UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS FACULDADE DE FARMÁCIA Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas

GABRIELA CURI NÓBREGA

Biotransformação da Curcumina por *Beauveria* do Cerrado em derivado mais solúvel e potencialmente antioxidante

Goiânia 2016





TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR AS TESES E DISSERTAÇÕES ELETRÔNICAS NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), regulamentada pela Resolução CEPEC nº 832/2007, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou *download*, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

1. Identificação do material bibliográfico: [x] Dissertação [] Tese

2. Identificação da Tese ou Dissertação

Nome completo do autor: Gabriela Curi Nóbrega

Título do trabalho: Biotransformação da Curcumina por *Beauveria* do Cerrado em derivado mais solúvel e potencialmente antioxidante

3. Informações de acesso ao documento:

Concorda com a liberação total do documento [x] SIM [] NÃO¹

Havendo concordância com a disponibilização eletrônica, torna-se imprescindível o envio do(s) arquivo(s) em formato digital PDF da tese ou dissertação.

Data: 12/07/2019

Assinatura do (a) autor (a) ²

¹ Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. A extensão deste prazo suscita justificativa junto à coordenação do curso. Os dados do documento não serão disponibilizados durante o período de embargo.

²A assinatura deve ser escaneada.

GABRIELA CURI NÓBREGA

Biotransformação da Curcumina por *Beauveria* do Cerrado em derivado mais solúvel e potencialmente antioxidante

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Goiás, para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Área de Concentração: Fármacos e Medicamentos.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Valéria de Oliveira

Goiânia 2016

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UFG.



Aos meus pais, pelo apoio e incentivo incondicionais.

Agradecimentos

À Deus, pela motivação e persistência.

Aos meus pais, Anastácio e Artenezina, pelo apoio e compreensão ao longo do trabalho.

Ao meu irmão Gustavo, minha prima Daniela e minha madrinha Daise, pelo incentivo em iniciar o mestrado.

A orientadora, Prof^a. Dr^a. Valéria de Oliveira, pela oportunidade e grande contribuição para o meu conhecimento científico.

Ao Professor Eric Gil, pela contribuição com os testes de atividade antioxidante.

A Kelly Frauzino, Júlia Ulhoa, Paula Melo, Evilana Lima, Sarah Nunes e Liliane pela contribuição e amizade ao longo desses dois anos.

Aos membros da banca da qualificação e da defesa, pela disponibilidade em colaborar com o trabalho.

A todos, que contribuíram de forma direta e indireta para a realização desse trabalho.

RESUMO

A Curcumina é um polifenol que possui diversas atividades biológicas, entretanto, possui baixa absorção, resultando assim em reduzida biodisponibilidade. Logo, o objetivo do trabalho é biotransformar a curcumina em um produto potencialmente antioxidante e mais solúvel em água. Para isso, é utilizado o aparato enzimático de fungos filamentosos, os quais possibilitam realizar diversas modificações estruturais em uma só etapa reacional, favorecendo assim a aplicação dos princípios da química verde. Sendo assim, foram selecionadas duas cepas de Beauveria (Beaveria bassiana ATCC 7159 e a Beauveria do Cerrado IP 94) para a biotransformação da curcumina. Ambas foram incubadas em meio líquido de glicose e tiveram as reações monitoradas por Cromatografia em Camada Delgada (CCD) e Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) por 168 horas. A biotransformação pelas duas cepas originaram derivados semelhantes, entretanto somente a Beauveria do Cerrado IP 94, foi capaz de proporcionar um rendimento satisfatório do derivado, para a realização da completa caracterização. A caracterização do derivado foi proposta através da análise de espectrometria de massas e Ressonância Magnética Nuclear (¹H RMN, ¹³C RMN, HSQC e HMBC), dando origem ao derivado reduzido e metilglicosilado, denominado LaBiocon 552. Na tentativa de otimizar o processo de biotransformação, foram avaliados outros dois meios de cultura líquidos (Czapek e PDSM) com a Beauveria do Cerrado IP 94. O meio PDSM demonstrou ser capaz de proporcionar maior concentração de um dos derivados, em contrapartida o meio Czapek não apresentou a formação de nenhum produto. A atividade antioxidante foi avaliada pelo método de voltametria, tendo o derivado apresentado um potencial antioxidante satisfatório, entretanto menor que o da Curcumina. Porém, quando avaliada a solubilidade, o derivado apontou ser cerca de 9 vezes mais solúvel em água que a Curcumina. A avaliação da solubilidade foi realizada por espectrofotometria uv-vis.

Palavras-chave: *Beauveria* do Cerrado, Biotransformação, Curcumina, Solubilidade em água

ABSTRACT

The Curcumin is a polyphenol that has many biological activities, however, has low absorption, thus resulting in reduced bioavailability. Soon the objective of this study is to biotransform curcumin in a potentially antioxidant product and more water-soluble. To do this, it is used the enzyme apparatus filamentous fungi, which make possible perform several structural changes in a single reaction step, thereby facilitating the application of the principles of green chemistry. So, two strains were selected from Beauveria (Beaveria bassiana ATCC 7159 and Beauveria of Cerrado IP 94) for the biotransformation of curcumin. Both were incubated in liquid glucose medium and had reactions monitored by Thin Layer Chromatography (TLC) and High Performance Liquid Chromatography (HPLC) for 168 hours. The biotransformation by both strains gave similar products, however only the *Beauveria* of Cerrado IP 94, was able to provide a satisfactory yield of the derivative, to perform of the complete characterization. Characterization of the derivative was proposed by mass spectrometric analysis and nuclear magnetic resonance (1H NMR, 13C NMR, HSQC e HMBC), yielding reduced and metilglicosilado derivative, called LaBiocon 552. In an attempt to optimize the biotransformation, were evaluated two more culture mediums (Czapek and PDSM) with Beauveria of Cerrado IP 94. The PDSM medium shown to be capable of providing a higher concentration of derivatives, however the Czapek medium did not show the formation of any product. The antioxidant activity was evaluated by voltammetry method, and the derivative presented a satisfactory antioxidant activity, though lower than that of curcumin. However, when assessed solubility, derived pointed be approximately 9 times more water soluble curcumin. Evaluation of solubility was carried out by UV-Vis spectrophotometry.

Keywords: Beauveria of Cerrado, Biotransformation, Curcumin, Water-soluble

Lista de Anexos

Anexo 2 - Espectro de ¹³C RMN do LaBiocon 552 obtido em MeOD com TMS. Espectrômetro Bruker Avance III 500 de 11.75 T (500,13 MHz)......85

Anexo 4 - Espectro ampliado (5.6 a 4.7 ppm) de ¹H RMN do LaBiocon 552 obtido em MeOD com TMS. Espectrômetro Bruker Avance III 500 de 11.75 T (500,13 MHz) ..87

Anexo 6 - Espectro ampliado (2.9 a 1.6 ppm) de ¹H RMN do LaBiocon 552 obtido em MeOD com TMS. Espectrômetro Bruker Avance III 500 de 11.75 T (500,13 MHz) ..89

Anexo 7 - Espectro HSQC do substrato Curcumina obtido em MeOD com TMS90

Anexo 8 - Espectro HMBC do substrato Curcumina obtido em MeOD com TMS91

Anexo 9 - Espectro HSQC do LaBiocon 552 obtido em MeOD com TMS......92

Anexo 10 - Espectro HMBC do LaBiocon 552 obtido em MeOD com TMS93

Lista de Figuras

| Figura 1 - Metabólitos da Trimegestona obtidos por biotransformação20 |
|---|
| Figura 2 - Estrutura química dos curcuminóides21 |
| Figura 3 - Tautomerismo ceto-enólico da curcumina23 |
| Figura 4 - Derivados da curcumina obtidos por biotransformação com a <i>Diaporthe</i> sp |
| Figura 5 - Biotransformação da curcumina pela Rhodococcus rhodochrous25 |
| Figura 6 - Derivados da curcumina biotransformados por fungos filamentosos26 |
| Figura 7 - Biotransformação da curcumina pela Beauveria bassiana27 |
| Figura 8 - Estrutura química dos principais metabólitos da curcumina29 |
| Figura 9 - Dendograma das <i>Beauverias</i> do Cerrado e da <i>Beauveria bassiana</i> ATCC 7159 |
| Figura 10 - Espectro da curcumina – UV-VIS43 |
| Figura 11- Espectro do derivado em metanol – UV-VIS46 |
| Figura 12 - Previsão in silíco da curcumina48 |
| Figura 13 - Cromatograma da alíquota reacional do tempo 168 h da <i>Beauveria bassiana</i> |
| Figura 14 - Cromatograma da alíquota reacional do tempo 168 h da IP 9452 |
| Figura 15 - Cinética de formação dos derivados e consumo do substrato por Beauveria bassiana |
| Figura 16 - Cinética de formação dos derivados e consumo do substrato por IP 94 53 |
| Figura 17 - Purificação em coluna cromatográfica do LaBiocon 55255 |
| Figura 18 - Aspecto do halo de crescimento em diferentes meios de cultura |

| Figura 19 - Concentração do derivado 02 em diferentes meios de cultura59 |
|---|
| Figura 20 - Espectro de massas da curcumina60 |
| Figura 21 - Cromatograma da curcumina60 |
| Figura 22 - Espectro de massas do derivado LaBiocon 55261 |
| Figura 23 - Espectro de massas do derivado LaBiocon 552 com fragmentação do íon m/z 57361 |
| Figura 24 - Espectro de massas de alta resolução do derivado LaBiocon 55262 |
| Figura 25 – Proposta de fragmentação do LaBiocon 55263 |
| Figura 26 - Sinais dos espectros de ¹ H RMN da Curcumina e do LaBiocon 55264 |
| Figura 27 - Espectro ampliado (2.49 - 2.80) de ¹ H RMN do LaBiocon 55265 |
| Figura 28 - Sinais dos espectros de ¹³ C RMN da Curcumina e do LaBiocon 55266 |
| Figura 29 - Biotransformação da curcumina pela cepa fúngica <i>IP 94</i> 68 |
| Figura 30 – Voltamogramas do LaBiocon 552 obtidos por voltametria cíclica69 |
| Figura 31 - Voltamogramas do LaBiocon 552 obtidos por voltametria de onda quadrada |
| Figura 32 - Voltamogramas do LaBiocon 552 obtidos por voltametria de pulso diferencial |
| Figura 33 - Voltamogramas da Curcumina e do LaBiocon 552 obtidos por voltametria de pulso diferencial71 |
| Figura 34 - Curva de calibração da Curcumina72 |
| Figura 35 - Curva de calibração do LaBiocon 55272 |

Lista de Quadros

| Quadro 1- Locais de extração das diferentes cepas de Beauveria do cerrado | 31 |
|---|----|
|---|----|

| Quadro 2 · | - Principais | reações | químicas | realizadas | por | microrganismos | 49 |
|------------|--------------|---------|----------|------------|-----|----------------|----|
|------------|--------------|---------|----------|------------|-----|----------------|----|

Lista de Tabelas

| Tabela 1 - Proporção da fase móvel utilizada para eluição na coluna cromatográfica |
|--|
| Tabela 2 - Condições cromatográficas para o monitoramento da biotransformação 44 |
| Tabela 3 - Avaliação por CCD e CLAE dos derivados formados em 168 horas50 |
| Tabela 4 - Avaliação dos derivados formados após extração54 |
| Tabela 5 - Monitoramento do pH dos meios de cultura incubados com IP 94 e substrato |
| Tabela 6 - Avaliação do pH dos meios de cultura57 |
| Tabela 7 - Avaliação da produção de derivados em diferentes meios de culturaincubados com a IP 94 em 168 horas58 |
| Tabela 8 - Avaliação da solubilidade em água da Curcumina e do LaBiocon 55273 |

Lista de abreviaturas e siglas

ABTS 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) AcOEt Acetato de Etila ATCC American Type Culture Collection BDC Bidemetoxicurcumina B.O.D. **Biochemical Oxygen Demand** CCD Cromatografia em Camada Delgada CCT Coleção de Culturas Tropicais CLAE Cromatografia Líquida de Alta Eficiência Crti Centro Regional para o Desenvolvimento Tecnológico e Inovação Cur Curcumina CV Voltametria Cíclica d Dubleto dd Duplo dubleto DMC Demetoxicurcumina DMSO Dimetilsulfóxido DPPH 1,1-difenil-2-picrilhidrazil DPV Voltametria de Pulso Diferencial EM Espectrometria de Massas Glu Glicose HMBC Heteronuclear Multiple-Bond Correlation HSQC Heteronuclear Single-Quantum Correlation **IPTSP** Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública J Constante de acoplamento LaBiocon Laboratório de Bioconversão MeOH Metanol MeOD Metanol deuterado Multipleto m Northern Regional Research Laboratory NRRL m/z massa carga PDB Potato Dextrose Broth PDSM Peptone Dextrose Soy Medium

- q.s.p. quantidade suficiente para
- Rf Fator de retenção
- RMN ¹H Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
- RMN ¹³C Ressonância Magnética Nuclear de Carbono
- rpm Rotações por minuto
- s Singleto
- SWV Voltametria de Onda Quadrada
- TMS Tetrametilsilano
- Tr Tempo de retenção
- UV Ultravioleta
- δ Deslocamento químico

