



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS E NATURAIS  
FACULDADE DE QUÍMICA

**RODRIGO MELO DE OLIVEIRA**

**REAÇÕES DE BIOTRANSFORMAÇÃO E ATIVIDADE BIOLÓGICA DOS  
PRODUTOS REALIZADAS PELO FUNGO ENDOFÍTICO *Glomerella*  
*cingulata***

Belém - Pará

Abril - 2018



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS E NATURAIS  
FACULDADE DE QUÍMICA

**RODRIGO MELO DE OLIVEIRA**

**REAÇÕES DE BIOTRANSFORMAÇÃO E ATIVIDADE BIOLÓGICA DOS  
PRODUTOS REALIZADAS PELO FUNGO ENDOFÍTICO *Glomerella  
cingulata***

Trabalho de Conclusão de Curso  
apresentado à Faculdade de Química do  
Instituto de Ciências Exatas e Naturais da  
Universidade Federal do Pará para  
obtenção do título de Química Industrial.  
Orientador: Prof. Dr. Manoel Leão Lopes  
Júnior.

Belém - Pará  
Abril - 2018

**Rodrigo Melo de Oliveira**

**REAÇÕES DE BIOTRANSFORMAÇÃO E ATIVIDADE BIOLÓGICA DOS  
PRODUTOS REALIZADAS PELO FUNGO ENDOFÍTICO *Glomerella  
cingulata***

Trabalho de Conclusão de Curso  
apresentado à Faculdade de Química –  
UFPA como requisito para a obtenção do  
Grau de Química Industrial.

Orientador: Prof. Dr. Manoel Leão Lopes  
Júnior

Data da Apresentação: 13/04/2018

**Conceito:** \_\_\_\_\_

**Banca Examinadora**

-----  
Prof. Dr. Manoel Leão Lopes Júnior

CAMPUS UNIVERSITÁRIO DO TOCANTINS-CAMETÁ - UFPA – Orientador

-----  
Prof. Dr. Marivaldo José Costa Correa

PPGQ – ICEN – UFPA – Membro

-----  
Prof. Msc. Dalglish Gomes de Oliveira

SEDUC/PA - Membro

Dedico à minha família, que sempre me forneceu apoio e incentivo nos estudos e na vida.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço ao Universo porque tenho todas as minhas faculdades perfeitas e toda a capacidade de superação que um ser humano precisa ter para lidar com as dificuldades que surgem no decorrer de qualquer projeto.

À Universidade Federal do Pará por todo conhecimento adquirido durante o curso.

À minha mãe Ana Xavier e minha avó Jaci Luna, assim como também à minha noiva Raquel Plátilha pelo total apoio e dedicação nessa jornada na conclusão deste curso.

A toda minha família, pelos incentivos, sempre fornecidos, nos estudos.

Ao Prof. Dr. Manoel Leão Lopes Júnior, pela orientação e incentivo na produção e realização deste trabalho.

À amiga e colega de laboratório Fabiane Pinto, por todos os ensinamentos, contribuições, apoio, amizade e paciência para a realização desse trabalho.

Aos meus amigos da turma que fiz ao longo do curso em especial à Grace Kelly, Jefferson Barral, Kelly Guimarães, Luciano Vieira e Sidney Palheta, dentre muitos outros. Obrigado principalmente pelo grande companheirismo e momentos de descontração durante esse longo tempo de curso.

Aos funcionários do Instituto de Ciências Exatas e Naturais em especial ao Argemiro Ribeiro pelo auxílio e serviços prestados.

E a todos que contribuíram direta e indiretamente para a realização deste trabalho.

*“A sedução do maravilhoso embota nossas  
faculdades críticas.”*

*Carl Sagan*

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

AcOEt	Acetato de Etila
BDA	Batata – Dextrose – Agar
BHI	Brain Heart Infusion Broth
CDCl <sub>3</sub> -d	Clorofórmio Deuterado
$\delta$	Deslocamento Químico
DMSO	Dimetilsulfóxido
<i>d</i>	Dupleto
<i>Hz</i>	Hertz
<i>J</i>	Constante de Acoplamento
MeOH	Metanol
MHz	Megahertz
p.	Página
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
RMN <sup>1</sup> H	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio-1
S	Simpleto

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Fotografia da <i>Viola surinamensis</i> .....	15
Figura 2. Substâncias isoladas de <i>Viola surinamensis</i> .....	16
Figura 3. Estrutura da penicilina.....	18
Figura 4. Estrutura do taxol.....	19
Figura 5. Substâncias Isoladas de <i>Glomerella cingulata</i> .....	20
Figura 6. Representação de uma reação orgânica biocatalítica.....	22
Figura 7. Biotransformação do ácido eburicoico.....	23
Figura 8. Biotransformação do ácido oleanólico.....	23
Figura 9. Bioconversão do limoneno.....	23
Figura 10. Bactéria <i>Escherichia coli</i> .....	24
Figura 11. Bactéria <i>Staphylococcus</i> .....	25
Figura 12. Bactéria <i>Klebsiella pneumoniae</i> .....	25
Figura 13. Bactéria <i>Enterococcus faecalis</i> .....	26
Figura 14. Ilustração do procedimento geral utilizado para as reações de biotransformação.....	30
Figura 15. Fluxograma da reação de Biotransformação.....	31
Figura 16. Distribuição das amostras na placa de 96 poços.....	34
Figura 17. Representação da Concentração Bactericida Mínima.....	35
Figura 18. Substratos utilizados para as reações de biotransformação .....	36
Figura 19. Esquema de biotransformação da (2 <i>E</i> )-1-(4-metoxifenil)-3-(3,4,5-trimetoxifenil) prop-2-en-1-ona (A).....	37
Figura 20. Espectros de RMN de <sup>1</sup> H (300 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) do substrato A.....	38
Figura 21. Espectros de RMN de <sup>1</sup> H (300 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) de S1 .....	39
Figura 22. Esquema de biotransformação (2 <i>E</i> )-1-(4-metoxifenil)-3-(2,3,4-trimetoxifenil) prop-2-en-1-ona (B) .....	40
Figura 23. Espectros de RMN de <sup>1</sup> H (300 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) do substrato <b>B</b> .....	41
Figura 24. Espectros de RMN de <sup>1</sup> H (300 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) de <b>S2</b> .....	42

