma. Dessa forma, definiu-se o tempo de 96 horas de incubação para o aumento de escala. A figura 33a-g (pág. 136) apresenta a sobreposição dos cromatogramas referentes aos testes nos tempos de 24 a 166 horas. Em preto está representada a afidicolina (padrão), em azul o teste (afidicolina + meio de cultura+ fungo) e em vermelho, o controle negativo (meio+fungo). A figura 33h representa a sobreposição dos cromatogramas do experimento em escala preparativa, no tempo de 96 horas. Foi possível verificar que não houve reprodutibilidade entre as escalas.

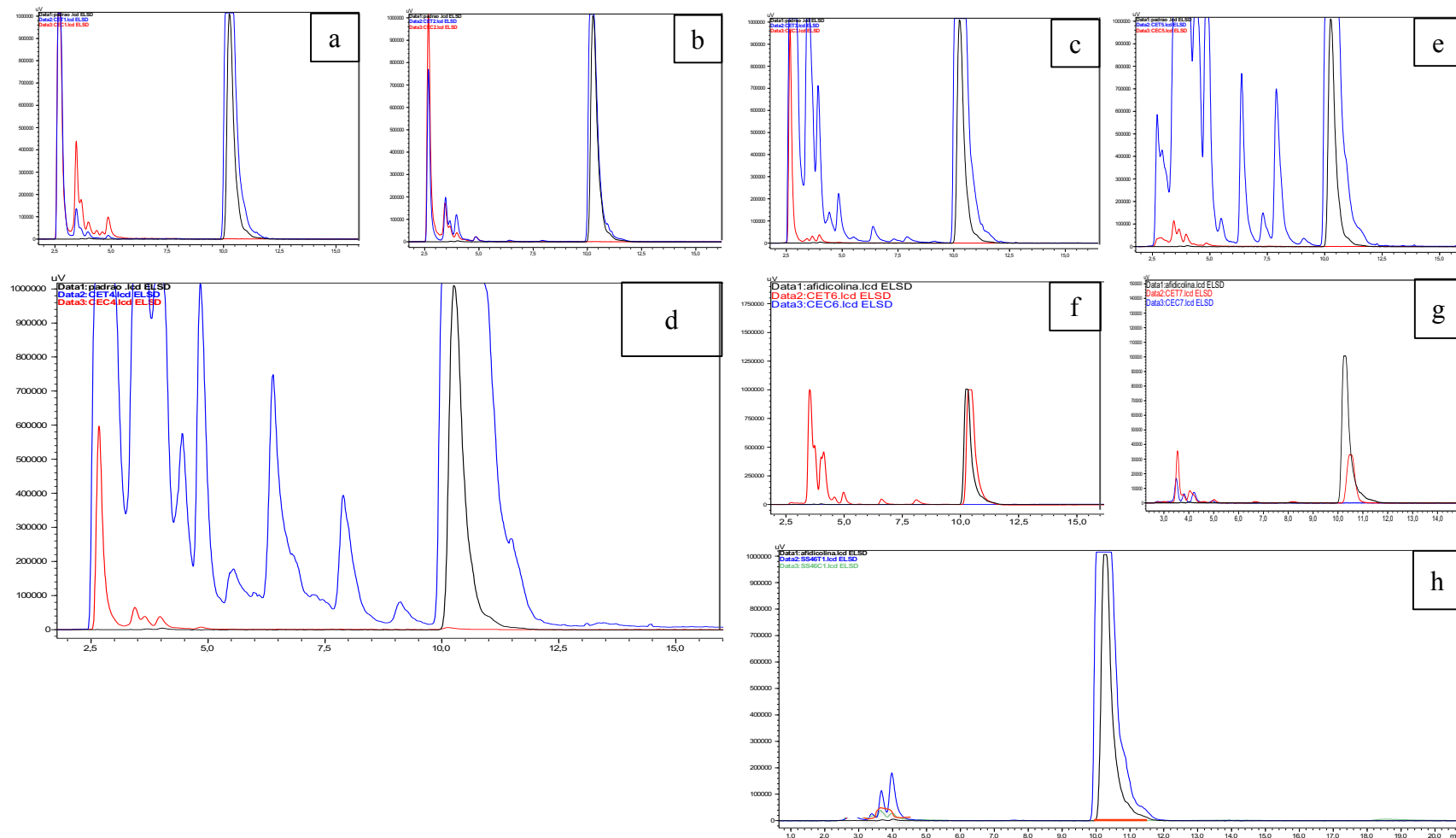


Figura 33. Sobreposição dos Cromatogramas da afidicolina pura (preto), teste (azul) e controle (vermelho) nos tempos de **a)** 24 horas; **b)** 48 horas; **c)** 72 horas; **d)** 96 horas; **e)** 120 horas; **f)** 144 horas; **g)** 166 horas. **h)** escala ampliada no tempo de 96 horas.

5.1.2 Biotransformação da afidicolina com fungo *Chaetomium globosum* ATCC 56726

A partir da análise dos perfis químicos dos extratos de biotransformação referentes à escala analítica, através de CLAE-ELSD, foi possível verificar que o fungo *C. globosum* foi capaz de biotransformar a afidicolina com formação de prováveis derivados. Definiu-se o tempo de 48 horas de incubação para o aumento de escala de biotransformação. A figura 34a-g (pág. 133) apresenta a sobreposição dos cromatogramas referentes aos testes nos tempos de 24 a 166 horas. Em preto está representada a afidicolina (padrão), em azul o teste (afidicolina + meio de cultura+ fungo) e em verde, o controle negativo (meio+fungo). A figura 34h representa a sobreposição dos cromatogramas do experimento em escala preparativa, no tempo de 48 horas. Foi possível verificar que houve reprodutibilidade entre as escalas, com a produção de um análogo majoritário no tempo de 7,09 minutos. Posteriormente, o extrato obtido foi submetido aos métodos cromatográficos descritos anteriormente, tendo como resultado o isolamento de um análogo da afidicolina, codificado como substância 1.

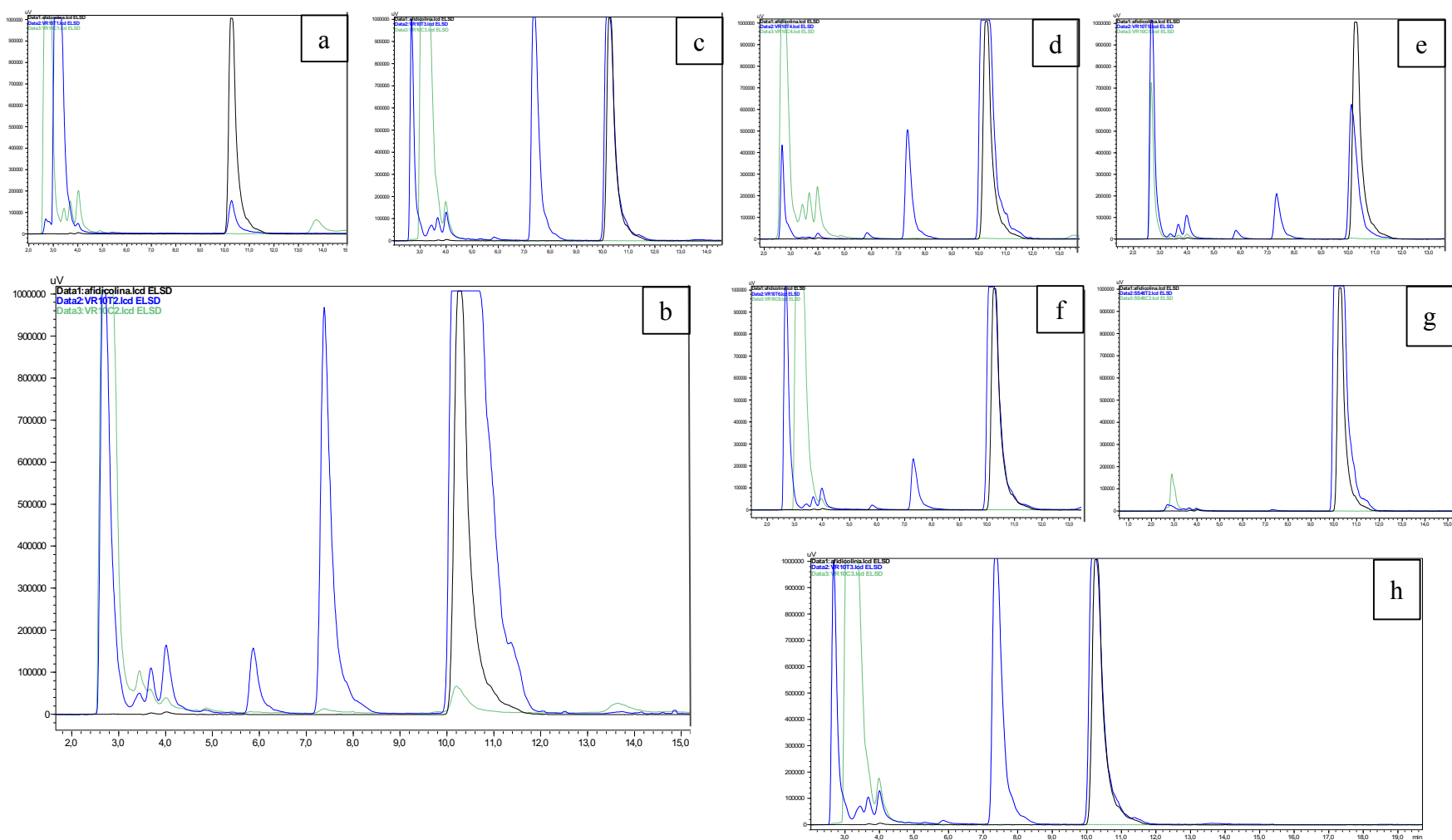


Figura 34. Sobreposição dos Cromatogramas da afidicolina pura (preto), teste (azul) e controle (verde) nos tempos de **a)** 24 horas; **b)** 48 horas; **c)** 72 horas; **d)** 96 horas; **e)** 120 horas; **f)** 144 horas; **g)** 166 horas. **h)** escala ampliada no tempo de 48 horas.

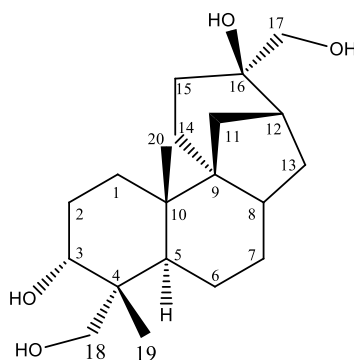
5.1.3 Identificação estrutural da substância de partida afidicolina

O espectro de RMN ^1H (figura 35, pág. 141) da afidicolina apresenta dois sinais singletos referentes a hidrogênios metílicos em δH 1,03 e δH 0,74 ppm, além de quatro sinais atribuídos a hidrogênios ligados à carbono contendo oxigênio entre δH 3,32- 3,62 ppm. O sinal em δH 3,62 ppm (sl) refere-se a um hidrogênio oximetínico que, devido ao pequeno valor da constante de acoplamento, está em posição H-3 equatorial. Além disso, o espectro de COSY evidencia o acoplamento de H-3 (δH 3,62 ppm) com dois hidrogênios em δH 1,95 ppm e δH 2,12 ppm, que correspondem aos dois H-2, confirmando a atribuição para H-3. Os outros quatro sinais de hidrogênios desblindados, vistos no espectro de RMN de ^1H , correspondem a quatro hidrogênios oximetilênicos, conforme evidenciado pelo mapa de contorno HMQC em que os hidrogênios em δH 3,49 ppm (d, $J = 11,0$ Hz, 1H) e δ 3,32 ppm (m) estão ligados ao carbono em δ 72,3 (C-18) e os hidrogênios em δH 3,40 ppm (d, $J = 11,5$ Hz, 1H) e δH 3,32 ppm (m) estão ligados ao carbono em δC 69,0 ppm (C-17). As atribuições de H-17 e H-18 são confirmadas pelas correlações observadas no HMBC, destacando a correlação dos dois H-18 com o C-3 (δC 77,5 ppm). A análise dos espectros de RMN de ^{13}C (figura 36, pág. 142) e mapas de contorno HMBC e HMQC (tabela 5, pág. 140) corroboraram a estrutura da classe dos diterpenos, revelando a presença de 20 carbonos: dois do tipo oximetilênico, um oximetínico, um quaternário ligado à hidroxila e dois metílicos, não apresentando carbonos insaturados.

De acordo com Chagas (2010), o cálculo para o grau de insaturação, com base nos dados de RMN, indica a presença de um diterpeno tetracíclico, confirmando, inclusive, a configuração absoluta, como sendo 3R, 4R, 5R, 8S, 9S, 10S, 12R e 16R. As correlações observadas nos espectros de HMBC, HMQC, COSY e NOESY para a afidicolina estão referenciadas por Fraga (2010), e os dados experimentais dos espectros encontram-se na tabela 5 (pág. 140).

Tabela 5. Dados de RMN de ^1H (500 MHz), ^{13}C (125 MHz), HMQC, HMBC e COSY, obtidos em CD_3OD referentes à substância de partida afidicolina

Posição átomo	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$ (multiplicidade, J em Hz)	COSY	HMBC ($^1\text{H} \rightarrow ^{13}\text{C}$)
1	27,9	1,69 (dd, 2,5, 13,5, $\text{H}\alpha$) 1,37 (d, 3, $\text{H}\beta$)		
2	27,4	1,94 (m, $\text{H}\beta$), 2,12 (m, $\text{H}\alpha$)		
3	77,3	3,62 (sl)	H-2	C-5
4	41,4	-		
5	34,8	2,44 (dd, 3,0, 12,5)	H-6a; b	C-2; 6; 10; 19
6	24,1	1,53 (m) 1,30 (dd, 3,5, 12,0)		
7	28,8	1,41 (dd, 6,5, 12,5), 1,32 (m)	H-6b	C-6; 9
8	41,3	2,05 (m)		
9	50,3	-		
10	40,8	-		
11	33,7	1,85 (d, 11), 1,38 (dd, 3,5, 12,5)	H-11b	C-9; 10; 12
12	42,3	2,18 (m)		C-16
13	32,3	1,79 (m), 1,00 (m)	H-13b; 8	C-9; 10; 12
14	25,6	1,92 (m), 0,95 (m)	H-14b	C-8; 9; 16
15	27,6	2,16 (m) 1,38 (dd, 3,5, 12,5)	H-15b; 14b	C-9; 10 C-9; 12; 14; 16
16	75,6	-		
17	68,7	3,40 (d, 11,5), 3,32 (m)	H-17b	C-12; 16
18	72,1	3,49 (d, 11,0), 3,32 (m)	H-18b	C-2; 3; 4; 5; 19
19	17,9	0,74 (m)		C-4; 5; 18
20	15,6	1,03 (m)		C-2; 5; 9; 10



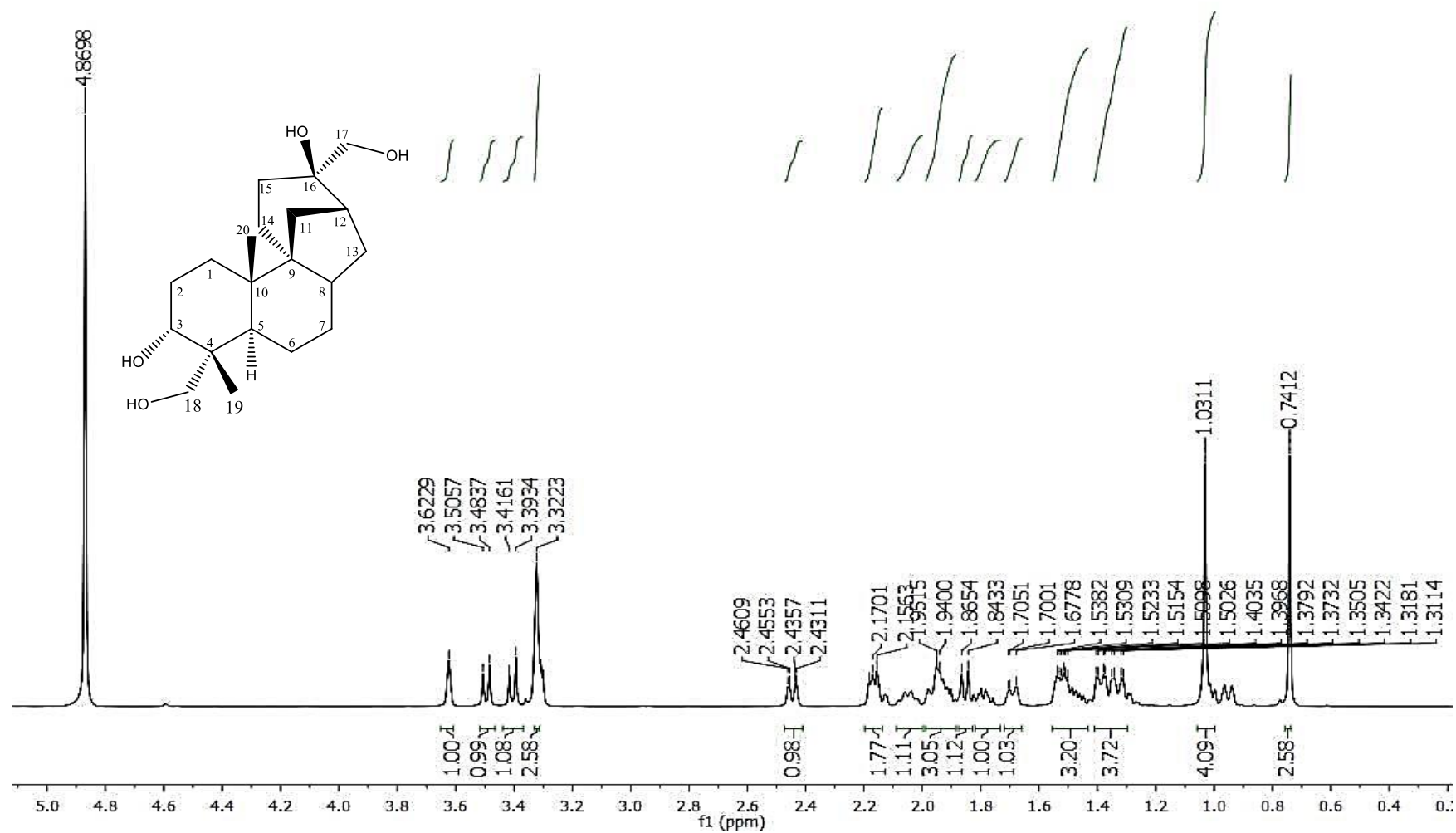


Figura 35. Espectro de RMN ^1H (500 MHz, CD_3OD) da afidicolina.

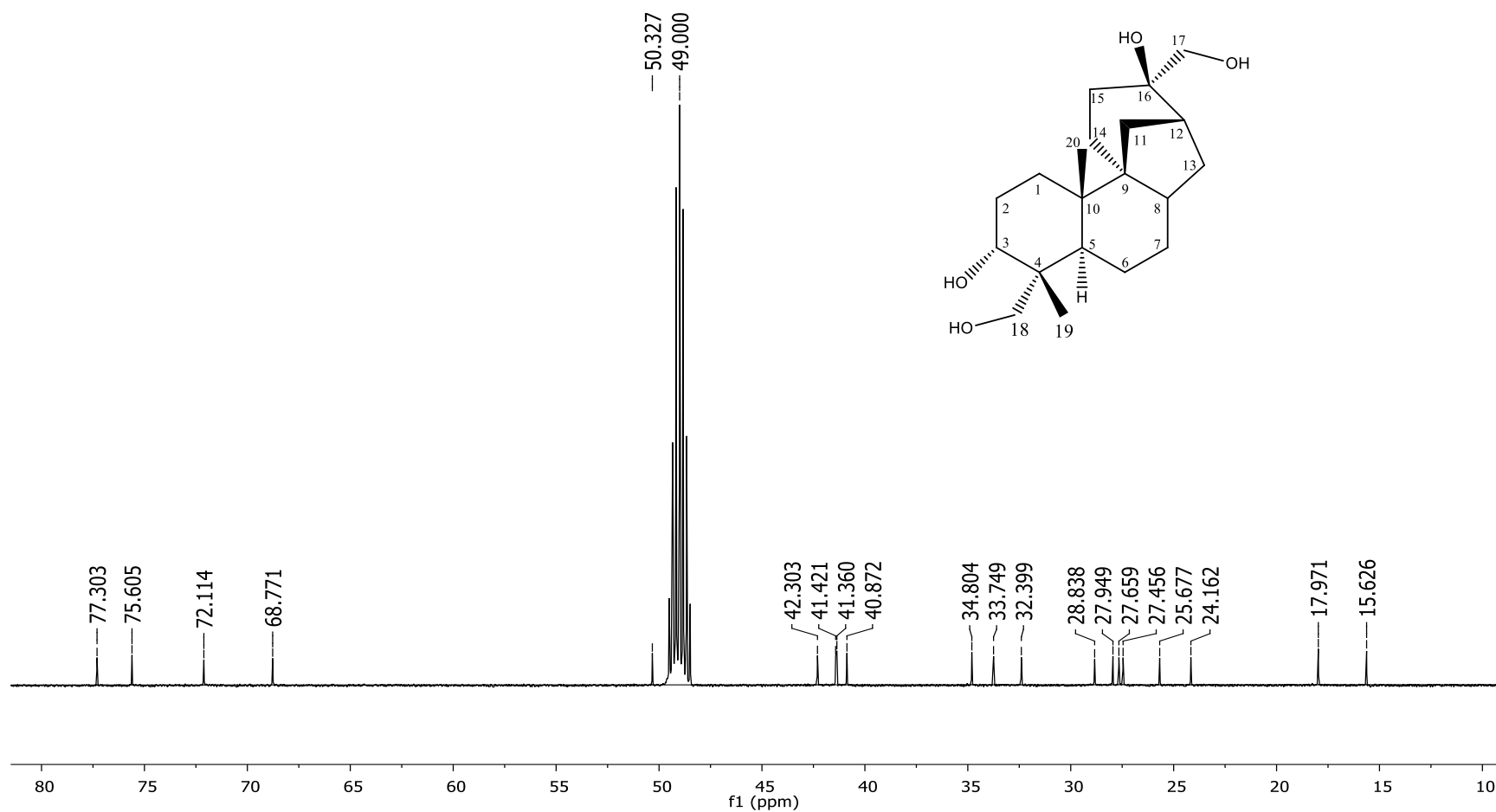


Figura 36. Espectro de RMN ^{13}C (125 MHz, CD_3OD) da afidicolina.

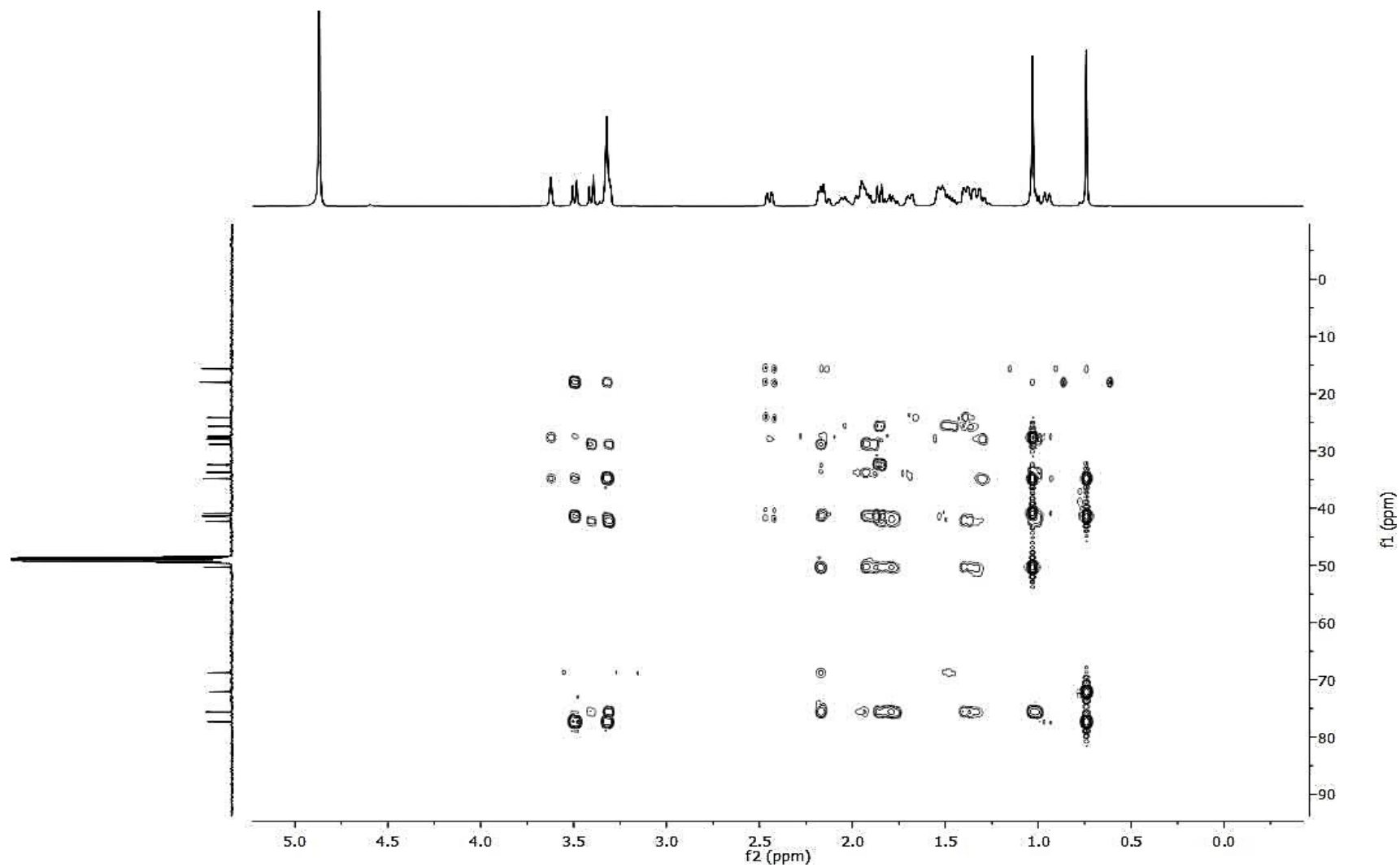


Figura 37. Mapa de contorno de HMBC (500MHz, CD₃OD) da afidicolina

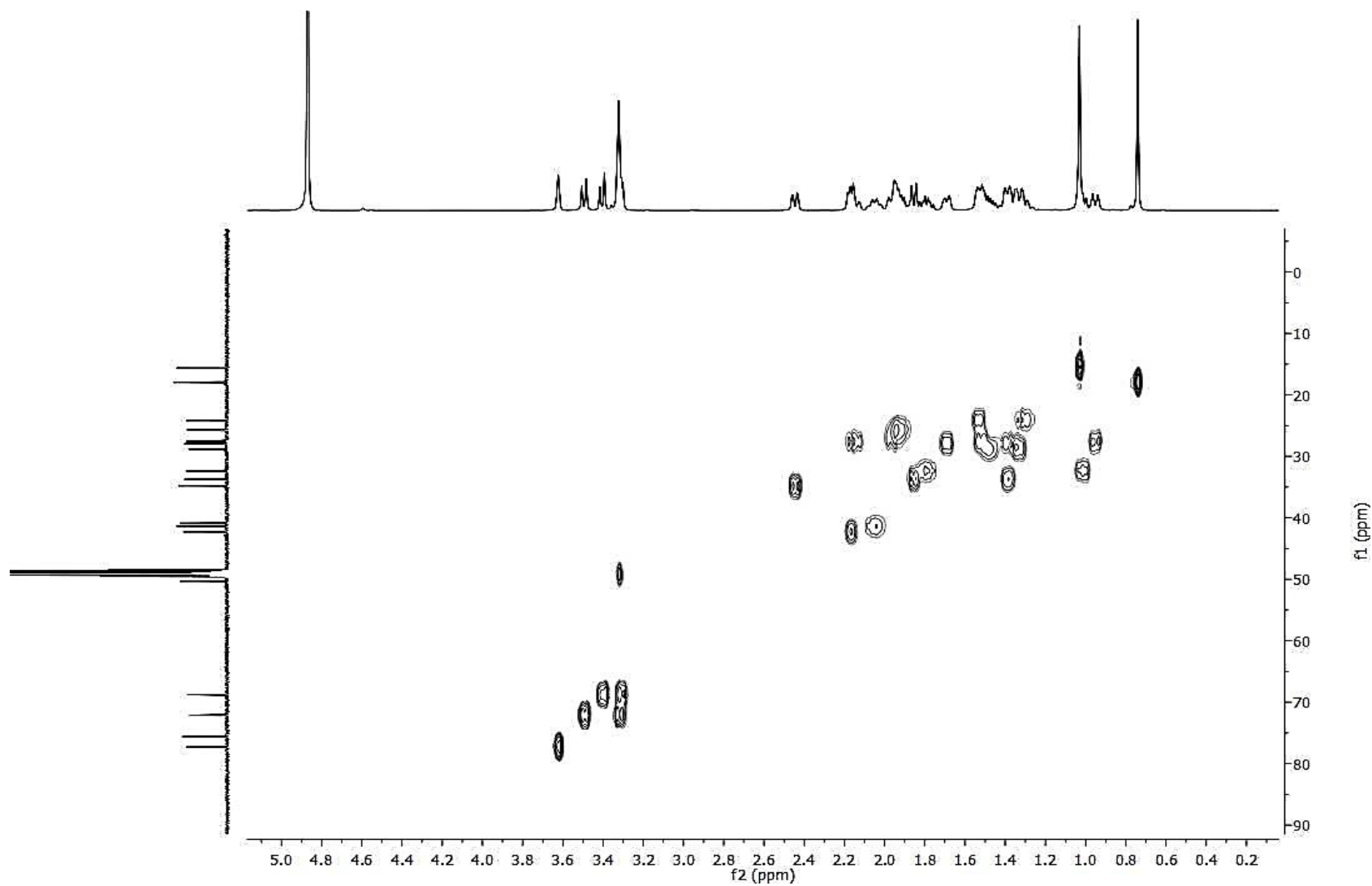


Figura 38. Mapa de contorno HMBC (500MHz, CD₃OD) da afidicolina

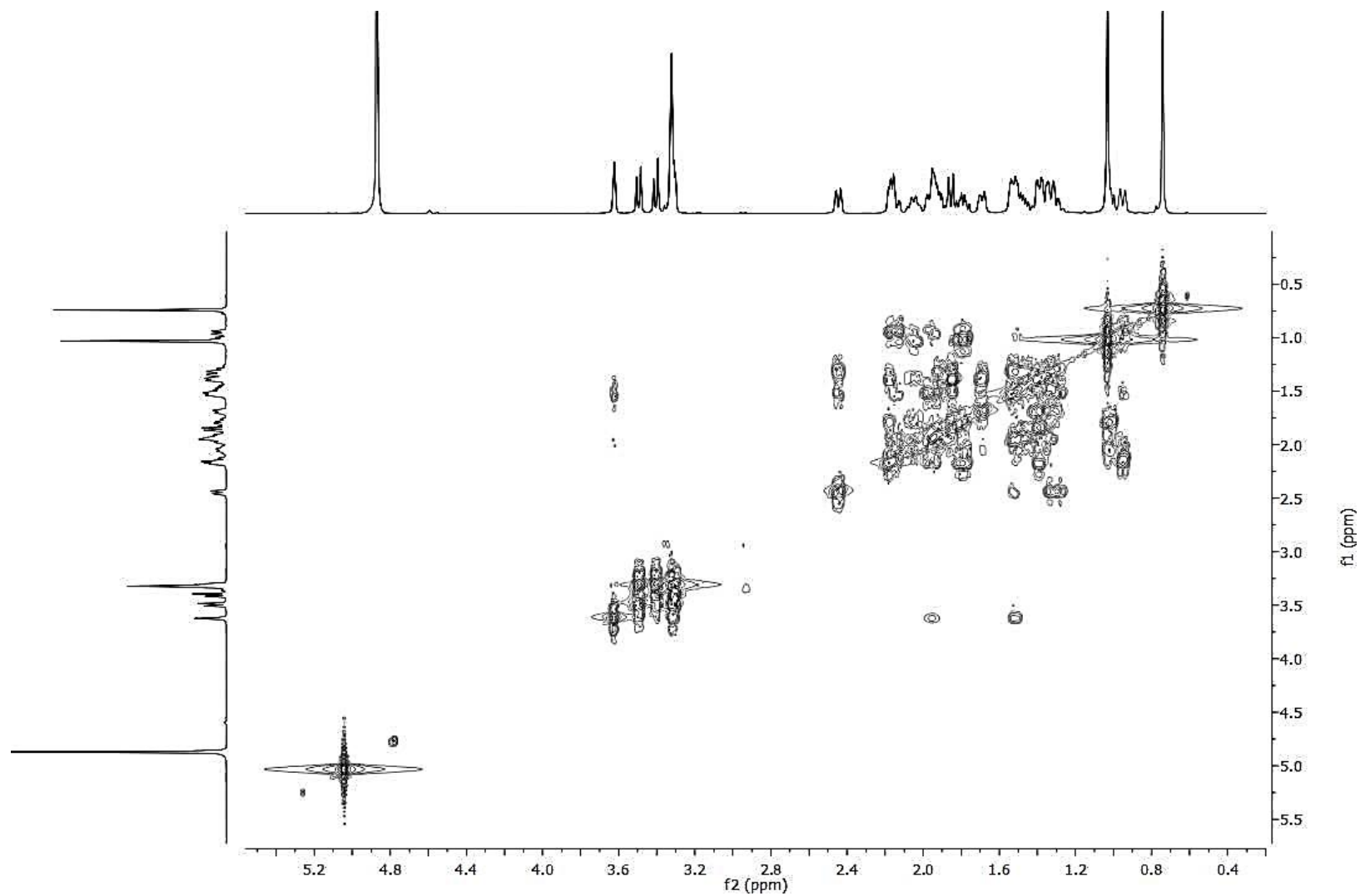


Figura 39. Espectro de COSY (500 MHz, CD₃OD) da afidicolina

5.1.4 Identificação estrutural do produto de biotransformação da afidicolina com o fungo *Chaetomium globosum* ATCC 56726 – SUBSTÂNCIA 1

O espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) da substância 1 (figura 40, pág. 148) apresentou-se similar ao espectro da sua respectiva substância de partida, a qual foi previamente descrita. Foi possível observar singletos em δH 1,00 e 1,17 ppm, referentes as duas metilas do esqueleto, CH_3 -19 e CH_3 -20, respectivamente, bem como os sinais de prótons desblindados em δH 3,67 (d, $J=10$ Hz, 1H), referente a H-18, e 3,47 ppm (d, $J=11$ Hz, 1H) e 3,37 ppm (t, $J=10,5$ Hz, 2H), referentes a H-17 α e H-17 β , os quais caracterizam a permanência dos dois grupamentos OH nos carbonos C-17 e C-18, assim como na afidicolina.