Sumário

| 1. | INTRODUÇÃO17 |
|-----|---------------------------------|
| 1.1 | Biotransformação17 |
| 1.2 | Curcumina21 |
| 1.3 | Biotransformação da curcumina24 |
| 1.4 | Metabólitos da curcumina27 |
| 1.5 | Beauveria bassiana30 |
| 1.6 | Atividade antioxidante32 |
| 2. | OBJETIVOS |
| 2.1 | Geral35 |
| 2.2 | Específicos35 |
| 3. | MATERIAIS E MÉTODOS |
| 3.1 | Substrato |
| 3.2 | Previsão <i>in silico</i> |
| 3.3 | Meios de Cultura37 |
| 3.3 | 1 Meio Sólido37 |
| 3.3 | 2 Meios Líquidos |
| 3.4 | Manutenção das Cepas |
| 3.5 | Triagem |
| 3.6 | Escala semipreparativa40 |
| 3.7 | Extração41 |
| 3.8 | Purificação41 |

| 3.9 Técnicas Cromatográficas42 | | |
|---|--|--|
| 3.9.1 Cromatografia de Camada Delgada42 | | |
| 3.9.2 Cromatografia em Coluna42 | | |
| 3.9.3 Sistema de purificação rápida (Isolera™)43 | | |
| 3.9.4 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)43 | | |
| 3.10 Avaliação dos meios de cultura44 | | |
| 3.11 Técnicas Espectroscópicas44 | | |
| 3.11.1 Espectrometria na região do UV-VIS44 | | |
| 3.11.2 Espectrometria de massas45 | | |
| 3.11.3 Ressonância Magnética Nuclear45 | | |
| 3.12 Atividade antioxidante45 | | |
| 3.13 Solubilidade | | |
| 3.13 Solubilidade46 | | |
| 3.13 Solubilidade | | |
| 3.13 Solubilidade 46 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO 48 4.1 Previsão in silico 48 4.2 Triagem 49 4.3 Escala semipreparativa 50 4.3.1 Monitoramento da reação 50 | | |
| 3.13 Solubilidade.464. RESULTADOS E DISCUSSÃO.484.1 Previsão in silico.484.2 Triagem.494.3 Escala semipreparativa.504.3.1 Monitoramento da reação.504.3.2 Extração.54 | | |
| 3.13 Solubilidade | | |
| 3.13 Solubilidade 46 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO 48 4.1 Previsão in silico 48 4.2 Triagem 49 4.3 Escala semipreparativa 50 4.3.1 Monitoramento da reação 50 4.3.2 Extração 54 4.3.3 Purificação 55 4.4 Avaliação dos meios de cultura 56 | | |
| 3.13 Solubilidade 46 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO 48 4.1 Previsão in silico 48 4.2 Triagem 49 4.3 Escala semipreparativa 50 4.3.1 Monitoramento da reação 50 4.3.2 Extração 50 4.3.3 Purificação 55 4.4 Avaliação dos meios de cultura 56 4.5 Caracterização 59 | | |
| 3.13 Solubilidade 46 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO 48 4.1 Previsão in silico 48 4.2 Triagem 49 4.3 Escala semipreparativa 50 4.3.1 Monitoramento da reação 50 4.3.2 Extração 50 4.3.3 Purificação 55 4.4 Avaliação dos meios de cultura 56 4.5 Caracterização 59 4.6 Atividade antioxidante 68 | | |

| 5. | CONCLUSÕES | 75 |
|----|----------------------------|----|
| 6. | REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 77 |
| 7. | ANEXOS | 84 |

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1 Biotransformação

A biotransformação pode ser definida como uma modificação de um composto para um produto estruturalmente semelhante, através da utilização de catalisadores biológicos, incluindo microrganismos, como os fungos (HEGAZY et al., 2015).

A biotransformação é uma estratégia alternativa com um ótimo potencial para a produção de novos compostos bioativos, tendo como destaque o uso reduzido de reagentes tóxicos, como medida que favorece o meio ambiente e ganha cada vez mais destaque (CAO et al., 2015).

Nos últimos anos a biotransformação tem ganhado reconhecimento em diversas indústrias, dentre elas destacam-se a química e a farmacêutica, devido a possibilidade da criação de novas rotas químicas, por um menor custo, além de permitir a realização de reações que dificilmente seriam obtidas por outra forma (POLLARD e WOODLEY, 2006).

As reações de biotransformação, podem ser realizadas utilizando células inteiras ou enzimas isoladas, na forma livre ou imobilizada. Entretanto, a extração e purificação das enzimas implicam em um alto custo, além de serem frequentemente menos estáveis se purificadas do que quando presentes em células inteiras. Logo, em processos industriais a biotransformação faz uso preferencialmente de células inteiras, ao invés das enzimas purificadas, tendo em vista as vantagens já mencionadas (NIKOLOVA e WARD, 1993). Além dos custos reduzidos, outro ponto de grande destaque deve-se a chamada química verde, a qual propõe a substituição de catalisadores metálicos por biocatalisadores não metálicos e a redução na utilização de solventes orgânicos, através da utilização da química aquosa ou a substituição por solventes menos tóxicos (POLLARD e WOODLEY, 2006).

A química verde também denominada de química limpa, química ecológica, eco química e química sustentável, vem ganhando cada vez mais espaço nos laboratórios químicos. Trata-se de medidas que visam reduzir não só o impacto ambiental, como a redução da exposição individual diante dos produtos químicos, sendo elas: reduzir o uso de solventes e reagentes químicos, através da diminuição do número de etapas reacionais e o desenvolvimento de técnicas que exijam amostras com menos solventes; economizar energia, através da redução do tempo de análise e aplicação de biocatalisadores; reduzir a emissão de gases e vapores; reduzir a quantidade de resíduo gerado e reduzir a exposição ocupacional a materiais laboratoriais, através da automatização das técnicas e miniaturização dos dispositivos analíticos (TOBISZEWSKI, MECHLINSKA, NAMIESNIK, 2010).

O processo para a transformação microbiana, ou biotransformação, requer condições reacionais brandas, como pH próximo a neutralidade, temperatura ambiente e pressão atmosférica. Em contraste, a síntese química requer frequentemente condições reacionais extremas, as quais não são propícias ao meio ambiente e indesejadas industrialmente. Além disso, tanto o pH extremo, como a pressão e a temperatura podem proporcionar efeitos nocivos ao técnico diretamente envolvido com as análises e a comunidade vizinha as áreas (HEGAZY et al., 2015).

Outro ponto positivo da biotransformação é a seletividade dos produtos, incluindo régio, quimio, diastero e enantioseletividade. Em alguns casos, como a hidroxilação seletiva de átomos de carbono não ativados, a biotransformação pode ser a única solução para a produção do composto final (CARVALHO, 2011).

Os microrganismos possuem diversas vantagens, como a capacidade de produzir uma ampla variedade de enzimas em um curto período de tempo, devido a sua característica natural de multiplicidade; a obtenção e cultivo em ambientes extremos, tais como temperaturas altas ou baixas e/ou em condições alcalinas ou ácidas, bem como a capacidade de alguns microrganismos estarem associadas a produção de compostos biodegradáveis (HEGAZI, 2015).

Na década de 50 Peterson e Murray (1952) despertaram o interesse da indústria farmacêutica ao conseguirem realizar a hidroxilação régio e estereoseletiva da progesterona, utilizando a cepa *Rhizopus* sp, originando assim a $11-\alpha$ -hidroxiprogesterona. Tal acontecimento chamou a atenção pela dificuldade na obtenção do produto pelos métodos químicos convencionais.

Lacroix e colaboradores (1999) na tentativa de obter novos metabólitos esteroidais, fez uma seleção com diversos microrganismos, para que assim fosse selecionado o microrganismo capaz de biotransformar a Trimegestona®. Logo, seu trabalho resultou em nove metabólitos, sendo biotransformado por diferentes cepas. Oito metabólitos foram hidroxilados em diferentes posições do anel, evidenciando dessa forma a régio e estereoseletividade das reações microbianas e dois metabólitos foram identificados como metabólitos humanos (Figura 1). A maior parte dos metabólitos, foram produzidos em quantidade suficiente para a realização de testes de atividade biológica posteriores. Logo, todos esses resultados demonstraram a utilidade e versatilidade dos sistemas de biotransformação microbiano como uma ferramenta para a identificação e produção de metabólitos humanos e não humanos potencialmente ativos. Além do mais, representa uma conveniente maneira de produzir candidatos a fármacos que dificilmente seria sintetizado ou até mesmo impossível de sintetizar pelos métodos químicos convencionais.



Legenda: 1- Trimegestona; 4 e 7- metabólitos humanos; 2, 3, 5, 6, 8, 9 e 10- derivados. Fonte: Lacroix, Biton e Azerad (1999).

A produção de metabólitos humanos através da biotransformação possibilita o estudo do metabolismo de fármacos, os quais são geralmente conduzidos em modelos de animais pequenos. Portanto, o modelo microbiano representa uma alternativa ao uso de modelos animais, pois conseguem mimetizar o metabolismo dos mamíferos e fornecer informações a respeito do destino do fármaco. Logo essa metodologia apresenta a vantagem de reduzir o uso de animais, principalmente nas fases iniciais do desenvolvimento do fármaco (SRISILAM e VEERESHAM, 2003; LACROIX, BITON, AZERAD, 1999).

1.2 Curcumina

Os curcuminóides são compostos fenólicos pigmentantes presentes no rizoma da *Curcuma spp.*, comumente conhecido por açafrão ou turmérico. Dentre os vários compostos presentes no rizoma do turmérico, os curcuminóides representam em torno de 3-5%. Os principais curcuminóides são curcumina, demetoxicurcumina e bidemetoxicurcumina, sendo a curcumina o polifenol majoritário (Figura 2) (SHARMA, GESCHER, STEWARD, 2005).





Fonte: Autor

A curcumina foi isolada pela primeira vez em 1815, porém é utilizada há mais tempo pela medicina tradicional oriental, devido as suas diversas atividades biológicas, e como condimento culinário, pela cor e sabor característicos oferecidos aos alimentos (GOEL, KUNNUMAKKARA, AGGARWAL, 2008). As propriedades biológicas atribuídas a curcumina são inúmeras, tais como, anti-inflamatória, antioxidante, antiviral, antifúngica, antibacteriana, cicatrizante, e o tratamento de doenças hepáticas (MAHESHWARI et. al., 2006). Além dessas atividades, nos últimos anos outras atribuições tem acompanhado esse polifenol, sendo elas antireumática (GOEL, KUNNUMAKKARA, AGGARWAL, 2008), adjuvante na terapia antimalárica (JAIN, SOOD, GOWTHAMARAJAN, 2013), cardioprotetora (PRASAD et al., 2014b), dentre ação a diversas outras doenças como, diabetes, Alzheimer, psoríase, fibrose cística e câncer (GARCIA-NINO e PEDRAZA-CHAVIERI, 2014). O combate a essa última patologia, deve-se a capacidade de inibir o DNA-carcinogênico, resultando assim em um agente capaz de induzir apoptose em numerosos sistemas celulares (DUVOIX et al., 2005; LIN, PAN, LIN-SHAIU, 2000; MAHESHWARI et al., 2006).

Além dessa interação múltipla a diversos alvos moleculares, o que faz com que a curcumina envolva ampla variedade de doenças, outro ponto de grande relevância é a segurança. Mesmo quando utilizada altas doses em modelos animais e estudos em humanos, a curcumina não demonstrou ser tóxica (GOEL, KUNNUMAKKARA, AGGARWAL, 2008).

A curcumina disponível comercialmente, não consiste somente de curcumina e sim de uma mistura de curcuminóides, a qual atende as seguintes proporções, curcumina (~77%), demetoxicurcumina (DMC) (~17%) e bidemetoxicurcumina (BMC) (~3%) (GOEL, KUNNUMAKKARA, AGGARWAL, 2008). Sendo assim, na maior parte das vezes, os estudos conduzidos com a curcumina, sejam eles pesquisas *in vitro*, *in vivo* ou ensaios clínicos, se valem dessa mistura de curcuminóides. Logo, há muita informação disponível sobre a curcumina comercial, porém, muito poucos estudos com a curcumina pura, DMC e BMC (PRASAD et al., 2014b).

A molécula da curcumina é tautomérica, portanto, pode assumir duas configurações distintas, bis-cetônica e enólica (Fig. 3). Em soluções aquosas ácidas e neutras a forma predominante é a cetônica, já em condições alcalinas a forma predominante é a enólica (PRASAD et al., 2014b). A estrutura tautomérica juntamente com os grupos aromáticos são responsáveis por influenciar a hidrofobicidade da molécula (SIVIERO et al., 2015). Já que a curcumina é praticamente insolúvel em água, porém solúvel em alguns solventes orgânicos, como metanol, etanol, dimetilsulfóxido e acetona (GOEL, KUNNUMAKKARA, AGGARWAL, 2008).

Figura 3 - Tautomerismo ceto-enólico da curcumina



Fonte: Sharma, Gescher, Steward (2005)

Entretanto, o desafio presente nesta promissora molécula, refere-se a biodisponibilidade, devido a má absorção. Vários estudos já relataram a baixa absorção da molécula, quando administrada via oral e intra peritoneal, sugerindo assim a pequena absorção pelo intestino (MAHESHWARI et al., 2006). Dentre esses estudos, encontra-se o realizado por Pan e colaboradores (1998), os quais administraram a ratos 1g/Kg de curcumina via oral e 0,1g/Kg intra peritoneal, tendo atingido, respectivamente, máxima concentração plasmática (0,22 µg/mL) dentro de 1 hora e declinado até a detecção limite de 6 horas, já quando administrado via intra peritoneal, a máxima concentração (2,25 µg/mL) foi atingida dentro de 15 minutos e declinado dentro de 1 hora. Em outro estudo realizado por Yang e colaboradores (2007), foi relatado a biodisponibilidade oral da curcumina em torno de 1%, no qual a administração intravenosa de 10 mg/Kg resultou em concentração sérica máxima de 0,36 \pm 0,005 µg/mL, enquanto a administração oral de 500 mg/Kg (50 vezes maior) implicou em 0,06 \pm 0,001 µg/mL.

Logo, diversas tentativas tem sido feitas para aumentar a biodisponibilidade da curcumina, como o uso de lipossomas, nanopartículas, micelas, complexos fosfolipídicos, análogos sintéticos, rotas alternativas para a administração, modificações estruturais da curcumina (PRASAD et al., 2014b; ANAND et al., 2007) e administração concomitante com outros agentes (KRISHNAKUMAR et al., 2015).

1.3 Biotransformação da curcumina

Com o objetivo de aumentar a biodisponibilidade sem diminuir a atividade biológica dos derivados da curcumina, diversos estudos por biotransformação tem sido aplicado a essa molécula nos últimos anos.