## RESUMO

O presente trabalho tem como finalidade testar o potencial de biotransformação do fungo endofítico *Glomerella cingulata* isolado das folhas da espécie vegetal *Virola surinamensis*. O fungo foi reativado e cultivado em placa de Petri utilizando como meio semissólido batata-dextrose-ágar (BDA). Nas reações de biotransformação o fungo endofítico *Glomerella cingulata* mostrou a capacidade de biorredução da dupla ligação  $\alpha,\beta$ -carbonilada das chalconas sintéticas: (2E)-1-(4-metóxfenil)-3-(3,4,5-trimetóxfenil)-prop-2-en-1-ona e (2E)-1-(4-metóxfenil)-3-(2,3,4-trimetóxfenil)-prop-2-en-1-ona resultando respectivamente nos produtos: 1-(4-metóxfenil)-3-(3,4,5-trimetóxfenil)-propan-1-ona e 1-(4-metóxfenil)-3-(2,3,4-trimetóxfenil)-propan-1-ona. Em relação aos substratos sintéticos dihidrodibenzalacetona, ácido abiético e antraceno-9,10-diona, não promoveu nenhum indicio de modificação estrutural, mostrando que o microrganismo não teve a capacidade de realizar reações de biotransformação com essas substâncias. Os produtos das biotransformações obtidos foram submetidos ao teste antimicrobiano frente as bactérias *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* e *Klebsiella pneumoniae*. Não foram observados atividade satisfatórios frente às bactérias mencionadas.

### Palavras-chave:

Biotransformação, Chalconas, *Glomerella cingulata*.

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>11</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>13</b>
<b>2.1</b>	<b>Geral</b> .....	<b>13</b>
<b>2.2</b>	<b>Específicos</b> .....	<b>13</b>
<b>3</b>	<b>REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	<b>14</b>
<b>3.1</b>	<b>A espécie vegetal <i>Virola surinamensis</i></b> .....	<b>14</b>
<b>3.2</b>	<b>Fungos Endofíticos</b> .....	<b>17</b>
<b>3.3</b>	<b>O gênero <i>Glomerella cingulata</i></b> .....	<b>19</b>
<b>3.4</b>	<b>Reação de Biotransformação</b> .....	<b>21</b>
<b>3.5</b>	<b>Considerações sobre bactérias utilizadas nos ensaios antimicrobianos</b>	<b>24</b>
<b>3.5.1</b>	<i>Escherichia coli</i> .....	<b>24</b>
<b>3.5.2</b>	<i>Staphylococcus aureus</i> .....	<b>24</b>
<b>3.5.3</b>	<i>Klebsiella pneumoniae</i> .....	<b>25</b>
<b>3.5.4</b>	<i>Enterococcus faecalis</i> .....	<b>26</b>
<b>4</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>27</b>
<b>4.1</b>	<b>Materiais</b> .....	<b>27</b>
<b>4.1.1</b>	<i>Equipamentos</i> .....	<b>27</b>
<b>4.1.2</b>	<i>Solventes</i> .....	<b>27</b>
<b>4.1.3</b>	<i>Substratos</i> .....	<b>27</b>
<b>4.1.4</b>	<i>Meios de cultura</i> .....	<b>28</b>
<b>4.1.5</b>	<i>Técnicas cromatográficas utilizadas para análises</i> .....	<b>28</b>
<b>4.1.6</b>	<i>Solução reveladora utilizada nas placas cromatográficas</i> .....	<b>28</b>
<b>4.1.7</b>	<i>Solvente Deuterado utilizado na análise de RMN de <sup>1</sup>H</i> .....	<b>28</b>
<b>4.1.8</b>	<i>Material utilizado no ensaio antimicrobiano</i> .....	<b>28</b>
<b>4.2</b>	<b>Métodos</b> .....	<b>29</b>
<b>4.2.1</b>	<i>Reativação e desenvolvimento do fungo</i> .....	<b>29</b>

4.2.2	<i>Meio de cultivo para a reação de biotransformação</i> .....	29
4.2.3	<i>Adição do fungo e do substrato ao sistema reacional para Biotransformação</i>	29
4.2.4	<i>Obtenções dos extratos reacionais da biotransformação</i> .....	31
4.3	<b>Teste antimicrobiano</b> .....	<b>32</b>
4.3.1	<i>Preparo do meio de cultivo BHI</i> .....	32
4.3.2	<i>Preparo do meio de cultivo Ágar BHI</i> .....	32
4.3.3	<i>Ativação das bactérias</i> .....	33
4.3.4	<i>Padronização das culturas</i> .....	33
4.3.5	<i>Preparo das amostras</i> .....	33
4.3.6	<i>Preparo do antibiótico controle</i> .....	33
4.3.7	<i>Ensaio para medir a CIM (Concentração Inibitória Mínima)</i> .....	34
4.3.8	<i>Tipo de atividade</i> .....	35
5	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>36</b>
5.1	<b>Produtos das Reações de Biotransformação</b> .....	<b>36</b>
5.2	<b>Biotransformação do substrato A</b> .....	<b>37</b>
5.3	<b>Biotransformação do substrato B</b> .....	<b>40</b>
5.4	<b>Resultados do Ensaio Antimicrobiano</b> .....	<b>43</b>
6	<b>CONCLUSÃO</b> .....	<b>44</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>45</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Em resposta à necessidade da indústria farmacêutica por novas moléculas, as empresas de química fina estão assumindo novas tecnologias de manufatura, visando produzir compostos que satisfaçam estas especificações. O desenvolvimento na biocatálise, combinado com os avanços na engenharia de processos, têm oferecido métodos melhorados para a produção de intermediários químicos valiosos (HUISMAN; GRAY, 2002).