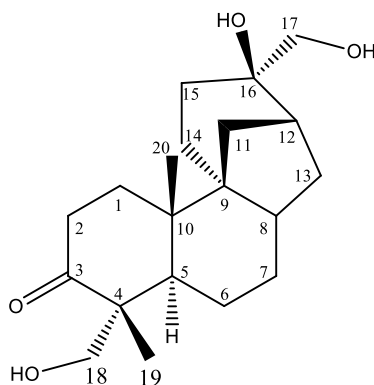
A principal diferença observada com a análise do espectro de RMN de ^1H foi o surgimento de um sinal em δH 2,64 (m, 1H), referente a H-12 axial, bem como a ausência do singlete desblindado em δH 3,62 ppm, referente a H-3 na substância de partida, o que sugeriu uma mudança no carbono C-3.

Os valores de deslocamentos de carbono da substância 1 foram determinados de forma indireta através dos mapas de contorno HMBC (figura 42, pág. 150) e HMBC (figura 43, pág. 151), bem como por comparação com dados da literatura (IPSEN, 1982; IPSEN; ROSAZZA, 1984; SANTOS, 2014). A partir da análise dos dados, observou-se o desaparecimento do sinal em δC 27,4 ppm referente a carbono metilênico C-2 na substância de partida, bem como o surgimento de um sinal em δC 218,0 ppm, o qual indica a presença de grupamento carbonila em C-3 no análogo. A localização deste grupamento pôde ser confirmada pelas correlações observadas no mapa de contorno HMBC dos sinais em δH 2,64 ppm (H-2) e δH 0,98 ppm (CH_3 -19) com o carbono 3 em δC 218,0 ppm. Observa-se também uma desblindagem dos carbonos C-1 (δC 31,4 ppm), C-2 (36,5 ppm) e C-4 (53,1 ppm) em relação à substância de partida, corroborando a inserção da carbonila no carbono C-3.

Dessa forma, a substância 1 pôde ser determinada como sendo a 3-ceto-afidicolina, Os dados experimentais dos deslocamentos químicos estão compilados na tabela 6 (pág. 147).

Tabela 6. Dados de RMN ^1H (500 MHz), ^{13}C (125 MHz), HMQC, HMBC e COSY, obtidos em CDCl_3 referentes a substância 1

Posição átomo	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$ (multiplicidade, J em Hz)	HMBC ($^1\text{H} \rightarrow ^{13}\text{C}$)	$\delta^{13}\text{C}$ (afidicolina)
1	31,4	0,95 (m), 1,82 (m)		27,9
2	36,5	2,64 (m)	C-3	27,4
3	218,0	-		77,3
4	53,1	-	C-5	41,4
5	36,3	2,32 (m)	C-2; 3; 6; 10; 19	34,8
6	24,5	1,53 (m)		24,1
7	29,6	1,23 (m)	C-6; 9	28,8
8	40,4	1,81 (m)		41,3
9	49,3	-		50,3
10	40,3	-		40,8
11	32,5	1,40 (m), 1,57 (m)	C-9; 10; 12	33,7
12	40,9	2,64 (m)	C-16	42,3
13	33,8	1,81 (m)	C-9; 10; 12	32,3
14	25,7	1,72 (m)	C-8; 9; 16	25,6
15	28,0	1,43 (m)	C-9; 10; 12; 14	27,6
16	74,5	-		75,6
18	67,6	3,67 (d, J= 10)	C-2; 3; 4; 5; 19	68,7
17	67,9	3,47 (d, J= 10) 3,37 (t, J=10)	C-12; 16	72,1
19	17,2	1,00 (s)	C-4; 5; 18	17,9
20	14,9	1,17 (s)	C-2; 5; 9; 10	15,6



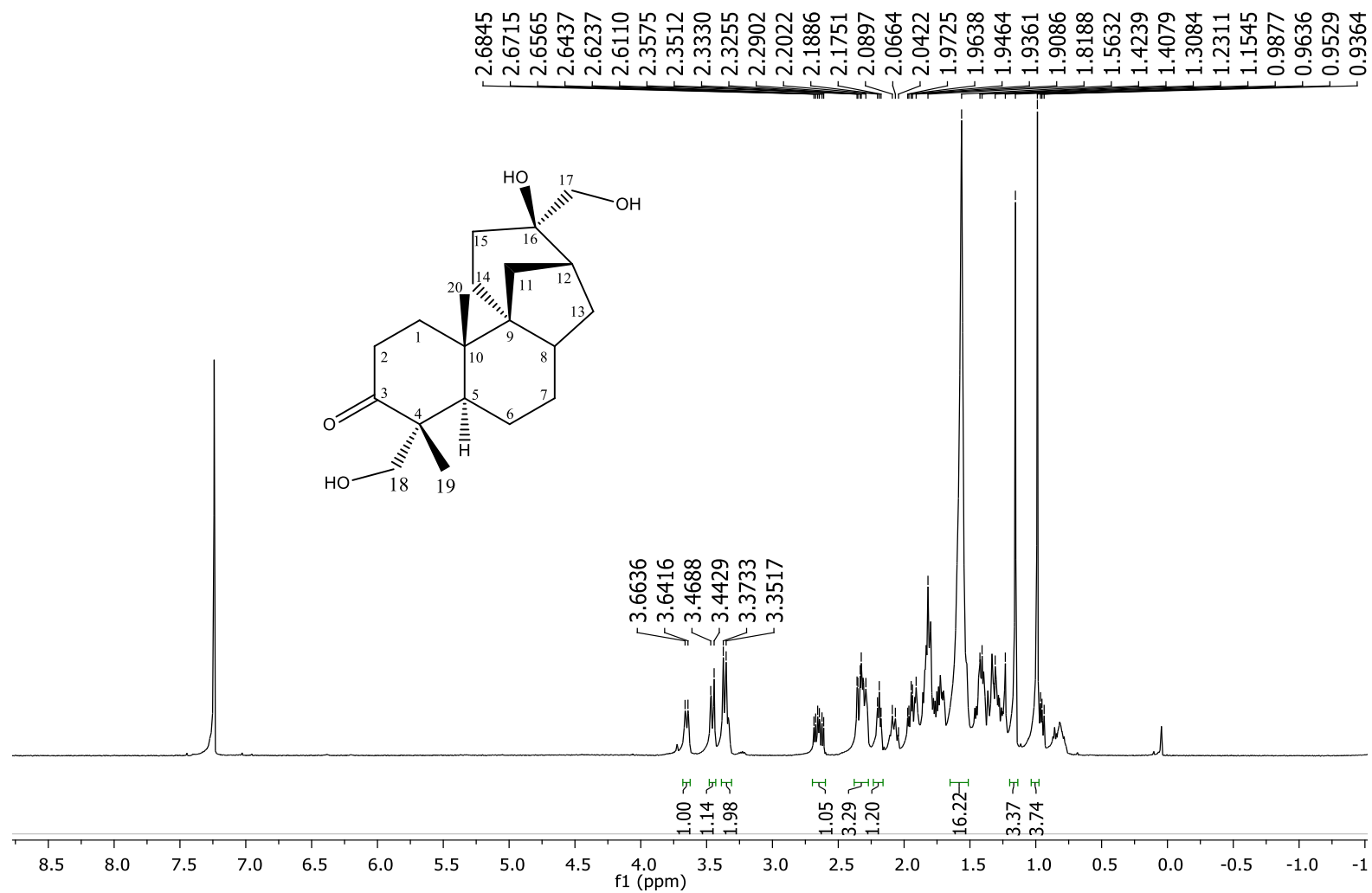


Figura 40. Espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) da substância 1

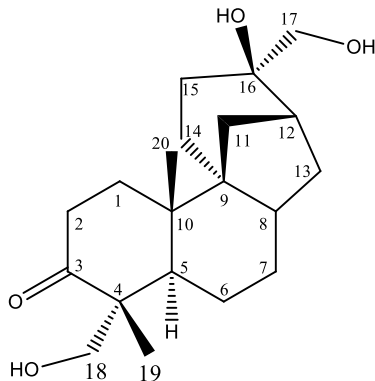


Figura 41. Expansão do espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) da substância 1 (0,7-3,7 ppm)

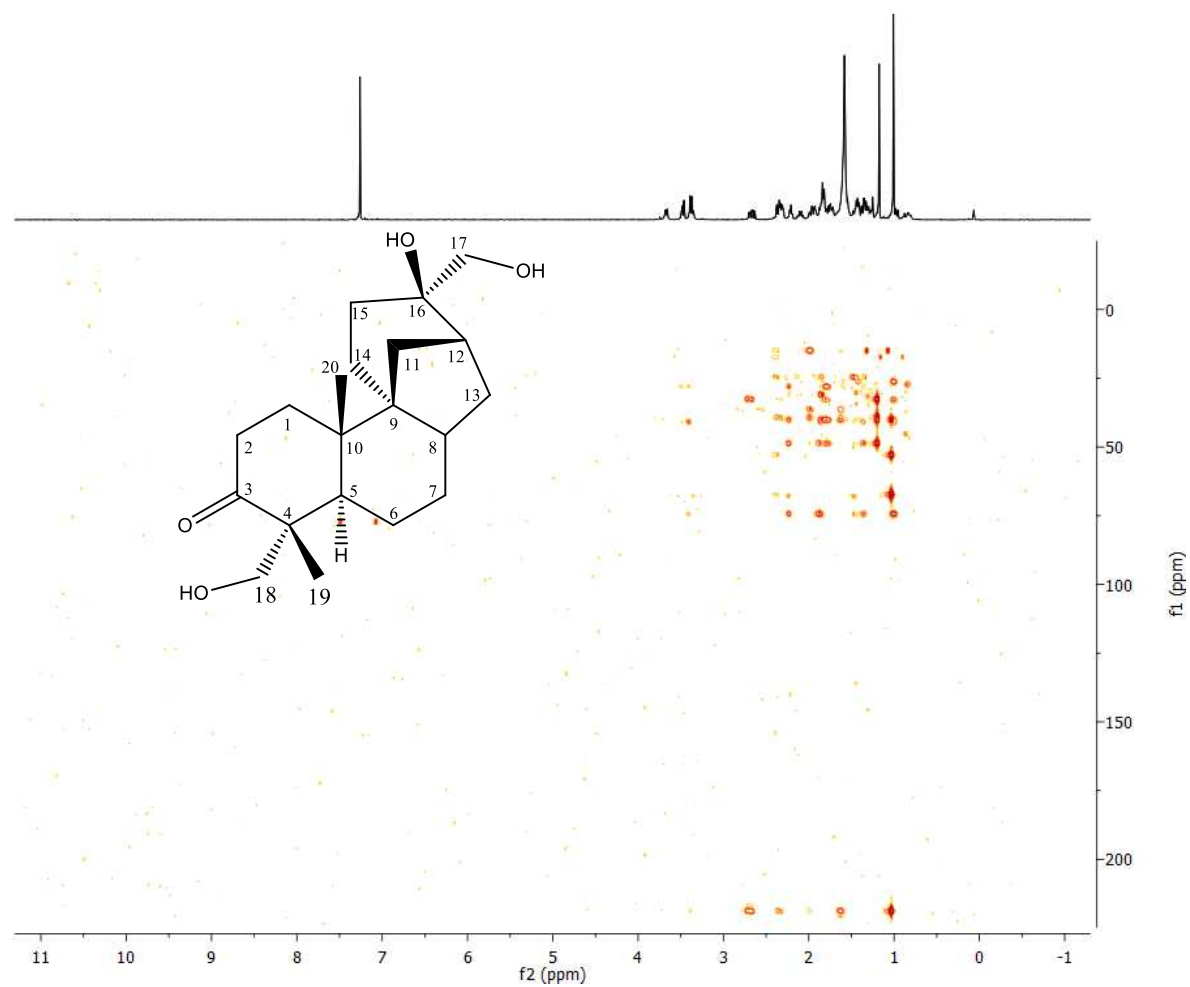


Figura 42. Mapa de contorno de HMBC (500 MHz/125 MHz, CDCl₃) da substância 1

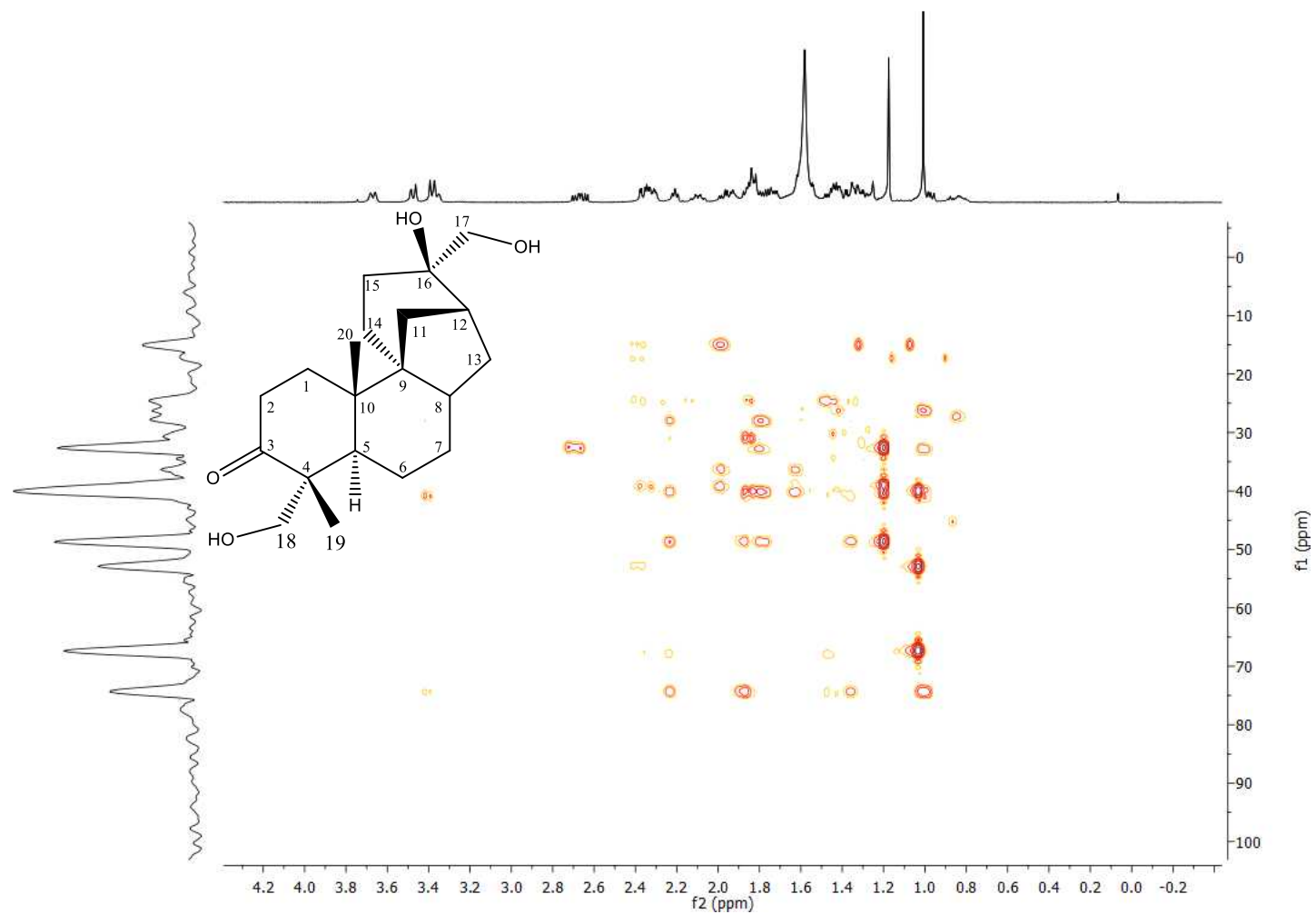


Figura 43. Expansão de HMBC (500 MHz/125 MHz, CDCl₃) da substância 1 (0-4,2)

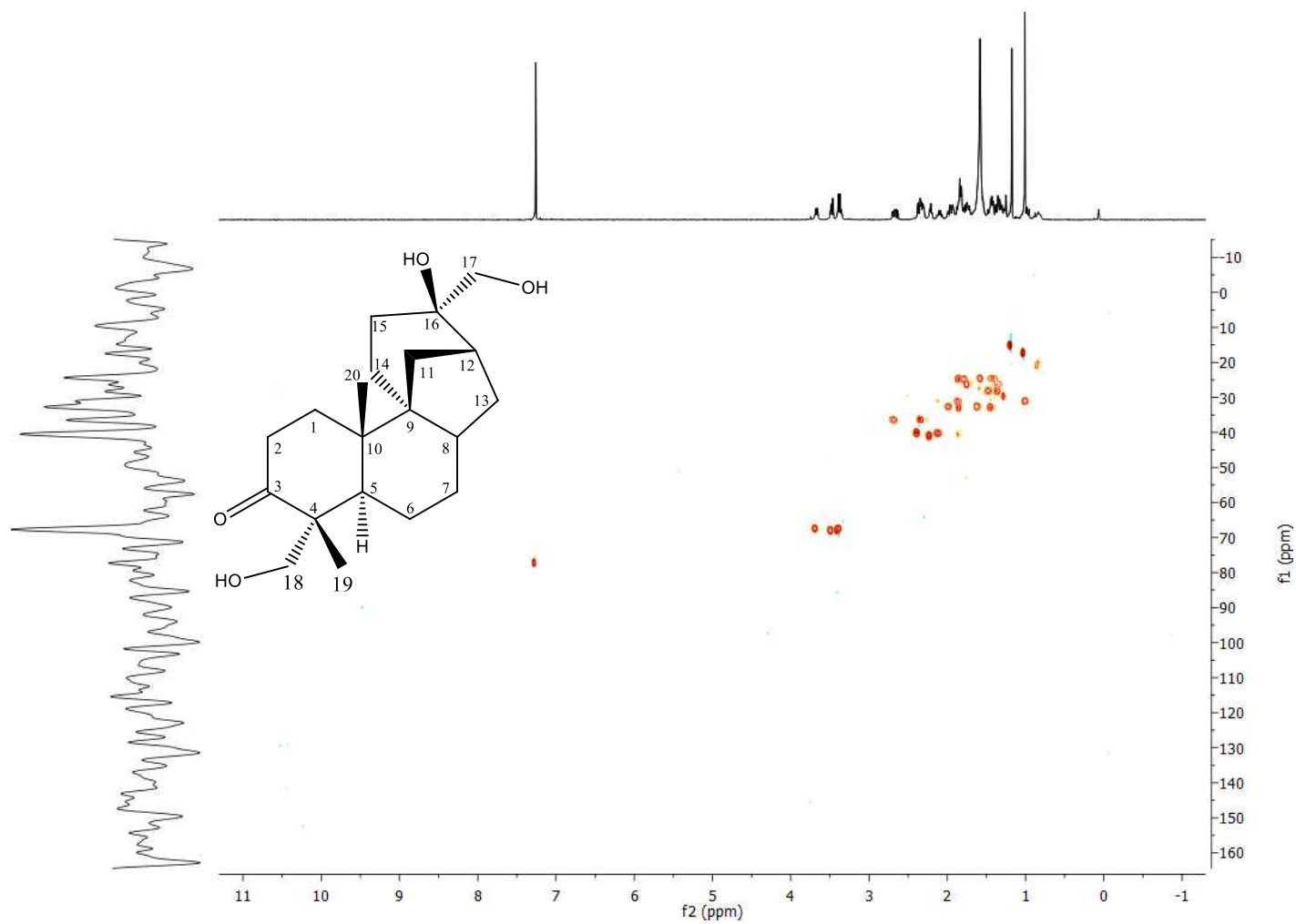


Figura 44. Mapa de contorno de HMBC (500 MHz/125 MHz, CDCl_3) da substância 1

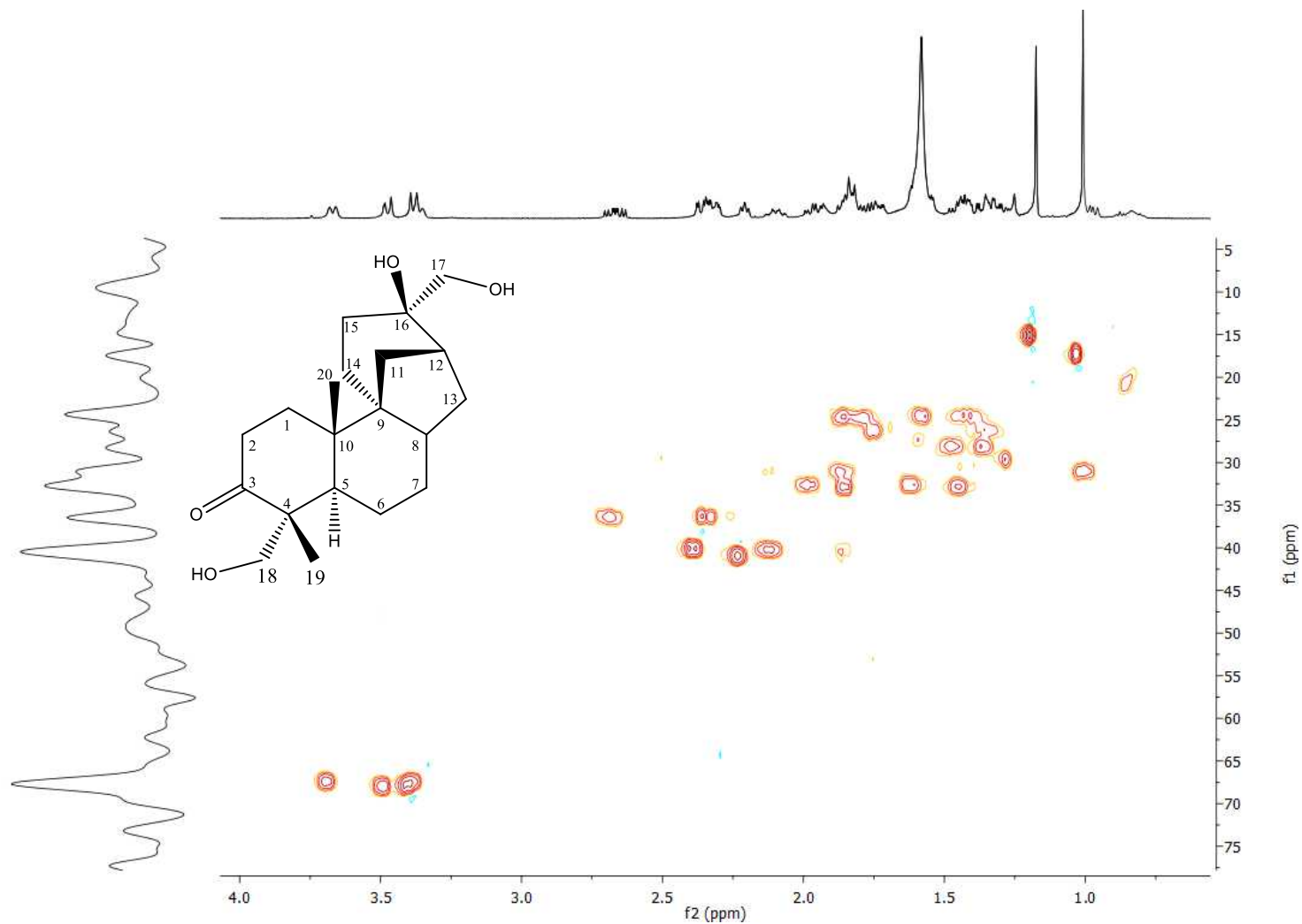


Figura 45. Expansão de HMQC (500 MHz/125 MHz, CDCl₃) da substância 1 (5-75/0-4,0)

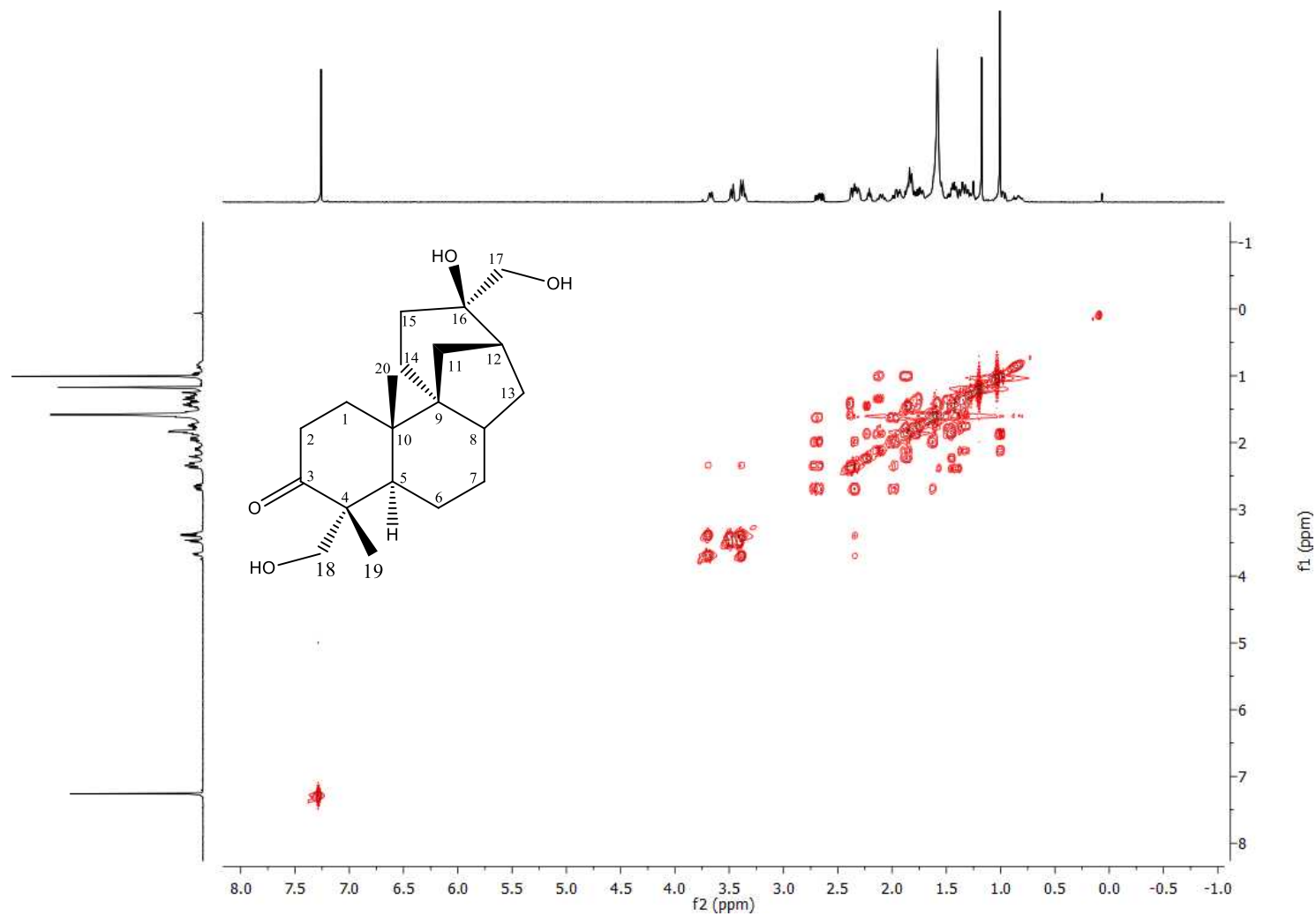


Figura 46. Espectro de COSY (500 MHz/125 MHz, CDCl₃) da substância 1.

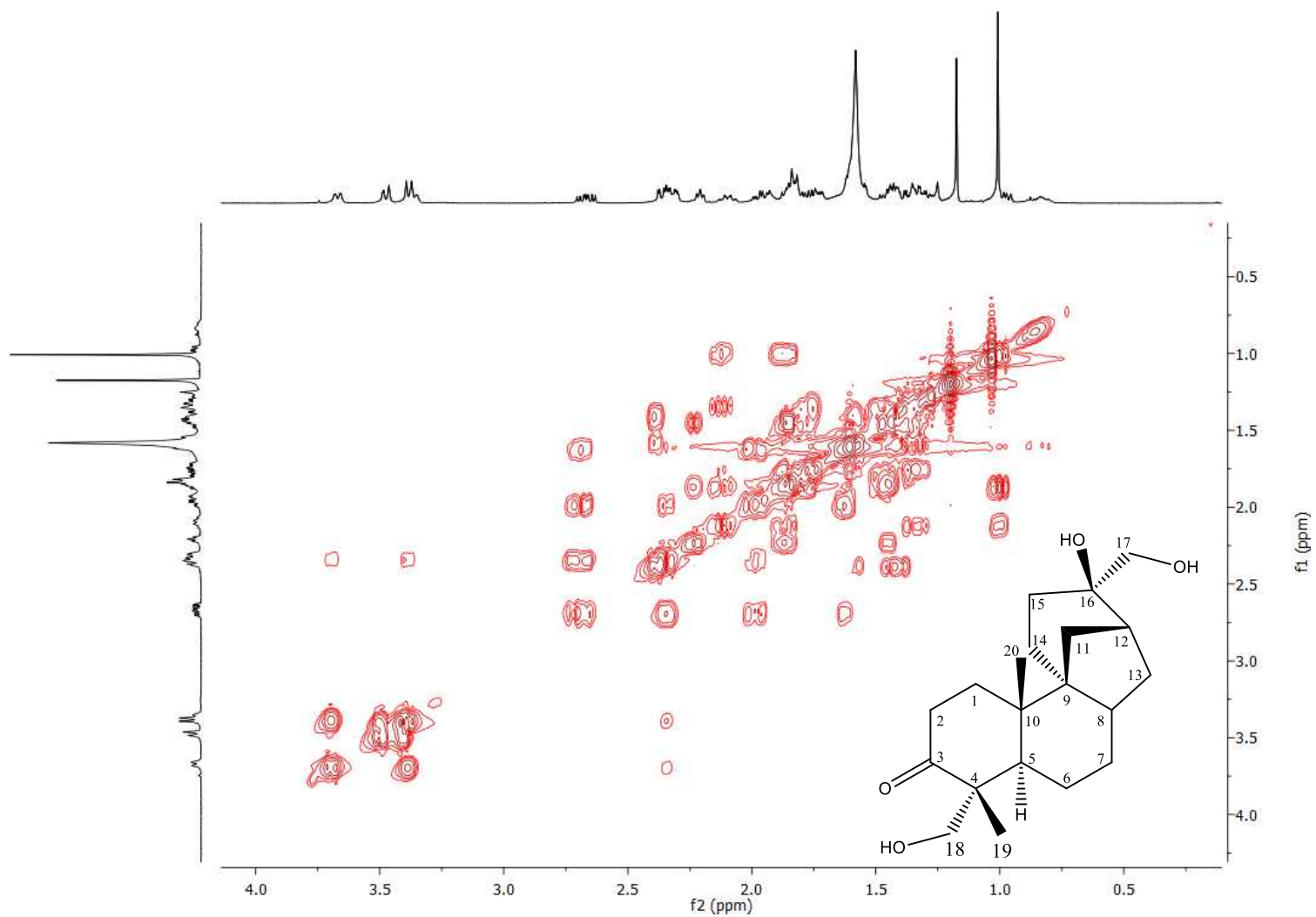


Figura 47. Expansão do espectro de COSY (500 MHz MHz, CDCl_3) da substância 1 (0-4,0).

Os estudos de biotransformação da afidicolina e correlação das modificações com propriedades biológicas podem ser considerados pouco explorados. Em 1982, Ipsen e colaboradores realizaram experimentos de transformação microbiológica da afidicolina, catalisada por fungos e actinobactérias, no qual foram produzidos 6 derivados. Neste trabalho 220 linhagens foram testadas e 5 foram selecionadas para a escala preparativa por metabolizarem a substância de partida. A linhagem *Scopulariopsis constantini* UI 1860 produziu 2 produtos acetilados da afidicolina (um na posição C-3 e outro na posição C-18), a linhagem *Trichothecium roseum* UI 320 produziu o derivado de afidicolina ácido carboxílico na posição C-18, as linhagens *Streptomyces griseus* ATCC 13273 e *Chaetomium funiculum* UI 141 formaram o derivado da afidicolina oxidado em C-3 e a linhagem *C. funiculum* também formou o derivado da afidicolina β -OH em C-3 (3-epiafidicolina). A linhagem *Streptomyces punipalus* NRRL 3529 originou um C-6 hidróxiderivado. Todos os produtos foram testados e possuíram reduzida atividade antitumoral.

Em 1992, Gordon e colaboradores realizaram outros experimentos de oxidação catalítica da afidicolina e, após uma sequência de reações semi-sintéticas, foi obtido o derivado 19-norafidicolano-16 β -ol, o qual foi submetido a biotransformação com fungo *Cephalosporium aphidicola* produzindo o derivado 19-norafidicolina.

Neste trabalho, o fungo *Chaetomium globosum* UI 141 originou o mesmo 3-ceto análogo produzido pelo fungo do mesmo gênero *Chaetomium funiculum* UI 141 em estudos preliminares.