Prana e colaboradores (2010) isolaram 45 fungos dos rizomas da *Curcuma longa L*. e os testaram em quatro diferentes meios de cultura, para avaliação da biotransformação da curcumina. Somente 4 fungos foram capazes de realizar a biotransformação. Dentre eles, um demonstrou maior estabilidade na formação dos derivados e então, testada a solubilidade. Apesar de não ter sido caracterizado, o derivado demonstrou ser mais solúvel em água do que a curcumina. Já em outro trabalho semelhante, Maehara e colaboradores (2011) isolaram um fungo filamentoso endofítico, *Diaporthe* sp, capaz de biotransformar a curcumina em quatro derivados mais solúveis em água (Figura 4).



Legenda: 1 – (3R,5R)- tetrahidrocurcumina; 2 – (3R,5S)- hexahidrocurcumina; 3 - (3S,5S)- octahidrocurcumina; 4 – meso-octahidrocurcumina. Fonte: Maehara et al. (2011).

Usando uma cepa bacteriana, Bharti e Gupta (2011) demonstraram a biotransformação da curcumina em vanilina, a qual é um dos mais importantes aditivos aromatizantes do mundo, sendo usado em bebidas, comidas, perfumes e produtos farmacêuticos (Figura 5).



Figura 5 - Biotransformação da curcumina pela Rhodococcus rhodochrous

Fonte: Bharti e Gupta (2011)

A introdução da unidade glicosídica aumenta a solubilidade da curcumina, podendo também aumentar a biodisponibilidade da mesma (ZHANG et al., 2010; PRASAD et al., 2014a). Diversos autores, tem demonstrado a formação de derivados glicosídicos a partir da biotransformação com fungos filamentosos. Zhang e colaboradores (2010), detectaram três fungos filamentosos (*Rhizopus chinensis, Absidia coerulea* e *Cunninghamella elegans*) capazes de biotransformar a curcumina em diversos derivados glicosídicos (Figura 6). A cepa *Rhizopus chinensis* foi a mais promissora, capaz de originar derivados com maiores rendimentos, sendo eles curcumina 4'-O-beta-D-glicosídeo (41,8%) e hexahidocurcumina (6,2%). Os derivados biotransformados pelas outras duas cepas foram minoritários, e portanto caracterizados somente por espectrometria de massas e ultravioleta. Já os derivados majoritários foram caracterizados por UV, espectrometria de massas, RMN ¹H e RMN ¹³C.



Figura 6 - Derivados da curcumina biotransformados por fungos filamentosos

Zeng e colaboradores (2010), incubaram a *Beauveria bassiana* em 50 mL de meio PDB a 250 rpm e 28°C, após 3 dias adicionaram 10 mg/mL de curcumina em metanol e mantiveram o experimento por mais 7 dias sob as mesmas condições iniciais. Posteriormente, realizaram a extração com metanol para o micélio e 1-butanol para o filtrado. A análise por CLAE foi realizada anteriormente a purificação, para a confirmação da biotransformação do substrato. Logo, o derivado foi caracterizado como 4'-O-metilglicose (Figura 7).





Além do aumento da solubilidade e biodisponibilidade, os derivados glicosilados da curcumina podem apresentar aumento da atividade biológica em relação a molécula de partida. Um exemplo é a curcumina-bis- β -D-glicosídeo, obtida através da biotransformação pela enzima enantioseletiva β -glicosidase, que resultou em aumento da atividade antimicrobiana, antioxidante e inibição da tirosinase, além de apresentar alta citotoxidade a linhagens de células de câncer de colo (PRASAD et al.,2014a).

1.4 Metabólitos da curcumina

Há relatos de diversos metabólitos da curcumina, sendo eles, dihidrocurcumina (DHC), tetrahidocurcumina (THC), hexahidrocurcumina (HHC),

Fonte: Adaptado de Zeng et al. (2010)

octahidrocurcumina (OHC), curcumina glicuronidada, DHC-glicuronidada, THCglicuronidada e curcumina sulfatada (PRASAD et al., 2014b). Porém, os principais metabólitos da curcumina in vivo são curcumina-glicuronidada, dihidrocurcuminaglicuronidada, THC-glicuronidada e THC, sendo a curcumina-glicuronidada representante de cerca de 99% dos metabólitos (PAN, HUANG, LIN, 1998). No entanto, quando administrada via oral os conjugados se resumem em glicuronídeo e glicuronídeo/sulfato (conjugado com ambos na mesma molécula) (ASAI e MIYAZAWA, 2000). Entretanto, quando administrado em humanos pela mesma via, não é observada a presença de conjugações mútuas na mesma molécula, somente a presença majoritária da curcumina glicuronidada seguida pela curcumina sulfatada (VAREED et al., 2008).

Na figura 8 são apresentadas as estruturas dos principais metabólitos da curcumina e as vias de administração correspondentes.



Figura 8 - Estrutura química dos principais metabólitos da curcumina

Legenda: (v.o) via oral; (i.p) intraperitoneal; (i.v) intravenosa. Fonte: Anand et al. (2007); Yao e Xue (2014).

Ireson e colaboradores (2001) na tentativa de investigar a atividade biológica dos metabólitos da curcumina compararam o metabolismo da mesma, através da suspensão de hepatócitos de ratos e humanos e com ratos *in vivo*. Os principais metabólitos produzidos in vitro tanto pelos ratos como pelo humano, foram a hexahidrocurcumina e a hexahidrocurcuminol. Já os maiores produtos obtidos in vivo foram a curcumina-glicuronidada e a curcumina-sulfatada. Posteriormente, foram testados a capacidade de quatro metabólitos da curcumina em inibir a expressão COX-2 em células epiteliais do cólon humano. Tetrahidrocurcumina. hexahidrocurcumina e curcumina-sulfatada inibiram de modo insatisfatório e a hexahidrocurcuminol demonstrou inatividade. Entretanto, outro estudo demonstrou que a tetrahidrocurcumina apresentou melhores resultados quando comparado a curcumina para o tratamento de ratos diabéticos do tipo 2, sendo capaz de aumentar os níveis plasmáticos de insulina e de antioxidantes, além de diminuir a peroxidação lipídica, resultando em efeito antidiabético (MURUGAN e PARI, 2006). Logo é possível notar que a diferença nos resultados é muito provavelmente devido à natureza dos ensaios empregados (ANAND et al., 2007).

1.5 Beauveria bassiana

A Beauveria é pertencente a família Moniliaceae, sendo encontrada naturalmente no solo, a qual é utilizada como patógeno a uma ampla gama de insetos e portanto aplicada como controle biológico. (HUSZCZA, DMOCHOWSKA-GLADYSZ, BARTMANSKA, 2005)

O fungo *Beauveria bassiana* ATCC 7159, também conhecido como *B. sulfurescens* ou *Sporotrichum sulfurescens*, é um dos biocatalisadores usados com maior freqüência devido a sua capacidade de catalisar diferentes tipos de reações, como hidroxilação, redução, oxidação, glicosilação, epoxidação e desalquilação (HOLLAND et al., 1999; BUCHANAN, WILLIAMS, REESE, 2000).

Costa e colaboradores (2011) analisaram a diversidade genética de isolados de *B. bassiana* do cerrado em comparação a *B. bassiana* ATCC 7159. No total foram extraídas 10 espécies do solo de reservas naturais de diferentes regiões do cerrado brasileiro (Quadro 1), as quais revelaram uma alta diversidade genética (Figura 9), tendo a *B. bassiana* ATCC 7159 apresentado somente 23% de similaridade genética com os isolados do cerrado.

| Cepas do Cerrado | Local |
|------------------|----------------------------|
| IP 3a | |
| IP 6 | |
| IP 8 | Parque Nacional das Emas |
| IP 11 | |
| IP 94 | |
| IP 98 | |
| IP 129 | Chapada dos Veadeiros |
| IP 132 | |
| IP 147 | Estação Florestal do Ibama |
| IP 153 | |

Quadro 1- Locais de extração das diferentes cepas de Beauveria do cerrado

Adaptado Costa et al. (2011)

Figura 9 - Dendograma das Beauverias do Cerrado e da Beauveria bassiana ATCC 7159



Adaptado Costa et al. (2011)

1.6 Atividade antioxidante

Antioxidantes são substâncias que previnem a oxidação de outros compostos, reagindo com radicais livres e finalizando a reação antes de danificarem moléculas. Os mecanismos envolvidos visam eliminar espécies que iniciem o processo de peroxidação, quelação de íons metálicos de modo a evitar que gerem espécies reativas, interrupção de reações de auto-oxidação e prevenção na formação de peróxidos (OROIAN e ESCRICHE, 2015).

A crescente demanda por antioxidantes naturais deve-se a diversos fatores, como o menor número de efeitos adversos, tendo em vista a redução de reagentes químicos quando comparado com os antioxidantes sintéticos e os benefícios nutricionais que podem ser proporcionados por alimentos e especiarias antioxidantes. As especiarias são fontes ricas de compostos fitoquímicos, dentre eles, destacam-se os fenóis e os polifenóis, os quais são responsáveis por grande atividade antioxidante, devido a função de agentes redutores, doadores de hidrogênio e a supressão de átomos de oxigênio radicalares (EMBUSCADO, 2015).

Entretanto, por vezes, as atividades biológicas dessas especiarias são limitantes, devido as suas propriedades farmacocinéticas. A curcumina, por exemplo, tem uma excelente atividade antioxidante, porém uma biodisponibilidade reduzida devida a má absorção, restringindo assim a ação das suas atividades. Logo, uma das estratégias para aumentar a absorção dos compostos é modificá-los estruturalmente, de modo a aumentar a solubilidade dos mesmos em água (KAMINAGA et al., 2003).

Os métodos existentes para a determinação da atividade antioxidante são diversos, podendo ser divididos em métodos clássicos e eletroanalíticos. Os métodos clássicos são espectrométricos, dentre eles o ABTS, o DPPH e o método de Folin-Ciocalteu. Já os métodos eletroanalíticos utilizam a voltametria para a determinação da atividade (SÁ, 2013).

Os métodos eletroanalíticos apresentam vantagens em relação aos métodos espectrométricos, pois são simples, baratos e se encaixam no molde da química verde, por consumirem pouca quantidade de reagentes, em sua maioria, não tóxicos

(SÁ, 2013). Além do mais, são técnicas capazes de apresentar respostas rápidas, alta sensibilidade e baixo limite de detecção (GIL e COUTO, 2013).

A voltametria estuda os fenômenos que ocorrem na interface entre o eletrodo e a solução, se baseando em três parâmetros da eletrólise: corrente elétrica, voltagem e tempo. Algumas variações na forma de se aplicar o potencial ao eletrodo determinam variações nas técnicas eletroanalíticas, dentre elas voltametria cíclica (CV), a voltametria de onda quadrada (SWV) e a voltametria de pulso diferencial (DPV) (SÁ, 2013).
OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

2.1 Geral

 Produzir derivado potencialmente antioxidante com maior solubilidade em água do 1,6-heptadieno-3,5-diona-1,7-bis(4-hidroxi-3-metoxifenil)-(1E,6E) ou Curcumina a partir da biotransformação fúngica.

2.2 Específicos

- Selecionar fungos filamentosos capazes de realizar a biotransformação da curcumina;
- Desenvolver e aplicar metodologias de monitoramento por Cromatografia em Camada Delgada (CCD) e Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE);
- Implementar processos de purificação dos derivados por cromatografia em coluna e cromatografia flash automatizada (Isolera[™]);
- Caracterizar estruturalmente o derivado obtido;
- Analisar a influência de três diferentes meios de cultura (PDSM, Glicose e Czapek) na produção de derivados;
- Avaliar o potencial antioxidante do derivado obtido;
- Desenvolver e aplicar metodologia para avaliar quantitativamente a solubilidade em água do substrato e do derivado.

MATERIAIS E METÓDOS

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Substrato

O substrato utilizado no presente estudo foi a Curcumina, obtido da Sigma Aldrich®.

3.2 Previsão in silico

Foi realizada a previsão *in silico* das prováveis modificações estruturais da curcumina utilizando o programa online gratuito MetaPrint 2D-React, desenvolvido pelo Centro de informática molecular do departamento de química da Universidade de Cambridge.

3.3 Meios de Cultura

- 3.3.1 Meio Sólido
 - Ágar Batata
 - 39 g de ágar batata;
 - 1000 mL de água destilada q.s.p.

Após a solubilização, o meio foi distribuído em tubos de ensaio com tampa baquelite e autoclavados durante 15 minutos a 121ºC.

3.3.2 Meios Líquidos

- Glicose
 - 20 g de glicose;
 - 5 g de extrato de levedura;
 - 5 g de peptona de soja;

- 5 g de cloreto de sódio;
- 5 g de fosfato de potássio dibásico;
- 1000 mL de água destilada q.s.p.
- Potato Dextrose Soy Medium PDSM
 - 20 g de glicose;
 - 5 g de peptona bacteriológica;
 - 5 g de lecitina de soja;
 - 5 g de fosfato de potássio monobásico;
 - 5 g de cloreto de sódio;
 - 3 g de extrato de levedura;
 - 1000 mL de água destilada q.s.p.
- Czapek
 - 30 g de sacarose;
 - 2 g de nitrato de sódio;
 - 1 g de fosfato de potássio monobásico;
 - 0,5 g de sulfato de magnésio;
 - 0,5 g de cloreto de potássio;
 - 0,01 g de sulfato de ferro (II);
 - 1000 mL de água destilada q.s.p.

Todos os meios de cultura líquidos, citados acima, foram distribuídos separadamente em erlenmeyers de 250 mL e autoclavados por 15 minutos a 121 °C.

3.4 Manutenção das Cepas

As cepas foram mantidas em meio ágar batata inclinado à temperatura entre 2°C e 4°C e repicadas periodicamente com solução de glicerol 25% (v/v).