A produção dessas substâncias, é devido, à crescente necessidade de preservação ambiental e redução das etapas envolvidas, tem exigido metodologias alternativas, como uso de biocatalisadores (DOUBLE; KRUTHIVENTI; GAIKAR, 2004), pois estes, além de fornecerem uma ampla economia em consumo de demais substâncias tradicionalmente utilizadas em processos industriais, acelerarem a produção em mais de centenas de vezes se comparado a processos convencionais. Biotransformações são importantes ferramentas na síntese orgânica, especialmente para a produção de moléculas quirais, em que reações químicas clássicas não são possíveis ou são ineficientes (BEATRIZ; LIMA; MARQUES, 2005).

O aumento no uso de processos que utilizam biocatalisadores, deu-se, principalmente, devido à alta demanda por novas moléculas com atividades farmacológicas. A biocatálise é uma alternativa sintética viável dentro dos princípios da química verde, pois são reações mais regioseletivas, quimiosseletivas e enantiosseletivas, fornecendo uma maior versatilidade e economia, diminuindo o uso de solventes e geração de subprodutos tóxicos ao homem e ao meio ambiente. Ainda, a literatura descreve o processo de biotransformação como uma forma de obtenção de derivados com maior atividade biológica, com melhores propriedades farmacocinéticas e para aumentar a diversidade química, através da obtenção de novas estruturas (BORGES et al., 2009).

De tal modo que se torna imprescindível o aprofundamento de pesquisas com plantas e com fungos que possuem essas características. Os fungos, em particular, são muito eficientes nos processos de reações de biotransformação, sendo seu uso de suma importância para as indústrias farmacêutica, química e agroquímica.

Isolado das folhas da espécie vegetal *Virola surinamensis*, árvore comum na região amazônica, o fungo *Glomerella cingulata*. Tendo como objetivo sua reativação, para a realização de reações de biotransformação e, também, a realização de testes antibacterianos com os produtos isolados para a obtenção de compostos com possível atividade biológica.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Geral

Explorar o potencial biotecnológico do fungo endofítico *G. cingulata* associado à espécie vegetal *V. surinamensis*, verificar as propriedades antimicrobianas da biomassa produzida e de substâncias isoladas, além de realizar reações de biotransformação.

### 2.2 Específicos

- ✓ Reativar o fungo endofítico *Glomerella cingulata*;
- ✓ Realizar reações de biotransformação utilizando o microrganismo para testar o potencial biocatalítico;
- ✓ Avaliar o potencial Antimicrobiano dos produtos das reações de biotransformação.

### 3 REVISÃO DA LITERATURA

#### 3.1 A espécie vegetal *Virola surinamensis*

O gênero *Virola* tornou-se alvo de intensos estudos científicos após a divulgação que algumas de suas espécies são usadas por certas tribos indígenas da Amazônia no preparo de um rapé alucinógeno e no envenenamento de flexas para a caça (VALDERRAMA, 2000). As espécies de *Virola* foram utilizadas na medicina tradicional como cura em infecções de pele (VEIGA et al., 2017). Sua resina foi utilizada no tratamento de erisipela e o chá de folhas é utilizado no tratamento de cólicas e dispepsia. Na Amazônia os índios inalam o vapor das folhas para tratar a malária. Nas regiões de ocorrência, o uso da *Virola* advém antes da colonização, quando os indígenas utilizavam suas sementes e cascas para a produção de alucinógenos. (PINÃ-RODRIGUES; MARQUEZ, 1999)

Dentre as mais conhecidas espécies de *Virola* está a *V. surinamensis* (figura 1, p. 15), (*Rol.*) *Warb.* pertencente à família Myristicaceae, e conhecida popularmente como ucuúba, ucuúba-branca, ucuúba-cheirosa, ucuúba-de-igapó, ucuúba-da-várzea, ucuúba verdadeira, bicuíba, bicuíba-branca, árvore-de-sebo, virola, entre outros. Sua reputação é crescente devido à utilização dessa espécie para a produção de uma gordura chamada de —sebo de ucuúba, provenientes das sementes utilizadas para a fabricação de velas, sabões e etc. A madeira de ucuúba é largamente utilizada na fabricação de compensado e os resíduos da produção industrial são usados na confecção de papel tipo Kraft de boa qualidade (GALUPPO e CARVALHO, 2001).

A espécie *V. surinamensis* é facilmente encontrada na América Central desde Guatemala até o Panamá, prosseguindo as Antilhas tendo seu ponto extremo nas Ilhas de Guagalupe, Granada, Trinidad e Tobago. Na América do Sul atinge Venezuela, Guiana Francesa, Colômbia, Peru, Bolívia e o Brasil (CESARINO, 2006).

Entre os importantes grupos de metabolismo secundário vegetal, estão os lignoides, que possuem essenciais funções tanto para as plantas que as produzem, quanto para o homem que extrai ou sintetiza. Sendo que para as plantas e evidenciado que os lignoides apresentam um papel em adaptação ecológica, pois lignanas são acumulados em madeira em resposta a ferimentos mecânicos, ou ocasionados por fungos ou bactérias (CHEN, 1976).

As plantas do gênero *Virola* são todas lenhosas, variando de pequenos arbustos até árvores de grande porte. Para a espécie em estudo encontra-se árvore de até 30 m de altura com tronco de até 1 m de diâmetro e folhas com até 20 cm de comprimento (RODRIGUES, 1980). A classificação taxonômica da espécie vegetal pode ser vista no Quadro 1.