Neste trabalho, apenas 4 linhagens de fungos foram testadas na fermentação da afidicolina o que pode ser considerado pouco para um trabalho de biotransformação, considerando o trabalho prévio realizado por Ipsen e colaboradores.

5.2 Ácido *ent*-7 α -acetoxytraquiloban-18-oico (T-360)

O diterpeno traquilobano T-360 apresenta-se na forma de cristais brancos e sua pureza foi confirmada através de RMN de ^1H (figura 46, pág. 158).

O fracionamento do extrato bruto obtido da biotransformação do T-360 com o fungo *Mucor rouxii* deu origem a um derivado, codificado como substância 2. Os cronogramas resultantes desse fracionamento, realizado por CLAE-reciclante em escala preparativa, estão representados na figura 45 (pág. 155).

Na figura 45a observa-se o cronograma completo da purificação da substância 2, com tempo total de 925 minutos. As figuras 44b-d referem-se às ampliações desta. É possível observar no cronograma, que se distinguem duas substâncias marjoritárias, que vão graduaamente se separando à medida que aumentam as quantidades de ciclo no experimento. No 15^o ciclo (580 min), iniciou-se a retiarada de um dos picos marjoritários com a abertura da válvula de reciclo, e após 4 ciclos adicionais, esta substância foi completamente consumida. A outra substância foi coletada no tempo de 880 minutos. Após análise de ambas as frações por a RMN de ^1H , foi possível identificar que a fração consumida tratava-se do padrão e a outra, coletada no tempo de 880 minutos, ao análogo (substância 2).

A metodologia aplicada para o isolamento do análogo mostrou-se bastante eficiente, visto que partiu-se de uma quantidade de 100mg resultante da reunião de extatos complexos de biotransformação da pequena escala. Ademais, apesar do tempo de 10 horas, apenas 1L da fase móvel foi utilizado em todo o experimento, devido ao sistema reciclante.

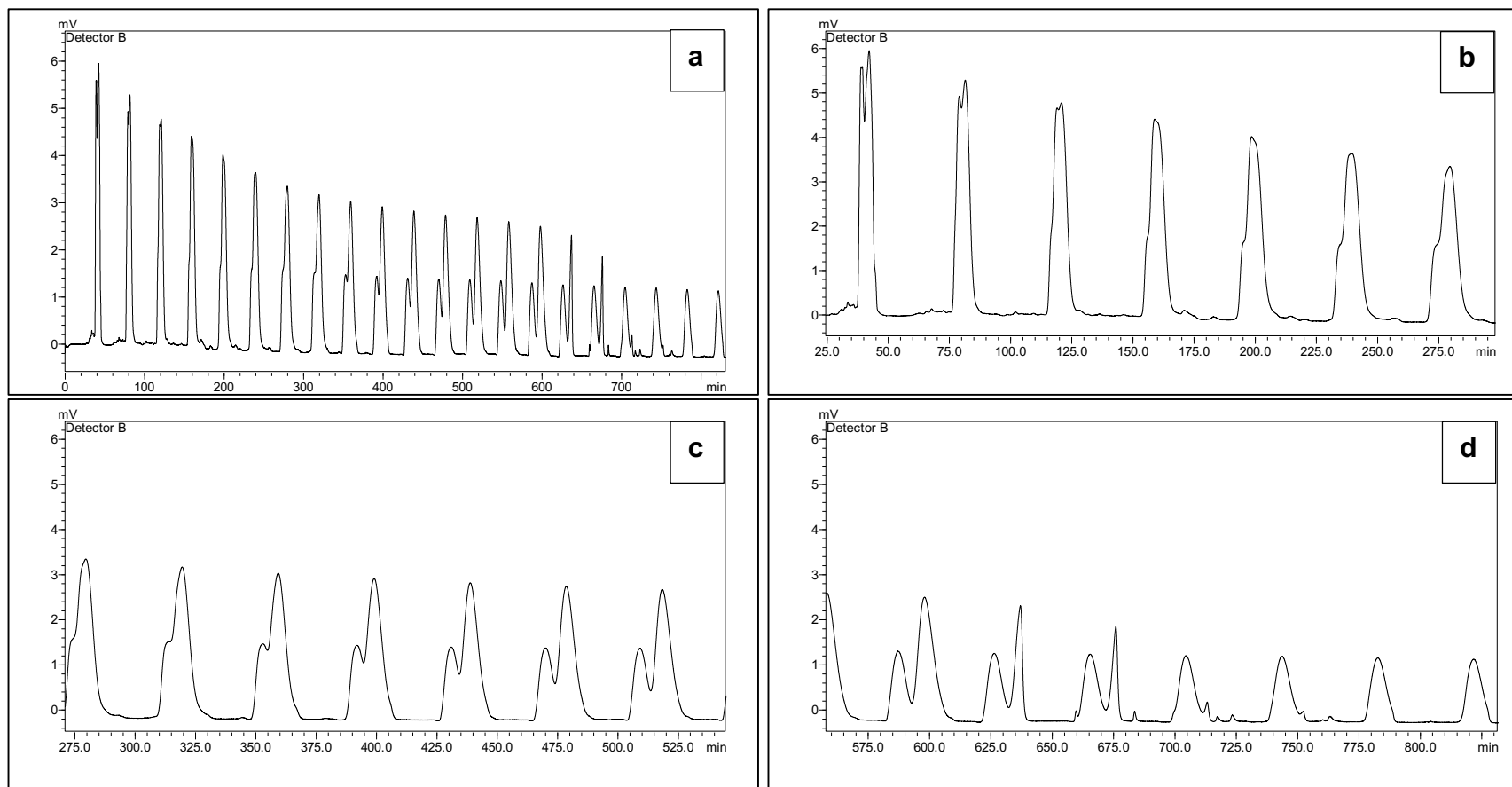


Figura 48. a) Cromatograma obtido em CLAE reciclante da purificação da fração proveniente da reunião dos extratos de biotransformação do T-360 com o fungo *M. rouxii* NRRL 1894; b) ampliação 1 (25-275 min); c) ampliação 2 (275-525 min); d) ampliação 3 (575- 925 min).

5.2.1 Identificação estrutural da substância de partida ácido *ent*-7 α -acetoxytraquiloban-18-oico (T-360)

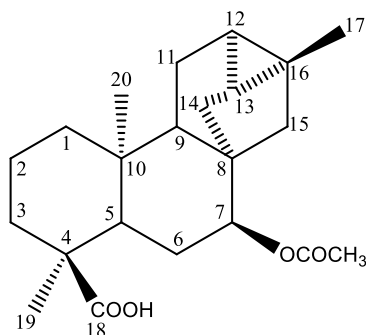
O espectro de RMN ^{13}C do T-360 (125 MHz, CDCl_3) (figura. 47, pág. 159) apresenta 20 sinais, correspondentes a 22 átomos de carbono. Destes, seis atribuídos a carbonos não hidrogenados, cinco a carbonos metínicos, sete a carbonos metilênicos e quatro a carbonos metílicos. Os sinais em δC 20,7; 24,2 e 23,3 ppm, típico de anel ciclopropano, caracterizam o esqueleto diterpênico do tipo traquilobano. A presença do sinal em δC 171,4 ppm, atribuído a grupo OCOCH_3 , confirma-se pelo sinal desblindado observado no espectro de RMN de ^1H (figura 46, pág. 158) em δH 2,06 ppm, típico de CH_3 pertencente a este grupo. O efeito de desproteção sofrido por C-6 (δC 27,8 ppm), juntamente com levantamento bibliográfico (TAVARES, 2006), imputa a inserção deste grupo OCOCH_3 em C-7 (δC 78,9 ppm). Sinais em δC 20,7, 16,4 e 15,2 ppm são atribuídos a presença de três metilas no esqueleto da molécula, CH_3 -17, 19 e 20, respectivamente, e o deslocamento em δC 185,1 ppm caracteriza a presença de carbonila de ácido na molécula, a qual está inserida no carbono C-4, fato verificado através da desproteção sofrida por esse carbono não hidrogenado, o qual absorve em δC 46,9 ppm.

O espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3), apresenta um envelope de sinais na região de δH 0,85 a 2,13 ppm com multiplicidades resolvidas e não resolvidas, no qual observa-se a presença de 4 singletos em δH 2,06; 1,18; 1,15 e 1,01 ppm, atribuídos a OCOCH_3 , CH_3 -17, CH_3 -19 e CH_3 -20, respectivamente.

As correlações observadas nos espectros de HMBC, HMQC, COSY e NOESY para o ácido *ent*-7 α -acetoxytraquiloban-18-oico estão referenciadas por Tavares (2006), e os dados experimentais dos espectros estão elencados na tabela 7 (pág. 157).

Tabela 7. Dados de RMN ^1H (500 MHz), ^{13}C (125 MHz), HMQC, HMBC e COSY, obtidos em CDCl_3 referentes a substância de partida ácido *ent*-7 α -acetoxytraquiloban-18-oico (T-360).

Posição átomo	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$ (multiplicidade, J em Hz)	COSY	HMBC ($^1\text{H} \rightarrow ^{13}\text{C}$)
1	38,6	0,90 (m), 1,55 (m)	H-1	
2	17,6	1,45 (m), 1,55 (m)		
3	37,2	1,65 (m), 1,70 (m)		C5; 18
4	46,9	-		
5	42,8	2,18 (d, J = 4,5)	H-6	C-7; 18; 20
6	27,8	1,40 (m), 1,60 (m)	H-7, H-5	C-5
7	78,9	4,65 (tl, J = 4,0)	H-6	C-5; 6; 14
8	44,5	-		
9	48,9	1,60 (m)		C-7; 14; 20
10	37,9	-		
11	19,5	1,70 (m), 1,90 (m)		
12	20,7	0,64 (m)	H-13	C-17
13	24,2	0,90 (m)	H-12	C-15; 17
14	32,8	1,45 (d, J = 4,8), 1,95 (m)	H-14	C-7
15	45,5	1,35 (m), 1,55 (m)		C-7; 14
16	23,3	-		
17	20,7	1,18 (s)		C-12; 13
18	185,1	-		
19	16,4	1,15 (s)		C-5
20	15,2	1,01 (s)		C-5
COMe	171,4	-		
COMe	21,6	2,06 (s)		



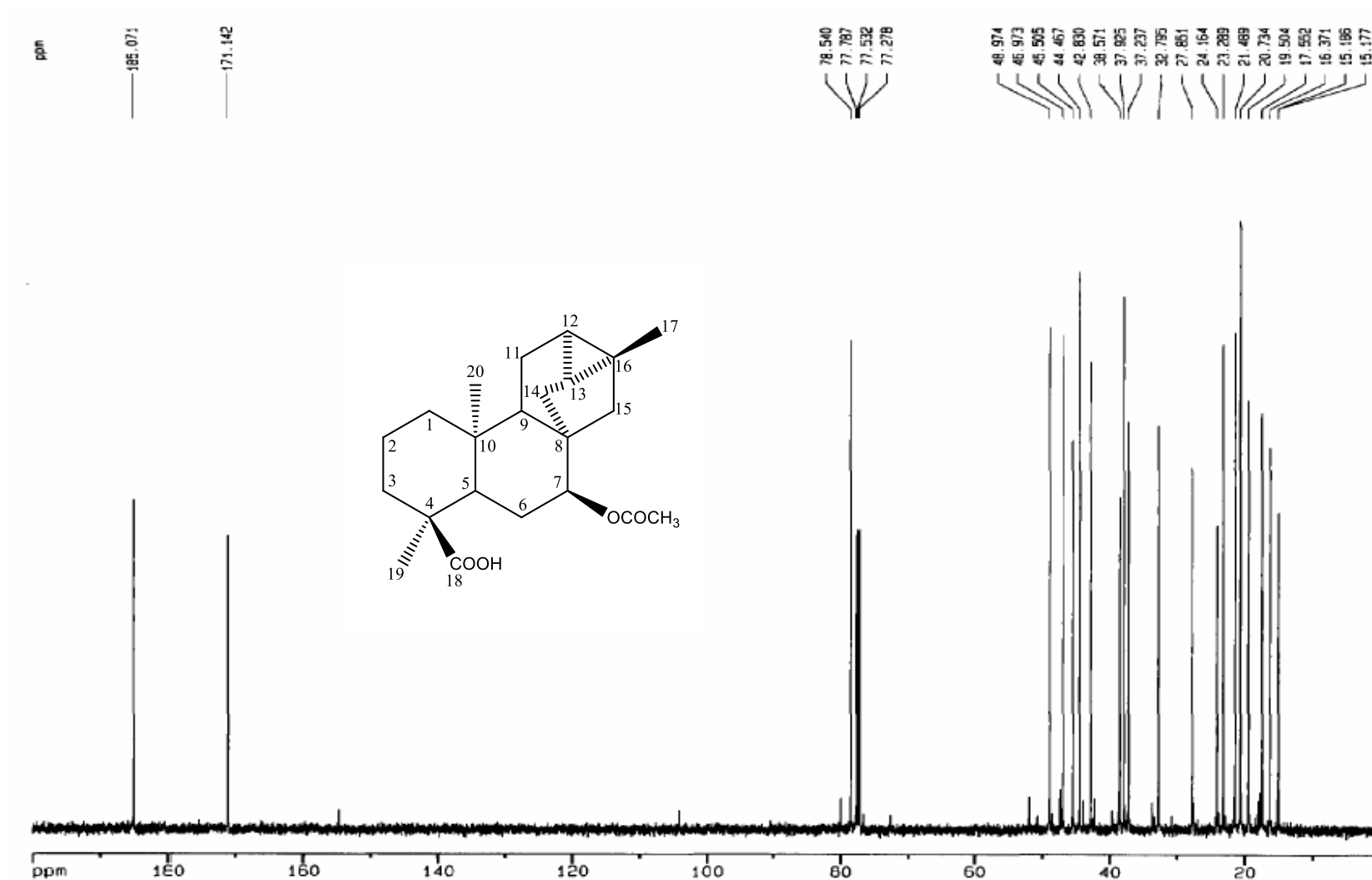


Figura 49. Espectro de RMN ^{13}C BB (125 MHz, CDCl_3) do ácido *ent*-7 α -acetoxitraquiloban-18-oico (T-360)

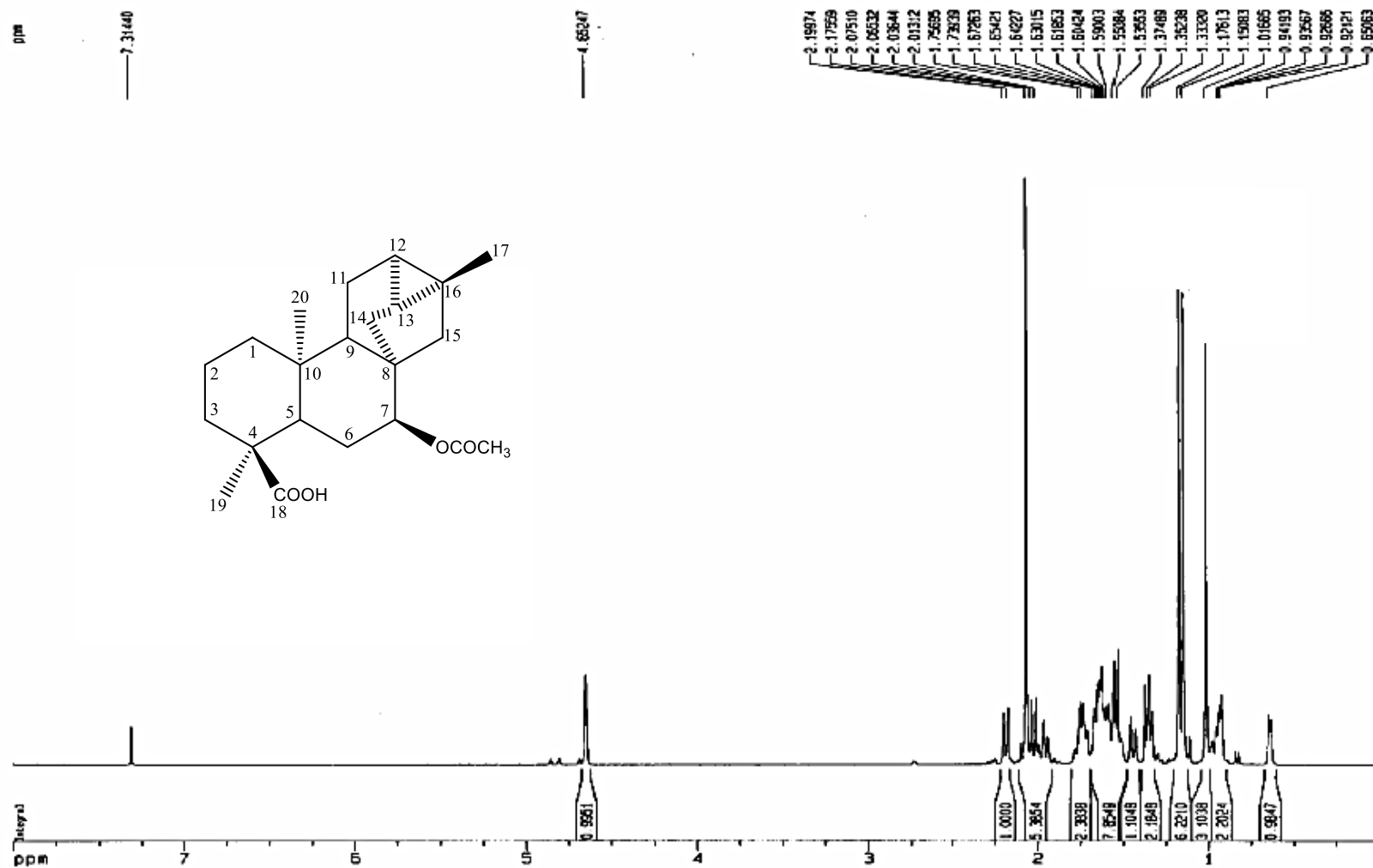


Figura 50. Espectro de RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃) do ácido *ent*-7α-acetoxitraquiloban-18-oico (T-360)

5.2.3 Identificação estrutural do produto de biotransformação do T-360 com o fungo *Mucor rouxii* NRRL 1894 – SUBSTÂNCIA 2

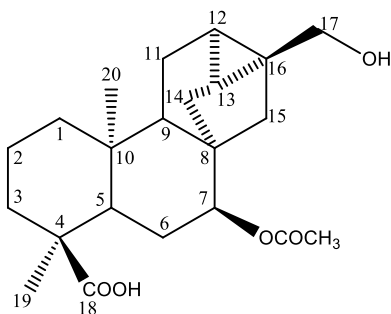
Os espectros de RMN de ^1H (500 MHz, CD_3OD) (figura 48, pág. 162) e de RMN de ^{13}C (125 MHz, CD_3OD) (figura 50, pág. 164) da substância 2 apresentam-se semelhantes aos espectros do seu respectivo padrão, o qual foi previamente descrito. Foi possível observar no espectro de RMN de ^{13}C os sinais do ciclopropano em δC 18,7, 18,3 e 29,7, referentes aos carbonos C-12, 13 e 16, respectivamente, caracterizando a preservação deste anel no esqueleto do análogo. O deslocamento em δC 171,4 caracteriza a manutenção do grupo OCOCH_3 e o sinal desprotegido em δC 78,4 atesta a ligação deste grupo ao carbono C-7, assim como no padrão. O conjunto de sinais em δC 185,1 (C-18) e 46,3 ppm (C-4) atestam a manutenção da carbonila de ácido na molécula, bem como a sua inserção no carbono C-4.

A partir da análise do espectro de RMN de ^1H foi possível observar a ausência do sinal em δH 1,18 ppm, referente à metila 17 na substância de partida, bem como o aparecimento de um sinal mais desprotegido em δH 3,52 ppm (dd, $J = 15,0, 10,0, 2\text{H}$), característico de hidrogênico oximetilênico, sugerindo a inserção de uma hidroxila no esqueleto do análogo, a qual foi corroborada pelo aparecimento do deslocamento em δC 65,9 ppm, característico de carbono ligado a elemento eletronegativo. Estes sinais em δH 3,52 e δC 65,9 ppm apresentaram correlação direta no espectro de HMQC (figura 54, pág. 168), atestando a inserção de um grupo OH no carbono C-17, a qual foi confirmada pelas correlações observadas no espectro de HMBC (figura 52, pág. 166) desde sinal em 3,52 ppm com os átomos de carbono nas posições 11 (δC 19,5 ppm), 15 (δC 41,9 ppm) e 16 (δC 30,9 ppm). Dessa forma, foi possível concluir que a substância 2 trata-se do ácido *ent-7 α -acetoxitraquiloban-17-hidroxi-18-oico*.

Os dados experimentais dos espectros de RMN deste composto encontram-se na tabela 8 (pág 161).

Tabela 8. Dados de RMN de ^1H (500 MHz), ^{13}C (125 MHz), HMQC, HMBC e COSY, obtidos em CD_3OD referentes a substância 2.

Posição átomo	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$ (multiplicidade, J em Hz)	COSY	HMBC ($^1\text{H} \rightarrow ^{13}\text{C}$)	$\delta^{13}\text{C}$ (partida)
1	39,6	0,92 (m), 1,57 (m)	H-1; 2		38,6
2	18,3	1,50 (m)	H-1		17,6
3	38,8	1,57 (m)	H-19		37,2
4	48,8	-			46,9
5	43,8	2,20 (d, $J = 10$)	H-6	C-4; 7; 19; 20	42,8
6	28,3	1,40 (m), 1,63 (d, $J = 15$)	H-5; 7	C-5	27,8
7	79,8	4,57 (t, $J = 4$)	H-6		78,9
8	45,1	-			44,5
9	50,0	1,65 (m)	H-11	C-14; 20	48,9
10	38,1	-			37,9
11	19,5		H-9; 12		19,5
12	20,0		H-11; 13		20,7
13	22,7	1,12 (s)	H-12		24,2
14	33,0	1,29 (m), 2,08 (d, $J = 15$)	H-17		32,8
15	41,9	1,45 (d, $J = 15$), 1,67 (m)		C-7; 14	45,5
16	30,9	-			23,3
17	67,4	3,58 (dd, $J = 10, 15$)	H-13; 14	C-11; 15; 16	20,7
18	183,4	-			185,1
19	16,9	1,12 (s)	H-3	C-3; 4; 5; 18	16,4
20	15,3	1,04 (s)		C-1; 5; 9	15,2
COMe	171,4	-			171,4
COMe	21,2	2,04 (s)		COMe	21,6



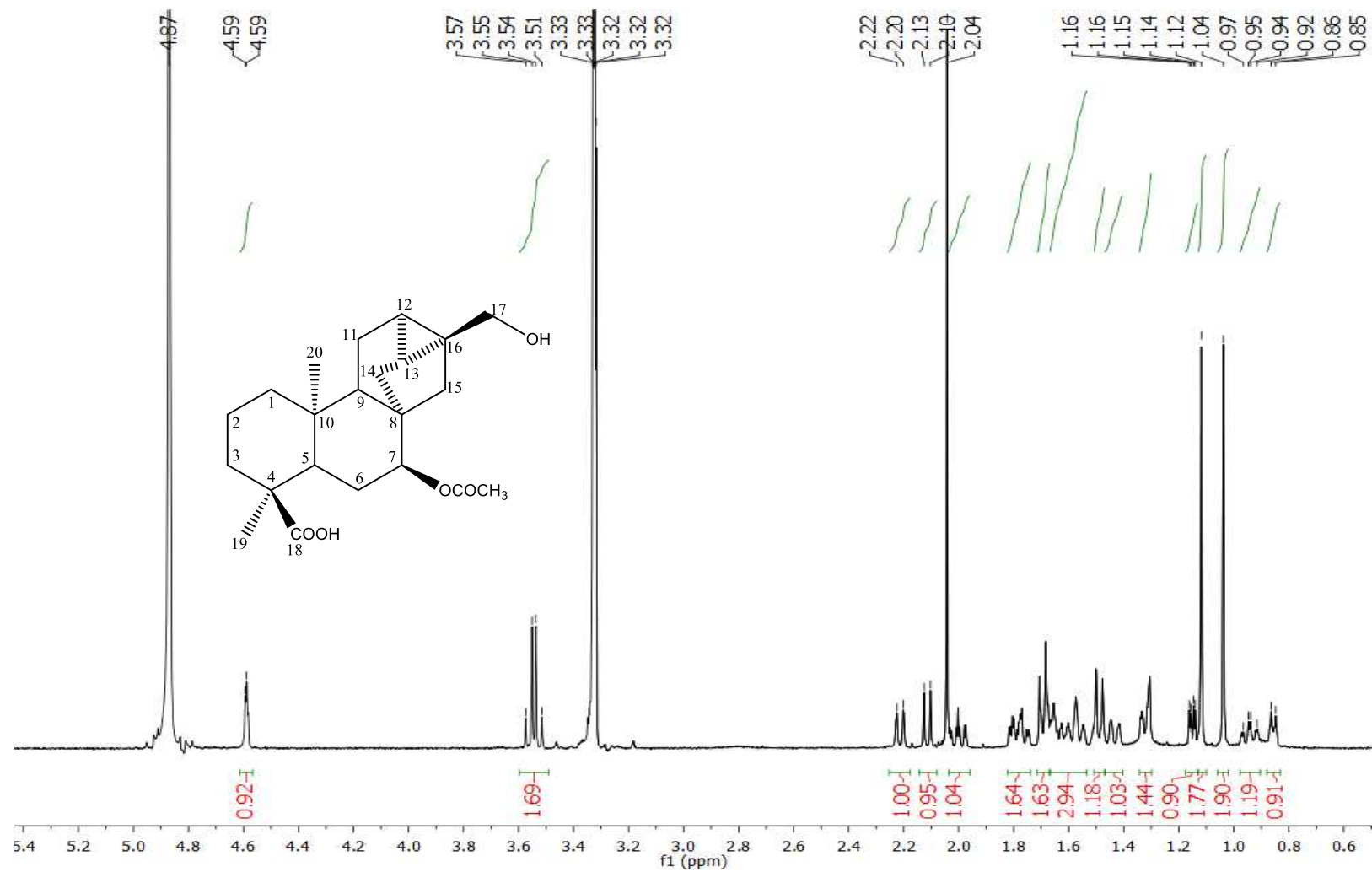


Figura 51. Espectro de ^1H RMN (500 MHz, CD_3OD) da substância 2.

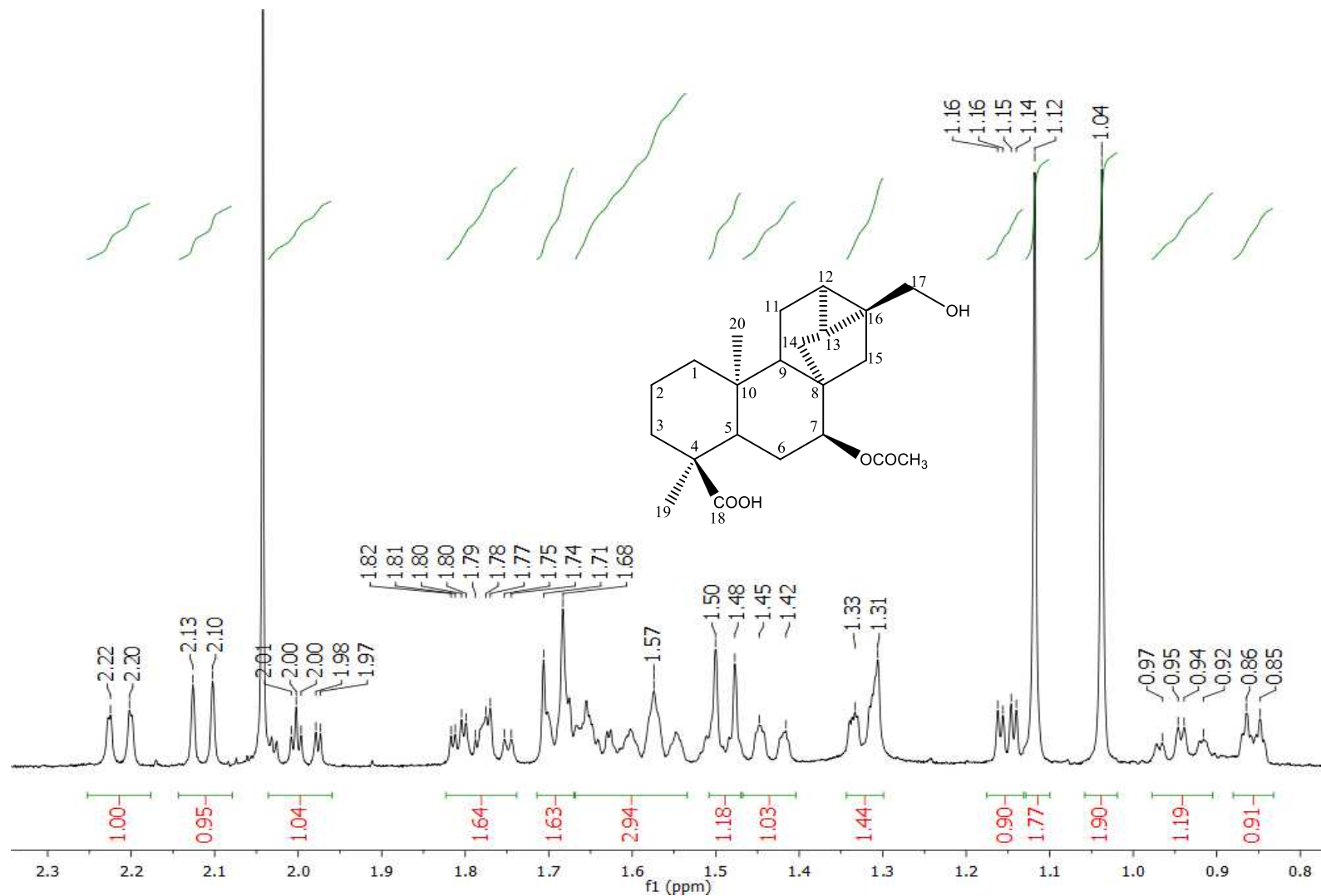


Figura 52. Expansão do espectro de ^1H RMN (500 MHz, CD_3OD) da substância 2 (0.8-2.2 ppm).