Antes de cada experimento, sub-culturas das cepas de interesse foram repicadas em meio ágar batata inclinado e mantidas durante 7 dias a 27°C em câmara germinativa do tipo Biochemical Oxygem Demand (B.O.D.) (Modelo TE 401 Tecnal).

3.5 Triagem

Para a seleção do microrganismo mais adequado capaz de biotransformar o substrato, foram selecionadas 18 cepas descritas abaixo, de coleções diferentes, "American Type Culture Collection" – USA (ATCC), "Northern Regional Research Laboratory" – USA (NRRL) e "Coleção de Culturas Tropicais" – Brasil (CCT).

As cepas com denominação *IP*, são cepas de *Beauveria bassiana spp*., isoladas de amostras de solo do Cerrado, identificadas pelo Instituto de Patologia e Saúde Pública da Universidade Federal de Goiás (IPTSP).

- Absidia blaskeleana ATCC 10148b
- Aspergillus ochraceus ATCC 1009
- Beauveria bassiana ATCC 7159
- Cunninghamella echinulata ATCC 9244
- Cunninghamella echinulata ATCC 9245
- Cunninghamella elegans ATCC 26169
- Cunninghamella elegans ATCC 36112
- Cylindrocarpus radicícola ATCC 11011
- Fusarium roseum ATCC 14717

- IP 94
- IP 127
- IP 147
- IP 153
- Mortierella isabelina NRRL 1757
- Mucor plumbeus ATCC 4740
- Pycnoporus sanguineus CCT 4518
- Rhizopus arrhizus ATCC 11145
- Rhodotorula mucilaginosa

Para a etapa de triagem, os microrganismos foram inoculados em meio líquido de glicose, sendo utilizada solução estéril de glicerol 25% (v/v) como veículo para transportar os esporos cultivados em meio sólido. A cada erlenmeyer com os respectivos microrganismos citados acima, foi inoculado uma gota da suspensão de esporos formada com glicerol e incubados em agitador rotativo a 200 r.p.m e 27°C durante 65 horas.

Após 65 horas, foi adicionado a cada erlenmeyer, 1 mL da solução do substrato, com concentração de 25mg/mL em acetona. Posteriormente, os mesmos foram novamente incubados sob as condições já citadas, por mais 96 horas.

Após a adição do substrato, foram retiradas alíquotas a cada 24 horas para o monitoramento da biotransformação, o qual foi realizado através de Cromatografia de Camada Delgada (CCD) e Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).

3.6 Escala semipreparativa

Após a triagem, foram selecionados microrganismos para a escala semipreparativa.

Foram incubados 10 erlenmeyers de cada microrganismo em meio líquido de glicose e um branco contendo apenas o meio e o substrato. Todos os erlenmeyers foram mantidos sob as mesmas condições da triagem, exceto o tempo após a adição do substrato, que foi de 168 horas. A cada 24 horas foram retiradas alíquotas para o monitoramento da biotransformação através de CCD e CLAE.

3.7 Extração

Ao final da incubação semipreparativa, foi realizada a extração dos produtos formados. Logo, todo o conteúdo dos erlenmeyers foi reunido e filtrado em funil de Buchner sob uma gaze tipo queijo, separando a fração aquosa da massa fúngica.

A fração aquosa foi colocada sob agitação e saturada com cloreto de sódio, em seguida filtrada à vácuo sob celite. Posteriormente, foi realizada a extração com 3 porções de 100 mL de acetato de etila (AcOEt).

A massa fúngica foi extraída primeiramente com acetona, sendo o volume o suficiente para cobrir todo o micélio, em seguida foi colocado no ultrassom por 15 minutos e posteriormente, filtrado em papel de filtro. Esse procedimento foi realizado 3 vezes. Em seguida, foi feita a extração com metanol (MeOH), conforme o procedimento realizado com a acetona.

As três frações (AcOEt, MeOH e Acetônica) foram coletadas em frasco contendo sulfato de magnésio anidro, filtradas em funil de vidro sinterizado e posteriormente rotaevaporadas.

3.8 Purificação

Após a extração foi realizada a purificação das frações, por coluna cromatográfica com sílica gel 60 e pelo sistema de purificação rápida (Isolera[™]), ambos monitorados por CCD. Posteriormente, as amostras purificadas foram rotaevaporadas e enviadas a análises espectroscópicas.

3.9 Técnicas Cromatográficas

3.9.1 Cromatografia de Camada Delgada

Foram utilizadas cromatofolhas de alumínio TLC 20 x 20 cm sílica gel 60F 254, com camada de sílica de espessura 0,25 cm (Alugram). As fases móveis testadas na corrida cromatográfica foram: AcOEt/MeOH 50:50; AcOEt/MeOH 70:30; AcOEt/MeOH 90:10 e AcOEt/MeOH 95:05. As placas foram visualizadas em luz ultravioleta 254 e 365 nm e reveladas em iodo ressublimado.

3.9.2 Cromatografia em Coluna

As especificações da coluna utilizada foram: 32 cm de altura e 2 cm de diâmetro, a qual foi preenchida com aproximadamente 10 cm de sílica flash.

A fase móvel utilizada na coluna foi desenvolvida, conforme as proporções abaixo, descritas na tabela 1:

| Acetato de Etila (AcOEt) | Metanol (MeOH) |
|--------------------------|----------------|
| 100 | - |
| 90 | 10 |
| 80 | 20 |
| 70 | 30 |
| 60 | 40 |
| 50 | 50 |
| 40 | 60 |
| - | 100 |
| | |

Tabela 1 - Proporção da fase móvel utilizada para eluição na coluna cromatográfica

3.9.3 Sistema de purificação rápida (Isolera[™])

Uma parte da etapa da purificação foi realizada pelo sistema de purificação rápida em aparelho Isolera One da Biotage OS 852M, versão 2.3.1. A metodologia desenvolvida utilizou fase móvel AcOEt e MeOH, fluxo 20 mL/min, cartucho Snap KP-Sil 10g, comprimentos de onda 254 e 280 nm. O volume de cada fração coletada foi 5 mL.

3.9.4 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

Para a determinação da metodologia, inicialmente foi realizada a varredura do substrato em espectrofotômetro Cintra 10e UV, cujo comprimento de onda de máxima absorção foi em torno de 420 nm (Figura 10), o qual foi de acordo com o citado por Sharma e colaboradores (2005).



Após a definição do comprimento de onda, diversas fases móveis foram testadas, sendo então estabelecida a metodologia descrita por Zeng e colaboradores (2010) com modificações (Tabela 2).

43

| Tempo (min) | Fase móvel (ACN/H2O pH 3,0) |
|-------------|-----------------------------|
| 0 | 20/ 80 |
| 3 | 30/ 70 |
| 9 | 50/ 50 |
| 15 | 80/ 20 |
| 17 | 20/ 80 |

Tabela 2 - Condições cromatográficas para o monitoramento da biotransformação

Condições cromatográficas: coluna Lichrosper 100 RP-18 Merck (250 x 4,6 mm x 5 μ m), fluxo: 1mL/min, λ : 420 nm, volume: 20 μ L. Fonte: Autor.

A fase móvel foi acidificada com ácido trifluoracético 0,1% e ajustado o pH para 3,0 com o auxílio do pHmetro SP 1400 Sensoglass. O cromatógrafo utilizado foi o Gilson®, equipado com duas bombas modelo 321 da Gilson®, injetor manual Rheodyone® com capacidade de 20 µL, detector UV-VIS modelo 152 Gilson®.

3.10 Avaliação dos meios de cultura

Para a avaliação dos diferentes tipos de meio de cultura na formação de derivados, foram testados outros dois meios, Czapek e PDSM. Ambos foram incubados por 168 horas, sob as mesmas condições citadas no item 3.4. A cada 24 horas foram retiradas alíquotas para o monitoramento do pH e da biotransformação, através de CCD e CLAE.

3.11 Técnicas Espectroscópicas

3.11.1 Espectrometria na região do UV-VIS

As análises espectrofotométricas foram realizadas em Espectrofotômetro Cintra® 10e UV-visible Spectrometer.

3.11.2 Espectrometria de massas

A análise de massas foi realizada pelo Centro Regional para o Desenvolvimento Tecnológico e Inovação (Crti) da Universidade federal de Goiás (UFG) em espectrômetro de massas TSQ Quantum, Thermo Scientific, com fonte H-ESI, operando em modo positivo, full scan no quadripolo Q1, utilizando voltagem do spray 2500 V, sheath gás 5 unid. arbitrárias, auxiliar gás 3 unid. Arbitrárias, temperatura do capilar 300°C, tube lens 66. As faixas de massas para aquisição dos espectros foram escolhidas em função da massa esperada do composto. A amostra foi pesada e diluída com metanol grau HPLC (Tedia) e 0,1% de ácido acético obtendo-se uma solução a 280 ppb. A fragmentação foi feita em Q2 utilizando o gás argônio e energia de colisão de 20 V. Já a análise de massas em alta resolução foi realizada em Espectrômetro de massas Q Exactive, Thermo Scientific, com fonte H-ESI, operando em modo positivo, full-scan, resolução de 35000, utilizando voltagem do spray 3000 V, sheath gas 5 unid. arbitrárias, auxiliar gas 3 unid. arbitrárias, temperatura do capilar 300°C, S-lens 66. A amostra foi diluída em metanol grau HPLC e adicionada de 0,1% de ácido cítrico. Utilizou-se o programa Xcalibur para a análise qualitativa dos dados.

3.11.3 Ressonância Magnética Nuclear

As análises de RMN foram realizadas pelo Instituto de Química da Universidade Federal de Goiás em espectrômetro Bruker Avance III 500 de 11.75 T (500,13 MHz para ¹H e 75,46 MHz para ¹3C), equipado com sonda de 4 mm. As amostras foram feitas em dimetilsulfóxido (DMSO) e MeOH deuterado utilizando tetrametilsilano (TMS) como padrão interno.

3.12 Atividade antioxidante

As análises referentes a atividade antioxidante foram realizadas pelo Laboratório de Análise Farmacêutica e Ambiental (LAFAM) da Faculdade de Farmácia da UFG em potenciostato/galvanostato µAutolab III[®] integrado ao software GPSE 4,9[®] Eco-Chemie. As medidas foram feitas em uma célula eletroquímica com três eletrodos, o eletrodo de carbono vítreo como eletrodo de trabalho, um eletrodo

de Ag/AgCI como eletrodo de referência e um eletrodo de platina como eletrodo auxiliar.

3.13 Solubilidade

A avaliação da solubilidade em água da curcumina e do derivado, foram realizadas em espectrofotômetro. Logo, foi realizada a varredura do derivado para a determinação do comprimento de onda de máxima absorção (Figura 11). Em seguida, foram feitas duas curvas de calibração, uma referente a curcumina e a outra ao derivado, cada qual com seus respectivos comprimentos de onda. As soluções das curvas de calibração foram preparadas em água (2 µg/mL, 4 µg/mL, 6 µg/mL, 8 µg/mL e 10 µg/mL), colocadas em ultrassom por 30 minutos e em seguida efetuada as leituras. Após a realização da curva, foram feitas duas soluções de concentrações idênticas em água (5 µg/mL), referentes ao substrato e ao derivado. Ambas foram levadas ao vortex por 1 minuto antes de serem lidas.





Análise realizada em espectrofotômetro Cintra 10e UV- visible Spectrometer. Fonte: Autor.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Previsão in silico

A previsão *in silico* das prováveis reações sugeridas a molécula da curcumina, foi realizada pelo programa MetaPrint2D-React. O MetaPrint2D-React é uma plataforma online que permite o desenho de estruturas e a consulta pelas regiões de maior predisposição metabólica, através de análise estatística de transformações conhecidas e relatadas na literatura científica. Logo, o programa prediz a probabilidade de uma determinada reação ocorrer em locais específicos da molécula, conforme banco de dados (PIECHOTA et. al., 2013).

Os resultados apresentados pelo programa (Figura 12) são sinalizados por cores, as quais indicam a ocorrência das reações. A cor vermelha indica a maior probabilidade, alaranjado probabilidade intermediária e verde baixa probabilidade.





4.2 Triagem

Após a previsão das possíveis reações, foram selecionados 17 fungos filamentosos e um fungo leveduriforme. A escolha diversificada foi realizada para contemplar um maior número de reações possíveis ao substrato e sugeridos pela previsão. Logo, foi realizado um levantamento bibliográfico com as principais reações químicas executadas pelos microrganismos da coleção do Laboratório de Bioconversão (LaBiocon) (quadro 2), e então selecionados os fungos de interesse.

| Microrganismo | Reação | Referência |
|------------------------|-------------------|----------------------------------|
| Absidia sp | Hidroxilação | LACROIX, BITON, AZERAD, 1999 |
| Aspergillus ochraceus | Hidroxilação | CAO et al., 2015 |
| Aspergillus sp | Demetilação | CAO et al., 2015 |
| | Hidroxilação | BIROLLI et al., 2015 |
| Decements to a stand | Metilação | |
| Beauveria bassiana | Glicosilação | CAO et al., 2015 |
| | Sulfatação | |
| | Hidroxilação | |
| Cunninghamella | Metilação | CAO et al. 2015 |
| blaskeleana | Sulfatação | |
| Cuppinghamolla | Sulfatação | CAO at al. 2015 |
| | Glicosilação | CAO et al. 2015 VANG et al. 2014 |
| | Hidrovilação | |
| | Sulfatação | CAO at al. 2015 |
| Cunninghamella elegans | | CAO et al., 2015 |
| | O- demeniação | |
| | O- glicuronidação | ASHA, VIDYAVATHI, 2009 |
| Fusarium roseum | Hidroxilação | LACROIX, BITON, AZERAD, 1999 |
| | Metilação | |
| IP 94 | Sulfatação | COSTA et al., 2008 |
| | Glicuronidação | |
| | Metilação | |
| IP 147 | Sulfatação | COSTA et al., 2008 |
| | Glicuronidação | |
| | Metilação | |
| IP 153 | Sulfatação | COSTA et al. 2008 |
| | Glicuronidação | 0001/101011,2000 |
| | | BIROLLI et al 2015: LACROIX |
| Mortierella isabellina | Hidroxilação | BITON, AZERAD, 1999 |
| | Sulfatação | MOUSSA et al., 1997 |
| | Hidroxilação | LACROIX, BITON, AZERAD, 1999 |
| Mucor plumbeus | Sulfatação | CAO et al., 2015 |
| Dhironwa an | | YANG et al., 2014; ZHANG et al., |
| <i>Rnizopus</i> sp | Giicosiiaçao | 2010 |
| Rhodotorula sp | Hidroxilação | CAO et al., 2015 |

Quadro 2 - Principais reações químicas realizadas por microrganismos

Fonte: Autor

Alguns microrganismos do LaBiocon não foram encontrados na literatura, porém foram selecionados na tentativa de descobrir novas reações biocatalíticas eficientes. Segundo Birolli e colaboradores (2015), a seleção de novos microrganismos é um importante método para a seleção biocatalítica, os quais podem implicar em produtos com alto rendimento.