**Quadro 1.** Classificação taxonômica da *Virola Surinamensis* (NEVES, 1999).

<b>REINO</b>	Vegetal
<b>DIVISÃO</b>	Spermatophyta
<b>CLASSE</b>	Dicotyledoneae
<b>ORDEM</b>	Lurales
<b>FAMÍLIA</b>	Myristicaceae
<b>GÊNERO</b>	<i>Virola</i>
<b>ESPÉCIE</b>	<i>Virola surinamensis</i>

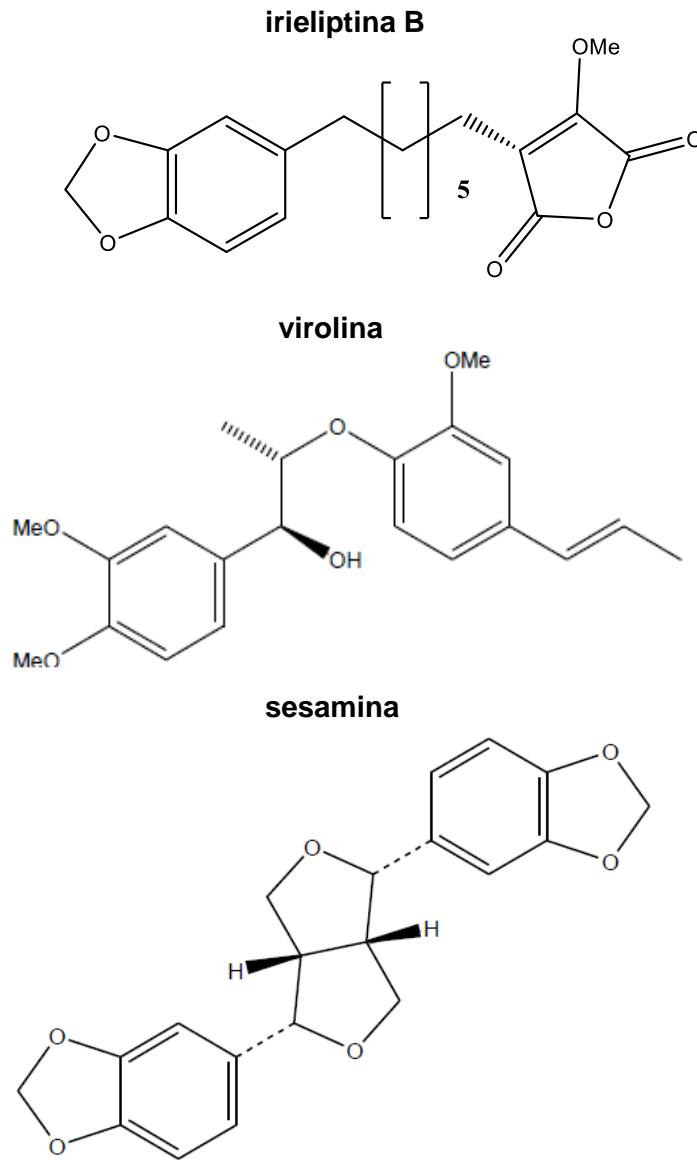
**Figura 1.** Fotografia da *Virola surinamensis*



Pesquisas realizadas com a *V. Surinamensis*, anteriormente, já forneceram isolamento de substâncias, muitas delas relatadas na literatura como substâncias de atividades farmacológicas. Algumas dessas substâncias podem ser vistas seguir. Na figura 2 (p. 16) está a irieliptina B (LOPES, et. al., 2004), extratos contendo essa substância demonstraram atividade seletiva sobre a cepa mutante de *S. cerevisiae*, Rad 52Y (CARBONEZI et al., 2004); a virolina que, em testes

realizados, foi comprovado o efeito alelopático dessa substância (BORGES et al., 2007); a sesamina (BORGES, 2003), essa substância tem a capacidade de oxidação hepática de ácidos gordos.

**Figura 2.** Substâncias isoladas de *Virolla surinamensis*



### 3.2 Fungos Endofíticos

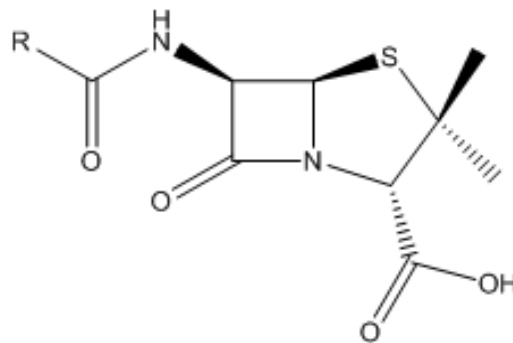
Os fungos estão entre os organismos mais importantes do planeta, não só por suas funções nos diferentes ecossistemas, mas também pela influência sobre os seres humanos em relação às atividades cotidianas, como produção de alimentos, na indústria farmacêutica, produção de medicamentos, dentre outras (MUELLER; SCHMIT, 2007). É importante ressaltar que os microrganismos são recursos renováveis e a sua produção de substâncias potencialmente bioativas em escala ampliada pode ser realizada usando a tecnologia existente, como a variação do meio e otimização das condições de cultivo. Como exemplo, a manipulação no meio de cultura do *Penicillium notatum*, que resultou em um aumento de 6000 vezes na produção da penicilina (DEMAIN, 2000).

Os microrganismos endofíticos, tais como os fungos, podem colonizar folhas, ramos e raízes, sem causar prejuízos aos hospedeiros, habitando de forma sistêmica o apoplasto, vasos condutores e em alguns casos o interior da célula (MUSSI-DIAS et al., 2012). Todos os microrganismos que habitam, pelo menos durante um período de seu ciclo de vida, o interior de um vegetal, podem ser considerados como um endófito. A distinção entre endófitos, epifíticos (aqueles que vivem na superfície das plantas) e fitopatógenos (aqueles que causam doenças às plantas) é de puro significado didático (AZEVEDO, 2000). É estimado que cerca de 80% das plantas são hospedeiras de fungos (ZHANG et al., 1997). Os mecanismos pelos quais fungos endofíticos controlam ataques de insetos são listados e incluem a produção de toxinas, bem como a influência desses compostos sobre plantas e animais e como sua produção pode ser afetada por condições genéticas e ambientais (AZEVEDO et al., 2000).