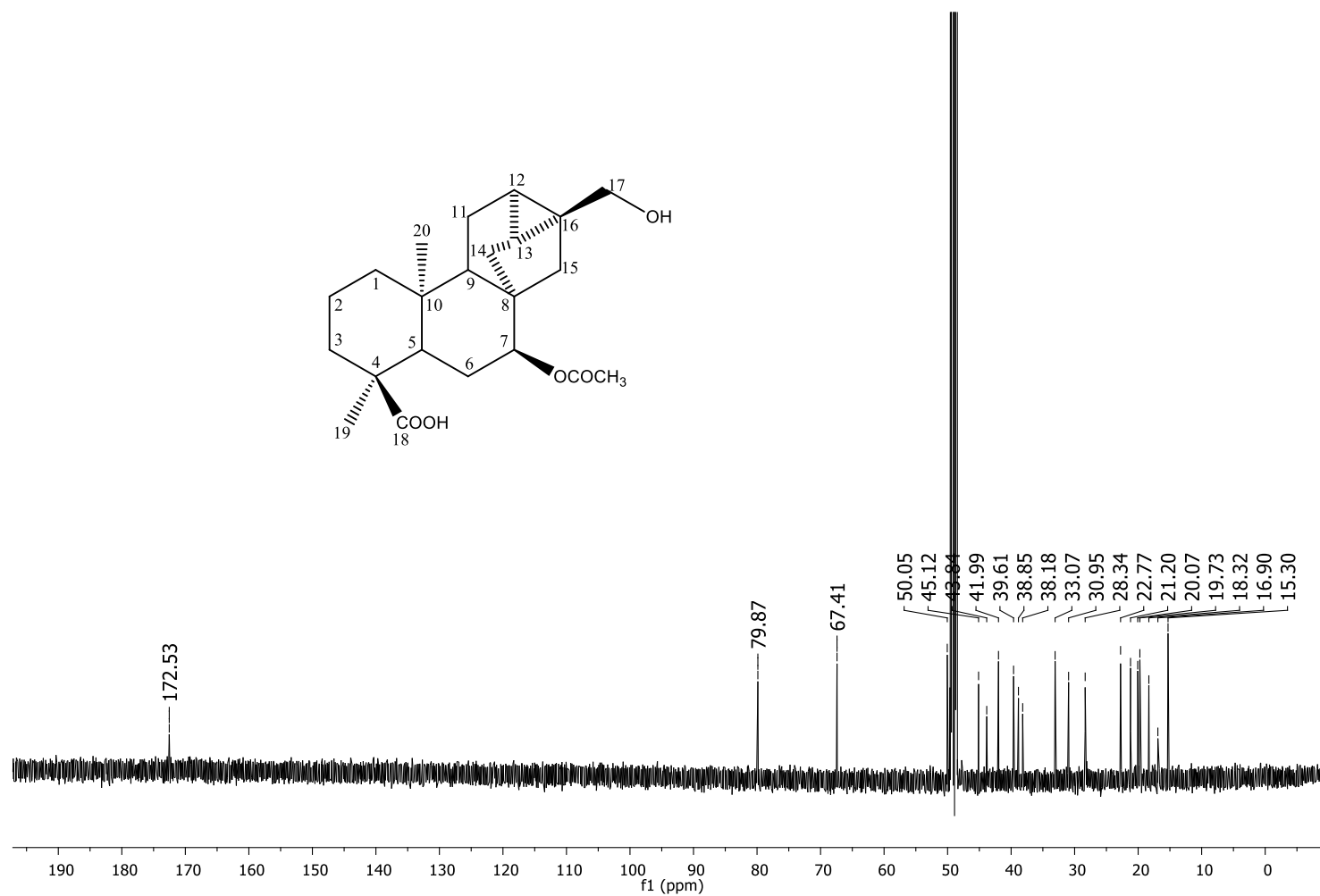


Figura 53. Espectro de ¹³C RMN (125 MHz, CD₃OD) da substância 2

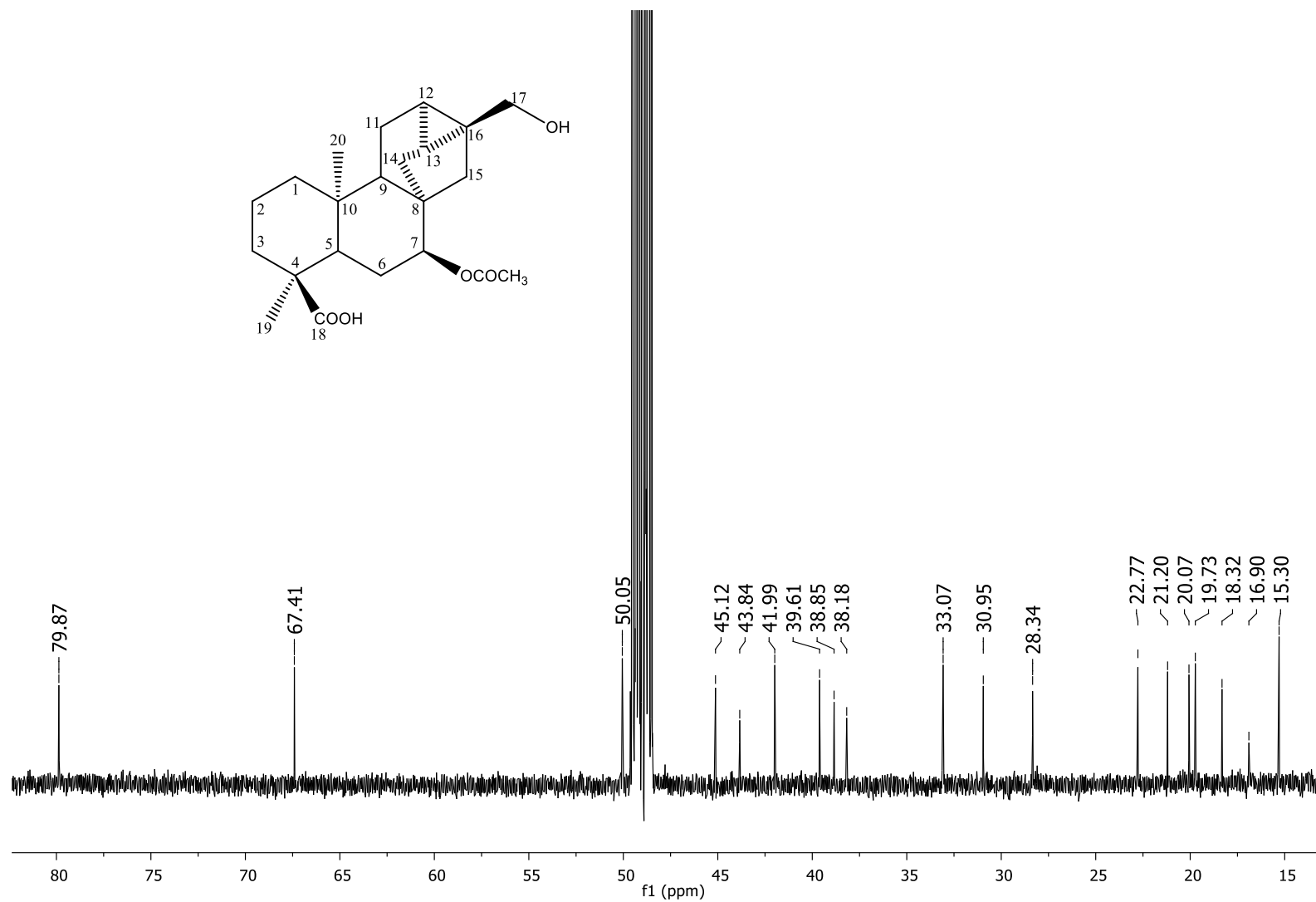


Figura 54. Expansão do espectro de ¹³C RMN (125 MHz, CD₃OD) da substância 2 (15.0-80.0 ppm)

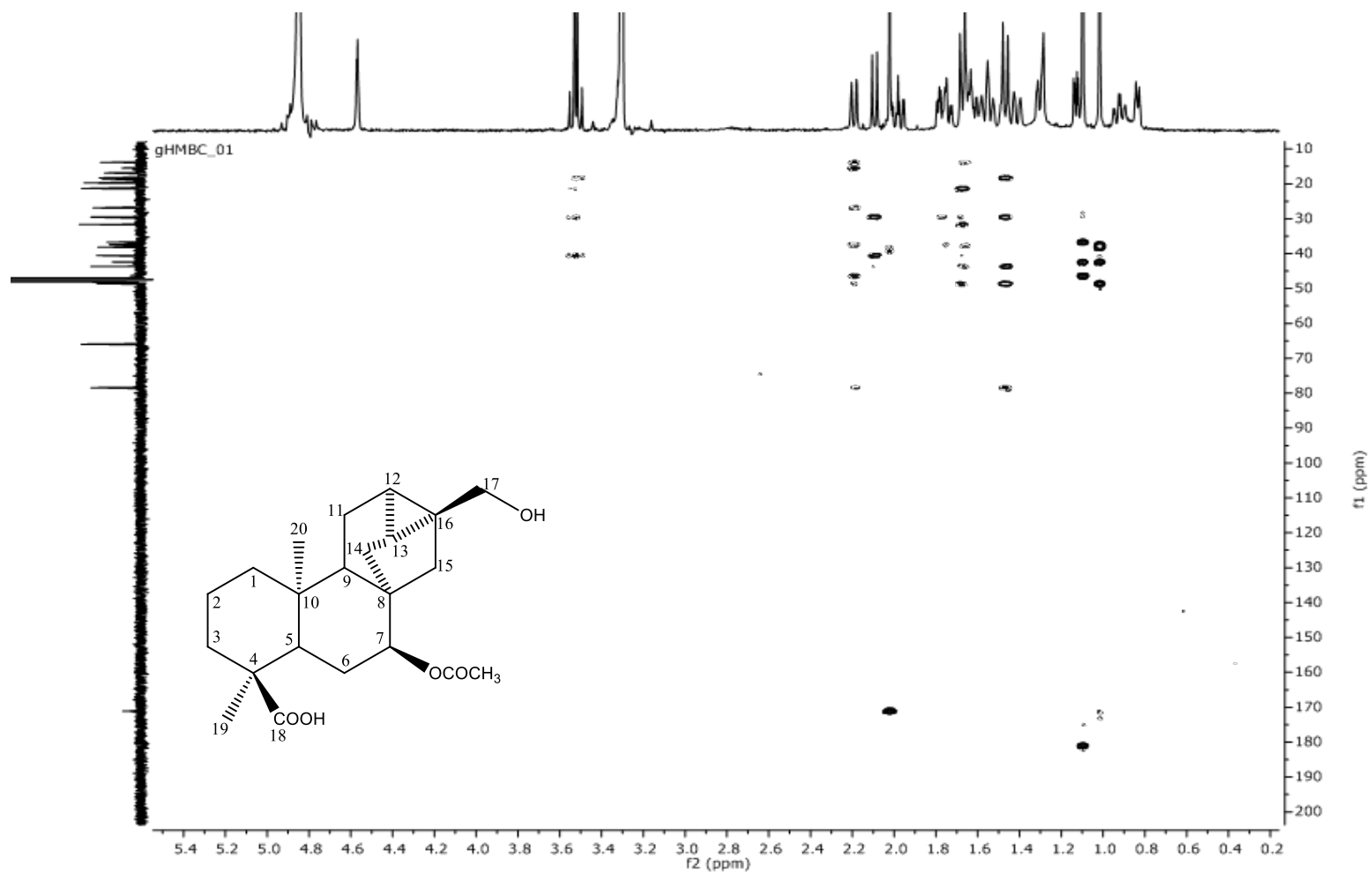


Figura 55. Mapa de contorno de HMBC (500 MHz/ 125 MHz, CD_3OD) da substância 2

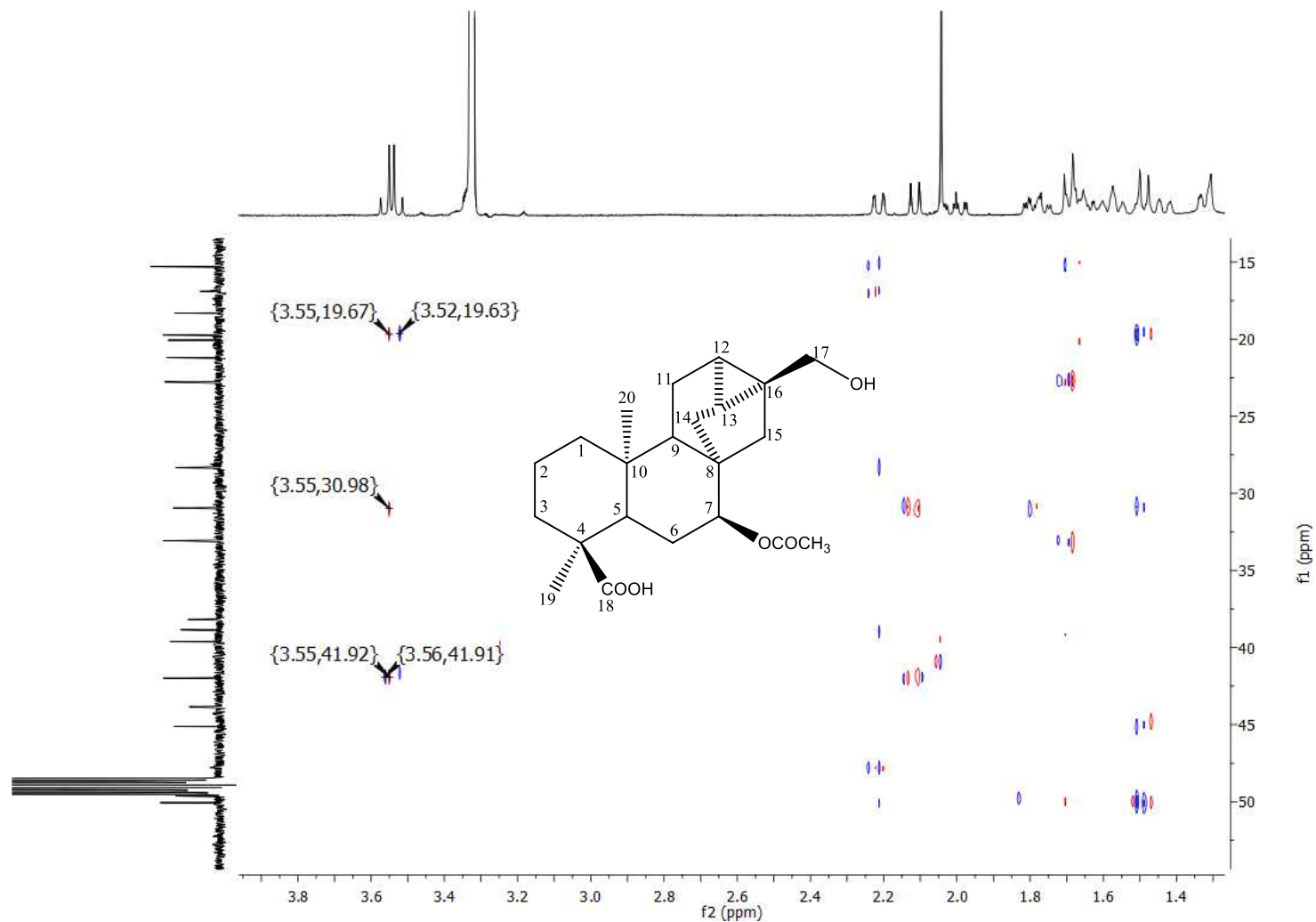


Figura 56. Expansão de HMBC (500 MHz/125 MHz, CD_3OD) da substância 2 (15-60/1,4-3,8 ppm).

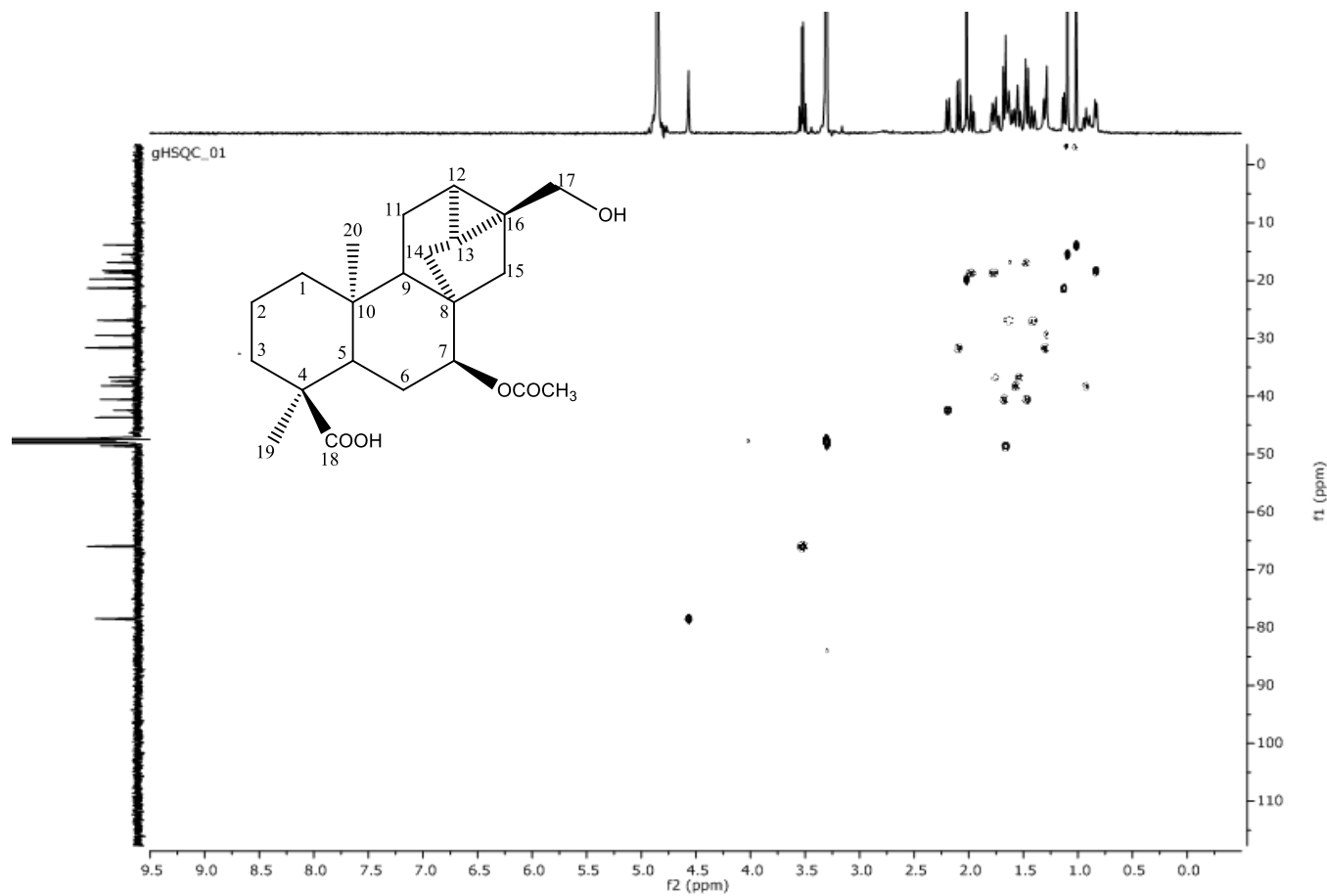


Figura 57. Mapa de contorno de HMBC (500 MHz, CD₃OD) da substância 2

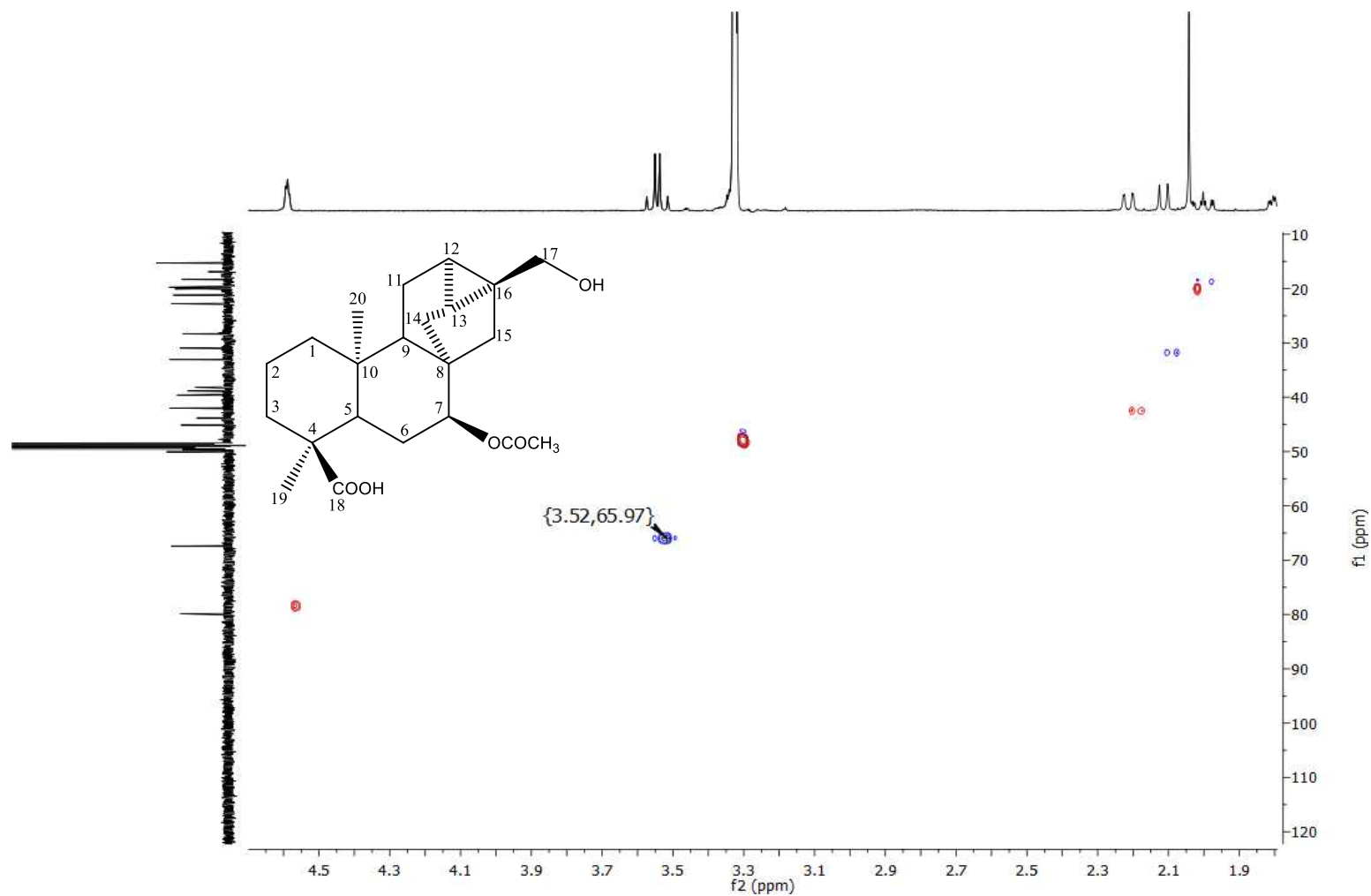


Figura 58. Expansão de HMQC (500 MHz/ 125 MHz, CD_3OD) da substância 2 (1,9-5,0/ 10-120 ppm).

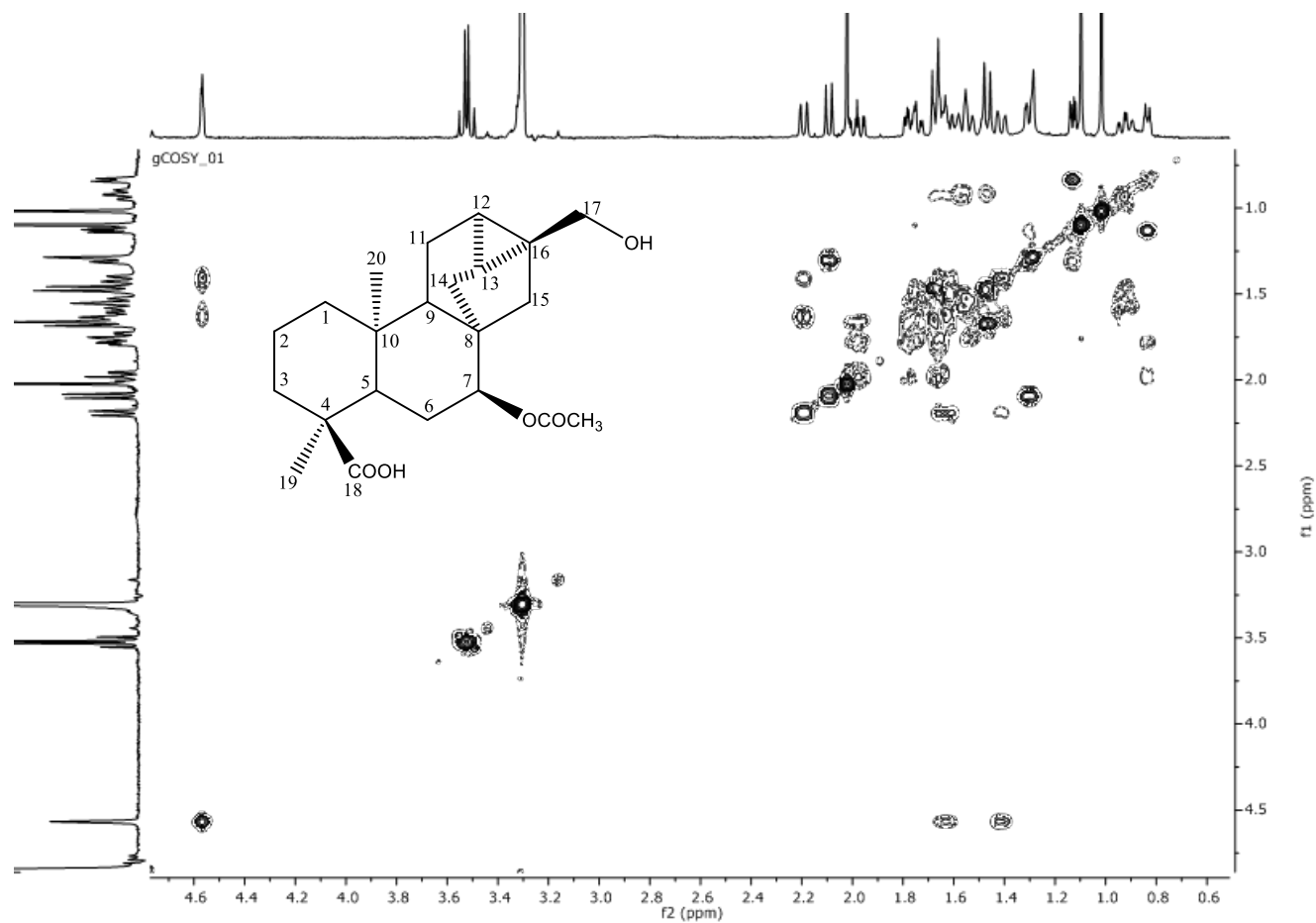


Figura 59. Espectro de correlação COSY (500 MHz, CD₃OD) da substância 2 (0.9-2.3ppm).

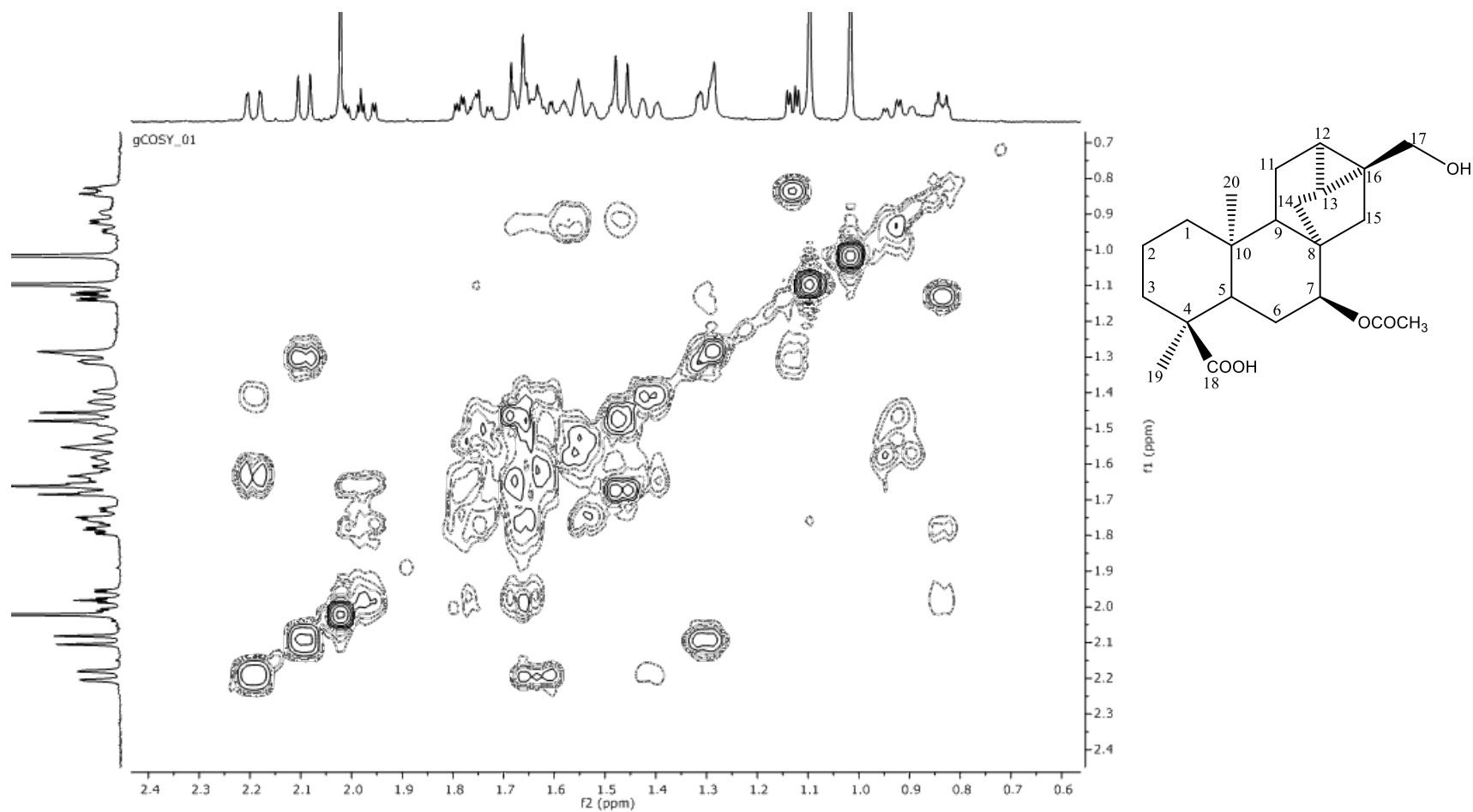


Figura 60. Expansão do espectro de correlação COSY (500 MHz, CD₃OD) da substância 2 (0.6-2.4ppm)

Experimentos de biotransformação do ácido traquilobano-19-oico fungo *Rhizopus stolonifer*, renderam dois compostos traquilobanos, hidroxilados em C-7 β e rearranjados do tipo *ent*-cauran-11-en-19-oico, hidroxilados em C-16 α **(255)** e C-9 β /C-16 α C-17 e

Em 2010, utilizando o fungo *Rhizopus arrhizus*, Leverrier e colaboradores obtiveram seis compostos oxidados a partir da biotransformação do ácido *ent*-traquiloban-18-oico **(257)**. Os compostos **(258, 2,8%)** e **(259, 3,7%)** resultaram de hidroxilação enzimática direta de **(257)** nas posições C-1 α e C-17, nessa ordem. Três derivados foram gerados a partir de rearranjo pós-clivagem do anel ciclopropano, com posteriores hidroxilações nos carbonos C-16 **(260, 4,2%)**, C-1 α **(261, 9,6%)** e C-16 com inserção de uma metoxila adicional α orientada no carbono C-17 α **(262, 1,8%)**, respectivamente. O composto **(263, 1%)** foi produzido por rearranjo do esqueleto carbônico triciclo [3.2.1.0] octano, com mudança do anel ciclopropano para os carbonos C-11, C-12 e C-13. Todos os produtos foram descritos como novos na literatura

O trabalho mais recente envolvendo biotransformação de traquilobanos foi publicado por Fraga e colaboradores (2012), no qual utilizaram o fungo *Gibberella fujikuroi* na degradação do Traquinol acetato **(264)**. O experimento originou apenas um monohidroxiderivado no carbono C-19 **(265, 1,3%)**

5.3 (2S*,3S*,4R*,5R*,9S*,11R*,15R*) -3,5,15- triacetoxi- 14-oxolatira-6(17),(12E)-dieno (EBOE-12)

O diterpeno latirano EBOE-12 apresenta-se na forma de óleo amarelo e sua pureza foi confirmada através de RMN de ^1H (figura 57, pág. 171).

5.3.1 Identificação estrutural da substância de partida (2S*,3S*,4R*,5R*,9S*,11R*, 15R*) -3,5,15- triacetoxi-14- oxolatira-6(17), (12E)-dieno (EBOE-12)

O espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) (figura 58, pág. 176) de EBOE-12 apresenta três singletos referentes a três grupos acetato (δH 1,97, 2,03 e 2,08), duas metilas ligadas a carbonos terciários (δH 1,13, s e 1,15, s) e duas ligadas a carbonos secundários (δH 0,89, d e 1,67, s). Os sinais em δH 5,54 (t, $J=3,4$) e 6,06 (d, $J=10,3$) referem-se a hidrogênicos oximetínicos que, devido aos seus valores da constante de acoplamento, estão em posições H-3 equatorial e H-5 axial, respectivamente. A partir da análise do espectro de RMN ^{13}C (Figura 59, pág. 177), observa-se a presença de um sinal em δC 196,8, referente a um grupo ceto (C-14), dois sinais em δC 146,7 e 134,2, referentes a uma dupla ligação (C-12/C-13), que possui configuração *trans*, confirmada pela ausência de correlação entre H-12 e CH_3 -20 no espectro de NOESY e um deslocamento em δC 144,4 que diz respeito a um grupo exometilênico (C-6).

A análise do espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) corroboram a estrutura da classe dos diterpenos, revelando a presença de 20 carbonos: 7 metínicos, 3 deles ligados a oxigênio; 4 metilênicos, um deles do grupo exometilênico, 5 não hidrogenados e 4 metílicos, sendo uma das metilas sobre dupla ligação.

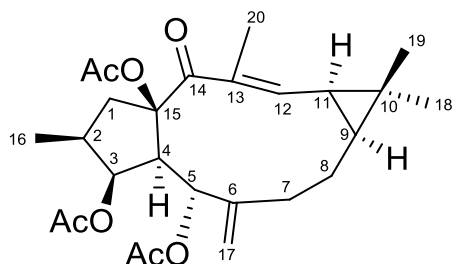
As conectividades entre prótons e carbonos, estabelecidas por experimentos de HMBC e HMQC, permitem estabelecer o esqueleto diterpênico como do tipo latirano com a presença de três grupos acetato nos carbonos C-3, C-5 e C-15. Todas as características espectrais, bem como comparação com os dados da literatura estabelecem a estrutura como sendo

(2S*,3S*,4R*,5R*,9S*,11R*,15R*) -3,5,15- triacetoxi-14 -oxolatira-6 (17), (12E) – dieno. Os dados experimentais dos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C encontram-se na tabela 10 (pág. 171), os quais estão de acordo com a literatura (ADOLF; HECKER, 1971; FERREIRA, 2002).

Tabela 9. Dados de RMN ^1H (500 MHz), ^{13}C (125 MHz) e HMBC, obtidos em CDCl_3 , referentes a substância de partida (2S*,3S*,4R*,5R*,9S*,11R*,15R*) - 3,5,15- triacetoxi-14 -oxolatira-6 (17), (12E) –dieno.