Todos os fungos foram incubados em meio líquido de glicose. A cada 24 horas, após a adição do substrato, foram retiradas alíquotas para análise por CCD e CLAE. Ao final de 96 horas a incubação foi interrompida.

Diante a análise pelos dois métodos de monitoramento, CCD e CLAE, foram selecionados dois microrganismos para a escala semipreparativa, *Beauveria bassiana* ATCC 7159 e a *Beauveria* do cerrado *IP 94*. Os critérios para a seleção consideraram as cepas capazes de biotransformar o substrato, o número de derivados apresentados e a diferença de polaridade entre eles.

4.3 Escala semipreparativa

4.3.1 Monitoramento da reação

Após a seleção das cepas para a escala semipreparativa, ambas foram incubadas em meio de glicose por um período de 168 horas, sob condições já descritas no item 3.5. A cada 24 horas foram retiradas alíquotas dos sobrenadantes de incubação e analisadas por CCD e CLAE.

Ao final da incubação foram medidos os fatores e tempos de retenção dos derivados de cada uma das cepas (Tabela 3).

| Tabela 3 - Avaliação por C | CD e CLAE dos derivados | formados em 168 horas |
|----------------------------|-------------------------|-----------------------|
|----------------------------|-------------------------|-----------------------|

| | Beauveria | a bassiana | IP | 94 |
|-----------|-----------|------------|------|-------|
| Derivados | Rf | Tr | Rf | Tr |
| 01 | 0,45 | 8,64 | 0,45 | 8,64 |
| 02 | 0,08 | 10,86 | 0,08 | 10,86 |

Legenda: Rf- fator de retenção, Tr- tempo de retenção.Fonte: Autor

Nas duas análises, CCD e CLAE, as duas cepas *Beauveria bassiana* e *IP 94*, apresentaram derivados com os fatores e tempos de retenção iguais. Portanto, é provável que as duas cepas tenham produzido os mesmos derivados.

Para a identificação dos derivados formados, primeiramente foi injetado uma solução metanólica da Curcumina de concentração 0,02 mg/mL e posteriormente os brancos, a alíquota do meio de glicose (branco 1) e as alíquotas do meio com os microrganismos de interesse sem o substrato (branco 2).

Abaixo seguem os cromatogramas das alíquotas reacionais em 168 horas das cepas *Beauveria bassiana* (Figura 13) e *IP 94* (Figura 14), após a identificação do meio de cultura e do substrato.



Figura 13 - Cromatograma da alíquota reacional do tempo 168 h da Beauveria bassiana

Legenda: Glu- Meio de glicose; 01 e 02- Derivados. Análise realizada em cromatógrafo Gilson® coluna Lichrosper 100 RP-18 Merck (250 x 4,6 mm x 5µm), fluxo: 1mL/min, λ : 420 nm, volume: 20 µL.Fonte: autor





Legenda: Glu- Meio de glicose; 01 e 02- Derivados. Análise realizada em cromatógrafo Gilson® coluna Lichrosper 100 RP-18 Merck (250 x 4,6 mm x 5µm), fluxo: 1mL/min, λ : 420 nm, volume: 20 µL. Fonte: Autor.

Todas as alíquotas de incubação de cada um dos microrganismos, nos tempos 24h, 48h, 72h, 96h e 168h foram injetadas, logo foram comparadas as áreas sob a curva de cada derivado com a da curcumina, e então construída a cinética de formação dos derivados associada ao consumo do substrato (Figura 15) e (Figura 16).



Figura 15 - Cinética de formação dos derivados e consumo do substrato por Beauveria bassiana

Análise realizada em cromatógrafo Gilson® coluna Lichrosper 100 RP-18 Merck (250 x 4,6 mm x 5 μ m), fluxo: 1mL/min, λ : 420 nm, volume: 20 μ L. Fonte: Autor.



Figura 16 - Cinética de formação dos derivados e consumo do substrato por IP 94

Análise realizada em cromatógrafo Gilson® coluna Lichrosper 100 RP-18 Merck (250 x 4,6 mm x 5 μ m), fluxo: 1mL/min, λ : 420 nm, volume: 20 μ L. Fonte: Autor.

A escolha do término de incubação em 168 horas se deve ao consumo do substrato. Durante a seleção dos microrganismos, foi observado que a *Beauveria bassiana* e a *IP 94* não consumiram todo o substrato em 96 horas quando avaliados pelo método de monitoramento de cromatografia em camada delgada (CCD). Dessa maneira, a incubação foi estendida até o tempo de 168 horas, para que assim, todo o substrato fosse consumido. Logo ao analisar a figura 15, pode-se observar que a maior produção dos derivados pela *Beauveria bassiana,* foi no tempo de 168 horas. Porém, quando analisado a produção dos derivados pela *IP 94* (Figura 16), é observado que o derivado 01 se manteve constante a partir de 96 horas e o derivado 02 obteve a máxima concentração no mesmo tempo. Logo, para estudos posteriores a interrupção da reação no tempo 96 horas para a *IP 94*, mesmo sem o consumo de todo o substrato, se faz interessante devido a maior concentração dos derivados.

Na figura 15 nota-se que o substrato é consumido em 72 horas, porém os derivados não são totalmente formados nesse tempo. Ambos os derivados apresentam maior concentração em 168 horas, mesmo com o microrganismo tendo aparentemente consumido toda a curcumina em 72 horas. Tal fato pode estar associado a adsorção do substrato a superfície da biomassa fúngica ou a internalização pelo micélio, não estando portanto, disponível no sobrenadante de incubação (ARAÚJO et al., 2013).

Já na figura 16 é possível notar que nas primeiras 48 horas, a curcumina é drasticamente consumida e os derivados formados, porém em 96 horas uma grande quantidade de curcumina reaparece sem implicar na diminuição da concentração dos derivados e decai até a concentração zero no tempo de 168 horas. Assim como mencionado acima, é provável que o substrato tenha sido adsorvido ou internalizado em 72 horas e depois externalizado no tempo de 96 horas, devido alteração do pH. Como mostrado mais adiante na Tabela 5, é notado que o pH do meio reacional é mantido constante até 72 horas, porém em 96 horas a um aumento significativo no pH do meio.

4.3.2 Extração

Após a análise da cinética do meio reacional, foi realizado o processo de extração, cuja finalidade era extrair possíveis derivados tanto do sobrenadante (fração acetato de etila) como do micélio (fração acetônica e metanólica), conforme evidenciado na Tabela 4.

| | 3 | | | 3 | | |
|---------------|--------------------|----------|----------|----------------------------|----------|----------|
| | Beauveria bassiana | | | Beauveria do Cerrado IP 94 | | |
| | 01 | 02 | 03 | 01 | 02 | 03 |
| | Rf (0,1) | Rf (0,4) | Rf (0,6) | Rf (0,2) | Rf (0,6) | Rf (0,7) |
| Fr. AcOEt | + | + | + | - | + | + |
| Fr. Acetônica | - | - | + | + | - | + |
| Fr. MeOH | _ | _ | _ | _ | _ | _ |

Tabela 4 - Avaliação dos derivados formados após extração

Legenda: 01, 02, 03 - derivados; Rf- fator de retenção; Os símbolos (+) e (-) indicam, respectivamente, presença ou ausência de derivados. Condições cromatográficas: AcOEt/ MeOH (95:05) revelado por UV (254 nm e 365 nm). Fonte: Autor

Do sobrenadante de incubação foram extraídos três prováveis derivados biotransformados pela *Beauveria bassiana* e dois biotransformados pela *IP 94*. Já os derivados provenientes do micélio dos dois microrganismos se concentraram todos na fração acetônica, sendo um provável derivado obtido pela *Beauveria bassiana* e dois pela *IP 94*. Entretanto, o fator de retenção do provável derivado da fração acetônica foi igual ao fator de retenção de um dos derivados da fração AcOEt biotransformados pela *Beauveria bassiana*, logo as duas frações foram reunidas em

uma fração única. Um dos prováveis derivados da fração acetônica biotransformado pela *IP 94* também apresentou similaridade com um dos derivados da fração AcOEt, no entanto, o outro derivado da fração acetônica apresentou uma polaridade muito maior que a da curcumina, levando a hipótese de pouco promissor, já que são esperados derivados funcionalizados, ou seja, estrutura e consequentemente polaridade próxima ao substrato. Por essa razão, foi escolhida a fração AcOEt da *IP 94* para ser purificada.

4.3.3 Purificação

Após a extração foi realizada a purificação da fração única da *Beauveria bassiana* e da fração AcOEt da *IP 94.*

Foram purificados cinco derivados da fração única da *Beauveria bassiana*, no entanto, nenhum deles foram obtidos em quantidade suficiente para a realização da caracterização.

A fração AcOEt da *IP 94* foi purificada pelo sistema de purificação rápida (Isolera[™]), resultando em 32,5 mg do derivado denominado LaBiocon 552, a partir do extrato purificado em coluna cromatográfica, que por sua vez foi purificado a partir de 173,5 mg do extrato bruto. O rendimento do LaBiocon 552 foi 18,7%.

Na figura 17 é apresentado o LaBiocon 552 após a purificação em coluna. Como pode notar, o mesmo não estava puro, sendo portanto purificado pelo sistema de purificação rápida (Isolera™).





Condições cromatográficas: AcOEt/MeOH (95:05) revelados por UV (254 e 365 nm). Fonte: Autor

O outro derivado purificado pelo sistema de purificação rápida não foi obtido em quantidade suficiente para a caracterização.

Em seguida o LaBiocon 552 foi enviado para análises espectrométricas, massas e RMN.

4.4 Avaliação dos meios de cultura

A escolha adequada do meio de cultura é um fator crítico no desenvolvimento da biotransformação, pois o mesmo é capaz de induzir enzimas do microrganismo, as quais influenciam tanto na formação de novos derivados como no rendimento dos mesmos (GURRAM et al., 2009).

Logo, na tentativa de otimizar o rendimento dos derivados, foram testados dois outros meios de cultura, Czapek e PDSM com a cepa *IP 94*.

Todos os meios apresentaram halo de crescimento antes da adição do substrato, indicando assim, o crescimento da cepa fúngica nos meios de cultura testados (Figura 18).



Figura 18 - Aspecto do halo de crescimento em diferentes meios de cultura

Legenda: Da esquerda para a direita os meios são: PDSM, glicose, czapek. Fonte: Autor

Todos os meios, tiveram o pH dos meios reacionais monitorados a cada 24 horas (Tabela 5).

| | 24h | 48h | 72h | 96h | 120h | 144h | 168h |
|---------|-----|-----|-----|-----|------|------|------|
| Glicose | 4,0 | 4,0 | 4,0 | 7,0 | 8,0 | 8,0 | 8,0 |
| PDSM | 3,0 | 4,0 | 5,0 | 5,0 | 6,0 | 7,0 | 7,0 |
| Czapek | 6,0 | 6,0 | 5,0 | 5,0 | 5,0 | 5,0 | 5,0 |

Tabela 5 - Monitoramento do pH dos meios de cultura incubados com IP 94 e substrato

Fonte: Autor

Na tabela 6 são apresentados o pH de cada um dos meios de cultura anterior a inoculação do microrganismo, dos meios de cultura com o microrganismo, porém sem a curcumina e dos meios de cultura com a curcumina, entretanto sem a *IP 94*.

Tabela 6 - Avaliação do pH dos meios de cultura

| | Meio de Cultura | Meio + <i>IP</i> 94 | Meio + Curcumina |
|---------|-----------------|---------------------|------------------|
| Glicose | 7,0 | 4,0 | 7,0 |
| PDSM | 5,0 | 3,0 | 5,0 |
| Czapek | 5,0 | 6,0 | 5,0 |

Fonte: Autor

O pH do meio de cultura influencia na concentração de bicarbonato dissolvido formado a partir do gás carbônico gasoso, logo a prevalência do pH e a capacidade de tamponamento do meio podem influenciar tanto no crescimento fúngico como na formação de produtos, já que mudanças no pH podem ocasionar perturbações ao equilíbrio interno do microrganismo (PAPAGIANNI, 2004). Logo, é provável que essa mudança de pH no tempo 96 horas, tenha ocasionado tanto a formação da maior concentração de produtos, como a externalização da curcumina, como visto na figuras 16 do item 4.3.1.

Em seguida, foi realizado o monitoramento por CCD da biotransformação nos diferentes meios de cultura. Foram aplicadas as cromatofolhas alíquotas dos meios reacionais nos tempos (24 h, 48 h, 72 h, 96 h, 120 h, 144 h e 168 h) e o branco contendo somente o meio de cultura com a *IP 94*, ou seja, sem o substrato. A aplicação do branco elimina a possibilidade de manchas provenientes do meio de cultura ou do microrganismo serem atribuídas a derivados do substrato.