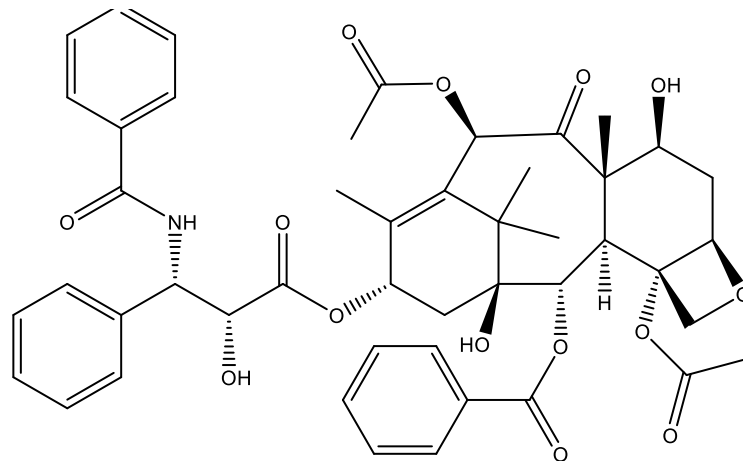
Os fungos endofíticos são um grupo diversificado de ascomicetos definidos por sua ocorrência assintomática nos tecidos vegetais. Eles ocorrem em todo o território terrestre, nas comunidades naturais e antrópicas, colonizando plantas no Ártico, solos geotérmicos, desertos, oceanos, florestas tropicais, mangues e florestas costeiras (JALGAONWALA; MOHITE; MAHAJAN, 2011; ARNOLD, 2007). Normalmente, centenas de espécies de endófitos podem ser isoladas de uma única planta, sendo que pelo menos um é especificado ao hospedeiro (TAN; ZOU, 2001).

Fungos endofíticos representam uma fonte rica de produtos naturais novos e bioativos. Eles colonizam um habitat ecológico praticamente inexplorado e seus metabólitos secundários são particularmente ativos, possivelmente devido às interações metabólicas com seus hospedeiros (CHAPLA; BIASETTO; ARAÚJO, 2012). Os microrganismos endofíticos são um reservatório significativo de novos metabólitos secundários bioativos, incluindo antimicrobianos, inseticidas, compostos anticancerígenos, antidiabéticos e imunossupressores com suas grandes aplicações potenciais na agricultura, medicina e indústria de alimentos (KHARWAR et al., 2011; YU et al., 2010). Portanto, o estudo dos endófitos parece ser uma estratégia promissora na obtenção ou identificação de substâncias potencialmente bioativas (SOMENSI, 2012). Algumas dessas substâncias podem ser citadas como a substância clássica penicilina (figura 3), como antibiótico, descoberto por Alexander Fleming em 1928 e produzido pelo fungo *Penicillium notatum*, abriu a era do uso de antibióticos na terapêutica moderna e assim, o interesse no estudo de microrganismos como fonte de agentes bioativos (SCRIABINE et al., 1999).

**Figura 3.** Estrutura da penicilina.



E também o composto chamado taxol (figura 4, p. 19) isolado do fungo endofítico *Taxomices andreanae* no qual é utilizado como agente quimioterapêutico para o tratamento de vários cânceres incluindo câncer de mama, ovário refratário, cólon e sarcoma.

**Figura 4.** Estrutura do taxol.

### 3.3 O gênero *Glomerella cingulata*

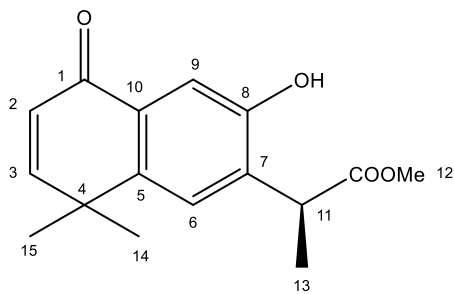
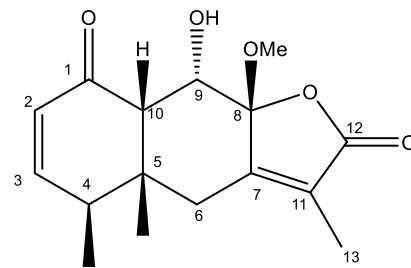
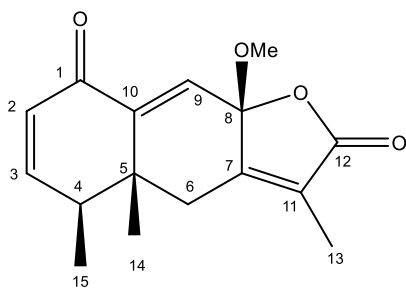
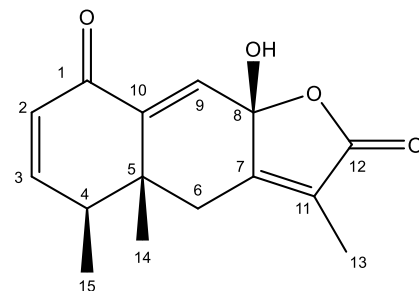
O gênero *Glomerella* é de interesse fitopatológico pertencente ao Reino Fungi, divisão Ascomycotina, Classe Ascomycetes, Ordem Polystigmatales, Família Glomerellaceae. Os ascomicetos constituem o grupo mais numeroso de fungos, ocorrendo nos mais variados habitats exercendo saprofitismo e/ou parasitismo, causando diversos tipos de doenças em plantas (BERGAMIN FILHO et al., 1995).

O fungo *Glomerella cingulata* (Stonem Spauld. e Schrenk) é um fungo cujos hospedeiros são atacados através de vários mecanismos, podendo ocorrer a penetração do tecido cuticularizado através de apressórios ou não. Também pode ocorrer penetração direta por hifas não diferenciadas através de células não cuticularizadas, estômatos e ferimentos (BRUGGEN e MARAITE, 1987; ZAKARIA, 1995; LOPEZ, 2001). É encontrado mundial, mas predominante em climas subtropical. Hospedeiro comum incluindo frutas tal como manga, papaya, abacate, morango, maçã e frutas cítricas, e espécies de plantas não cultivada são também são afetadas (BAILEY; JEGER, 1992; MEDEIROS et al., 2010). A seguir encontra-se a classificação taxonômica do fungo no Quadro 2 (p. 20).