Posição átomo	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$ (multiplicidade, J em Hz)	HMBC ($^1\text{H} \rightarrow ^{13}\text{C}$)
1	48,3	3,42 (dd, 14,3, 8,7, H α) 1,57 (dd, 14,3, 11,4, H β)	C-16
2	37,2	2,23 (m)	C-1 α ; 1 β ; 16
3	80,2	5,54 (t, 3,4)	C-1 α ; 16
4	52,2	2,75 (dd, 10,3, 3,4)	C-1 α ; 5
5	65,8	6,06 (d, 10,3)	C-4; 17a; 17b
6	144,4	-	C-4; 5; 7 α ; 7 β , 17b
7	34,9	2,05*, H α 2,15*, H β	C-5; 17a; 17b
8	21,6	2,03*, H α 1,97*, H β	
9	35,3	1,13*	C-18; 19
10	25,3	-	C-18; 19
11	28,4	1,37 (dd, 11,4, 8,2)	C-18; 19
12	146,7	6,47 (dd, 11,4, 1,1)	C-20
13	134,2	-	C-11; 20
14	196,8	-	C-1 α ; 4; 12; 20
15	92,4	-	C-1 α ; 1 β ; 3; 5
16	14,1	0,89 (d, 6,8)	C-1 β
17	115,5	4,97 (s, H α), 4,70 (s, H β)	C-5; 7 α ; 7 β
18	28,9	1,15 (s)	C-19
19	16,8	1,13 (s)	C-18
20	12,4	1,67 (s)	C-12
3-CO	170,6	-	C-3; 3-COMe
3-COMe	21,2	1,97 (s) ⁺	
5-CO	170,7	-	C-5; 5-COMe
5-COMe	20,9	2,03 (s) ⁺	
15-CO	169,8	-	C-15 COMe
15-COMe	21,9	2,08	

* sinais sobrepostos/ ⁺ sinais intercambiáveis



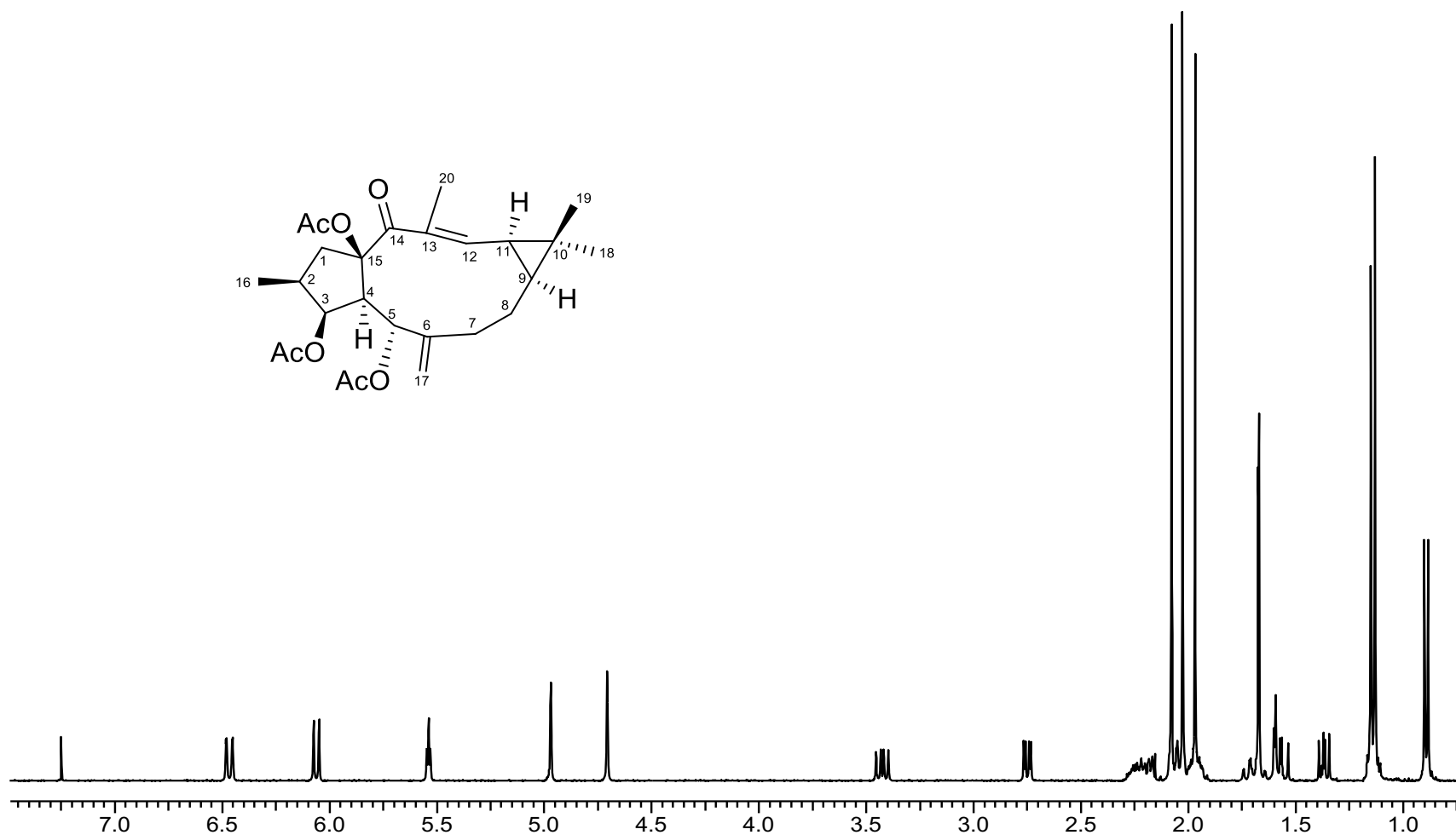


Figura 61. Espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) de EBOE-12

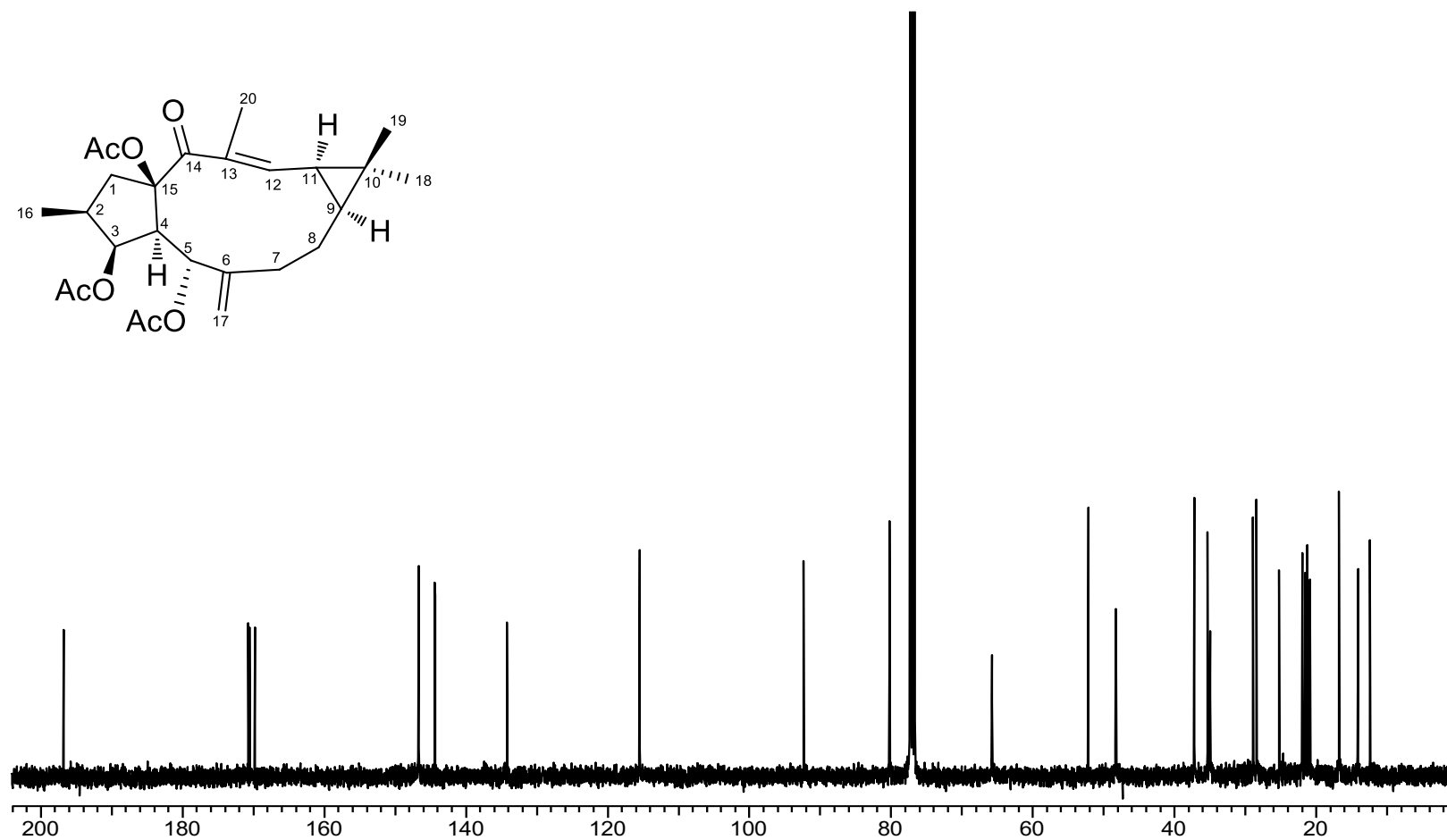


Figura 62. Espectro de RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) de EBOE-12

5.3.2 Identificação estrutural do produto de biotransformação de EBOE-12 com o fungo *Mucor circinelloide* – SUBSTÂNCIA 3

Os espectros de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) (figura 59, pág. 174) e de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) (figura 62, pág. 177) da substância 3 apresentam-se similares aos espectros do seu respectivo padrão, o qual foi previamente descrito. Foi possível observar no espectro de RMN de ^{13}C os sinais característicos do esqueleto latirano preservados em δC 52,1, 37,2, 25,1, 28,9, e 92,6 ppm, referentes aos carbonos 4, 9, 10, 11 e 15, respectivamente. Os deslocamentos em δC 169,9 (15-CO), 170,7 (3-CO) e 171,0 (5-CO), confirmam a presença dos três grupos acetóxi, e os sinais em δC 196,7 (C-14) e 144,9/116,6 (C-6/C-17) certificam, nesta ordem, a manutenção do grupo cetona e da dupla exocíclica na molécula. Foi possível observar o desaparecimento do sinal em δC 21,6, referente ao carbono metilênico C-8, existente no espectro de RMN de ^{13}C do padrão, bem como o aparecimento do sinal em δC 67,0 no espectro do análogo, indicativo de carbono metínico ligado a elemento eletronegativo.

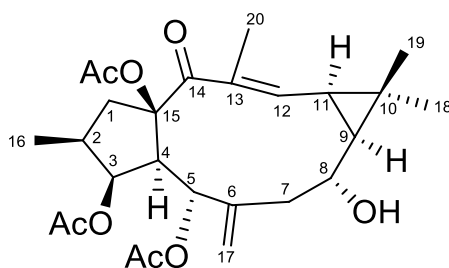
No espectro de RMN de ^1H foi possível notar o aparecimento de um duplo tripleto em δH 4,12 ($J=10,4, 10,3, 2,4$), o qual se correlacionou com o sinal em δC 67,0 ppm, como observado no seu espectro heteronuclear de HMQC (figura 65, pág. 180), confirmando a inserção de grupamento hidroxila no carbono C-8. A desproteção de 5 ppm e 2 ppm, sofrida pelos carbonos C-7 (δC 40,2) e C-9 (37,2), respectivamente, corroboram esta inserção da hidroxila no carbono C-8. Correlações existentes entre os sinais em δH 4,12 (H-8) com os sinais em δH 1,25 (H-7) e δH 2,26 (H-9) no espectro de COSY (figura 67, pág. 182), atestam, uma vez mais, a presença do carbono metínico C-8 hidroxilado.

Através da análise do espectro de NOESY (figura 69, pág. 184), foi possível observar uma correlação entre os sinais em δH 4,12 (H-8) e em δH 6,06 (H-5), ambos dispostos equatorialmente na molécula. Dessa forma, a estereoquímica relativa do grupo inserido em C-8 na substância 3, pôde ser definida como $\alpha\text{-OH}$. Os dados experimentais dos espectros de RMN deste composto encontram-se na tabela 10 (pag 173).

Tabela 10. Dados de RMN ^1H (500 MHz), ^{13}C (125 MHz) e HMBC, obtidos em CDCl_3 referentes a substância 3.

Posição átomo	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$ (multiplicidade, J em Hz)	HMBC ($^1\text{H} \rightarrow ^{13}\text{C}$)
1	48,2	3,43 (dd, J= 14,4, 8,7, H α) 1,57, H β (sl)	C-16
2	37,2	2,37 (m)	C-1 α ; 1 β ; 16
3	80,2	5,56 (t)	C-1 α ; 16
4	52,1	2,73 (dd, J= 10,3, 3,5)	C-1 α ; 5
5	66,4	6,05 (d, J= 10,3)	C-4; 17 α ; 17 β
6	144,9	-	C-4; 5; 17 α ; 17 β
7	40,2	1,25*, H α 1,27*, H β	C-5; 17 α ; 17 β
8	67,0	4,12 (td, J= 10,4, 10,3, 2,4)	
9	37,2	2,26 (m)	C-18; 19
10	25,1	-	C-18; 19
11	28,9	1,22 (s)	C-18; 19
12	141,5	6,44 (dd, J= 11,7, 1,1)	C-20
13	135,3	-	C-11; 20
14	196,7	-	C-1 α ; 1 β ; 3; 5
15	92,6	-	C-1 β
16	14,2	0,9 (d, J= 6,7)	C-5; 7 α ; 7 β
17	116,6	5,02 (s), H α 4,74 (s), H β	
18	29,9	1,67 (s)	C-19
19	16,5	1,30 (s)	C-18
20	12,5	1,23 (s)	C-12
3-CO	170,7	-	C-3; 3-COMe
3-COMe	21,0	2,10 (s) ⁺	
5-CO	171,0	-	C-5; 5-COMe
5-COMe	21,3	2,00 (s) ⁺	
15-CO	169,9	-	C-15; 15-COMe
15-COMe	22,1	2,04 (s) ⁺	

* sinais sobrepostos/ + sinais intercambiáveis



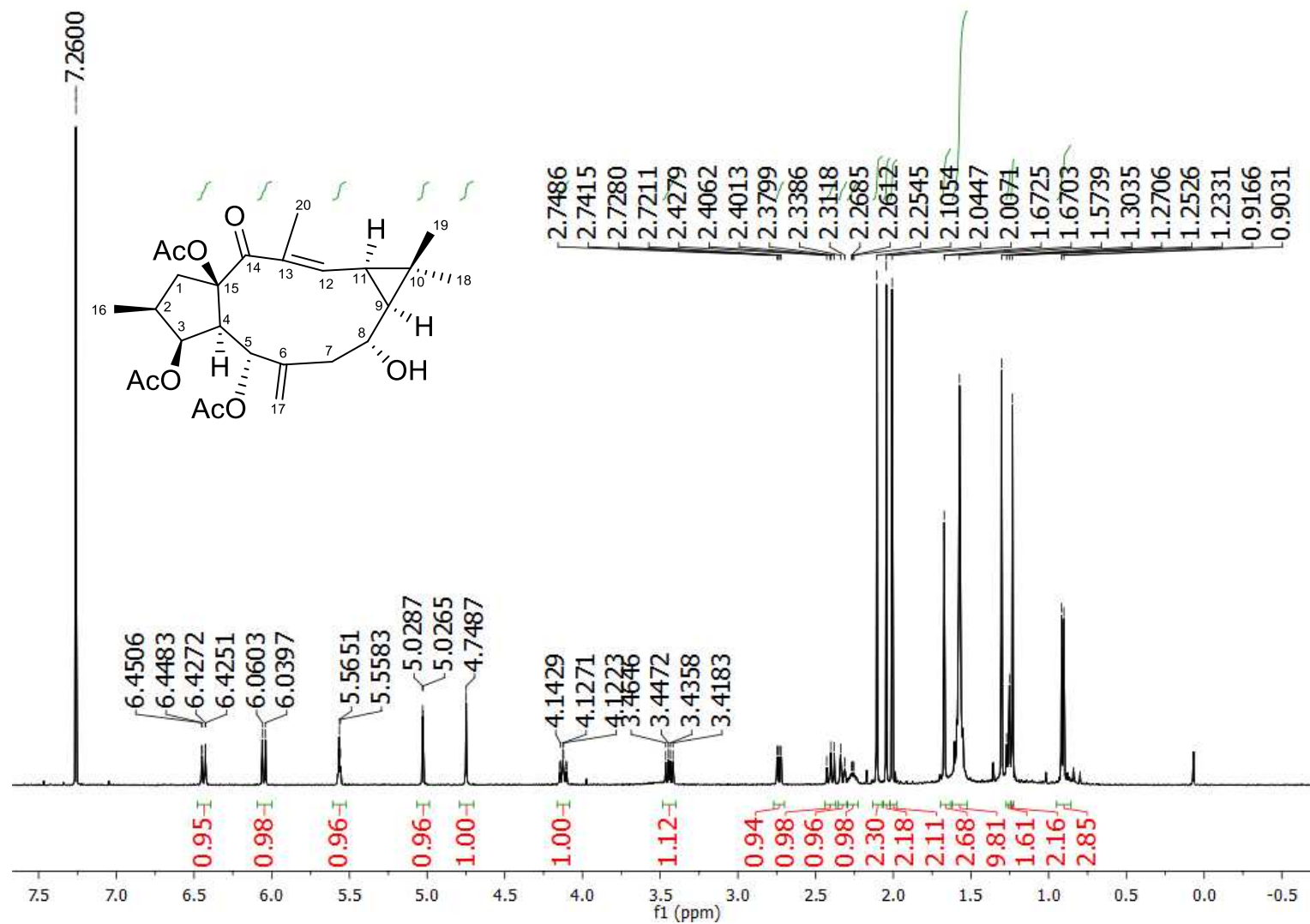


Figura 63. Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) da substância 3.

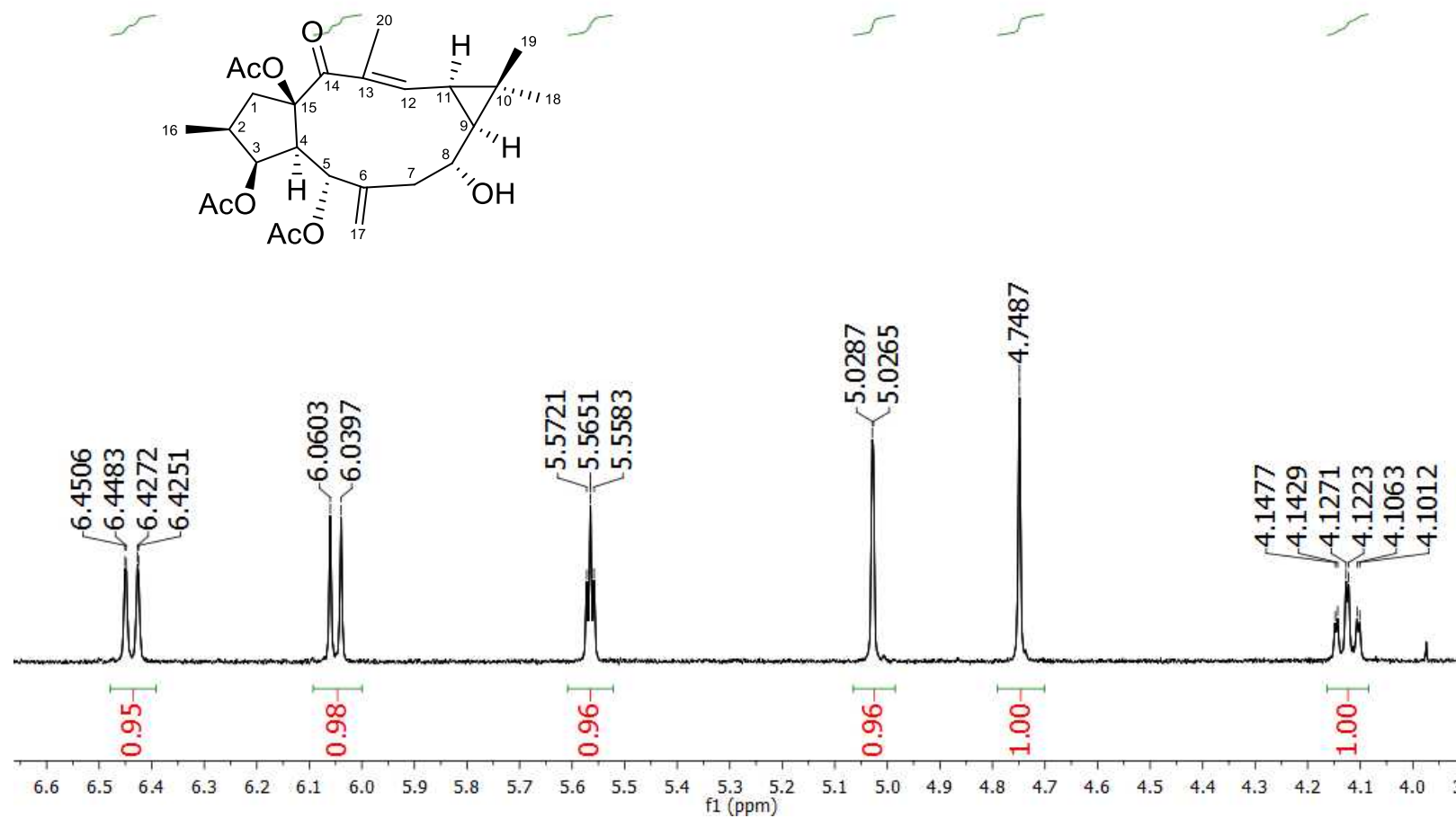


Figura 64. Expansão do espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) da substância 3 (4,0-6,6 ppm)

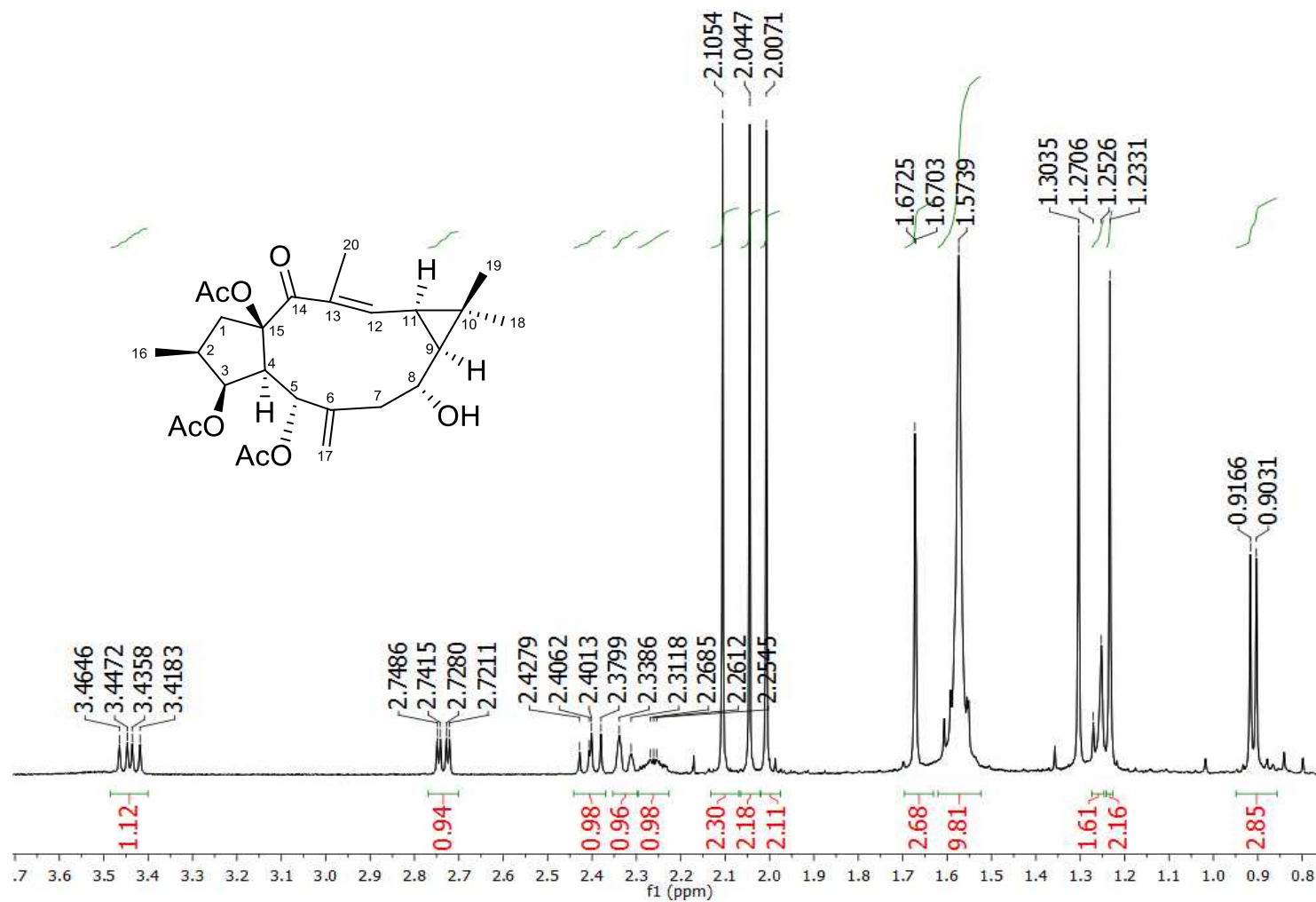


Figura 65. Expansão do espectro de RMN de ¹H (500 MHz, CDCl₃) da substância 3 (0.8-3.6 ppm)

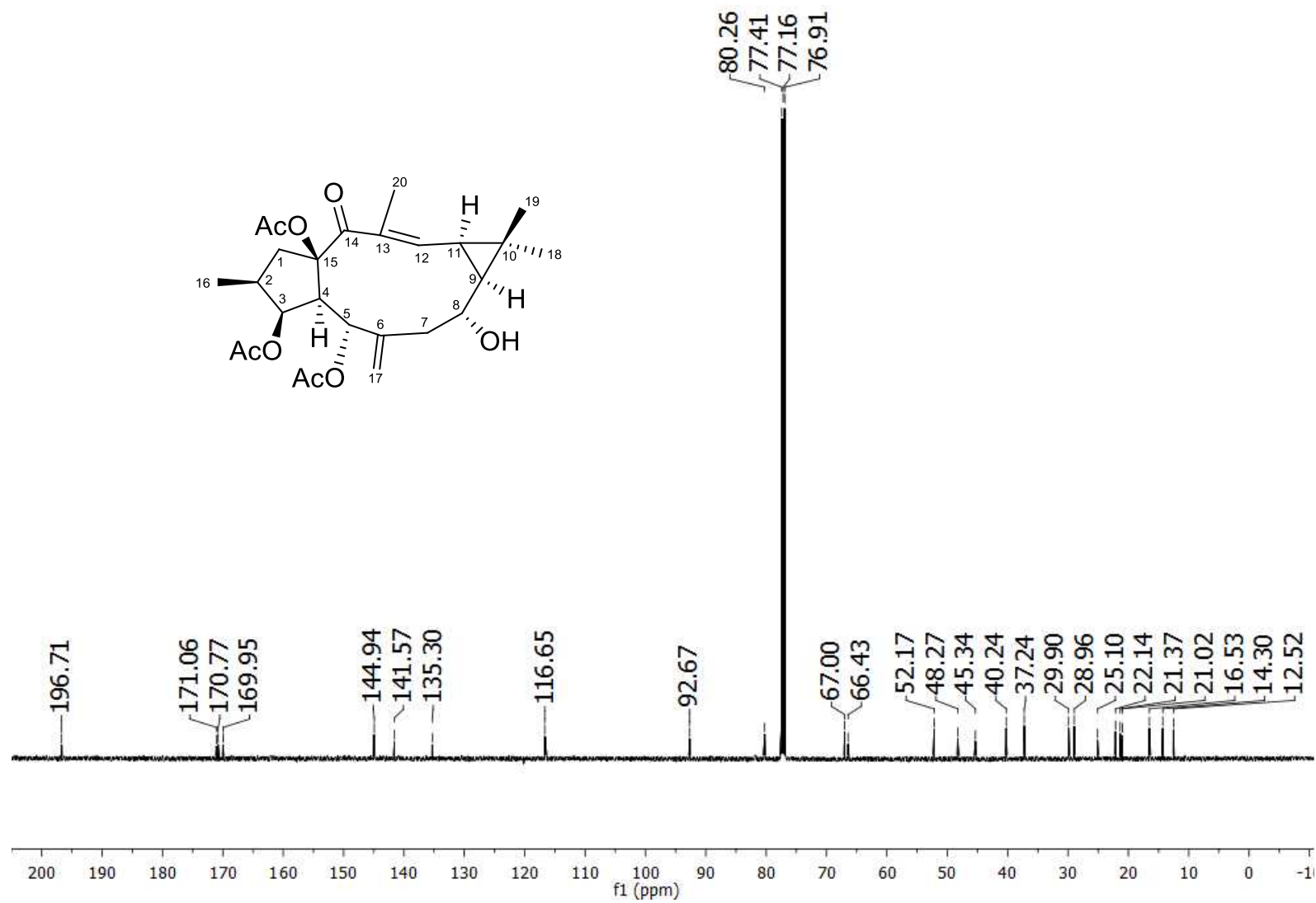


Figura 66. Espectro de RMN de ¹³C (125 MHz, CDCl₃) da substância 3.

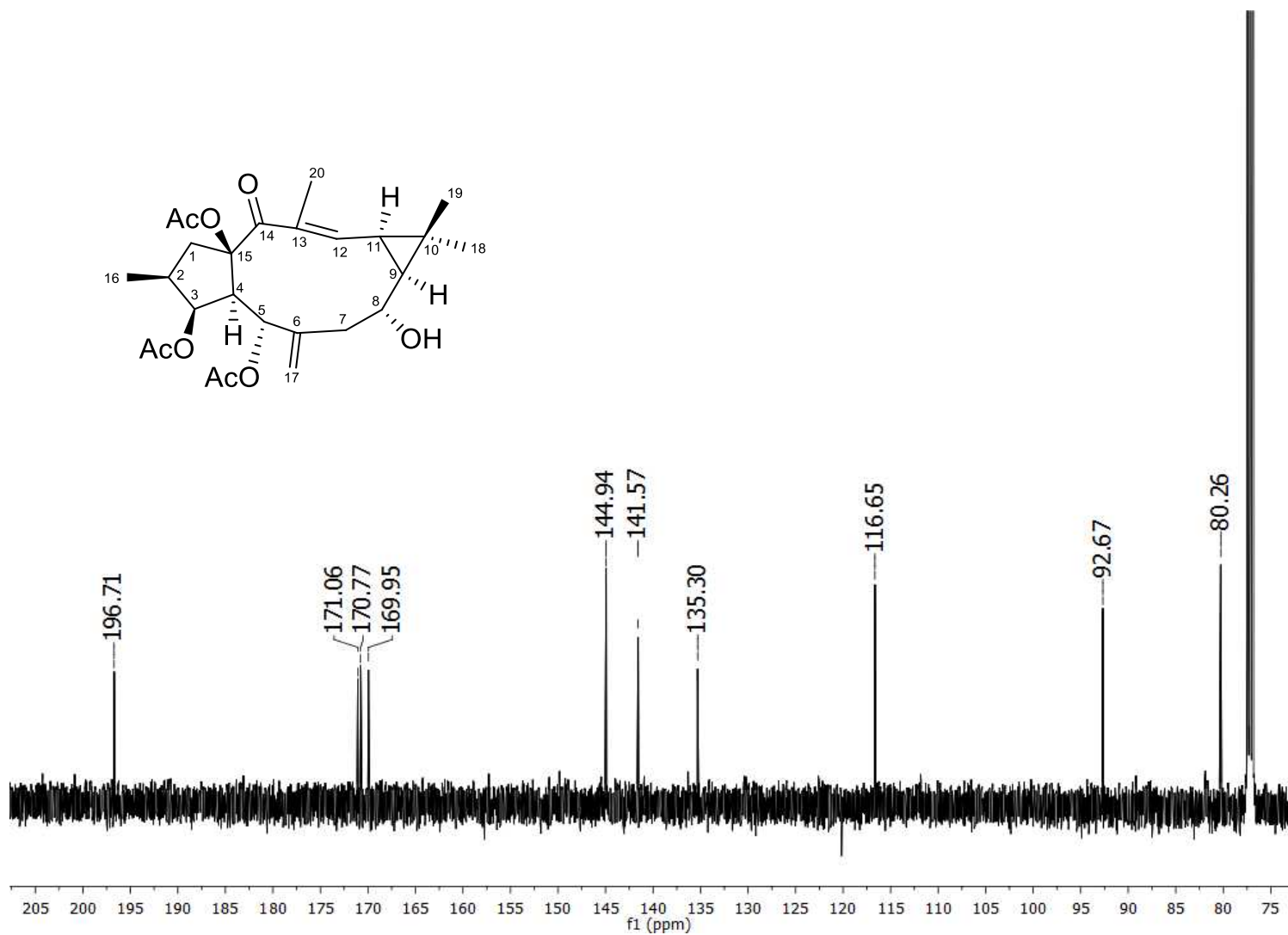


Figura 67. Expansão do espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) da substância 3 (75-205 ppm)