Abaixo a tabela 7 apresenta os fatores de retenção de cada derivado formado nos diferentes meios de cultura, bem como os fatores de retenção dos brancos.

| | 01 Rf(0,1) | 02 Rf(0,3) | 03 Rf(0,4) | 04 Rf(0,5) | 05 Rf(0,6) | 06 Rf(0,7) | Cur Rf(0,9) |
|--------------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|----------------|
| Glicose | + | + | - | + | + | - | + |
| Glicose + IP 94 | - | - | - | + | + | - | - |
| PDSM | + | + | + | - | - | + | + |
| PDSM + IP 94 | - | - | - | - | - | + | - |

Tabela 7 - Avaliação da produção de derivados em diferentes meios de cultura incubados com a *IP* 94 em 168 horas

Legenda: 01, 02, 03, 04, 05, 06 - derivados; Cur- curcumina; os símbolos (+) e (-) indicam, respectivamente, presença ou ausência de derivados. Condições cromatográficas: AcOEt/ MeOH (95:05) revelado por UV (254 nm e 365 nm) e iodo. Fonte: Autor

O meio czapek não apresentou nenhum derivado, por essa razão não aparece na tabela 7. No meio de glicose foram observados quatro prováveis derivados, porém dois deles apresentaram o mesmo tempo de retenção do branco, portanto, foram considerados dois derivados. No meio PDSM também foram observados quatro prováveis derivados, porém apenas uma mancha apresentou o mesmo tempo de retenção do branco, sendo assim considerados três derivados.

Posteriormente as alíquotas do meio PDSM foram injetadas no CLAE, no qual foi observado a formação de dois derivados. O derivado majoritário, apresentou o mesmo tempo de retenção do derivado 02 do meio de glicose, incubado com as cepas (*Beauveria bassiana* e *IP 94*). Entretanto, o derivado minoritário apareceu nos tempos 24 e 48 horas, com um tempo de retenção muito próximo ao derivado 02, e desapareceu nas alíquotas seguintes.

Após a detecção da formação do mesmo derivado nos diferentes meios (glicose e PDSM), foram comparadas as áreas do derivado 02 nos diferentes tempos (Figura 19).



Figura 19 - Concentração do derivado 02 em diferentes meios de cultura

Análise realizada em cromatógrafo Gilson® coluna Lichrosper 100 RP-18 Merck (250 x 4,6 mm x 5 μ m), fluxo: 1mL/min, λ : 420 nm, volume: 20 μ L. Fonte: Autor

Conforme apresentado na figura 19, foi observado que a *IP 94*, quando incubada em meio PDSM é capaz de proporcionar um maior rendimento do derivado 02 até o tempo 96 horas. Logo, pode-se concluir que é possível otimizar o processo de biotransformação com a mudança do meio de cultura, sendo capaz de obter maiores rendimentos de determinados derivados.

4.5 Caracterização

O derivado foi caracterizado por espectrometria de massas e ressonância magnética nuclear (¹H, ¹³C, HSQC, HMBC), sendo proveniente da biotransformação com a *IP 94* e denominado LaBiocon 552.

A análise de massas do padrão Curcumina (Figura 20), confirmou a mistura dos três principais curcuminóides presentes na preparação, exibindo como íons [M+H]⁺ m/z 369.10, 339.08 e 309.12 referentes respectivamente a curcumina (Cur), demetoxicurcumina (DMC) e bidemetoxicurcumina (BDC) (YANG et al., 2007). Os quais também foram identificados durante a análise por CLAE (Figura 21) (SYED et al., 2015). Em ambos, notou-se o pico majoritário da curcumina, o qual representa aproximadamente 77% dos curcuminóides nas preparações comerciais, segundo Goel e colaboradores (2008).



Legenda: Curcumina (Cur); Bidemetoxicurcumina (BDC); Demetoxicurcumina (DMC). Condições cromatográficas: Fonte H-ESI, operando em modo positivo. Fonte: Autor.





Legenda: Curcumina (Cur); Bidemetoxicurcumina (BDC); Demetoxicurcumina (DMC). Análise realizada em cromatógrafo Gilson® coluna Lichrosper 100 RP-18 Merck (250 x 4,6 mm x 5 μ m), fluxo: 1mL/min, λ : 420 nm, volume: 20 μ L. Fonte: Autor.

A análise de massas do derivado Labiocon 552 apresentou o íon molecular [M+Na]⁺ com m/z 573.51, cujo espectro é mostrado na figura 22.



A fragmentação desse íon (m/z 573) (Figura 23) apresentou os seguintes fragmentos m/z 397, o qual sugeriu a perda de uma unidade de glicose metilada [M-177+Na]⁺ e m/z 379, que indicou a perda de uma molécula de água [M-177-18+Na]⁺.



Figura 23 - Espectro de massas do derivado LaBiocon 552 com fragmentação do íon m/z 573 labiocon552trag#1-50 RT: 0.00-0.42 AV: 50 NL: 1.10E7

Posteriormente foi realizada a análise de massas de alta resolução (Figura 24), a qual indicou a massa exata do íon molecular $[M+Na]^+$ m/z 573.23076, cuja fórmula molecular sugerida pelo software foi C₂₈H₃₈O₁₁Na⁺, com erro de 0,344 ppm.



Figura 24 - Espectro de massas de alta resolução do derivado LaBiocon 552 Labicon552_2#1-50 RT: 0.00-0.12 AV: 50 NL: 1.51E8

Condições cromatográficas: Fonte H-ESI, operando em modo positivo. Fonte: Autor

A bioconversão da curcumina realizada por Zhang e colaboradores (2013) deu origem a dois derivados, sendo um deles a hexahidrocurcumina, cuja fragmentação foi ao encontro dos resultados parciais do presente trabalho. Logo, na figura 25 é sugerida a estrutura molecular do LaBiocon 552, com os respectivos fragmentos.



Fonte: Autor

Em seguida foram realizadas as análises de RMN. Abaixo na figura 26, foram registrados os sinais ¹H RMN do substrato e do derivado LaBiocon 552.

| | $\begin{array}{c} 0 \\ 3 \\ 4 \\ 0 \\ 0 \\ 0 \\ 0 \\ 0 \\ 0 \\ 0 \\ 0 \\ 0$ | LaBiocon 552 |
|---------------------|---|---|
| 1 | 6.58 (2H; d; <i>J</i> =15.64 Hz) | * |
| 2 | 7.53 (2H; d; <i>J</i> =15.64 Hz) | 1.68 (2H; m) |
| 3 | - | 4.00 (1H; m) |
| 4 | 7.45 (1H; d; <i>J</i> = 8.34) | * |
| 6 | 7.53 (2H; d; <i>J</i> =15.64 Hz) | * |
| 7 | 6.58 (d; <i>J</i> =15.64 Hz) | * |
| 2′ | 7.17 (2H; d; <i>J</i> =1.65) | 7.04 (1H; d; <i>J</i> =8.39) |
| 5′ | 6.78 (2H; d; <i>J</i> =8.18) | 6.76 (1H; d; <i>J</i> =1.91) |
| 6′ | 7.06 (2H; dd; <i>J</i> =8.18 e 1.65) | 6.71 (1H; dd; <i>J</i> = 1.91 e 8.39) |
| -OCH ₃ ′ | 3.87 (6H; s) | 3.80 (3H; s) |
| 2″ | 7.17 (d; <i>J</i> =1.65) | 6.68 (1H; d; <i>J</i> =8.01) |
| 5″ | 6.78 (d; <i>J</i> =8.18) | 6.84 (1H; d; <i>J</i> =1.91) |
| 6″ | 7.06 (dd; <i>J</i> =8.18 e 1.65) | 6.60 (1H; dd; <i>J</i> = 1.91 e 8.01) |
| -OCH3" | 3.87 (s) | 3.83 (3H; s) |
| 1‴ | | 4.81 (1H; d; <i>J</i> =7.6 Hz) |
| 2‴′ | | 3.68 (1H; m) |
| 3‴′ | | 3.55 (1H; m) |
| 4‴′ | | 3.36 (1H; m) |
| 5″′ | | 3.19 (1H; t; <i>J</i> = 8.77) |
| 6″′ | | 3.48 (1H; dd; J = 7.63 e 9.16) e 3.54 (1H; d; J = 8.77) |
| -0CH3 ^{""} | | 3.58 (3H; s) |

Figura 26 - Sinais dos espectros de ¹H RMN da Curcumina e do LaBiocon 552

Condições: Dados obtidos em MeOD em 500 MHz com TMS como padrão interno. Fonte: Autor.

Na figura 26, os prótons referentes aos carbonos 1, 4, 6 e 7 do LaBiocon 552 foram integrados juntos, presentes na região 2.49 a 2.80 ppm, totalizando 8 prótons (Figura 27).



Figura 27 - Espectro ampliado (2.49 - 2.80) de ¹H RMN do LaBiocon 552

Condições: Dados obtidos em MeOD em 500 MHz com TMS como padrão interno. Fonte: Autor

Os sinais evidenciados tanto de ¹H (Figura 26) como de ¹³C (Figura 28), foram semelhantes com os encontrados para a hexahidrocurcumina por Zhang e colaboradores (2010). O mesmo pode-se dizer para a unidade metil glicosilada, cujos sinais foram de acordo com os encontrados por Zeng (2010).

| · · · · | Curcumina | LaBiocon 552 |
|---------------------|-----------|--------------|
| 1 | 117.6 | * |
| 2 | 131.4 | 38.5 |
| 3 | 159.5 | 66.6 |
| 4 | 127.4 | * |
| 5 | 183.4 | 210.1 |
| 6 | 131.4 | * |
| 7 | 117.6 | * |
| 1' | 110.1 | 138.5 |
| 2' | 121.7 | 116.9 |
| 3' | 140.6 | 150.4 |
| 4' | 147.4 | 145.6 |
| 5' | 111.8 | 111.6 |
| 6' | 115.6 | 120.4 |
| -OCH ₃ | 55.0 | 55.0 |
| 1" | 122.0 | 134.0 |
| 2" | 121.7 | 114.6 |
| 3" | 127.4 | 148.7 |
| 4" | 147.4 | 145.6 |
| 5" | 111.8 | 112.7 |
| 6" | 115.6 | 120.4 |
| -OCH ₃ " | 55.0 | 55.0 |
| 1'" | | 101.5 |
| 2'" | | 60.8 |
| 3'" | | 75.7 |
| 4'" | | 75.5 |
| 5'" | | 79.1 |
| 6''' | | 73.5 |
| -OCH3 | | 59.4 |

Figura 28 - Sinais dos espectros de ¹³C RMN da Curcumina e do LaBiocon 552

Na figura 28, os carbonos marcados (*) correspondem aos prótons da região 2.49 – 2.80 ppm, cuja região correlaciona-se aos seguintes carbonos 28.7, 30.8, 44.6 e 49.6 (Anexo 2) e (Anexo 9).

O favorecimento da forma enólica da curcumina pode ser constatada pela região em que se encontram os carbonos 3 e 5. A região 100 – 160 ppm, indica a presença de um alceno (C-3 e C-4), já a região por volta de 185 ppm aponta a presença de cetona (Figura 28) (PAVIA, et al., 2010).

No espectro de ¹H RMN do derivado LaBiocon 552, foram notados a presença de sinais adicionais em região de campo mais baixo ou seja, mais próximo do TMS. A diferença no deslocamento químico dos sinais da cadeia aberta da curcumina ($\delta_{\rm H}$

Condições: Dados obtidos em MeOD em 500 MHz com TMS como padrão interno. Fonte: Autor

6.58 – 7.53) em relação ao derivado ($\delta_{\rm H}$ 1.68 – 4.00), evidenciou a redução da cadeia (ZHANG et al., 2010; ZHANG et al., 2013; HERATH, FERREIRA, KHAN, 2007). Nessa mesma região, também foram detectados os sinais que sugerem a presença de uma glicose metilada ($\delta_{\rm H}$ 3.19 – 4.81). O sinal típico de um açúcar é evidenciado pela presença de um próton e um carbono anoméricos, o qual é claramente percebido no derivado como um dubleto ($\delta_{\rm H}$ 4.81, *J* = 7.6 Hz) (Anexo 4), correspondente ao C-1^{*'''*} ($\delta_{\rm C}$ 101.5) (Anexo 9). O largo acoplamento (*J* = 7.6) indica configuração β do próton anomérico, o qual é notado a correlação com C-4^{*''*} ($\delta_{\rm C}$ 145.6) através do espectro HMBC (Anexo 10), indicando assim a posição do açúcar no anel. Todos esses valores referentes ao deslocamento químico e acoplamento dos elementos anoméricos (próton e carbono), estão de acordo com os encontrados por Yang e colaboradores (2014). A posição do radical metoxietano (R-CCOCH₃) na glicose, também foi estabelecida por HMBC, através da correlação do próton ($\delta_{\rm H}$ 3.54) aos carbonos C-4^{*'''*} ($\delta_{\rm C}$ 75.5) e C-5^{*'''*} ($\delta_{\rm C}$ 79.1).

Logo, as análises por espectrometria de massas e ressonância magnética nuclear (1D e 2D) sugeriram a redução da curcumina e a ligação de uma unidade glicosídica metilada, originando o inédito derivado hexahidrocurcumina-4'-O-β-metilglicosideo (LaBiocon 552) (Figura 29). São diversos os registros na literatura de produtos obtidos a partir da curcumina, porém não foi encontrado nenhum derivado da mesma, que tenha sido reduzido e metilglicosilado ao mesmo tempo. Zeng e colaboradores (2010) obtiveram um derivado metilglicosilado da curcumina através da biotransformação com a *Beauveria bassiana*, portanto, pode-se concluir que apesar das semelhanças entre as espécies *Beauveria bassiana* e *IP 94*, a *Beauveria* do Cerrado foi capaz de bioconverter a curcumina em um derivado inédito. Na Figura 29 são evidenciadas as prováveis modificações estruturais do produto.



Fonte: Autor

4.6 Atividade antioxidante

As técnicas utilizadas para a avaliação da atividade antioxidante foram eletronanalíticas, sendo elas voltametria cíclica (CV), a voltametria de onda quadrada (SWV) e a voltametria de pulso diferencial (DPV).