**Quadro 2.** Taxonomia do fungo *Glomerella cingulata*.

<b>REINO</b>	Fungi
<b>DIVISÃO</b>	Ascomycotina
<b>CLASSE</b>	Ascomycetes
<b>ORDEM</b>	Polystigmatales
<b>FAMÍLIA</b>	Glomerellaceae
<b>GÊNERO</b>	Glomerella
<b>ESPÉCIE</b>	<i>Glomerella cingulata</i>

Algumas classes de substâncias já foram isoladas deste endófito, muitas delas relatadas na literatura como substâncias de excelentes atividades farmacológicas, podemos citar algumas dessas atividades como anticancerígena, antimicrobiana entre outras. Algumas dessas substâncias podem ser vistas abaixo (figura 5), por exemplo, os sesquiterpenos (A-D) Glomeremofilanos (LIU et al., 2017) que possuem a atividade anti-inflamatória neurológica, revelando papel importante na inibição de doenças como Alzheimer e Parkinson.

**Figura 5.** Substâncias Isoladas de *Glomerella cingulata*.**Estrutura do Glomeremofilano A****Estrutura do Glomeremofilano B****Estrutura do Glomeremofilano C****Estrutura do Glomeremofilano D**

### 3.4 Reação de Biotransformação

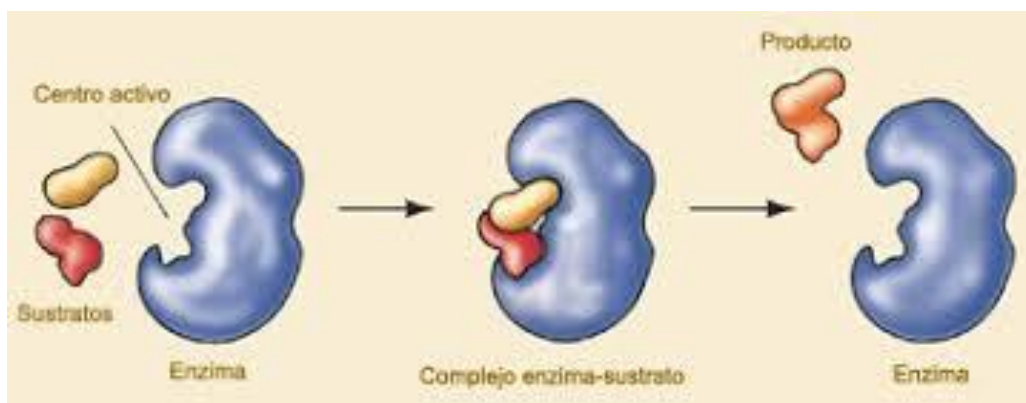
Biotransformações são conversões químicas catalisadas por enzimas (SHAW, 2003) sobre substratos naturais ou sintéticos. Os processos biocatalíticos utilizando células íntegras ou enzimas isoladas têm encontrado diversas aplicações, especialmente nas indústrias química, agroquímica e farmacêutica (PINHEIRO, 2007; HUISMAN, 2002). É uma ferramenta importante na síntese orgânica, especialmente para a produção de moléculas quirais e sempre que as reações químicas são ineficientes (PINHEIRO; MARSAIOLI, 2007).

O desenvolvimento de novos métodos biocatalíticos vem crescendo em várias áreas de conhecimento como a química, microbiologia e engenharia genética, e novos microrganismos e/ou suas enzimas são sujeitos a triagem intensiva.

A base teórica da utilização de biocatálise em transformações orgânicas é a grande diversidade e número de enzimas disponíveis na natureza (OLIVEIRA; OLIVEIRA, 2012). A aplicação de enzimas, como as microbianas, como catalisadores em processos industriais, mostra-se vantajosa, pois são específicas, naturais e geralmente não apresentam toxicidade, sendo essas características importantes tanto para a indústria quanto para o meio ambiente. Dentre as enzimas microbianas, aquelas produzidas por fungos estão em expansão de uso em diversos processos (ESPOSITO; AZEVEDO, 2010).

A capacidade de aproximar os substratos em uma determinada orientação favorece a diminuição da energia de ativação, que é necessária para converter o substrato em produto. Em geral, as velocidades de reações se tornam mais rápidas na ordem de  $10^6$  até  $10^{23}$  vezes quando comparadas com as não catalisadas (NELSON; COX, 2000; VOET; VOET, 1995). O mecanismo simplificado da ação desses biocatalisadores, também conhecido por chave-fechadura, pode ser representado como mostrado na Figura 6 (p. 22), onde a enzima atua catalisando a reação sem afetar a formação do produto (FABER, 1997).

**Figura 6.** Representação de uma reação orgânica biocatalítica.



Estudos de biotransformação de produtos naturais realizados por cepas fúngicas têm sido descritos na literatura como estratégias para obtenção de derivados com maior atividade biológica, menos toxicidade, com propriedades farmacocinéticas melhoradas ou, ainda, para aumentar a diversidade química através da obtenção de novas estruturas (BORGES et al., 2009).

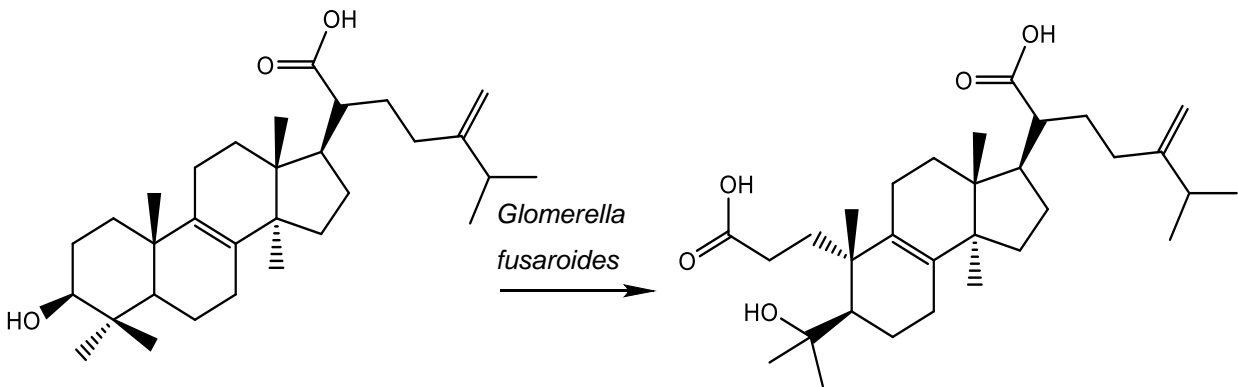
Em muitas bioconversões relatadas na literatura, os biocatalisadores utilizados têm origem microbiana: microrganismos ou seus sistemas enzimáticos isolados. Cada uma das possibilidades apresenta vantagens e desvantagens: sistemas enzimáticos isolados são comercialmente disponíveis e alguns são relativamente fáceis de serem obtidos. No entanto, alguns desses sistemas isolados exigem a presença de cofatores e a necessária regeneração desse material pode ser uma complicação. Organismos inteiros, por sua vez, não requerem uso de cofatores e de maneira geral são mais baratos que os sistemas enzimáticos isolados. Por outro lado, as etapas de crescimento e manutenção desses organismos exigem árduo trabalho manual (COLLADO; ALEU, 2001; FABER, 2004).