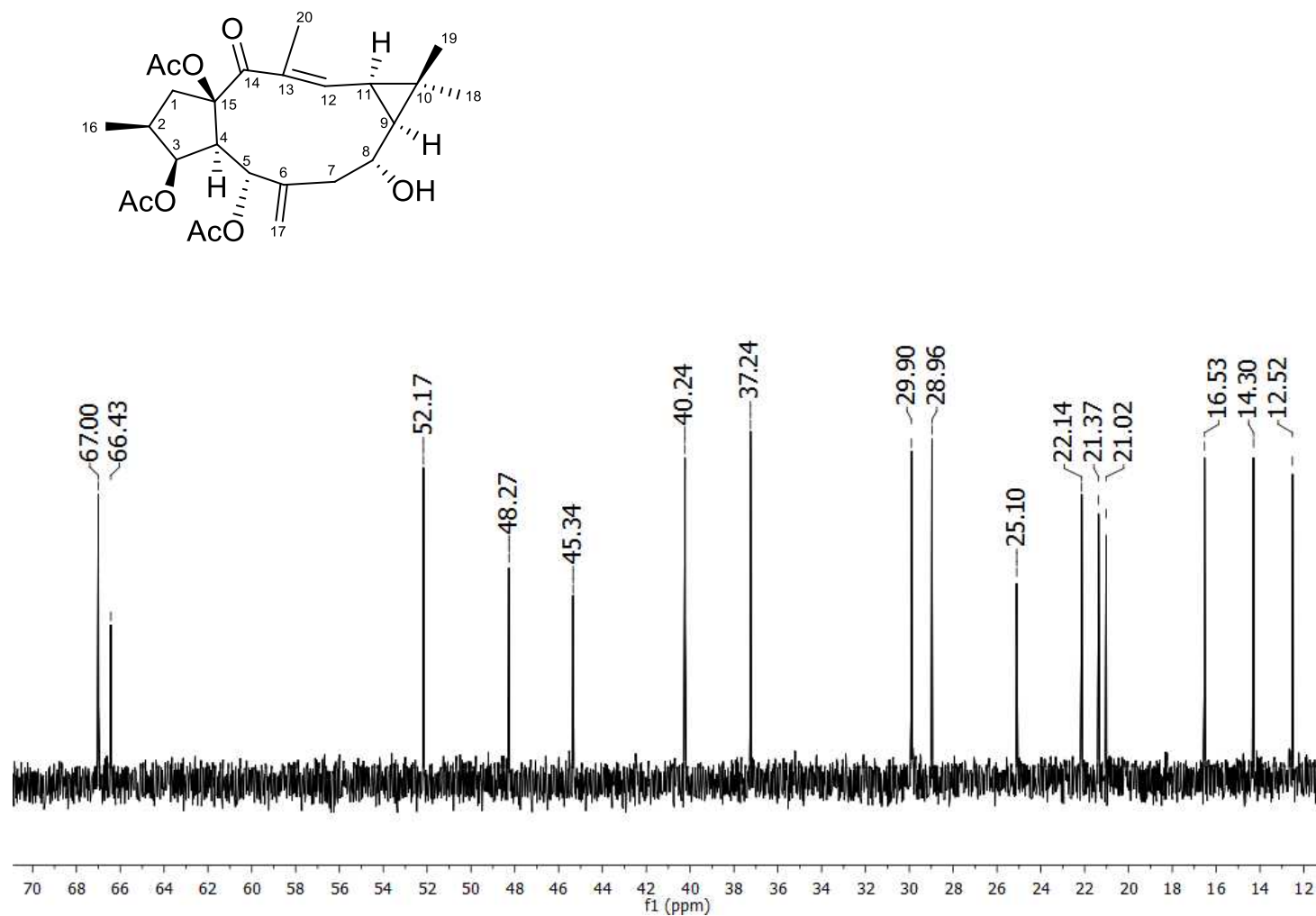


Figura 68. Expansão do espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) da substância 3 (12-70 ppm)

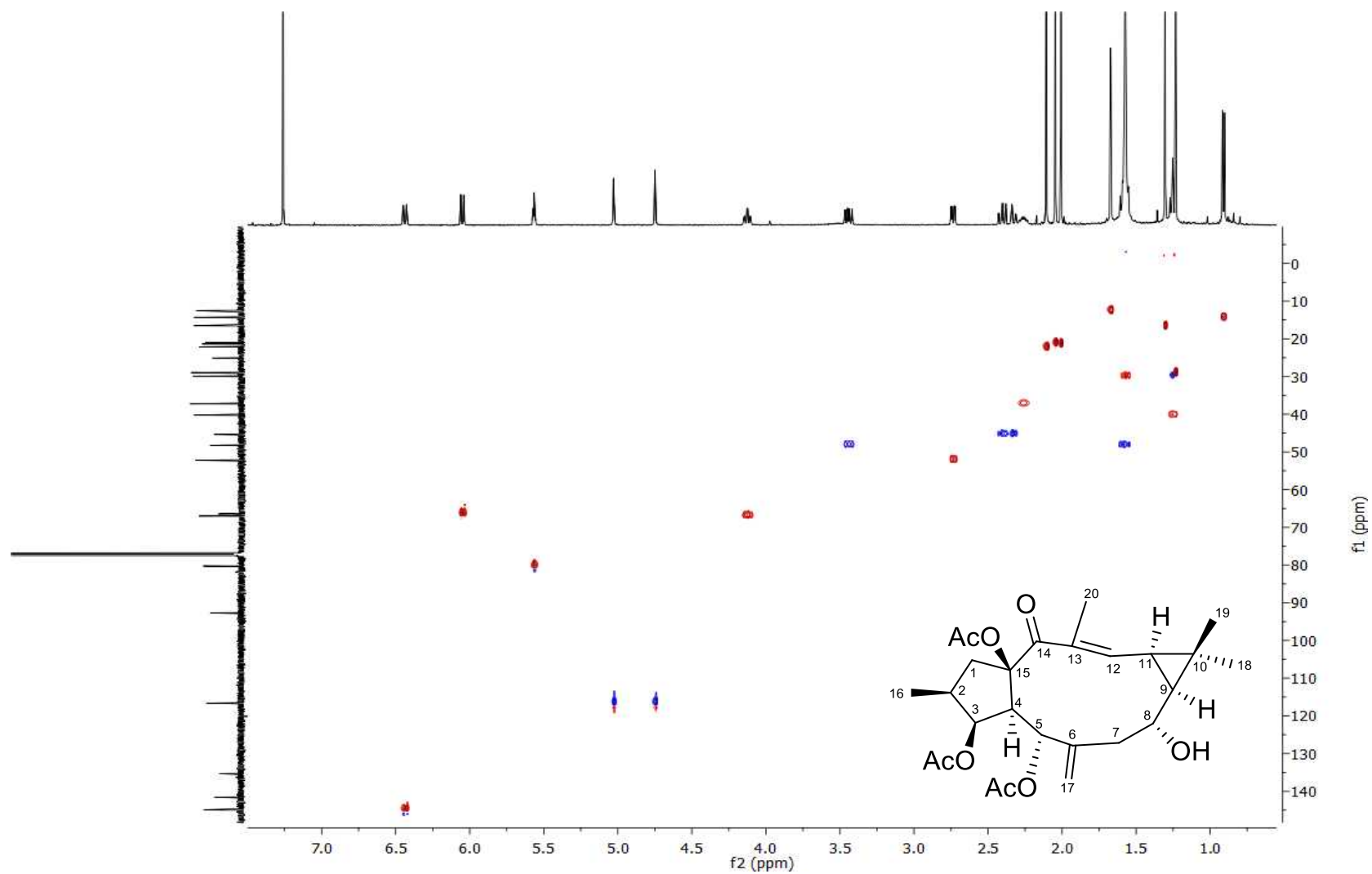


Figura 69. Mapa de contorno de HMBC (500 MHz/125 MHz, CDCl₃) da substância 3.

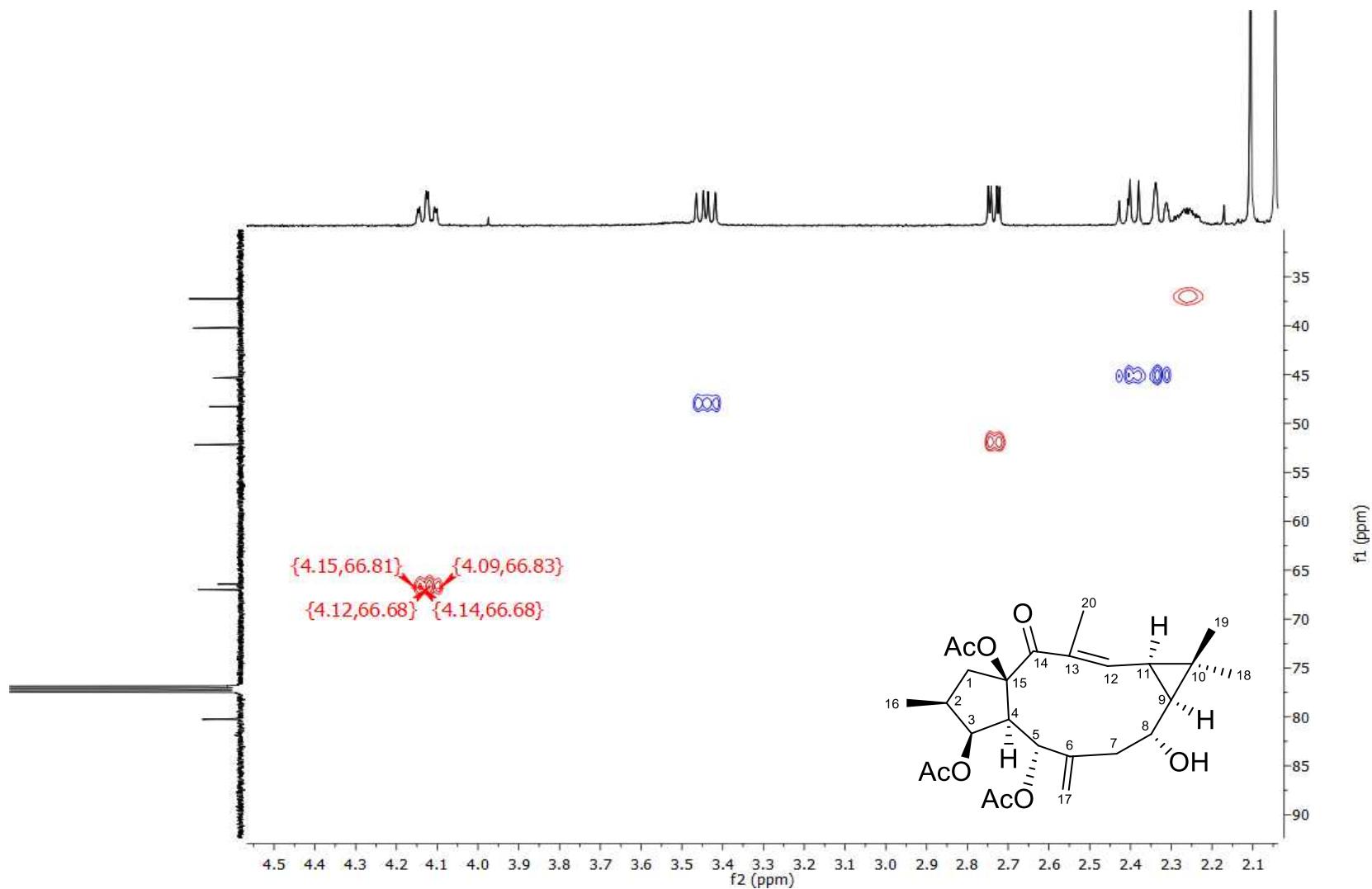


Figura 70. Expansão de HMQC (500 MHz/125 MHz, CDCl₃) da substância 3 (35-90/2,1-4,5).

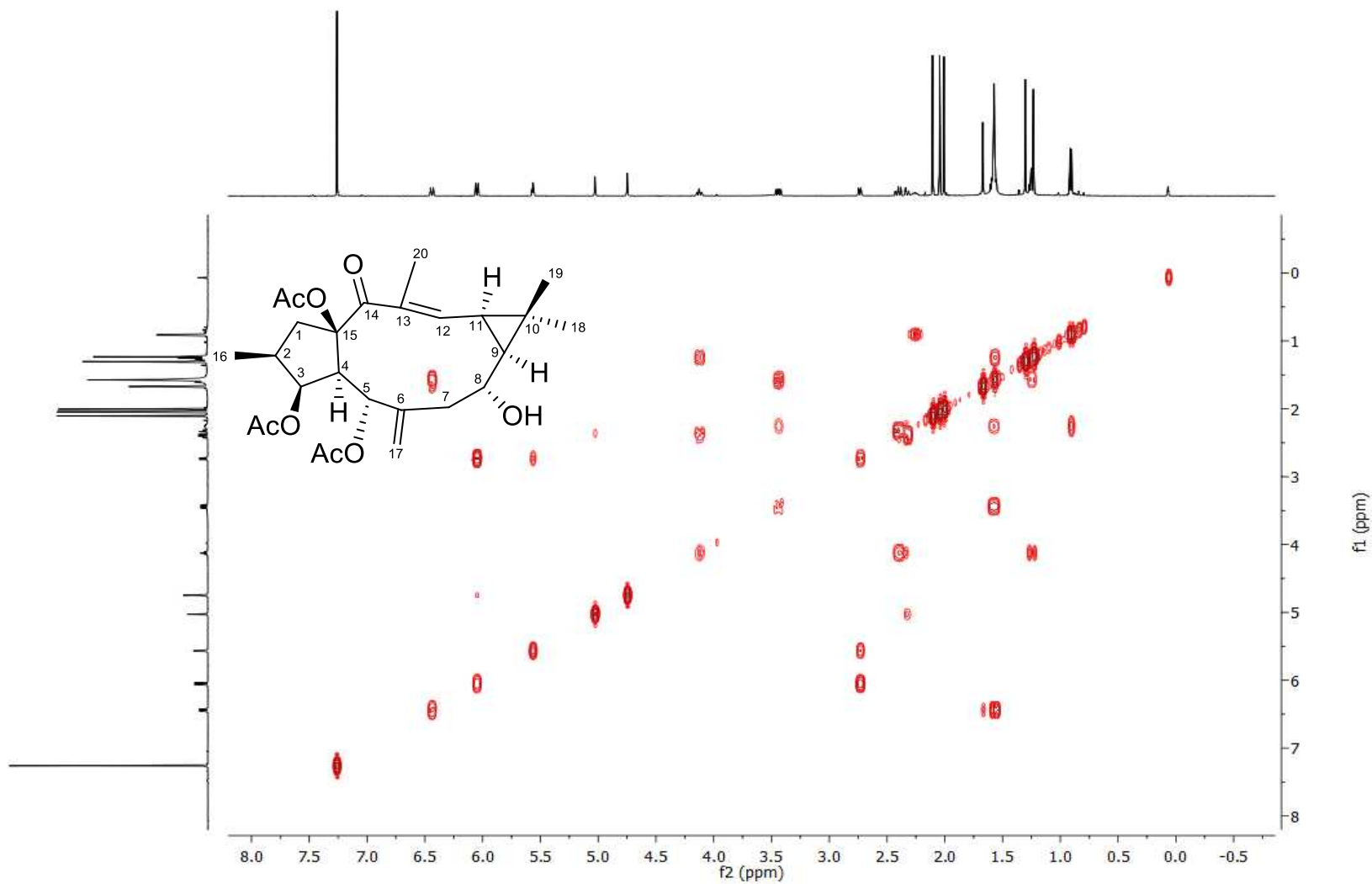


Figura 71. Espectro de COSY (500 MHz, CDCl₃) da substância 3

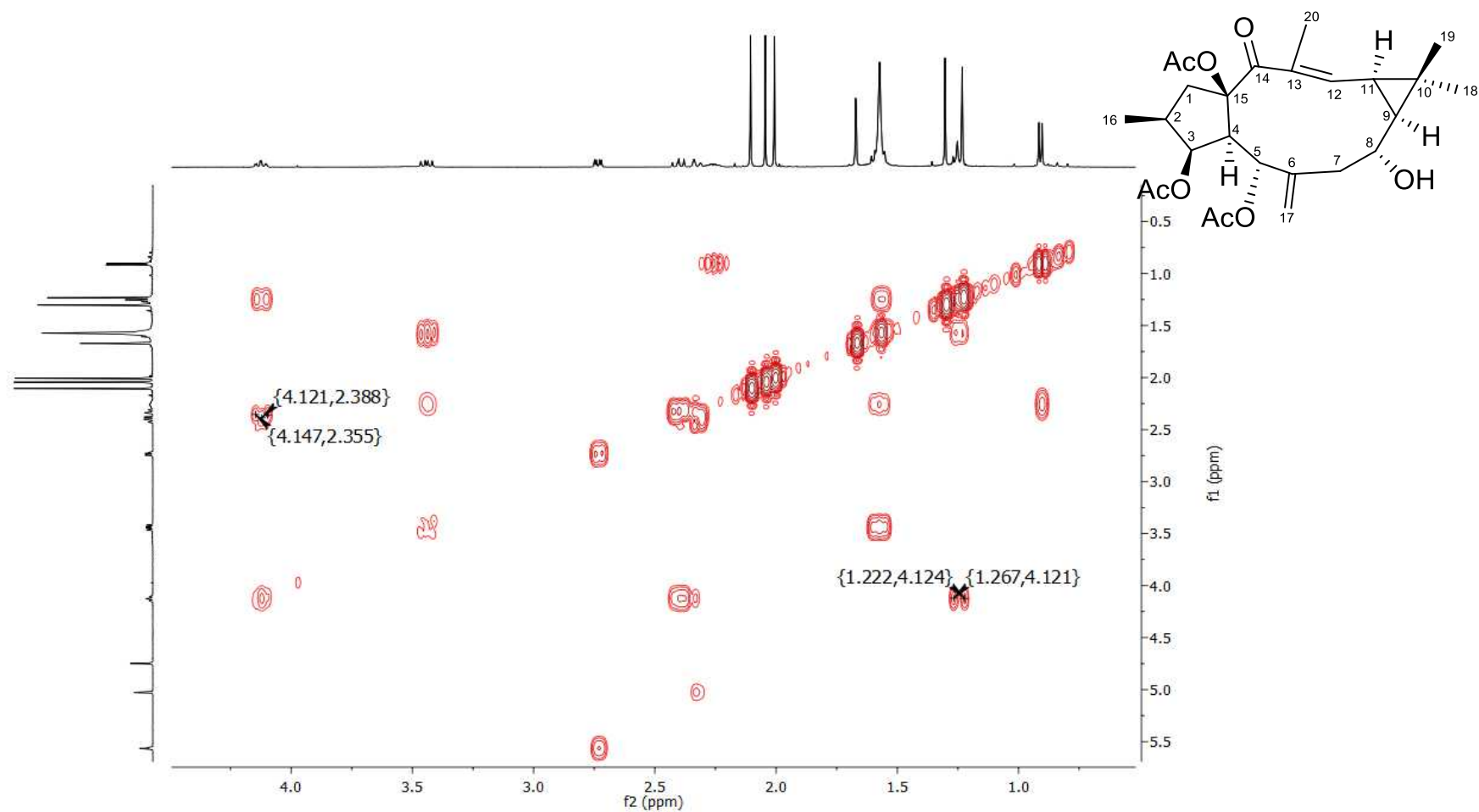


Figura 72. Expansão do espectro de COSY (500 MHz, CDCl₃) da substância 3 (0,5-5,5).

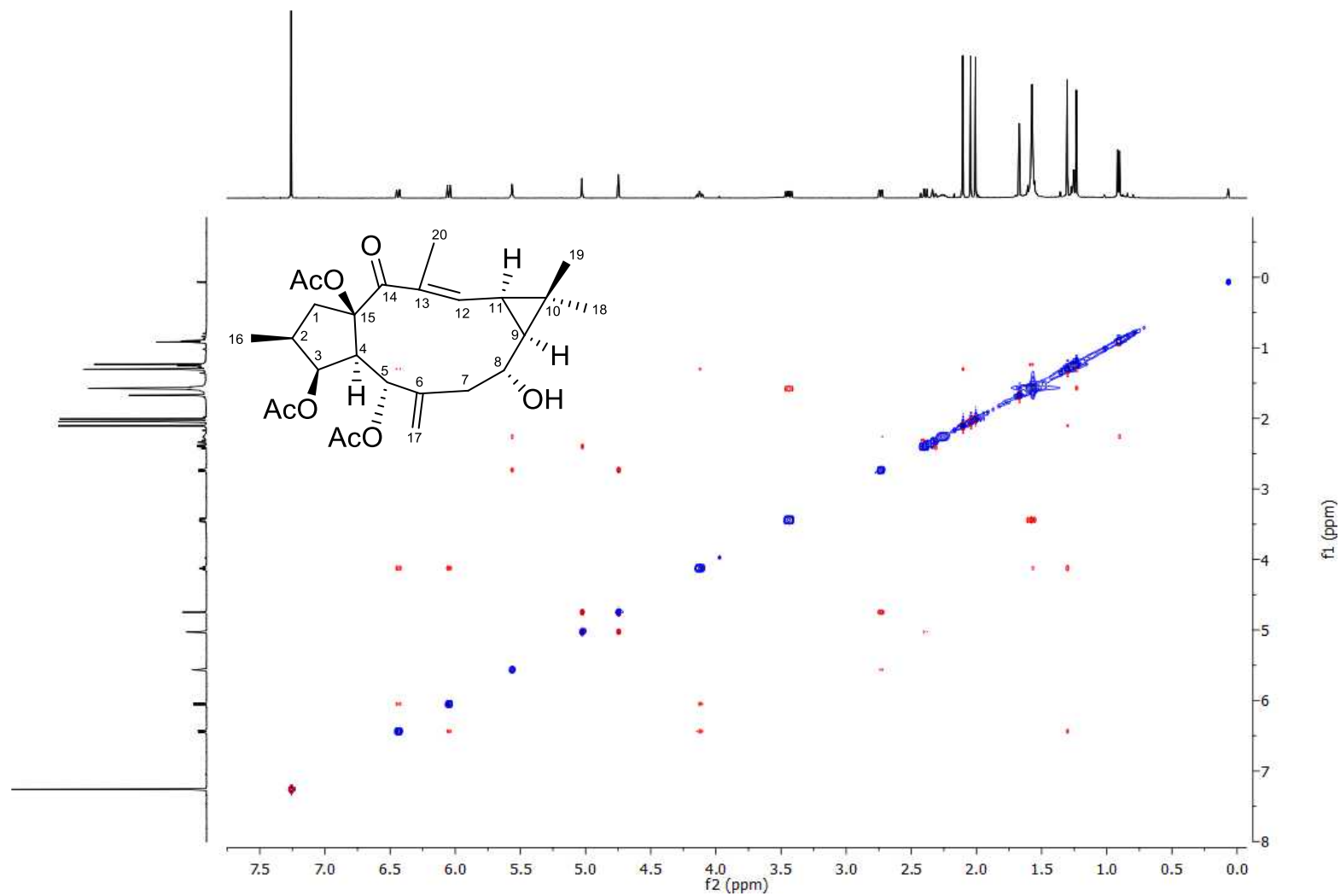


Figura 73. Espectro de NOESY (500 MHz, CDCl₃) da substância 3.

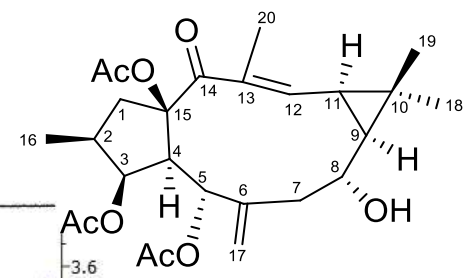


Figura 74. Expansão do espectro de NOESY (500 MHz, CDCl₃) da substância 3 (3,6-6,8).

_____ **CONCLUSÕES**

6. CONCLUSÕES

Para os experimentos de biotransformação da afidicolina, realizou-se *screening* com quatro fungos: *Beauveria bassiana* ATCC 7159, *Chaetomium globosum* ATCC 56726, *Cunninghamella echinulata* ATCC 8688^a e *Penicilium crustosum* VR4. Após monitoramento por 168h, observou-se que os fungos *Beauveria bassiana* ATCC 7159 e *Penicilium crustosum* VR4 não catalisaram a formação de metabólitos. Os experimentos realizados com *Cunninghamella echinulata* ATCC 8688^a em pequena escala não foram reprodutíveis em escala ampliada, na qual houve aumento da quantidade de massa micelial e de substrato por frasco, além do aumento do tamanho do frasco. Isto pode ter ocorrido pelas diferenças de oxigenação entre os frascos de pequena e maior escala.

O fungo *Chaetomium globosum* ATCC 56726 foi o único que levou a formação de um metabólito da afidicolina. Este fungo catalisou a oxidação do grupo álcool a cetona no carbono C-3, originando o 3-ceto-afidicolina, principal produto de metabolização da afidicolina *in vivo*, mimetizando o fungo o metabolismo humano. Dessa forma, experimentos de biotransformação com o fungo *Chaetomium globosum* ATCC constituem modelos para estudos de metabolização da afidicolina e seus derivados, em mamíferos.

Os experimentos de degradação do *ent-7 α* -acetoxitraquiloban-18-oico (T-360) pelo fungo *Mucor rouxii* NRRL 1894 originaram um C-17 hidróxi derivado, relatado como inédito na literatura. O terceiro diterpeno utilizado, o (2S*, 3S*, 4R*, 5R*, 9S*, 11R*, 15R*)-3,5,15- triacetoxi-14- oxolatira-6 (17),(12E)-dieno (EBOE-12), foi submetido a experimentos de biotransformação com os fungos *Mucor circinelloide* NRRL 3631 (+) e *Botrytis cinerea* UCA992, porém, apenas o primeiro fungo catalisou a formação de um derivado C-8 α hidroxilado, relatado como inédito na literatura.

Este estudo corrobora resultados prévios de ensaios de biotransformação microbiana de produtos naturais, nos quais os fungos têm se mostrado eficientes na produção de novos análogos de produtos naturais.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

1. ADOLF, W.; HECKER, E. Further new diterpene esters from the irritant and cocarcinogenic seed oil and latex of the caper spurge (*Euphorbia lathyris* L.). **Experientia**, v. 27(12), p. 1393-1394, 1971.
2. ADRIO, J.L.; DEMAINE, A.L. Fungal Biotechnology. **International Microbiology**, v. 6, p.191-199, 2003.
3. AKIHISA, T.; HAMASAKI, Y.; TOKUDA, H.; UKIYA, M.; KIMURA Y.; NISHINO, H. Microbial transformation of isosteviol and inhibitory effects on Epstein-Barr virus activation of the transformation products. **Journal of Natural Products**, v. 67(3), p. 407-410, 2004.
4. ALAM, M.; HANSON, J.R.; SARAH, F. The biotransformation of some 6 substituted *ent*-kaur-16-enes by *Gibberella fujikuroi*. **Phytochemistry**, v. 30, p. 807–809, 1991.
5. ALEU, J.; COLLADO, I, G. Biotransformations by *Botrytis* species. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 13, p.77-93, 2001.
6. ALMEIRA, M. O. **Obtenção de derivados dos terpenos enidrina e afidicolina por biotransformação e semi-síntese e avaliação da atividade leishmanicida**. Dissertação de mestrado. Ribeirão Preto: Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, 2010.
7. AMBROSIO, S. R.; TIRAPELLI, C. R.; DA COSTA, F. B.; DE OLIVEIRA, A. M.; Kaurane and pimarane-type diterpenes from the *Viguiera* species inhibit vascular smooth muscle contractility. **Life Science**, v. 79, p. 925-933, 2006.

8. AMBROSIO, S. R.; ARAKAWA, N. S.; ESPERANDIM, V. R.; ALBUQUERQUE, S.; COSTA, F. B. Trypanocidal activity of pimarane diterpenes from *Viguiera arenaria* (Asteraceae). *Phytotherapy Research*, v. 22(10), p. 1413-1415, 2008.

9. AMBROSIO, S. R.; FURTADO, N. A.; DE OLIVEIRA, D. C.; DA COSTA, F. B.; MARTINS, C. H.; DE CARVALHO, T. C.; PORTO, T. S.; VENEZIANI, R.C. Antimicrobial activity of kaurane diterpenes against oral pathogens. ***Zeitschrift für Naturforschung***, v. 63, p. 326–330, 2008.

10. ANDERSON, A. B.; MCCRIDLE, R.; TURNBULL, J. K. Microbial transformation of 17-norkauran-16-one and 16-norphyllocladan-16-one by *Aspergillus niger*. ***Journal of Chemical society communication***, v. 33, p. 143-144, 1973.

11. ARANDA, G.; LALLEMAND, J.; HAMMOUMI, A.; AZERAD, R. Microbial hydroxylation of sclareol by *Mucor plumbeus*. ***Tetrahedron Letters***, v. 32(15), p.1783–1786, 1991.

12. ARECHE, C.; SCHMEDA-HIRSCHMANN, G.; THEODULOZ, C.; RODRIGUEZ, J. A. Gastroprotective effect and cytotoxicity of abietane diterpenes from the Chilean Lamiaceae *Sphacele chamaedryoides* (Balbis) Briq. ***Journal of Pharmacy and Pharmacology***, v. 61, p. 1689-1697, 2009.

13. AVILA, L.; PEREZ, M.; SANCHEZ-DUFFHUES, G.; HERNÁNDEZ-GALÁN, R.; MUÑOZ, E.; CABEZAS, F.; QUIÑONES, W.; TORRES, F.; ECHEVERRI, F. Effects of diterpenes from latex of *Euphorbia lactea* and *Euphorbia laurifolia* on human immunodeficiency virus type 1 reactivation. ***Phytochemistry***, v. 71(2), p. 243-284, 2010.

14. BADRIA, F. A.; HUFFORT, C. D. Microbial transformation of Stemodin, a Stemodia diterpene. **Phytochemistry**, v. 30(7), p. 2265-2268, 1990.
15. BAKER, D. D.; CHU, M.; OZA, U.; RAJGARHIA, V. The value of natural products to future pharmaceutical discovery. **Natural Product Reports**. v. 24, p. 1225-1244, 2007.
16. BALOCHE, I. B.; BALOCH, M. K. Isolation and characterization of cytotoxic compounds from *Euphorbia cornigera* Boiss. **Journal of Asian Natural Products Research**, v. 12(11), p. 985-991, 2010.
17. BALOCH, I. B.; BALOCH, M. K.; BALOCH, A. K. Bio-active compounds from *Euphorbia cornigera* Boiss. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 44, p. 3188-3194, 2009.
18. BARRERO, A.F.; OLTRA, J.E.; CABRERA, E.; REYES, F.; ÁLVAREZ, M. Metabolism of gibberellins and *ent*-kaurenoids in mutants of *Gibberella fujikuroi*. **Phytochemistry**, v. 50, p.1133–1140, 1999.
19. BARRERO, A. F.; OLTRA, J. E.; CERDÁ-OLMEDO, E.; ÁVALOS, J.; JUSTICIA, J. Microbial transformation of *ent*-kaurenoic acid and its 15-hydroxy derivatives by the SG138 mutant of *Gibberella fujikuroi*. **Journal of Natural Products**, v. 64, p. 222–225, 2001.
20. BARREIRO, E. J.; FRAGA, C. A. M. Aspectos gerais da ação dos fármacos. In _____. **Química medicinal: as bases moleculares da ação dos fármacos**. 2 ed. Porto Alegre: Artmed, 2008. Cap. 1, p. 19-70.
21. BASAPPA MAHESWARAPPA, N.; SUBBAIAH, V.; MUTHUPALANI, M.; YAMAGANI, P. K.; MOHAN, K. Antioxidant activity of carnosic acid and rosmarinic acid in raw and cooked ground chicken patties. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 94 (2), p. 273-279, 2013.

22. BAUER, J.; KUEHNL, S.; ROLLINGER, J. M.; SCHERER, O.; NORTHOFF, H.; STUPPNER, H.; WERZ, O.; KOEBERLE A. Carnosol and carnosic acids from *Salvia officinalis* inhibit microsomal prostaglandin E2 synthase-1. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 342 p. 169–176, 2012.

23. BEALE, M.H.; BEARDER, J.R.; DOWN, G.H.; HUTCHISON, M.; MACMILLAN, J.; PHINNEY, B.O. The biosynthesis of kaurenolide diterpenoids by *Gibberella fujikuroi*. **Phytochemistry**, v. 21, p. 1279–1287, 1982.

24. BEARDER, J.R.; MACMILLAN, J.; WELS, C.M. The metabolism of steviol to 13-hydroxylated *ent*-gibberellanes and *ent*-kauranes. **Phytochemistry**, v. 14, p. 1741–1748, 1975.

25. BECERRA, J.; FLORES, C.; MENA, J.; AQUEVEQUE, P.; ALARCÓN, J.; BITTNER, M.; HERNÁNDEZ, V.; HOENEISEN, M. Antifungal and antibacterial activity of diterpenes isolated from Wood extractables of Chilean Podocarpaceae. **Boletín de la Sociedad de Chilena de Química**, vol.47, p. 151-157, 2002.

26. BEILBY, J.P.; GHISALBERTI, E.L.; JEFFERIES, P.R.; SEFTON, M.A.; SHEPPARD, P.N. Microbiological transformation of tetracyclic diterpenes. **Tetrahedron Letters**, v. 14, p. 2589- 2592, 1973.

27. BERNARDES, W. A.; LUCARINI, R.; TOZATTI, M. G.; SOUZA, M. G.; SILVA, M. L.; FILHO, A. A.; MARTINS, C. H.; CROTTI, A. E.; PAULETTI, P. M.; GROPPPO, M.; CUNHA, W. R. . Antimicrobial activity of *Rosmarinus officinalis* against oral pathogens: relevance of carnosic acid and carnosol. **Chemistry and Biodiversity**, v. 7 (7), p.1835-40, 2010.

28. BISIO, A.; FRATERNALE, D.; DAMONTE, G.; MILLO, E.; LANTERI, A. P.; RUSSO, E.; ROMUSSI, G.; PARODI, B.; RICCI, D.; DE TOMMASI, N. Phytotoxic activity of *Salvia jamensis*. **Natural Product Communications**, v. 4, p. 1621-1630, 2009.

29. BLOCK, S.; BACCELLI, C.; TINANT, B.; MEERVELT, L. V.; ROZENBERG, R.; JIWAN, J. H.; LLABRE, S. G.; PAUW-GILLET, M.; QUETIN-LECLERCQ, J. Diterpenes from the leaves of *Croton zambesicus*. **Phytochemistry**, v. 65, p. 1165-1171, 2004.

30. BLOCK, S.; GERKENS, P.; PEULEN, O.; JOLOIS, O.; MINGEOT-LECLERCQ, M.P.; PAUW-GILLET, M.C.; QUETIN-LECLERCQ, J. Induction of apoptosis in human promyelocytic leukemia cells by a natural trachylobane diterpene. **Anticancer Research**, v. 25, p. 363–368. 2005.

31. BOAVENTURA, M. A. D.; HANSON, J. R.; HITCHCOCK, P. B.; TAKAHASHI, J. A. The biotransformation of *ent*-19-hydroxykaur-16-en-15-one by *Cephalosporium aphidicola*. **Phytochemistry**, v. 37, p. 387–389, 1994.

32. BOAVENTURA, M. A. D.; OLIVEIRA, A.B.; HANSON, J.R.; HITCHCOCK, P.B.; TAKAHASHI, J.A. The biotransformation of methyl *ent*-15-oxokaur-16-en-19-oate by *Rhizopus stolonifer* and *Mucor plumbeus*. **Phytochemistry**, v. 40, p. 1667–1669, 1995.