Na figura 30 é apresentado o voltamograma de voltametria cíclica, no qual pode-se observar que a amostra é oxidada em duas etapas (1a e 2a).

Figura 29 - Biotransformação da curcumina pela cepa fúngica IP 94



Figura 30 – Voltamogramas do LaBiocon 552 obtidos por voltametria cíclica

Voltamogramas cíclicos sucessivos obtidos para o derivado 1mg/mL em Tampão fosfato, pH 6. Faixa de potencial de 0 a 1.3 V, velocidade de varredura 100 mV/s.

A aplicação da técnica SWV deve-se a possibilidade de visualizar se a transferência de elétrons da reação é reversível ou não (ENACHE & OLIVEIRA-BRETT, 2011). Na figura 31 é possível notar que o processo oxidativo do derivado é reversível devido a presença de mais de um pico.





Voltamogramas de onda quadrada obtidos para DC 0,1mg/mL em Tampão fosfato, pH 6. Faixa de potencial de 0 a 1.3 V, Freqüência de 25 Hz, amplitude de pulso de 50 mV.
A fim de obter uma melhor avaliação do derivado, foi realizada a técnica DPV (Figura 32), a qual apresenta maior sensibilidade e resolução dos picos, mostrando picos não observáveis no CV (SÁ, et al.; 2014). A diminuição dos picos conforme o número de scan, pode estar associado a diminuição da área disponível da superfície do eletrodo, devido a adsorção dos produtos de oxidação da amostra analisada (ENACHE & OLIVEIRA-BRETT, 2011).

Figura 32 - Voltamogramas do LaBiocon 552 obtidos por voltametria de pulso diferencial



Voltamogramas de pulso diferencial sucessivos obtidos para o derivado 1mg/mL em Tampão fosfato, pH 6. Faixa de potencial de 0 a 1.3 V, velocidade de varredura 10 mV/s, amplitude de pulso de 50 mV.

Posteriormente foi aplicada a técnica DPV a curcumina e comparado com o voltamograma do derivado LaBiocon 552 (Figura 33).





Voltamogramas de pulso diferencial sucessivos obtidos para o derivado 2mg/mL (...) e para a Curcumina (__) em Tampão fosfato, pH 6. Faixa de potencial de 0 a 1.3 V, velocidade de varredura 10 mV/s, amplitude de pulso de 50 mV.

A análise das duas figuras (Figura 30 e 32) indicam intensa corrente gerada, a qual está diretamente relacionada com a quantidade de antioxidante presente na amostra, atividade a qual é intensificada devido a sua capacidade de autorenovação (Figura 31) (SÁ, et al.; 2014). Entretanto, apesar da boa atividade antioxidante demonstrada pelo derivado, quando comparado com a curcumina (Figura 33), pode-se notar que o derivado apresentou atividade antioxidante menor que a molécula de partida. Logo, pode-se concluir que o LaBiocon 552 apresentou bom potencial antioxidante, entretanto menor que a curcumina.

4.7 Solubilidade

Após a caracterização do LaBiocon 552, foi realizada a varredura do mesmo, cujo comprimento de onda de máxima absorção foi em torno de 280 nm (Figura 11).

Em seguida, foram feitas as curvas de calibração para a curcumina (Figura 34) e para o LaBiocon 552 (Figura 35), cada qual com os respectivos comprimentos de onda, 420 e 280 nm.



Análise realizada em espectrofotômetro Cintra 10e UV- visible Spectrometer, λ: 420 nm. Fonte: Autor.



Análise realizada em espectrofotômetro Cintra 10e UV- visible Spectrometer, λ: 280 nm. Fonte: Autor.

Após a construção das curvas de calibração, foram efetuadas a leitura da solução de curcumina a 5 µg/mL e do derivado na mesma concentração. A absorbância encontrada para cada um dos compostos foi jogada nas equações correspondentes (Figura 34) e (Figura 35). Dada as concentrações equivalentes às absorbâncias, foi avaliado o percentual da curcumina e do LaBiocon 552 capaz de solubilizar em água.

O aumento da solubilidade do derivado em relação a curcumina, devido as modificações estruturais, redução e glicosilação, foram sugeridas por diversos autores (PRASAD, et al., 2014; ZENG et al., 2010; ZHANG, et al., 2010). Logo, o LaBiocon 552 demonstrou ser aproximadamente 9 vezes mais solúvel em água que a curcumina (Tabela 08). Acarretando, portanto, em um provável aumento na absorção de um composto potencialmente antioxidante.

| Tabela 8 - Avaliação da solubilidade em água da Curcumina e do LaBiocon 552 | | | | | | | | | |
|---|-------------|---------------------------------|------------------------------|--------------|--|--|--|--|--|
| | Absorbância | Concentração teórica (µg/mL) | Concentração real (µg/mL) | Solubilidade | | | | | |
| Curcumina | 0,0102 | 5 | 0,4 | 1 | | | | | |
| LaBiocon 552 | 0,0144 | 5 | 3,48 | 8,7 | | | | | |

Análise realizada em espectrofotômetro Cintra 10e UV- visible Spectrometer. Fonte: Autor.

Logo, apesar do menor potencial antioxidante, o LaBiocon 552 demonstrou ser bastante promissor, pois apresentou satisfatória atividade antioxidante, além de provável melhora farmacocinética em relação a curcumina.

<u>CONCLUSÕES</u>

5. CONCLUSÕES

- As cepas *Beauveria bassiana* e *IP 94* demonstraram ser capazes de biotransformar a curcumina;
- A maior concentração dos derivados biotransformados pelas cepas *Beauveria bassiana* e *IP 94*, foram obtidas nos tempos 168 e 96 horas, respectivamente;
- A cepa *IP 94* quando incubada no meio PDSM, apresentou maior concentração de um dos derivados;
- O processo de purificação pelo sistema de purificação rápida (Isolera[™]) se mostrou eficiente;
- Foi caracterizado um derivado da biotransformação com a IP 94;
- A cepa *IP* 94 foi capaz de biotransformar a curcumina no derivado hexahidrocurcumina-4'-O-β-metilglicosideo;
- O rendimento do derivado obtido foi cerca de 19%;
- O derivado identificado apresentou promissora atividade antioxidante;
- O derivado LaBiocon 552 demonstrou ser cerca de 9 vezes mais solúvel em água do que a Curcumina.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANAND, P.; KUNNUMAKKARA, A. B.; NEWMAN, R. A.; AGGARWAL, B. B. Biovailability of Curcumin: Problems and Promises. **Molecular Pharmaceutics**, v. 04, p. 807- 818, 2007.

ARAÚJO, K. C. F.; COSTA, E. M. M. B., PANZINI, F.; VALADARES, M. C.; OLIVEIRA, V. Bioconversion of quercetin and rutin and the cytotoxicity activities of the transformed products. **Food and Chemical Toxicology**, v. 51, p. 93- 96, 2013.

ASAI, A.; MIYAZAWA, T. Occurrence of orally administered curcuminoid as glucuronide and glucuronide/sulfate conjugates in rat plasma. Life Sciences, v. 67, p. 2785- 2793, 2000.

ASHA, S.; VIDYAVATHI, M. Cunninghamella – A microbial model for drug metabolism studies – A review. **Biotechnology Advances**, v. 27, p. 16- 29, 2009.

BHARTI, A. A. L. N.; GUPTA, R. K. Biotransformation of curcumin to vanillin. Indian Journal of Chemistry, v. 50 B, p. 1119- 1122, 2011.

BIROLLI, W. G.; FERREIRA, I. M.; ALVARENGA, N.; SANTOS, D. A.; MATOS, I. L.; COMASSETO, J. V.; PORTO, A. L. M. Biocatalysis and biotransformation in Brazil: An overview. **Biotechnology Advances**, 2015.

BUCHANAN, G. O.; WILLIAMS, L. A. D.; REESE, P. B. Biotransformation of cadinane sesquiterpenes by Beauveria bassiana ATCC 7159. **Phytochemistry**, v. 54, p. 39- 45, 2000.

CAO, H.; CHEN, X.; JASSBI, A. R.; XIAO, J. Microbial biotransformation of bioactive flavonoids. **Biotechnology Advances**, v. 33, p. 214- 223, 2015.

CARVALHO, C. C. C. R. Enzymatic and whole cell catalysis: Finding new strategies for old processes. **Biotechnology Advances**, v. 29, p.75-83, 2011.

COSTA, E. M. M. B.; PIMENTA, F. C.; LUZ, W. C.; OLIVEIRA, V.; OLIVEIRA, M.; BUENO, E.; PETROFEZA, S. *Beauveria bassiana*: Quercetinase production and genetic diversity. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.42, p.12- 21, 2011.

COSTA, E. M. M. B.; PIMENTA, F. C.; LUZ, W. C.; OLIVEIRA, V. Selection of Filamentous Fungi of the *Beauveria* Genus able to Metabolize Quercetin Like Mammalian Cells. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 39, p. 405- 408, 2008.

DUVOIX, A.; BLASIUS, R.; DELHALLE, S.; SCHNEKENBURGER, M.; MORCEAU, F.; HENRY, E.; DICATO, M.; DIEDERICH, M. Chemopreventive and therapeutic effects of curcumin. **Cancer Letters**, v. 223, p. 181- 90, 2005.

EMBUSCADO, M. E. Spices and herbs: Natural sources of antioxidants – a mini review. **Journal of functional foods**, v. 18, p. 811- 819, 2015.

ENACHE, T. A.; OLIVEIRA-BRETT, A. M. Phenol and para-substituted phenols electrochemical oxidation pathways. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 655, p. 9-16, 2011.

GARCIA-NINO, W. R.; PEDRAZA-CHAVIERI, J. Protective effect of curcumin against heavy metals-induced liver damage. **Food and Chemical Toxicology**, v. 69, p. 182-201, 2014.

GIL, E.S.; COUTO, R. O. Flavonoid electrochemistry: a review on the electroanalytical applications. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 23, p. 542-558, 2013.

GOEL, A.; KUNNUMAKKARA, A. B.; AGGARWAL, B. B. Curcumin as "Curecumin": From Kitchen to clinic. **Biochemical Pharmacology**, v. 75, p. 787-809, 2008.

GURRAM, S. P.; KOLLU, N. R.; SIVADEVUNI, G.; SOLIPURAM, M. R. Biotransformation of albendazole by *Cunninghamella blakesleeana*: influence of incubation time, media, vitamins and solvents. **Iranian Journal of Biotechnology**, v. 7, 2009.

HEGAZY, M. F.; MOHAMED, T. A.; ELSHAMY, A. I.; MOHAMED, A. H.; MAHALEL U. A.; REDA, E. H.; SHAHEEN, A. M.; TAWFIK, W. A.; SHAHAT, A. A.; SHAMS, K. A. ABDEL-AZIM, N. S.; HAMMOUDA F. M. Microbial biotransformation as a tool for drug development based on natural products from mevalonic acid pathway: A review. **Journal of Advanced Research**, v. 6, p. 17- 33, 2015.

HERATH, W.; FERREIRA, D.; KHAN, I. A. Microbial metabolism. Part 7: Curcumin. **Natural Product Research**, v. 21, p. 444 – 450, 2007.

HOLLAND, H. L.; TERENCE A. M.; PHILLIP. J. N.; ZABIC M.; A New Paradigm for Biohydroxylation by *Beauveria bassiana* ATCC 7159. **Tetrahedron**, v. 55, p. 7441-7460, 1999.

HUSZCZA, E.; DMOCHOWSKA-GLADYSZ, J.; BARTMANSKA, A. Transformations of Steroids by *Beauveria bassiana*. **Zeitschrift für Naturforschung**, p. 103- 108, 2005.

IRESON, C.; ORR, S.; JONES, D. J. L.; VERSCHOYLE, R.; LIM, C.; LUO, J.; HOWELLS, L.; PLUMMER, S.; JUKES, R.; WILLIAMS, M.; STEWARD, W. P.; GESCHER, A. Characterization of Metabolites of the Chemopreventive Agent Curcumin in Human and Rat Hepatocytes and in the Rat *in Vivo*, and Evaluation of Their Ability to Inhibit Phorbol Ester-induced Prostaglandin E2 Production1. **Cancer research**, v. 61, p. 1058- 1064, 2001.

JAIN, K.; SOOD, S.; GOWTHAMARAJAN, K. Modulation of cerebral malaria by curcumin as an adjunctive therapy. **The Brazilian Journal of infectious diseases**, v. 17, p. 579- 591, 2013.

KAMINAGA, Y.; NAGATSU, A.; AKIYAMA, T.; SUGIMOTO, N.; YAMAZAKI, T.; MAITANI, T.; MIZUKAMI, H. Production of unnatural glucosides of curcumin with drastically enhanced water solubility by cell suspension cultures of *Catharanthus roseus*. **FEBS Letters**, v. 555, p. 311- 316, 2003.

KRISHNAKUMAR, I. M.; MALIAKEL, A.; GOPAKUMAR, G.; KUMAR, D.; MALIAKEL, B.; KUTTAN, R. Improved blood–brain-barrier permeability and tissue distribution following the oral administration of a food-grade formulation of curcumin with fenugreek fibre. **Journal of Functional foods**, v. 14, p. 215- 225, 2015.

LACROIX, I.; BITON, J.; AZERAD, R. Microbial models of drug metabolism: microbial transformations of Trimegestone (RU27987), a 3-keto-delta(4,9(10))-19-norsteroid drug. **Bioorganic Medicinal Chemistry**, v. 7, p. 2329- 41, 1999.

LIN, J. K.; PAN, M. H.; LIN-SHIAU, S. Y. Recent studies on the biofunctions and biotransformations of curcumin. **Biofactors**, v. 13, p. 153- 158, 2000.

MAEHARA, S.; IKEDA, M.; HARAGUCHI, H., KITAMURA, C., NAGOE, T.; OHASHI, K.; SHIBUYA, H. Microbial Conversion of Curcumin into Colorless Hydroderivates by the Endophytic Fungus *Diaporthe* sp. Associated with *Curcuma longa*. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 59, p. 1042 -1044, 2011.