As vantagens e desvantagens do processo irão determinar a viabilidade de cada caso específico. O uso de biocatálise para modificações de moléculas orgânicas têm várias vantagens. As condições reacionais são suaves, não são produzidos rejeitos industriais tóxicos e as reações são específicas. Dentre as desvantagens podem ser citadas a perda de atividade enzimática com o tempo, custos mais altos assim como as maiores dificuldades no desenvolvimento de

processos envolvendo microrganismos em cultivo. Entretanto, em muitos casos, as vantagens predominam (OLIVEIRA, 2012). Na literatura existem vários trabalhos referentes à biotransformação com fungos dos mais diversos gêneros, como podem ser vistas nas reações abaixo.

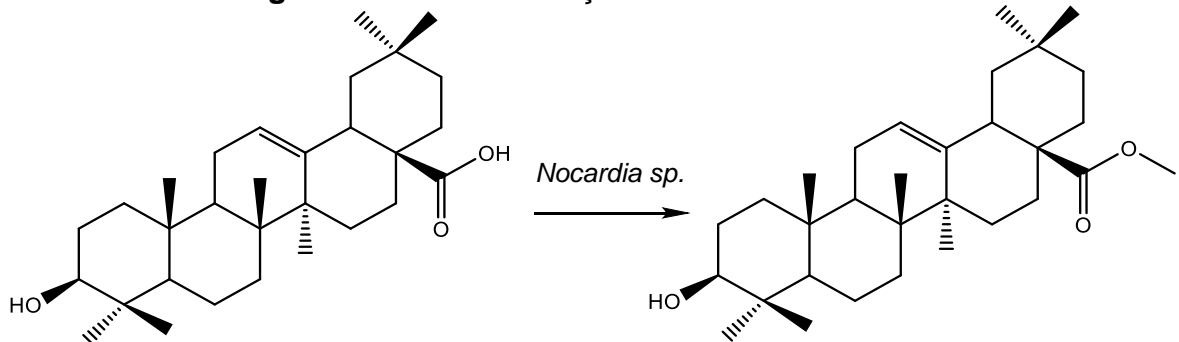
Biotransformação do ácido eburicoico pelo o fungo *Glomerella fusarioides* (figura 7) via clivagem oxidativa do anel A (SHIRANE et al, 1996).

**Figura 7.** Biotransformação do ácido eburicoico



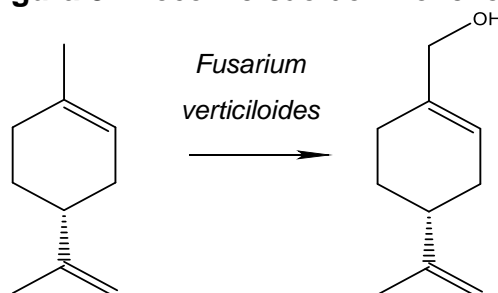
Biotransformação do ácido oleanólico pelo o fungo *Nocardia sp.* (figura 8) produzindo o metil éster de ácido oleanólico (ZHANG et al, 2005).

**Figura 8.** Biotransformação do ácido oleanólico



A bioconversão do limoneno em álcool perílico (figura 9) pelo o fungo *Fusarium verticilloides* (DE OLIVEIRA; STRAPASSON, 2000).

**Figura 9.** Bioconversão do limoneno



### 3.5 Considerações sobre bactérias utilizadas nos ensaios antimicrobianos

#### 3.5.1 *Escherichia coli*

*E. coli* é uma bactéria Gram-negativa, oxidase-negativa, em forma de haste da família Enterobacteriaceae. É capaz de crescer tanto aerobicamente e anaerobicamente, de preferência a 37 ° C. A *E. coli* (figura 10) é amplamente estudada em humanos, animais, alimentos e meio ambiente. Embora existam muitas características comuns que esses patótipos empregam para colonizar a mucosa intestinal e causar doenças, o curso, o início e as complicações variam significativamente. Os surtos são comuns em países desenvolvidos e em desenvolvimento, e às vezes eles têm consequências fatais. Muitos destes patógenos são uma grande preocupação com a saúde pública, pois apresentam baixas doses infecciosas e são transmitidos através de meios onipresentes, incluindo alimentos e água (CROXEN et al., 2013).

**Figura 10.** Bactéria *Escherichia coli*.



Fonte: exame.abril.com.br

#### 3.5.2 *Staphylococcus aureus*

*S. aureus* Bactéria é uma bactéria gram-positiva, patogênica, causadora de doenças respiratórias e cardíacas e a principal causadora de infecções hospitalares (SOUZA et al., 2004). A *S. aureus* (figura 11, p. 25) é um importante patógeno humano que causa uma ampla gama de infecções clínicas. É uma das principais causas de bacteriemia e endocardite infecciosa, bem como infecções osteoarticulares, cutâneas e moles, pleuropulmonar e infecções relacionadas a dispositivos (TONG et al., 2015).