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

34. BORGES, K. B.; BORGES, W. S.; DURÁN-PATRON, R.; PUPO, M. T.; BONATO, P. S. COLLADO I. G.. Stereoselective biotransformation using fungi as biocatalyst. **Tetrahedron Asymetry**, v. 20, p. 385-397, 2009

35. BORGES, W. de S. B.; BORGES, K. B.; BONATO, P. S.; SAID, S.; PUPO, M. T. Endophytic fungi: natural products, enzymes and biotransformation reactions. **Current Organic Chemistry**, v. 13, p. 1137-1163, 2009.

36. BRANNON, D. R.; BOAZ, H. E.; WILEY, B. J.; MABE, J. A.; HORTON, D. R. Hydroxylation of Some Dehydroabietanes With. *Corticium sasakii*, **Journal of Organic Chemistry**, v. 33(12), p. 4462-4466, 1968.

37. BRUNDRET, K. M.; HESP, B.; DALZIEL, W. X-Ray Crystallographic Determination of Structure of Antibiotic Aphidicolin - Tetracyclic Diterpenoid Containing A New Ring System. **Journal Of The Chemical Society-Chemical Communications**, v. 18, p. 1027-1029, 1972.

38. BUCKNALL, R. A.; MOORES, J.; SIMMS, R.; HESP, B. Antiviral Effects of Aphidicolin, A New Antibiotic Produced By *Cephalosporium-Aphidicola*. **Antimicrobial Agents And Chemotherapy**, v. 4, p. 294-298, 1973.

39. BUTLER, M. S. The role of natural product chemistry in drug discovery. **Journal of Natural Products**, v. 67, p. 2141-2153, 2004.

40. CAPEL, C. S.; SOUZA, A. C. D.; CARVALHO, T. C.; SOUSA, J. P. D.; AMBRÓSIO, S. R.; MARTINS, C. H. G.; CUNHA, W. R.; GALÁN, R. H.; FURTADO, N. A. J. C. Biotransformation using *Mucor rouxii* for the production of oleanolic acids derivatives and their antimicrobial activity against oral pathogens. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 38, p. 1493-1498, 2011.

41. CASTELLO-BRANCO, M.V.S; ANAZETTI, M.C; SILVA, M.S; TAVARES, J.F; DINIZ, M.F.F.M; FRUNGILLO, L; HAUN, M; MELO, P.S. Diterpenes from *Xylopia langsdorffianna* and inhibit cell growth and induce differentiation in human leukemia cells. **Zeitschrift für Naturforschung** , v. 64, p. 650 – 656, 2009.

42. CAVALCANTI, B. C.; COSTA-LOTUFO, L. V.; MORAES, M. O.; BURBANO, R. R.; SILVEIRA, E. R.; CUNHA, K. M. A.; RAO, V. S. N.; MOURA, D. J.; ROSA, R. M.; HENRIQUES, J. A. P. Genotoxicity evaluation of kaurenoic acid, a bioactive diterpenoid present in copaiba oil. **Food and Chemical Toxicology**, v. 44, p. 388–392, 2006.

43. CHAMY, M. C.; OREJARENA, S.; ROVIROSA, J.; MARTIN, A. S. Biotransformation of *ent*-beyerenes with *Mucor plumbeus*. **Journal of the Chilean Chemical Society**, v. 58(4), p. 1980-1981, 2013.

44. CHANG, F.-R.; YANG, P.-Y.; LIN, J.-Y.; LEE, K.-H.; WU, Y.-C. Bioactive kaurane diterpenoids from *Annona glabra*. **Journal of Natural Products**, v. 61, p. 437–439, 1998.

45. CHANG, S. F.; YANG, L.-M.; HSU, F.-L.; HSU, J.-Y.; LIAW, J.-H.; LIN, S.-J. Transformation of steviol-16 α ,17-epoxide by *Streptomyces griseus* and *Cunninghamella bainieri*. **Journal of Natural Products**, v. 69, p. 1450–1455, 2006.

46. CHANG, S. F.; YANG, L. M.; LO, C. H.; LIAW, J. H.; WANG, L. H.; LIN, S. J. Microbial transformation of isosteviol and bioactivities against the glucocorticoid/androgen response elements. **Journal of Natural Products**, v. 71(1), p. 87-92, 2008.

47. CHANG, S. F.; CHOU, B. H.; YANG, L. M.; HSU, F. L.; LIN, W. K.; HO, Y.; LIN, S. J. Microbial transformation of isosteviol oxime and the inhibitory

effects on NF-kappaB and AP-1 activation in LPS-stimulated macrophages.

Bioorganic and Medicinal Chemistry, v. 17(17), p. 6348-6356, 2009.

48. CHAGAS, F. O. **Utilização de culturas mistas como estratégia para estimular a biossíntese de produtos naturais por fungos endofíticos.** Dissertação de mestrado. Ribeirão Preto: Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, 2010.
49. CHAVAN, M. J.; WAKTE, P. S.; SHINDE, D. B. Analgesic and anti-inflammatory activities of 18-acetoxy-ent-kaur-16-ene from *Annona squamosa* L. bark. **Inflammopharmacology**, v. 19, p. 111-115, 2011.
50. CHEN, A.R.M.; REESE, P. B. Biotransformation of terpenes from *Stemodia maritima* by *Aspergillus niger* ATCC 9142. **Phytochemistry**, v. 59, p.57-62, 2002.
51. CHEN, A. R. M.; RUDDOCK, P. L. D.; LAMM, A. S.; REYNOLDS, W. F.; REESE, P. B. Stemodane and stemarane diterpenoid hydroxylation by *Mucor plumbeus* and *Whetzelinia sclerotiorum*. **Phytochemistry**, v. 66, p. 1898-1902, 2005.
52. CHEENPRACHA, S.; YODSAOUE, O.; KARALAI, C.; PONGLIMANONT, C.; SUBHADHIRASAKUL, S.; TEWTRAKUL, S.; KANJANA-OPAS, A. Potential anti-allergic *ent*-kaurene diterpenes from the bark of *Suregada multiflora*. **Phytochemistry**, v. 67, p. 2630–2634, 2006.
53. CHIN, Y-W.; BALUNAS, M.; CHAI, H.; KINGHORN, A. D. Drug Discovery from Natural Sources. **The journal of the American Association of Pharmaceutical Scientists**, v. 8, n. 2, p. E239-E253, 2006.
54. CHOU, B.; YANG, L.; CHANG, S.; HSU, F.; LO, C.; LIAW, J.; LIU, P.; LIN, S. Microbial Transformation of Isosteviol Lactone and Evaluation of the Transformation Products on Androgen Response Element. **Journal of Natural Products**, v. 71(4), p. 602-607, 2008

55. CHOUDHARY, M. I.; MOHAMMAD, M. Y.; MUSHARRAF, S. G.; ONAJOB, I.; MOHAMMAD, A.; ANIS, I.; SHAH, M. R.; ATTA-UR-RAHMAN. Biotransformation of clerodane diterpenoids by *Rhizopus stolonifer* and antibacterial activity of resulting metabolites. **Phytochemistry**, v. 90, p. 56-61, 2013.

56. CLAYDEN, J.; GREEVES, N.; WARREN S.; WOTHERS, P. **Organic Chemistry**. 1.ed. Oxford: Oxford University Press, pp. 1270-1271, 2001.

57. CLSI (2008) **Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi**; approved standard CLSI document M38-A2. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne.

58. COOK, I.F.; JEFFERIES, P.R.; KNOX, J.R. Acidic *ent*-kauranoids from the metabolism of *ent*-kaura- 2,16-dien-19-ol in *Gibberella fujikuroi*. **Tetrahedron**, v. 31, p. 251–255, 1975.

59. COREA, G.; FATTORUSSO, E.; LANZOTTI, V.; MEGLIO, P. D.; MAFFIA, P.; GRASSIA, G.; LALENTI, A.; LANARO, A. Discovery and Biological Evaluation of the Novel Naturally Occurring Diterpene Pepluanone as Antiinflammatory Agent. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 48 (22), p.7055-7062, 2005.

60. CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J. Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. **Journal of Natural Products**. v. 23, p. 311-335, 2012.

61. CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J. Natural Products as Sources of New Drugs from 1981 to 2014. **Journal of Natural Products**, v. 79, p. 629-661, 2016.

62. CUADRADO-BERROCAL, I.; GÓMEZ-GAVIRO, M. V.; BENITO, Y.; BARRIO, A.; BERMEJO, J., FERNÁNDEZ-SANTOS, M. E.; SÁNCHEZ, P. L.; DESCO, M.; FERNÁNDEZ-AVILÉS, F.; FERNÁNDEZ-VELASCO, M.; BOSCA, L.; DE LAS HERAS, B. A labdane diterpene exerts ex vivo and in vivo cardioprotection against post-ischemic injury: involvement of AKT-dependent mechanisms. **Biochemical Pharmacology**, v. 93(4), p. 428-439, 2015.

63. CUPERTINO-SILVA, Y. K.; DIAS, T. L. M. F.; MUNIZ, G.; SANTOS, M. S.; TAVARES, J. F.; SILVA, M. S.; ARAUJO JUNIOR, J. X.; MOREIRA, A. M. S.; Atividade antinoceptiva de diterpenos isolados de *Xylopia langsdorffiana* (ANNONACEAE). **Anais do 38º Congresso Brasileiro de Farmacologia e Terapêutica Experimental**: Ribeirão Preto- SP, 2006.

64. DE SOUZA, N. J.; DOHADWALLA, A. N.; REDEN, J. Forskolin: A Labdane Diterpenoid With Antihypertensive, Positive Inotropic, Platelet Aggregation Inhibitory, and Adenylate Cyclase Activating Properties. **Medicinal Research Reviews**, v. 3 (2), p. 201-219, 1983.

65. DEMETZOS, C.; DIMAS, K.; HATZIANTONIIOUS, S.; ANASTASAKI, T.; ANGELOPOULOU, D. Cytotoxic and anti-inflammatory activity of labdane and cisclerodane type diterpenes. **Planta Medica**, v. 67, p. 614–618, 2001.

66. DEV, S.; MISRA, R. C. R. C. **Handbook of Terpenoids, Diterpenoids**. Boca Raton: CRC Press, 1985.

67. DEWICK, P. M. **Medicinal natural Products: A Biosynthetic Approach**. 3 ed. Chichester, England: John Wiley & Sons, Ltd, 2009.

68. DÍEZ, D.; SANCHEZ, J. M.; RODILLA, J. M.; ROCHA, P. M.; MENDES, R. S.; PAULINO, C.; MARCOS, I. S.; BASABE, P.; URONES, J. G. Microbial Hydroxylation of Sclareol by *Rhizopus Stolonifer*. **Molecules**, v.10(8), p. 1005-1009, 2005.

69. DIMAS, K.; PAPADAKI, M.; TSIMPLOULI, C.; HATZIANTONIOU, S.; ALEVIZOPOULOS, K.; PANTAZIS, P.; DEMETZOS, C. Labd-14-ene-8,13-diol (sclareol) induces cell cycle arrest and apoptosis in human breast cancer cells and enhances the activity of anticancer drugs. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 60(3), p. 127-33, 2006.

70. DIMAS, K.; HATZIANTONIOU, S.; TSELENI, S.; KHAN, H.; GEORGOPOULOS, A.; ALEVIZOPOULOS, K.; WYCHE, J. H.; PANTAZIS, P.; DEMETZOS, C. Sclareol induces apoptosis in human HCT116 colon cancer cells in vitro and suppression of HCT116 tumor growth in immunodeficient mice. **Apoptosis**, v. 12(4), p. 685-694, 2007

71. ENDRINGER, D. C.; TAVEIRA, F. S. N.; KONDRATYUKC, T. P.; PEZZUTOC, J. M.; BRAGA, F. C. Cancer chemoprevention activity of labdane diterpenes from rhizomes of *Hedychium coronarium*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 24, p. 408-412, 2014.

72. FABER, K. **Biotransformations in organic chemistry**. Berlin, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, p. 402, 2007.

73. FAROOQ, A.; TAHARA, S. Biotransformation of two cytotoxic terpenes, alpha-santonin and sclareol by *Botrytis cinerea*. **Zeitschrift für Naturforschung C**, v. 55(9-10), p. 713-717, 2000.

74. FERBER, K. **Biotransformation in Organic Chemistry**. 5 ed. Berlin: Springer, 2004.

75. FERREIRA, L. H. M. MARGARIDA, A. V. D.; CARVALHO, M. J. M.; CARVALHO, M. M.; SEQUEIRA, A. M. S. S. Jatrophone and lathyrane diterpenoids from *Euphorbia hyberna* L. **Phytochemistry**, v. 61, p. 373–377, 2002.
76. FOUSTERIS, M. A.; KOUTSOUREA, A. I.; NIKOLAROPOULOS, S. S.; RIAHI, A.; MUZART, J. Improved chromium-catalyzed allylic oxidation of 5-steroids with *t*-butyl Hydroperoxide. **Journal of Molecular Catalysis A: Chemical**, v. 250, pp. 70-74, 2006.
77. FRAGA, B. M.; HANSON, J. R.; HERNÁNDEZ, M. G.; SARAH, F. Y. The microbiological transformation of some *ent*-kaur-16-ene 7-,15- and 18-alcohols by *Gibberella fujikuroi*. **Phytochemistry**, v.19, p. 1087–1091, 1980.
78. FRAGA, B. M.; GONZÁLEZ, A. G.; HANSON, J. R.; HERNÁNDEZ, M. G. The microbiological transformation of some *ent*-3 β -hydroxykaur-16-enes by *Gibberella fujikuroi*. **Phytochemistry**, v. 20, p. 57–61. 1981.
79. FRAGA, B. M.; GONZÁLEZ, A. G.; GONZÁLEZ, P.; HANSON, J. R.; HERNÁNDEZ, M. G.; HITCHCOCK, P. B. The formation of *ent*-6 α ,7 α -epoxykaurene of possible biosynthetic significance by *Gibberella fujikuroi*. **Journal of Chemical society communication**, v. 1, p. 311–312, 1982.
80. FRAGA, B. M.; GONZÁLEZ, A. G.; GONZÁLEZ, P.; HANSON, J. R.; HERNÁNDEZ, M.G. The microbiological transformation of some *ent*-kaur-6,16-dienes by *Gibberella fujikuroi*. **Phytochemistry**, v. 22, p. 691–694, 1983.
81. FRAGA, B. M.; GONZÁLEZ, P.; HERNÁNDEZ, M. G.; GARCÍA-TELLADO, F.; PERALES, A. The microbiological transformation of candidiol, *ent*-15 β ,18-dihydroxy-kaur-16-ene, by *Gibberella fujikuroi*. **Phytochemistry**, v. 25, p. 1235–1237, 1986.

82. FRAGA, B. M.; HERNÁNDEZ, M. G.; RODRIGUES, M. D.; DIAZ, C. E.; GONZÁLEZ, P.; HANSON, J.R. Transformation of *ent*-kaur-15-ene by *Gibberella fujikuroi*. **Phytochemistry**, v. 26, p. 1931–1934, 1987.

83. FRAGA. B. M.; HERNÁNDEZ, M. G.; DIAZ, C. E.; GONZÁLEZ, P.; GUILLERMO, R. The microbiological transformation of some *ent*-15 β -hydroxykaurenes by *Gibberella fujikuroi*. **Phytochemistry**, v. 27, p. 3131–3136, 1988.

84. FRAGA, B. M.; GONZALEZ, P.; GUILLERMO, R.; HERNANDEZ, M. G.; ROVIROSA, J. The microbiological transformation of some *ent*-13-epi-manoyl oxide diterpenes by *Gibberella fujikuroi*. **Phytochemistry**, v. 28, p. 1851– 1854, 1989.

85. FRAGA, B. M.; HERNÁNDEZ, M.G.; GONZÁLEZ, P. The microbiological transformation of some *ent*-7 α ,15 β -dihydroxykaurene derivatives by *Gibberella fujikuroi*. **Phytochemistry**, v. 1, p. 2567–2571, 1991.

86. FRAGA, B. M.; HERNÁNDEZ, M. G.; GONZÁLEZ, P. Biotransformation of two *ent*-15 β -hydroxy kaur- 16-ene derivatives by *Gibberella fujikuroi*. **Phytochemistry**, v. 31, p. 3845–3849, 1992.

87. FRAGA, B. M.; GARCÍA-TELLADO, F.; GONZÁLEZ, P.; HERNÁNDEZ, M.G. The chemical and microbiological synthesis of 14-hydroxy-gibberellins. **Tetrahedron**, v. 48, 8491–8504, 1992.

88. FRAGA, B. M.; HERNÁNDEZ, M. G.; GARCÍA-TELLADO, F.; GONZÁLEZ, P.; PERALES, A. The biotransformation of two *ent*-15 β -16 β -epoxy-kaurane derivatives by *Gibberella fujikuroi*. **Phytochemistry**, v. 34, p. 133–138, 1993.

89. FRAGA, B. M.; GARCÍA-TELLADO, F.; GONZÁLEZ, P.; HERNÁNDEZ, M.G. The microbiological transformation of 14 β ,19-dihydroxy-*ent*-kaur-15-ene by *Gibberella fujikuroi*. **Phytochemistry**, v. 34, p.1035–1040, 1993.

90. FRAGA, B. M.; GONZALEZ, P.; GUILLERMO, R.; HANSON, J. R.; HERNANDEZ, M. G.; TAKAHASHI, J.A. The microbiological transformation of two *ent*-16 β , 17-epoxykaurane derivatives by *Gibberella fujikuroi*. **Phytochemistry**, v. 37, p. 717–721, 1994.

91. FRAGA, B. M.; GONZALEZ, P.; GUILLERMO, R.; HERNANDEZ, M. G.; PERALES, A. The chemical and microbiological preparation of 15-oxo-gibberellin derivatives. **Tetrahedron**, v. 51, p. 10053–10064, 1995.

92. FRAGA, B.M.; HERNÁNDEZ, M.G.; GUILLERMO, R. The biotransformation of two 3,15 oxygenate *ent*-kaurane derivatives by *Gibberella fujikuroi*. **Journal of Natural Products**, v. 59, p. 952–957, 1996.

93. FRAGA, B.M.; GONZÁLEZ, P.; GUILLERMO, R.; HERNÁNDEZ, M.G. A study of microbiological reduction of α,β -unsaturated carbonyl *ent*-kaurenes by *Gibberella fujikuroi*. **Tetrahedron**, v. 52, p. 13767–13782, 1996.

94. FRAGA, B.M.; GONZÁLEZ, P.; GUILLERMO, R.; HERNÁNDEZ, M.G. The formation of an *ent*-11 α ,16 α - epoxykaurene of biosynthetic significance by *Gibberella fujikuroi*. **Natural Products Letters**, v. 8, p. 257–262, 1996.

95. FRAGA, B. M.; GONZALEZ, P.; GUILLERMO, R.; HERNANDEZ, M. G. Microbial transformation of Manoyl oxide derivatives by *Mucor Plumbeus*. **Journal of Natural Products**, v. 61(10), p. 1237-1241, 1998.

96. FRAGA, B. M.; GONZALEZ, P.; GUILLERMO, R.; HERNANDEZ, M. G.
The biotransformation of manoyl oxide derivatives by *gibberella fujikuroi* - the fungal epimerization of an alcohol group. **Tetrahedron**, v. 54(22), p. 6159-6168, 1998.

97. FRAGA, B. M.; GONZÁLEZ, P.; HERNÁNDEZ, M. G.; SUÁREZ, S.
Formation of 2,3-seco-acids in the biotransformation of the diterpene ribenone by *Gibberella fujikuroi*. **Tetrahedron**, v. 55, p. 1781–1792, 1999.

98. FRAGA, B. M.; GUILLERMO, R.; HERNÁNDEZ, M. G.; CHAMY, M. C.; GARBARINO, J. A. The biotransformation of 18-hydroxy-9-epi-*ent*-pimara-7,15-diene by *Gibberella fujikuroi*. **Phytochemistry**, v. 53(3), p. 395-399, 2000.

99. FRAGA, B. M.; GONZÁLEZ, P.; HERNÁNDEZ, M. G.; SUÁREZ, S.
Biotransformation of the diterpene ribenone by *Mucor plumbeus*. **Tetrahedron**, v. 57, p. 761–770, 2001.

100. FRAGA, B. M.; HERNÁNDEZ, M. G.; ARTEGA, J. M.; SUAREZ, S. The microbiological transformation of the diterpenes dehydroabietanol and teideadiol by *Mucor plumbeus*. **Phytochemistry**, v. 63(6), p. 663-668, 2003.

101. FRAGA, B.M.; GUILLERMO, R.; HERNÁNDEZ, M.G. The microbiological transformation of two 15 β -hydroxy-*ent*-kaurene diterpenes by *Gibberella fujikuroi*. **Journal of Natural Products**, v. 67, p. 64–69, 2004.

102. FRAGA, B. M.; GONZALEZ, P.; HERNANDEZ, M. G. J.; SUÁREZ, S.
Biotransformation of 7-oxo-*ent*-kaur-16-ene derivatives by *Gibberella fujikuroi*. **Tetrahedron**, v. 61, p. 5623–5632, 2005.

103. FRAGA, B. M.; BRESSA, C.; GONZÁLEZ, P.; GUILLERMO, R.; HERNÁNDEZ, M. G.; SUÁREZ, S. The microbiological transformation of 7 α -hydroxy-*ent*-kaur-16-enederivates by *Gibberella fujikuroi*. **Phytochemistry**, v. 68, p. 1557-1563, 2007.

104. FRAGA, B. M.; GUILLERMO, R.; HERNÁNDEZ, M. G.; CHAMY, M. C.; GARBARINO, J. A. Biotransformation of two *ent*-Pimara-9(11),15-diene derivatives by *Gibberella fujikuroi*. **Journal of Natural Products**, v. 72, p. 87-91, 2009.

105. FRAGA, B. M.; ALFONSO, I. DE; GONZÁLEZ-VALLEJO, V.; GUILLERMO, R. Microbial transformation of two 15 α -hydroxy-*ent*-kaur-16-ene diterpenes by *Mucor plumbeus*. **Tetrahedron**, v. 66, pp. 227-234, 2010.

106. FRAGA, B. M.; GONZALEZ-VALLEJO, V.; GUILLERMO, R. On the biotransformation of *ent*-trachylobane to *ent*-kaur-11-ene diterpenes. **Journal of Natural Products**, v. 74(9), p. 1985-1989, 2011.

107. FRAGA, B. M.; BRESSA, C.; GONZÁLEZ-VALLEJO, V.; GONZÁLEZ, P.; GUILLERMO, R. Biotransformation of *ent*-kaur-16-ene and *ent*-trachylobane 7 β -acetoxy derivatives by the fungus *Gibberella fujikuroi* (*Fusarium fujikuroi*). **Phytochemistry**, v.81, p. 60–70, 2012.

108. FRAGA, B. M.; GONZÁLEZ-VALLEJO, V.; GUILLERMO, R.; AMARO-LUIS, J. M. Microbiological transformation of two 15 α -hydroxy-*ent*-kaur-9(11),16-diene derivatives by the fungus *Fusarium fujikuroi*. **Phytochemistry**, v. 89, p. 39–46, 2013.

109. FUJITA, E.; NAGAO, Y.; KANEKO, K.; NAKAZAWA, S.; KURODA, H. The antitumor and antibacterial activity of the *Isodon* diterpenoids. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 24, p. 2118-2127, 1976

110. GALLO, M. B. C.; CHAGAS, F. O.; ALMEIDA, M. O.; MACEDO, C. C.; CAVALCANTE, B. C.; BARROS, F. W. A.; MORAES, M. O.; COSTA-LOTUFO, L. V.; PESSOA, C.; BASTOS, J. K.; PUPO, M. T. Endophytic fungi found in association with *Smallanthus sonchifolius* (Asteraceae) as resourceful producers of cytotoxic bioactive natural products. **Journal of Basic Microbiology**, v. 49, p. 142-151, 2009.

111. GARCÍA, P. A.; DE OLIVEIRA, A. B.; BATISTA, R. Occurrence, biological activities and synthesis of kaurane diterpenes and their glycosides. **Molecules**, v. 12, p. 455-83, 2007.

112. GARCÍA-GRANADOS, A.; MARTINEZ, A.; MARTINEZ, J. P.; ONORATO, M. E.; ARIAS, J. M. Biotransformation of *ent*-13-*epi*- and *ent*-manoyl oxides by *Rhizopus nigricans* cultures. **Journal of Chemistry Society Perkin Transactions**, v. 1, P. 1261–1266, 1990.

113. GARCÍA-GRANADO, A.; MARTINEZ, A.; ONORATO, M.E.; RUIZ, M.L.; SÁNCHEZ, J.M.; ARIAS, J.M. Biotransformation of highly substituted *ent*-kaur-16-enes by *Rhizopus nigricans*. **Phytochemistry**, v. 29, p. 121–126, 1990.

114. GARCÍA-GRANADO, A.; MARTINEZ, A.; ORTIZ, A.; ONORATO, M.E.; ARIAS, J.M. Microbiological transformation of tetracyclic diterpenes: Conversion of *ent*-kaurenones by *Curvularia* and *Rhizopus* strains. **Journal of Natural Products**, v. 53, p. 441–450, 1990.

115. GARCÍA-GRANADOS, A.; JIMENEZ, M. B.; MARTINEZ, A.; RIVAS, F.; ONORATO, M. E.; ARIAS, J. M. Chemical-microbiological synthesis of *ent*-13-epi-manoyl oxides with biological activities. **Phytochemistry**, v. 37, p. 741–747, 1994.

116. GARCÍA-GRANADOS, A.; LINÁN, E.; MARTINEZ, A.; RIVAS, F.; ARIAS, J. M.; Preparation of polyoxygenated *ent*-13-epi-manoyl oxides by chemical-microbiological semisyntheses. **Phytochemistry**, v. 38, p. 1237–1244, 1995.

117. GARCÍA-GRANADOS, A.; GUTIERREZ, J. J.; MARTINEZ, A.; RIVAS, F.; ARIAS, J. M. Biotransformation of *ent*-6 α -acetoxo and *ent*-6-ketomanoyl oxides with *Rhizopus nigricans* and *Curvularia lunata* cultures. **Phytochemistry**, v. 45, p. 283–291, 1997.

118. GARCÍA-GRANADOS, A.; MARTÍNEZ, A.; QUIRÓS, R.; EXTREMERA, A. L.; Chemical-microbiological semisynthesis of enantio-Ambrox1 derivatives. **Tetrahedron**, v. 55, p. 8567–8578, 1999.

119. GARCÍA-GRANADOS, A.; MARTÍNEZ, A.; PARRA, A.; RIVAS, F. Manoyl-Oxide Biotransformations with Filamentous Fungi. **Current Organic Chemistry**, v. 11, P. 679-692, 2007.

120. GARCÍA-GRANADOS, A.; FERNÁNDEZ, A.; GUTIÉRREZ, M. C.; MARTÍNEZ, A.; QUIRÓS, R.; RIVAS, F.; ARIAS, J. M. Biotransformation of *ent*-13-epi-manoyl oxides difunctionalized at C-3 and C-12 by filamentous fungi. **Phytochemistry**, v. 65(1), P. 107-115, 2004.

121. GASKIN, P.; HUTCHISON, M.; LEWIS, N.; MACMILLAN, J.; PHINNEY, B.O. Microbiological conversion of 12-oxygenated and other derivatives of *ent*-kaur-16-en-19-oic acid by *Gibberella fujikuroi*. **Phytochemistry**, v. 23, p. 559–564, 1984.

122. GHISALBERTI, E.L.; JEFFERIES, P.R.; SEFTON, M.A.; SHEPPARD, P.N. Microbial transformation of 19-oxygenated *ent*-kauranes. **Tetrahedron**, v. 33, p. 2451–2456, 1977.

123. GHOSH, S.; INDUKURI, K.; BONDALAPATI, S.; SAIKIA, A. K.; RANGAN, L. Unveiling the mode of action of antibacterial labdane diterpenes from *Alpinia nigra* (Gaertn.) B. L. Burtt seeds. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 63, p. 101-105, 2013.

124. GIGANTE, B.; SILVA, A. M.; CURTO, M. M. J.; FEIO, S. S.; ROSEIRO, J.; REIS, L. V. Structural effects on the bioactivity of dehydroabietic acid derivatives. **Planta Medica**, v. 68(8), p. 680-684. 2002.

125. GIRI, A.; DHINGRA, V.; GIRI, C.C.; SINGH, A.; WARD, O.P.; NARASU, L.M. Biotransformations using plant cells, organ cultures and enzyme systems: current trends and future prospects. **Biotechnology Advances**, v. 19, p. 175-199, 2001.

126. GONG, Y.; LI, Y.; LU, Y.; LI, L.; ABDOLMALEKY, H.; BLACKBURN, G. L.; ZHOU, J. R. Bioactive tanshinones in *Salvia miltiorrhiza* inhibit the growth of prostate cancer cells in vitro and in mice. **Internation Journal of Cancer**, v. 129(5), p. 1042-1052, 2011.

127. GORDON, J. F.; HANSON, J. R.; JARVIS, A. G.; RATCLIFFE, A. H. Oxidation of aphidicolin and its conversion into 19-noraphidicolan-16 β -ol. **Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1**, v. 22, p. 3019-3022, 1992.

128. GOUIRIC, S.C.; FERESIN, G.E.; TAPIA, A.A.; ROSSOMANDO, P.C.; SCHMEDA-HIRSCHMANN, G.; BUSTOS, D.A. $1\beta,7\beta$ -Dihydroxydehydroabietic acid, a new biotransformation product of dehydroabietic acid by *Aspergillus niger*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 20, p. 281–284, 2004.

129. GROSS, H. Strategies to unravel the function of orphan biosynthesis pathways: recent examples and future prospects. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 75, p. 267-77, 2009.

130. GU, W.; WANG, S. Synthesis and antimicrobial activities of novel 1H-dibenzo[a,c]carbazoles from dehydroabietic acid. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 45(10), p. 4692-4696, 2010.

131. GUILLOPÉ, R.; ESCOBAR-KHONDIKER, M.; GUÉRINEAU, V.; LAPRÉVOTE, O.; HÖGLINGER, G. U.; CHAMPY, P. Kaurenoic acid from pulp of *Annona cherimolia* in regard to Annonaceae-induced Parkinsonism. **Phytotherapy Research**, v. 25, p. 1861-1864, 2011.

132. GUNATILAKA, A. A. L. Natural products from plant-associated microorganisms: distribution, structural diversity, bioactivity and implications of their occurrence. **Journal of Natural Products**, v. 69, p. 509-526, 2006.

133. GUO, P.; LI, Y.; XU, J.; LIU, C.; MA, Y.; GUO, Y. Bioactive *neo*-Clerodane Diterpenoids from the Whole Plants of *Ajuga ciliata* Bunge. **Journal of Natural Products**, v. 74 (7), p. 1575–1583, 2011.

134. HANSON, J.R.; HITCHCOCK, P.B.; TAKAHASHI, J.A. Biotransformation of *ent*-16 β ,19-dihydroxykaurane by *Cephalosporium aphidicola*. **Phytochemistry**, v. 40, p. 797-800, 1995.

135. HANSON, J. R.; WHITE, A. F. The transformation of steviol by *Gibberella fujikuroi*. **Tetrahedron**, v. 24, p. 6291–9293, 1968.

136. HANSON, J. R.; HAWKER, J.; WHITE, A. F. Studies in terpenoid biosynthesis. Part IX. The sequence of oxidation on ring B in kaurene-gibberellin biosynthesis. **Journal of Chemistry Society Perkin Transactions**, v. 1, p. 1892–1895, 1972.

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

138. HANSON, R.H. Diterpenoids. **Natural Products Report**, v. 22, p. 594-602, 2006.

139. HATZIANTONIOU, S.; DIMAS, K.; GEORGOPOULOS, A.; SOTIRIADOU, N.; DEMETZOS, C. Cytotoxic and antitumor activity of liposome-incorporated sclareol against cancer cell lines and human colon cancer xenografts. **Pharmacological Research**, v. 53(1), p. 80-87, 2006.

140. HE, W.; LIU, M.; LI, X.; ZHANG, X.; ABDEL-MAGEED, W. M.; WANG, L. L. W.; ZHANG, J.; HAN, J.; DAI, H.; QUINN, R. J.; LIU, H.; LUO, H.; ZHANG, L.; LIU, X. Fungal biotransformation of tanshinone results in [4+2] cycloaddition with sorbicillinol: evidence for enzyme catalysis and increased antibacterial activity. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 100 (19), p. 8349-8357, 2016.

141. HERTWECK, C. Hidden biosynthetic treasures brought to light. **Nature Chemical Biology**, v. 5, p. 450-452, 2009.

142. HOSONO, M.; TAKAHIRA, T.; FUJITA, A.; FUJIHARA, R.; ISHIZUKA, O.; OHIO, I.; TATEE, T.; NAKAMURA, K. Cardiovascular effects of NICH 477, a novel potent water soluble forskolin derivative. **European Journal of Pharmacology**, v. 183, p. 2110-2116, 1990.

143. HOSNY, M.; JOHNSON, H. A.; UELTSCHY, A. K.; ROSAZZA, J. P. Oxidation, reduction, and methylation of carnosic acid by *Nocardia*. **Journal of Natural Products**, v. 65(9), p. 1266-1269, 2002.

144. HSU, F. L.; HOU, C. C.; YANG, L. M.; CHENG, J. T.; CHI, T. C.; LIU, P. C.; LIN, S. J. Microbial transformations of isosteviol. **Journal of Natural Products**, v. 65(3), p.273-277, 2002.

145. HU, S.H.; GENAIN, G. E.; AZERAD, R.; Microbial transformation of steroids: Contribution to 14 α -hydroxylations. **Steroids**, v. 60, p. 337-352, 1995.

146. HUANG, G. J.; PAN, C. H.; WU, C. H. Sclareol exhibits anti-inflammatory activity in both lipopolysaccharide-stimulated macrophages and the λ -carrageenan-induced paw edema model. **Journal of Natural Products**, v. 75(1), p. 54-59, 2012.