MAHESHWARI, R. K.; SINGH, A. K.; GADDIPATI, J.; SRIMAL, R. C. Multiple biological activities of curcumin: A short review. **Life Sciences**, v. 78, p. 2081- 2087, 2006.

MOUSSA, C.; HOUZIAUX, P.; DANREE, B.; AZERAD, R. Fungal Metabolism of Phenolic and Nonphenolic *p*-Cymene-Related Drugs and Prodrugs. I. Metabolites of Thymoxamine. **Drug Metabolism & Disposition**, v. 25, 1997.

MURUGAN, P.; PARI, L. EFFECT OF TETRAHYDROCURCUMIN ON PLASMA ANTIOXIDANTS IN STREPTOZOTOCIN- NICOTINAMIDE EXPERIMENTAL DIABETES. Journal of Basic & Clinical Physiology & Pharmacology, v. 17, p. 231-244, 2006.

NIKOLOVA, P.; WARD, O. P. Whole cell biocatalysis in nonconventional media. **Journal of Industrial Microbiology**, v. 12, p. 76- 86, 1993.

OROIAN, M.; ESCRICHE, I. Antioxidants: Characterization, natural sources, extraction and analysis. **Food Research International**, v. 74, p. 10- 36, 2015.

PAN, M.; HUANG, T.; LIN, J. Biotransformation of curcumin through reduction and glucuronidation in mice. **Drug Metabolism & Disposition**, v. 27, 1998.

PAPAGIANNI, M. Fungal morphology and metabolite production in submerged mycelial processes. **Biotechnology Advances**, v. 22, p. 189- 259, 2004.

PAVIA, D. L.; LAMPMAN, G. M.; KRIZ, G. S.; VYVYAN, J. R. Introdução à Espectroscopia. São Paulo: Cengage Learning, 2010.

PETTERSON, D. H.; MURRAY, H. C. Microbiological oxygenation of steroids at carbon 11. Journal of American Chemical Society, v. 74, p. 1871-1872, 1952.

PIECHOTA, P.; CRONIN, M. T. D.; HEWITT, M.; MADDEN, J. C. Pragmatic Approaches to Using Computational Methods to Predict Xenobiotic Metabolism. **Journal of Chemical Information and Modeling**, 2013.

POLLARD, D.J.; WOODLEY, J. M. Biocatalysis for pharmaceutical intermediates: the future is now. **TRENDS in Biotechnology**, v. 25, 2006.

PRANA, T. K.; SRIKANDACE, J.; SUMITRO, E.; WULANDARI, D. The potency of Endophytic Fungi of Turmeric (*Curcuma longa L.*) in Biotransformation of Curcumin Compounds in Various Media. **Research Journal of Microbiology**, v. 5, p. 1189-1198, 2010.

PRASAD, E.; HAMEEDA, B.; RAO, A. B.; REDDY, G. Biotransformation of curcumin for improved biological activity and antiproliferative activity on acute HT-29 human cell lines. **Indian Journal Biotechnology**, v. 13, p. 324- 329, 2014a.

PRASAD, S.; GUPTA, S. C.; TYAGI, A. K.; AGGARWAL, B.B. Curcumin, a component of golden spice: From bedside to bench and back. **Biotechnology Advances**, v. 32, p. 1053-1064, 2014b.

RIOS, E. V.; DUQUE, A. L. C.; LEÓN, D. F. R. Caracterización espectroscópica y cromatográfica de curcumina extraída de los rizomas de Cúrcuma (*cúrcuma longa l.*) Cultivada en el departamento del Quindío. **Revista de Investigaciones Universidad del Quindio**, v. 19, p. 18- 22, 2009.

SÁ, L. Z. C. M. Determinação eletroanalítica e espectrofotométrica da atividade antioxidante de fermentados de jabuticaba e vinhos de diferentes procedências. 2013. 98 (Mestrado). Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Goiás, Goiânia.

SÁ, L. Z. C. M.; CASTRO, P. F. S.; LINO, F. M. A.; BERNARDES, M. J. C.; VIEGAS, J. C. J.; DINIS, T. C. P.; SANTANA, M. J.; ROMAO, W.; VAZ, B. G.; LIÃO, L. M.; GHEDINI, P. C.; ROCHA, M. L.; GIL, E. S. Antioxidant potential and vasodilatory activity of fermented beverages of jabuticaba Berry (*Myrciaria jaboticaba*). Journal of functional foods, v. 8, p. 169- 179, 2014.

SHARMA, R. A.; GESCHER, A. J.; STEWARD, W. P. Curcumin: The story so far. **European Jornal of Cancer**, v. 41, p. 1955- 1968, 2005.

SIVIERO A.; GALLO E.; MAGGINI V.; GORI L.; MUGELLI A.; FIRENZUOLI F.; VANNACCI A. Curcumin, a golden spice with a low bioavailability. **Journal of Herbal Medicine**, 2015. http://dx.doi.org/10.1016/j.hermed.2015.03.001

SOMPARN, P.; PHISALAPHONG, C.; NAKORNCHAI, S.; UNCHERN, S.; MORALES, N. P. Comparative Antioxidant Activities of Curcumin and Its Demethoxy and Hydrogenated Derivatives. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 30, p. 74-78, 2007.

SRISILAM, K.; VEERESHAM, C. Biotransformation of drugs by microbial cultures for predicting mammalian drug metabolism. **Biotechnology Advances**, v. 21, n. 1, p. 3-39, Mar 2003.

SYED, H. K.; LIEW, K. B.; LOH, G. O. K.; PEH, K. K. Stability indicating HPLC- UV method for detection of curcumin in *Curcuma longa* extract and emulsion formulation. **Food Chemistry**, v. 170, p. 321- 326, 2015.

TOBISZEWSKI, M.; MECHLINSKA, A.; NAMIESNIK, J. Green analytical chemistry – theory and practice. **Chemical Society Reviews**, v. 30, p. 2869- 2878, 2010.

VAREED, S. K.; KAKARALA, M.; RUFFIN, M. T.; CROWELL, J. A.; NORMOLLE, D. P.; DJURIC, Z.; BRENNER, D. E. Pharmacokinetics of Curcumin Conjugate Metabolites in Healthy Human Subjects. **Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention**, v. 17, p. 1411- 1417, 2008.

YANG, K.; LIN, L.; TSENG, T.; WANG, S.; TSAI, T. Oral bioavailability of curcumin in rat and the herbal analysis from *Curcuma longa* by LC–MS/MS. **Journal of Chromatography B**, v. 853, p. 183- 189, 2007.

YANG, L.; WANG, Z.; LEI, H.; CHEN, R.; WANG, X.; PENG, Y.; DAI, J. Neuroprotective glucosides of magnolol and honokiol from microbial-specific glycosylation. **Tetrahedron**, v. 70, p. 8244- 8251, 2014.

YAO, E. C.; XUE, L. Therapeutic Effects of Curcumin on Alzheimer's Disease. Advances in Alzheimer's Disease, v. 3, p. 145 -159, 2014.

ZENG, J.; YANG, N.; LI, X; SHAMI, P. J.; ZHAN, J. 4`-O-Methyglycosylation of curcumin by *Beauveria bassiana*. **Natural Product Communications**, v. 5, p. 77-80, 2010.

ZHANG, X.; YE, M.; LI, R.; YIN, J.; GUO, D. Microbial transformation of curcumin by *Rhizopus chinensis*. **Biocatalysis and Biotransformation**, v. 28, p. 380- 386, 2010.

ZHANG, W.; HUANG, J.; WO, X.; WANG, P. Transformation of Curcumin to Its Derivatives with a Novel *Pichia kudriavzevii* ZJPH0802 Strain. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 170, p. 1026- 1037, 2013.

<u>ANEXOS</u>

7. ANEXOS

Anexo 1 - Espectro de ¹H RMN do substrato Curcumina obtido em MeOD com TMS. Espectrômetro Bruker Avance III 500 de 11.75 T (500,13 MHz)







Anexo 3 - Espectro ampliado (7.10 a 6.40 ppm) de ¹H RMN do LaBiocon 552 obtido em MeOD com TMS. Espectrômetro Bruker Avance III 500 de 11.75 T (500,13 MHz) = CHANNEL f1 ========= 500.1316710 MHz 7.20 usec 65536 f 500.1300118 MHz 600 1300118 MHz 0 0 00 Hz 70.00 Hz 20151223 20151223 12.000 spect for 1H/13 65536 MeOD 8 12500.000 H: 0.190735 H 2.6214900 s 40.000 u 66.50 u 1.0000000 s 552 1 Ч Ľ labiocon шш പ SF01 SF01 NUC1 P1 SI SF SF SF SSB SSB CB CB 11 mdd 6.45 6.50 6.55 6.60 58 0 6.65 0 62 6.70 0 66 6.75 **58 0** 6.80 6.85 0 62 6.90 6.95 7.00 7.05 0 67 7.10

86







| | • • • • | ~~ ~~ | | | ~ ~ | | | •••• | •••• | | • • • • • | | | | | | | | | | |
|-------------------------|--|-------------------------------------|-----------------------------|----------------------------|------------|--|-------------------|---|--------------------------|-----------------|-------------|---------------|---------|-----------------|-----------------------|-----------------------|----------------------|----------------|---|---------------------------------------|-----------------|
| | | | Z H Z H Z | 0000 | useo Ku | 0 0 | 8 8 8 8 8 8 | 8 8 0 0 0 | 8 8 0 0 0 0 | | ZHM | usec | usec | MHZ | HZ DDM | 4 | ZHM | ZH | | MHZ | ZH |
| labiocon565 | 20151201 18.20 spect 5 mm TBI 1H/13 | hsqcetgpsi_MOD 4096 MeOD 8 | 16 15000.000 3.662109 | 0.1365833 203 22 223 | 301.4 | 145.000000000000000000000000000000000000 | 0.00172414 | 0.0300000000000000000000000000000000000 | 0.00086207 0.00001330 | CHANNEL fl ===: | 500.1317390 | 8.91 17.82 | 1000.00 | 200 125.7704 | 187.969925 298.910 | Echo-Antiecho 1024 | 500.1300019 QSINE | 0.00 | 0.02 | echo-antiecho 125.7577929 OSINE | 0.00 |
| NAME EXPNO PROCNO | Date_ Time INSTRUM PROBHD | PULPROG TD SOLVENT NS | DS SWH FIDRES | AQ RG | E E | CNST2 D0 | D4 | D11 D16 | D24 IN0 ZGOPTNS | | SF01 | P.C.C. | P28 | TD SF01 | FIDRES SW | FIMODE | SF WDW | SSB LB U | N D D D D D D D D D D D D D D D D D D D | MC2 SF WDW | SSB LB GB |



Anexo 7 - Espectro HSQC do substrato Curcumina obtido em MeOD com TMS

| op o o a o a a a o | 00.000.0000 | | | |
|---|---|--|---|---|
| | CC HAZ CRSEC ARSEC | <pre>x x x x x x x x x x x x x x x x x x x</pre> | MHZ MHZ USEC USEC HZ HZ HZ | z HM Z HM Z HM Z HM |
| labiocon565 300 300 20151201 17:16 17:16 17:16 17:16 17/13 14/13 hmbcgplpndgf MeoD | 15000.016 3.662109 0.1365833 0.1365833 33.333 36.50 | 145.000010 10.0000000 1.00000000 1.00000000 | CHANNEL fl ==== 500.1317390 8 11 17.82 17.82 17.82 187.969925 187.969925 | 5 00.00 5 00.1292048 5 1022048 5 1022 0 0 00 0 0 00 0 0 00 0 0 00 1024 1024 1024 1024 1024 0 1002 0 100 0 1002 0 1002 |
| NAME EXPNO FXOCNO Date InsTrum FULPROG PULPROG TD NC | SSWH FIDRES AQ DW DE | LE CNST2 CNST13 D0 D1 D16 D16 IN0 | ====== SF01 NUC1 P1 P2 ND0 TD SF01 STDRES ST01 STDRES | PAN ST ST ST ST SS SS PC SS SS SS SS SS SS SS SS SS SS SS SS SS |



| ATTEXU O - ESDECTIU FINIDO UU SUDSTIALU OUTOUTITIA UDITUU ETTI NIEUD CUTT TIN | Anexo 8 - | Espectro | HMBC do | substrato | Curcumina | obtido | em MeOD | com TM |
|---|-----------|------------------------------|---------|-----------|-----------|--------|---------|--------|
|---|-----------|------------------------------|---------|-----------|-----------|--------|---------|--------|







| | | | | | • • • • • • | | | | | |
|--|---|---|--|--|-------------------------|---|--|--|---|----------|
| | | HZ HZ SeC | usec K K | 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 | 0 0 0 0 0 0 0 0 0 | MHz MHz usec usec | MHZ HZ MM | MHz HZ | ZHM | Ηz |
| labiocon 552 300 1 20151223 122.07 | 5 mm TBI 1H/13 hmbcgplpndqf 4096 MeOD | 6142.50 1.499635 0.3334644 203 | 81.400 6.50 298.3 145.0000000 | 10.0000000 0.00000300 1.00000300 0.00344828 | 0.000200000 | CHANNEL fl ==== 500.1318898 1H 7.20 14.40 | 200 125.7703 187.969925 298.910 | 2048 500.1300032 SINE 0 0.00 | 0 0.02 1024 2F 125.7576152 2TNE STNE | 0.00 |
| NAME EXPNO PROCNO Date_ Time | INSTRUM PROBHD PULPROG TD SOLVENT NS | SWH FIDRES AQ RG | DW DE TE CNST2 | CNST13 D0 D2 D2 | D16 INO | ====================================== | TD TD FIDRES SW FNMODR | S S S S S S S S S S S S S S S S S S S | С С С С С С С С С С С С С С С С С С С | GB GB |



Anexo 10 - Espectro HMBC do LaBiocon 552 obtido em MeOD com TMS