147. IPSEN, J.; FUSKA, J.; FOSKOVA, A.; ROSAZZA, J. P. Microbial transformations of natural antitumor agents. Conversions of aphidicolin. **Journal of Organic Chemistry**, v. 47(17), p. 3278-3282, 1982.

148. IPSEN, J.; ROSAZZA, J. Microbial transformations of natural antitumor agents, 25. Conversions of 3-ketoaphidicolin. **Journal of Natural Products**, v. 47(3), p. 497-503, 1984.

149. ISHIKAWA, T.; CHAICHANTIPYUTH, C.; PETSOM, A.; TAWEECHOTIPATR, P.; MUANGSIN, N.; CHAICHIT, N.; PUTHONG, S.; ROENGSUMRAN, S.; KAWAHATA, M.; WATANABE, T. New Labdane-Type Diterpenoids from *Croton oblongifolius* and Their Cytotoxic Activity. **Heterocycles**, v. 65, p.809-815, 2005.

150. KALPOUTZAKIS, E.; CHINOUE, I.; MITAKU, S.; SKALTSOUNIS, A. L.; HARVALA, C. Antibacterial labdane-type diterpenes from the resin "ladano" of *Cistus creticus subsp. creticus*. **Natural Products Letters**, v.11, p.173-177, 1998.

151. KAYSER, O.; KIDERLEN, A. F.; BERTELS, S.; SIEMS, K. Antileishmanial activities of aphidicolin and its semisynthetic derivatives. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 45, p. 288-292, 2001.

152. KHAN, A. L.; HUSSAIN, J.; HAMAYUN, M.; GILANI, S. A.; AHMAD, S.; REHMAN, G.; KIM, Y. H.; KANG, S. M.; LEE, I. J. Secondary metabolites from *Inula britannica* L. and their biological activities. **Molecules**, v. 15, p. 1562-1577, 2010.

153. KIM, S.; NA, M.; OH, H.; JANG, J.; SOHN, C. B.; KIM, B. Y.; OH, W. K.; AHN, J. S. PTP1B inhibitory activity of kaurane diterpenes isolated from *Siegesbeckia glabrescens*. **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**, v. 21, p. 379–383, 2006.

154. KINGHOM, D., O'NEIL, M. O. ACS Symp. Ser. 1996, 179, 647.

155. KINOUECHI, K.; OHTSU, H.; TOKUDA, H.; NISHINO, H.; MATSUNAGA, S.; TANAKA, R. Potential antitumor-promoting diterpenoids from the stem bark of *Picea glehni*. **Journal of Natural Products**, v. 63(6), p. 817-20, 2000.

156. KOYANAGI, T.; KATAYAMA, T.; SUZUKI, H.; NAKAZAWA, H.; YOKOZEKI, K.; KUMAGAI, H. Effective production of 3,4-dihydroxyphenyl-L-alanine (L-DOPA) with *Erwinia herbicola* cells carrying a mutant transcriptional regulator TyrR. **Journal of Biotechnology**, v.115(3), p. 303–306, 2005.

157. KUTNEY, J. P.; BERSET, J. D.; HEWITT, G. M.; SINGH, M. Biotransformation of Dehydroabietic, Abietic, and Isopimaric Acids by *Mortierella isabellina* Immobilized in Polyurethane Foam. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 54(4), p. 1015-1022, 1988.

158. KUZMA, L.; ROZALSKI, M.; WALWNCKA, E.; ROZALSKA, B.; WYSOKINSKA, H. Antimicrobial activity of diterpenoids from hairy roots of *Salvia sclarea* L.: Salvipisone as a potential anti-biofilm agent active against antibiotic resistant *Staphylococci*. **Phytomedicine**, v. 14, p. 31-35, 2007.

159. LAM, B. Y.; LO, A. C.; SUN, X.; LUO, H. W.; CHUNG, S. K.; SUCHER, N. J. Neuroprotective effects of tanshinones in transient focal cerebral ischemia in mice. **Phytomedicine**, v.10(4), p. 286-291, 2003.

160. LAMM, A. R.; REYNOLDS, W. F.; REESE, P. B. Bioconversion of *Stemodia maritima* diterpenes and derivatives by *Cunninghamella echinulata* var. *elegans* and *Phanerochaete chrysosporium*. **Phytochemistry**, v. 67(11), p. 1088-1093, 2006.

161. LAVAGNINI, C. G.; DI CARNE, C. A. V.; CORREA, F.; HENRIQUE, F.; TOKUMO, L. E.; SILVA, M. H.; SANTOS, P. C. S. Fisiologia vegetal - hormônio giberelina. **Revista Científica Eletrônica de Agronomia**, v. 25 (1), p.48-52, 2014.

162. LEGRAS, J.-L.; MERDINOGLU, D.; CORNUET, J.-M.; KARST, F. Bread, beer and wine: *Saccharomyces cerevisiae* diversity reflects human history. **Molecular Ecology**, v.16, n.10, pp. 2091-2102, 2007.

163. LEKMAN, R.; SJOHOLM, R. Hydroxylation of Dehydroabietic acid by *Fomes annosus*. **Acta Chemica Scandinavica**, v. 33, p. 76-78, 1979.

164. LEUENBERGER, H. G. W. Interrelations of chemistry and biotechnology - I. Biotransformation - a useful tool in organic chemistry. **Pure Applied Chemistry**, v. 62(4), p. 753-768, 1990.

165. LEVERRIER, A.; MARTIN, M. T.; SERVY, C.; OUAZZANI, J.; RETAILLEAU, P.; AWANG, K.; MUKHTAR, M. R.; GUÉRITTE, F.; LITAUDON, M. Rearranged diterpenoids from the biotransformation of *ent*-trachyloban-18-oic acid by *Rhizopus arrhizus*. **Journal of Natural Products**, v. 73(6), p. 1121-1125, 2010.

166. LI, C.; LEE, D.; GRAF, T. N.; PHIFER, S. S.; NAKANISH, Y.; BURGESS, J. P.; RISWAN, S. J.; SETYOWATI, F. M.; SARIBI, A. M.; SOERJARTO, D. D.; FARNSWORTH, N. R.; FALKINHAM, J. O.; KROLL, D. J.; KINGHORN, A. D.; WANI, M. V.; OBERLIES, N. H. A hexacyclic *ent*-trachylobane diterpenoid possessing an oxetane ring from *Metrephora glabra*. **Organic Letters**, v. 7, n. 5, p. 5709-5712, 2005.

167. LI, X.; NIE, L.; YANG, W.; CHEN, Z.; WANG, X.; LUO, L.; Suppressing effect of isoforskolin and forskolin on ocular hypertension in rabbits. **Zhonghua Yan Ke Za Zhi**, v. 36(4), p. 292-294, 2000.

168. LIN, C.; WANG, L.; WANG, H.; YANG, L.; GUO, H.; WANG, X. Tanshinone IIA inhibits breast cancer stem cells growth in vitro and in vivo through attenuation of IL-6/STAT3/NF-kB signaling pathways. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 114(9), p. 2061-2070, 2013.

169. LIN, L.; GAO, Q.; CUI, C.; ZHAO, H.; FU, L.; CHEN, L.; YANG, B.; LUO, W.; ZHAO, M. Isolation and identification of *ent*-kaurane-type diterpenoids from *Rabdosia serra* (MAXIM.) HARA leaf and their inhibitory activities against HepG-2, MCF-7, and HL-60 cell lines. **Food Chemistry**, v. 131, p. 1009–1014, 2012.

170. LIN, R.; WANG, W. R.; LIU, J. T.; YANG, G. D.; HAN, C. J. Protective effect of tanshinone IIA on human umbilical vein endothelial cell injured by hydrogen peroxide and its mechanism. **Journal of Ethnopharmacology**, v.108, p. 217–222, 2006.

171. LIN, S. J.; ROSAZZA, J. P. Microbial Transformations of Isocupressic Acid. **Journal of Natural Products**, v. 61, p.922-926, 1998.

172. LIN, S. J.; SHORT, R. E.; FORD, S. P.; GRINGS, E. E.; ROSAZZA, J. P. In vitro biotransformations of isocupressic acid by cow rumen preparations: formation of agathic and dihydroagathic acids. **Journal of Natural Products**, v. 6(1), p.51-56, 1998.

173. LISS, S. N.; BICHO, P. A.; SADDLER, J. N. Microbiology and biodegradation of resin acids in pulp mill effluents: a minireview. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 43(7), p. 599-611. 1997.

174. MARQUINA, S.; PARRA, J. L.; GONZÁLEZ, M.; ZAMILPA, A.; ESCALANTE, J.; HERNÁNDEZ-TEJO, M. R.; ALVARES, L. Hydroxylation of the diterpenes *ent*-kaur-16-en-19-oic and *ent*-beyer-15-en-19-oic acids by the fungus *Aspergillus niger*. **Phytochemistry**, v. 70, p. 2017-2022, 2009.

175. MARTIN, G.D.; REYNOLDS, W. F.; REESE, P. B. Investigation of the importance of the C-2 and C-13 oxygen functions in the transformation of stemodin analogues by *Rhizopus oryzae* ATCC 11145. **Phytochemistry**, v. 65(15), p. 2211-2217, 2004a.

176. MARTIN, G.D.; REYNOLDS, W. F.; REESE, P. B. Investigation of the importance of C-2 oxygen function in the transformation of stemodin analogues by *Rhizopus oryzae* ATCC 11145. **Phytochemistry**, v. 65, p. 701-710, 2004b.

177. MARTIN, V. J. J.; YU, Z.; MOHN, W. W. Recent advances in understanding resin acid biodegradation: microbial diversity and metabolism. **Archives of Microbiology**, v. 172, p. 131- 138, 2012.

178. MARTINSEN, A.; BACCELLI, C.; NAVARRO, I.; ABAD, A.; QUETIN-LECLERCQ, J.; MOREL, N. Vascular activity of a natural diterpene isolated from *Croton zambesicus* and of a structurally similar synthetic trachylobane. **Vascular Pharmacology**, v. 29, p. 63–69, 2009.

179. MENDOZA, L.; SEPÚLVEDA, C.; MELO, R.; COTORAS, M. Characterization of the antifungal activity against *Botrytis cinerea* of sclareol and 13-*epi*-sclareol, two labdane-type diterpenoids. **Journal of the Chilean Chemical Society**, v. 60(3), p. 3024-3028, 2015

180. MERRITT, A. T.; LEY, S. V. Clerodane diterpenoids. **Natural Products Reports**, v. 9, p. 243-287, 1992.

181. MIRANDA, F. J.; ALABADÍ, J. A.; ORTÍ, M.; CENTENO, J. M.; PINON, M. YUSTE, A.; SANZ-CERVERA, J. F.; MARCO, A.; ALBORCHT, E. Comparative Analysis of the Vascular Actions of Diterpenes Isolated from *Euphorbia canariensis*. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 50, p. 237-241, 1998.

182. MITSUKURA, K.; IMOTO, T.; NAGAOKA, H.; YOSHIDA, T.; NAGASAWA, T. Regio- and Stereo-selective Hydroxylation of Abietic Acid Derivatives by *Mucor circinelloides* and *Mortierella isabellina*. **Biotechnology Letters**, v. 27, p. 1305-1310, 2005.

183. MOSADDIK, M. A. In vitro cytotoxicity of tanshinones isolated from *Salvia miltiorrhiza* Bunge against P388 lymphocytic leukemia cells. **Phytomedicine**, v. 10(8), p. 682-685, 2003.

184. MUZART, J. Bimetallic oxidation catalysts: oxidations with *tert*-butylhydroperoxide mediated by bis-(tributyltin oxide) dioxochromium(VI). **Synthetic Communications**, v.19, pp. 2061-2067, 1989.

185. NAGAO, Y.; ITO, N.; KOHNO, T.; KURODA, H.; FUJITA, E. Antitumor activity of Rabdosis and Teucrium diterpenoids against P 388 lymphocytic leukemia in mice. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 30, p. 727-729, 1982.

186. NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural Products as source of new drugs over the last 25 years. **Journal of Natural Products**, v. 70, p. 461-477, 2007.

187. OHKOSHI, E.; KAMO, S.; MAKINO, M.; FUJIMOTO, Y. ent-Kaurenoic acids from Mikania hirsutissima (Compositae). **Phytochemistry**, v. 65, p. 885–890, 2004.

188. OHWADA, T.; NONOMURA, T.; MAKI, K.; SAKAMOTO, K.; OHYA, S.; MURAKI, K.; IMAIZUMI, Y. Dehydroabietic acid derivatives as a novel scaffold for large-conductance calcium-activated K⁺ channel openers. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 13(22), p. 3971-3974, 2003.

189. OLIVEIRA, A. B.; HANSON, J. R.; TAKAHASHI, J. A. The biotransformation of *ent*-15-oxo-kaur-16-en-19-oic acid and its methyl ester by *Cephalosporium aphidicola*. **Phytochemistry**, v. 40, p. 439–442, 1995.

190. OLIVEIRA, B. H.; SANTOS, M. C.; LEAL, P. C. Biotransformation of the diterpenoid, isosteviol, by *Aspergillus niger*, *Penicillium chrysogenum* and *Rhizopus arrhizus*. **Phytochemistry**, v. 51(6), p. 737-741, 1999.

191. OLIVEIRA, B. H.; FILHO, J. D. F.; LEAL, P. C. Biotransformation of steviol by *Aspergillus niger* and *Fusarium moniliforme*. **Journal of Brazilian Chemical Society**, v. 16, p. 210–213, 2005.

192. OLIVEIRA, K. B.; OLIVEIRA, B. H. Obtenção de substâncias bioativas através da biotransformação de produtos naturais. **Revista eletrônica de Farmácia**, v. 9(1), p.89-99, 2012.

193. OLIVEIRA, S. Q.; MARIA TEREZA ROJO DE ALMEIDA, M. T. R.; MARASLIS, F.; SILVA, I. T.; SINCERO, T. C. M.; PALERMO, J. A.; CABRERA, G. M.; CARO, M. S. B.; SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P. Isolation of three new *ent*-labdane diterpenes from *Dodonaea viscosa Jacquin* (Sapindaceae): Preliminary evaluation of antiherpes activity. **Phytochemistry Letters**, 2012.

194. PATEL, R. N. Synthesis of chiral pharmaceutical intermediates by biocatalysis; **Coordination Chemistry Reviews**, v. 252, p. 659-701, 2008.

195. PATERSON, P.; ANDERSON, E. A. The Renaissance of Natural Products as Drug Candidates. **Science**, v. 310, p. 450-453, 2014.

196. PECHWANG, J.; SIHANONTH, P.; PORNPAAKAKUL, S.; MUANGSIN, N.; PIAPUKIEW, J.; VANGNAI, A.; CHAICHIT, N.; CHUCHAWANKUL, S.; PETSOM, A. Biotransformation of *ent*-kaur-16-en-19-oic acid by *Psilocybe cubensis*. **Natural Products Reports**, v. 24, p. 905–914, 2010.

197. PFISTERER, P. H.; ROLLINGER, J. M.; SCHYSCHKA, L.; RUDY, A.; VOLLMAR, A. M.; STUPPNER, H. Neoandrographolide from *Andrographis paniculata* as a potential natural chemosensitizer. **Planta Medica**, v. 76, p. 1698-1700, 2010.

198. PITA, J. C. L. R.; XAVIER, A. L.; SOUSA, T. K. G. S.; MANGUEIRA, V. M.; TAVARES, J. F.; OLIVEIRA-JUNIOR, R. J.; VERAS, R. C.; PESSOA, H. L. F.; SILVA, M. S.; MORELLI, S.; ÁVILLA, V. M. R.; SILVA, T. G.; DINIZ, M. F. F. M. D.; CASTELLO-BRANCO, M. V. S. *In Vitro* and *in Vivo* Antitumor Effect of Trachylobane-360, a Diterpene from *Xylopia langsdorffiana*. **Molecules**, v. 17, p. 9573-9589, 2012.

199. PORTO, T. S.; FILHO, A. A. S.; MAGALHÃES, L. G.; DOS SANTOS, R. A.; FURTADO, N. A. J. C.; ARAKAWAC, N. S.; SAID, S.; DE OLIVEIRA, D. C. R.; GREGÓRIO, L. E.; RODRIGUES, V.; VENEZIANI, R. C. S.; AMBRÓSIO, S. Fungal Transformation and Schistosomicidal Effects of Pimaradienoic Acid. **Chemistry and Biodiversity**, v. 9, p. 1465-1474, 2012.

200. PRINZ, S.; MULLNER, U.; HEILMANN, J.; WINKEL-MANN, K.; HASLINGER, E.; HUFNER, A. Oxidation products of abietic acid and its methyl ester. **Journal of Natural Products**, v. 65(11), p. 1530-34, 2002.

201. PUPO, M. T.; GUIMARÃES, D. O.; FURTADO, N. A. J. C.; BORGES, W. S. Microbial natural products: a promising source of bioactive compounds. In: TAFT, C. A. **Modern Biotechnology in Medicinal Chemistry and Industry**. Kerala: Research Signpost, p. 51-78, 2006.

202. QIN, B.; PERRY, L. G.; BROECKLING, C. D.; DU, J.; STERMITZ, F. R.; PASCHKE, M. W.; VIVANCO, J. M. Phytotoxic Allelochemicals From Roots and Root Exudates of Leafy Spurge (*Euphorbia esula* L.). **Plant Signal Behaviour**, v. 1, p. 323-327, 2006.

203. QUEIROGA, K. F.; TAVARES, J. F.; ALMEIDA, J. R. G. S.; MARTINS, R. M.; SILVA, T. M. S.; SILVA, M. S. Atividade moluscicida de diterpenos isolados de *Xylopija langsdorffiana* A. St.; Hil & Tul (Annonaceae). In: 29 reunião anual da Sociedade Brasileira de Química, 2006, Águas de Lindóia. **Livro de resumos** da 28 reunião anual da Sociedade Brasileira de Química, 2006.

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

205. RAVIKANTH, V.; NIRANJAN REDDY, V. L.; PRABHAKAR RAO, T.; DIWANB, P.V.; RAMAKRISHNAB, S.; VENKATESWARLU,Y. Macrocyclic diterpenes from *Euphorbia nivulia*. **Phytochemistry**, 59, p. 331-335, 2002.

206. RIVILLA, C. P. Estudio de los hongos filamentosos *Botrytis cinerea*, *Trichoderma viride* y *Eutypa lata* como potenciales biocatalizadores. Diseño y síntesis de sustancias con actividad antifúngica mediante el uso de sistemas biológicos. Puerto Real: Universidad de Cádiz, 2009.

207. RIZZO, C. J.; SMITH, A. B. Aphidicolin synthetic studies: a stereocontrolled end game. **Journal of the Chemical Society Perkin Transactions**, v. 5, p. 969-979, 1991.

208. RUIZ, Y.; RODRIGUES, J.; ARVELO, F.; USUBILLAGA, A.; MONSALVE, M.; DIEZ, N; GALINDO-CASTRO, I. Cytotoxic and apoptosis-inducing effect of *ent*-15- oxo-kaur 16-en-19-oic acid, a derivative of grandiflorolic acid from *Espeletia schultzei*. **Phytochemistry**, v. 69, n. 2, pp. 432-438, 2008.

209. RYU, S.Y.; LEE, C. O.; CHOI, A. U. In vitro Cytotoxicity of tanshinones from *Salvia miltiorrhiza*. **Planta Medica**, v. 63, p. 339-342, 1997.

210. SAIRAFIANPOUR, M.; CHRISTENSEN, J.; STAERK, D.; BUDNIK, B. A.; KHARAZMI, A. BAGHERZADEH, K.; JAROSZEWSKI, J. W. Leishmanicidal, antiplasmodial, and cytotoxic activity of novel diterpenoid 1, 2-quinones from *Perovskia abrotanoides*: new source of tanshinones. **Journal of Natural Products**, v. 64, p. 1398–1403, 2001.

211. SANTOS, R, F.; MARTINS, I. R. R.; TRAVASSOS, R. A.; TAVARES, J. F.; SILVA, M. S.; EDGAR J.; PAREDES-GAMERO, E. J.; FERREIRA, A. T.; NOUAILHETAS, V. L. A.; ABOULAFIA, J.; VERA L.S.; RIGONI, V. S. L.; SILVA, B. A. *Ent*-7 α -acetoxyrachyloban-18-oic acid and *ent*-7 α -hydroxyrachyloban-18-oic acid from *Xylopia langsdorfiana* A. St-Hil. & Tul. modulate K⁺ and Ca²⁺ channels to reduce cytosolic calcium concentration

- on guinea pig ileum. **European Journal of Pharmacology**, v. 678, p. 39-37, 2012.
212. SANTOS, G. B.; ALMEIDA, M. O.; CARDOSO, I. A.; MANFRIM, V.; CHAGAS, F. O.; TOLEDO, J. S.; PINZAN, C. C.; ARAUJO, A. S.; CRUZ, A. K.; PUPO, M. T.; EMERY, F. S. The semisynthetic landscape of aphidicolin: inspiration towards leishmanicidal compounds. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 25(10), p. 1885-1899, 2014.
213. SCHLEPPER, M.; THORMANN, J.; MITROVIC, V. Cardiovascular Effects of Forskolin and Phosphodiesterase-iii Inhibitors. **Basic Research in Cardiology**, v. 84, p. 197-212, 1989.
214. SEAMON, K. B.; DALY, J. W. Forskolin: A Unique Diterpene Activator of Cyclic AMP Generating System. **Journal of Cyclic Nucleotide Research**, v. 7, p. 201-224, 1981.
215. SEBISUBI, F. M.; ODYK, O.; ANOKBONGGO, W. W.; OGWAL-OKENG, J.; CARCACHE- BLANCO, E. J.; MA, C.; ORJALA, J.; TAN, G.T. Antimalarial activity of *Aspilia pruliseta*, a medicinal plant from Uganda. **Planta Medica**, v. 76, p. 1870-1873, 2010.
216. SEPÚLVEDA, B.; ASTUDILLO, L.; RODRÍGUEZ, J. A.; YÁNES, T.; THEODULOZ, C.; SCHMEDA-HIRSCHMANN, G. Gastroprotective and cytotoxic effect of dehydroabietic acid derivatives. **Pharmacology Research**, v. 52(5), p. 429-437, 2005.
217. SETO, C.; EGUCHI, S.; ARAIE, M. Acute effects of topical forskolin on aqueous humor dynamics in man. **Japanese Journal of Ophthalmology**, v. 30, p. 238-244, 1986.

218. SEVERIANO, M. E.; SIMÃO, M. R.; PORTO, T. S.; MARTIN, C. H. G.; VENEZIANI, R. C. S.; FURTADO, N. A. J.; ARAKAWA, N. S.; SAID, S.; DE OLIVEIRA, D. C. R.; CUNHA, W. R.; GREGORIO, J. E.; AMBROSIO, S. R. Anticariogenic Properties of *ent*-Pimarane Diterpenes Obtained by Microbial Transformation **Molecules**, v. 15(12), p. 8553-8566, 2010.

219. SEVERIANO, M. E.; SIMÃO, M. R.; RAMOS, H. P.; PARREIRA, R. L.; ARAKAWA, N. S.; SAID, S.; FURTADO, N. A.; DE OLIVEIRA, D. C.; GREGÓRIO, L. E.; TIRAPELLI, C. R.; VENEZIANI, R. C.; AMBRÓSIO, S. R. Biotransformation of *ent*-pimaradienoic acid by cell cultures of *Aspergillus niger*. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 21, p. 5870-5875, 2013.

220. SHIGEMATSU, Y.; MUROFUSHI, N.; TAKAHASHI, N. Structures of the metabolites from steviol methyl ester by *Gibberella fujikuroi*. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 46, p. 2313–2318, 1982.

221. SILVA, E. A.; TAKAHASHI, J. A.; BOAVENTURA, M. A. D.; OLIVEIRA, A. B. The biotransformation of *ent*-kaur-16-en-19-oic acid by *Rhizopus stolonifer*. **Phytochemistry**, v. 52, p. 397–400, 1999.

222. SILVA, E. A.; TAKAHASHI, J. A.; OLIVEIRA, A. B. An Interesting Backbone Rearrangement and Novel Derivatives from the Biotransformation of Trachyloban-19-oic Acid by *Rhizopus stolonifer*. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 13(1), p. 101-105, 2002.

223. SILVA, M. V. B.; ANAZETTI, M. V.; TAVARES, J. F.; SILVA, M. S.; DINIZ, M. F. F. M.; MELO, P. S.; HAUN, M. Comparative cytotoxicity of diterpenes isolated from *Xylopia langsdorffiana* on humanic leukaemia cells. **Brasilian Journal of Science**. v. 41, p. 481, 2005.

224. SINGH, G. M.; HEWITT, P. J.; SALISBURY, B. R.; WORTH, J. A.; SERVIZI, D. W.; GORDON, R. W. Studies related to biological detoxification of kraft pulp mill effluent. I. The biodegradation of dehydroabietic acid with *Mortierella isabellina*. **Canadian Journal of Chemistry**, v. 59, p. 2334-2341, 1981.

225. SINGLETARY, K. W.; NELSHOPPEN, J. M. Inhibition of 7,12-dimethylbenzanthracene- (DMBA) induced mammary tumorigenesis and of *in vivo* formation of mammary DMBA DNA adducts by rosemary extract. **Cancer Letters**, v. 60, p. 69–175, 1991.

226. SOUZA, A. B.; DE SOUZA, M. G.; MOREIRA, M. A.; MOREIRA, M. R.; FURTADO, N. A.; MARTINS, C. H.; BASTOS, J. K.; DOS SANTOS, R. A.; HELENO, V. C.; AMBROSIO, S. R.; VENEZIANI, R. C. Antimicrobial evaluation of diterpenes from *Copaifera langsdorffii* oleoresin against periodontal anaerobic bacteria. **Molecules**, v. 16(11), p. 9611-9619, 2011.

227. SPADARI, S.; FOCHER, F.; KUENZLE, C.; COREY, E. J.; MYERS, A. G.; HARDT, N.; REBUZZINI, A.; CIARROCCHI, G.; PEDRALINOY, G. In vivo distribution and activity of aphidicolin on dividing and quiescent cells. **Antiviral Research**, v. 5, p. 93- 101, 1985.

228. SPAKOWICZ, D. J.; STROBEL, S. A. Biosynthesis of hydrocarbons and volatile organic compounds by fungi: bioengineering potential. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 99(12), p. 4943-4951, 2015.

229. SUN, J.; YANG, M.; MA, X.; KANG, J.; HAN, J.; GUO, D. Microbial biotransformation of cryptotanshinone by *Cunninghamella elegans* and its application for metabolite identification in rat bile. **Journal of Asian Natural Products Research**, v. 11(6), p. 482-489, 2013.

230. TAKAHASHI, J. A.; GOMES, D. C.; LYRA, F. H.; SANTOS, G. F.; MARTINS, L. R. The Remarkable Structural Diversity Achieved in ent-Kaurane Diterpenes by Fungal Biotransformations. **Molecules**, v. 19, p. 1856-1886, 2014.

231. TAPIA, A. A.; VALLEJO, M. D.; GOUIRIC, S. S.; FERESIN, G. E.; ROSSOMANDO, P. C.; BUSTOS, D. A. Hydroxylation of dehydroabietic acid by *Fusarium* species. **Phytochemistry**, v. 46, p. 131–133, 1997.

232. TAVARES, J. F.; QUEIROGA, K. F.; SILVA, M. V. B.; DINIZ, M. F. F. M.; BARBOSA-FILHO, J. M.; CUNHA, E. V. L.; SIMONE, C. A.; ARAÚJO-JUNIO, J. X.; MELO, P. S.; HAUN, M.; SILVA, M. S. Ent-Trachylobane diterpenoids from *Xylopia langsdorffiana*. **Journal of Natural Products**, v. 69, p. 960-962, 2006.

233. TAVEEPANICH, S.; MUANGSIN, N.; SAITHONG, S.; PAKAWATCHAI, C.; CHAICHIT, N.; ROENGSUMRAN, S.; PETSOM, A. Biotransformation of ent-kaur-16-en-19-oic acid by *Absidia blakesleeana* and *Rhizopus oligosporus*. **Natural Products Reports** v. 24, p. 1050–1058, 2010.

234. THEODULOZ, C.; RODRIGUEZ, J. A.; PERTINO, M.; SCHMEDA-HIRSCHMAN, G. Antiproliferative activity of the diterpenes jatrophone and jatropholone and their derivatives. **Planta Medica**, v. 75, p. 1520-1522, 2009.

235. TIRAPELLI, C. R.; AMBROSIO, S. R.; DA COSTA, F. B.; DE OLIVEIRA, A. M. **Diterpenes: a therapeutic promise for cardiovascular diseases**. Recent Patents on Cardiovascular Drug Discovery, v. 3, p. 1-8, 2008

236. TORRENEGRA, R.; GOMEZ, D. L.; TELLEZ, A. N. Gibberelic activity of diterpenes derivatives of kaurenes isolated from *Espeletiaopsis santanderensis* Cuatr. **Actualidades Biológicas** v. 23, n. 75, 19-22, 2001.

237. TSIRI, D.; GRAIKOU, K.; POBLOCKA-OLECH, L.; KRAUZE-BARANOWSKA, M.; SPYROPOULOS, C.; CHINOU, I. Chemosystematic value of the essential oil composition of *Thuja* species cultivated in Poland-antimicrobial activity. **Molecules**, v. 14, p. 4707-4715, 2009.

238. ULUBELEN, A; BIRMAN, H; OKSUZ, S; TOPCU, G; KOLAK, U; BARLA, A; VOELTER, W. Cardioactive diterpenes from the roots of *Salvia eriophora*. **Planta Medica**, v. 68, p. 818-821, 2002.

239. VAN BEEK, T. A.; CLAASSEN, F. W.; DORADO, J.; GODEJOHANN, M.; SIERRA, A. R.; WIJNBERG, J. B. P. A. Fungal biotransformation products of dehydroabietic acid. **Journal of Natural Products**, v. 70(2), p. 154-159, 2007.

240. VIEIRA, H. S.; TAKAHASHI, J. A.; 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.

241. VIEIRA, H. S.; TAKAHASHI, J.A.; BOAVENTURA, M.A.D. Novel derivatives of *ent*-17,19 dihydroxy- 16 β H-kaurane obtained by biotransformation with *Verticillium lecanii*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 3704–3707, 2002.

242. WADA, K.; IMAI, T.; SHIBATA, K. Microbial productions of unnatural gibberellins from (–)-kaurene derivatives in *Gibberella fujikuroi*. **Agricultural and Biology Chemistry**, v. 43, p. 1157–1158, 1970.

243. WADA, K.; YAMASHITA, H. Synthesis and microbial transformation of *ent*-12 β -hydroxykaur-16- ene. **Agricultural and Biology Chemistry**, v. 44, p. 2249–2250, 1980.

244. WADA, K.; IMAI, T.; YAMASHITA, H. Microbiological production of plant gibberellins and related compounds from *ent*-kaurane derivatives in *Gibberella fujikuroi*. **Agricultural and Biology Chemistry**, v. 45, p. 1833–1842, 1981.

245. WOLDEMICHAEL, G. M.; WÄCHTER, G.; SINGH, M. P.; MAIESE, W. M. Antibacterial diterpenes from *Calceolaria pinifolia*. **Journal of Natural Products**, v. 66(2), p. 242-246, 2003.

246. WONG, K. K.; NGO, J. C.; LIU, S.; LIN, H. Q.; HU, C.; SHAW, P. C.; WAN, D. C. Interaction study of two diterpenes, cryptotanshinone and dihydrotanshinone, to human acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase by molecular docking and kinetic analysis. **Chemico-Biological Interactions**. v. 187, p. 335-339, 2010.

247. WU, Y. B.; NI, Z.Y.; SHI, Q.W.. Constituents from *Salvia* species and their biological activities. **Chemical Reviews**. v. 112 (11), p. 5967–6026, 2012.

248. WU, Y. C.; HUNG, Y. C.; CHANG, F. R.; COSENTINO, M.; WANG, H. K.; LEE, K. H. Identification of *ent*-dihydroxykauran-19-oic acid as an anti-HIV principle and isolation of the new diterpenoids annosquamosins A and B from *Annona squamosa*. **Journal of Natural Products**, v. 59, p. 635-637, 1996.

249. XU, J. LIU, C. GUO, P.; GUO, Y.; JIN, D.; SONG, X.; SUN, Z.; GUI, L.; MA, Y. Neuroprotective labdane diterpenes from *Fritillaria ebeiensis*. **Fitoterapia**, v. 82(5), p. 772-776, 2011.

250. YANG, L.-M.; HSU, F.-L.; CHANG, S.-F.; CHENG, J.-T.; HSU, C.-Y.; LIU, P.-C.; LIN, S.-J. Microbial metabolism of steviol and steviol-16 α ,17-epoxide. **Phytochemistry**, v. 68, p. 562–570, 2007.

251. ZAIDI, S. F. H.; AWALE, S.; KALAUNI, S. K.; TEZUKA, Y.; ESUMI, H.; KADOTA, S. Diterpenes from “Pini Resina” and their Preferential Cytotoxic Activity under Nutrient-Deprived Condition. **Planta Medica**, v. 72(13), p. 1231-1234, 2006.
252. ZHANG, D.; YANG, Y.; LEAKEY, J. E.; CERNIGLIA, C. E. Phase I and phase II enzymes produced by *Cunninghamella elegans* for the metabolism of xenobiotics. **FEMS Microbiology Letters**, v. 138(2-3), p. 221–226, 1996.
253. ZHENG, C. J.; HUANG, B. K.; WANG, Y.; YE, Q.; HAN, T.; ZHANG, Q. Y.; ZHANG, H.; QIN, L. P. Anti-inflammatory diterpenes from the seeds of *Vitex negundo*. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 18, p. 175-181, 2010.