**Figura 11.** Bactéria *Staphylococcus*



Fonte: [www.pinterest.com](http://www.pinterest.com)

### 3.5.3 *Klebsiella pneumoniae*

*K. pneumoniae* é um bacilo Gram-negativo, anaeróbio facultativo, membro da família Enterobacteriaceae, capaz de sobreviver em objetos inanimados ou fômites (objetos com capacidade de absorver, reter e transportar organismos contagiantes ou infecciosos, como por exemplo, sapatos), colonizar o corpo humano e causar infecções graves em pacientes imunocomprometidos (CORREA et al., 2013). A *Klebsiella pneumoniae* (figura 12) agora é reconhecida como uma ameaça urgente para a saúde humana devido ao surgimento de cepas resistentes a múltiplos fármacos associadas a surtos hospitalares e cepas hipervirulentas associadas a infecções graves adquiridas na comunidade (HOLT et al., 2015).

**Figura 12.** Bactéria *Klebsiella*

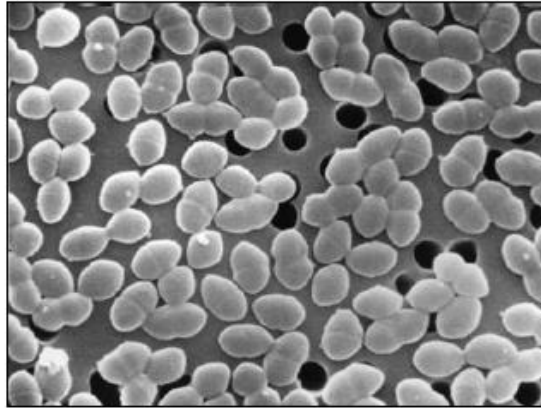


Fonte: [www.pinterest.com](http://www.pinterest.com)

### 3.5.4 *Enterococcus faecalis*

*E. faecalis* (figura 13) é o enterococo mais comum, gram-positivo, entérico facultativo (PINHEIRO et al., 2003). Os *Enterococcus* spp. compõem a microbiota intestinal de seres humanos e animais saudáveis e estão amplamente distribuídos no ambiente (BIAVASCO et al. 2007; CASAL et al. 2009, LÓPEZ et al. 2009; RIBOLDI et al. 2009). No Brasil, há poucos levantamentos a respeito da ocorrência de cepas de *Enterococcus* em alimentos de origem animal, tendo sido os relatos clínicos os mais publicados, em que se analisam cepas isoladas de pacientes humanos em hospitais (CAMPOS; SOUZA; SILVA; SANTANA, 2013).

**Figura 13.** Bactéria *Enterococcus faecalis*



Fonte: [www.biomedicinaemacao.com.br](http://www.biomedicinaemacao.com.br)

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Materiais

#### 4.1.1 Equipamentos

- ✓ Espectrômetro de Ressonância Magnética Nuclear – Modelo Mercury 300-Varian, operando a 75 MHz (RMN de  $^{13}\text{C}$ ) e 300 MHz (RMN de  $^1\text{H}$ );
- ✓ Autoclave vertical - Modelo Au PHOENIX;
- ✓ Capela de fluxo laminar - Modelo PA 320 PACHANE;
- ✓ Agitador Orbital tipo Shaker – MARCONI;
- ✓ Balança analítica Sartorius;
- ✓ Estufa incubadora: QUIMIS;
- ✓ Vortex : Genius 3 IKA<sup>®</sup>;
- ✓ Câmara de análise de fluorescência por luz ultravioleta: Cabine e luz SPECTROLINE, modelos CM-10/ENF-260C;

#### 4.1.2 Solventes

- ✓ Acetato de Etila (ISO FAR);
- ✓ Metanol (DINÂMICA);
- ✓ DMSO (ISO FAR).

#### 4.1.3 Substratos

- ✓ (2E)-1-(4-metoxifenil)-3-(3,4,5-trimetoxifenil)prop-2-en-1-ona;
- ✓ (2E)-1-(4-metoxifenil)-3-(2,3,4-trimetoxifenil)prop-2-en-1-ona;
- ✓ Diidroxidibenzalacetona;
- ✓ Antraceno-9,10-diona;
- ✓ Ácido Abiético.

#### 4.1.4 Meios de cultura

- ✓ Ágar (ISOFAR);
- ✓ Caldo BHI (KASVI);
- ✓ BHI ágar (KASVI);
- ✓ Dextrose (ISOFAR);
- ✓ Extrato de malte (HIMEDIA).

#### 4.1.5 Técnicas cromatográficas utilizadas para análises

- ✓ Cromatografia em camada delgada (CCD): cromatoplasmas de alumínio de sílica gel 60F254 espessura 0,2 mm (MERCK);
- ✓ DC-Fertigfolien ALUGRAM<sup>®</sup> Xtra SIL G/UV<sub>254</sub> espessura 0,2 mm.

#### 4.1.6 Solução reveladora utilizada nas placas cromatográficas

- ✓ Solução ácida de Sulfato Cérico [Ce(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>] 2%;

#### 4.1.7 Solvente Deuterado utilizado na análise de RMN de <sup>1</sup>H.

- ✓ Clorofórmio-D (Cambridge Isotope Laboratories).

#### 4.1.8 Material utilizado no ensaio antimicrobiano

- ✓ Placa de Elisa 96 poços (KASVI);
- ✓ TTC (Cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio) (NEON);
- ✓ Cloridrato de ciprofloxacino (MEDLEY<sup>®</sup>).

## 4.2 Métodos

### 4.2.1 *Reativação e desenvolvimento do fungo*

Uma cepa do microrganismo foi ativada em placa de Petri com o meio BDA (Batata Dextrose, Ágar). Para o preparo do meio foram utilizados 100 g de batata inglesa lavada e fatiada em 500 mL de água destilada, aquecido em aproximadamente 100 °C para extração do caldo, logo após a filtração da parte líquida, contendo os nutrientes da batata, adicionou-se 10 g de Ágar e 10 g de Dextrose, agitou-se até a homogeneização, a solução foi esterilizada em autoclave por 15 minutos a 121 °C. Cerca de 20 mL da solução foram distribuídos em cada placa de Petri e foi colocada em repouso na temperatura ambiente para que o meio ficasse semissólido, sendo em seguida, inoculado em capela de fluxo laminar, um fragmento do micélio para cada placa em seguida, armazenadas na micoteca do Laboratório de Bioensaios e Química de Microrganismos (LaBQuiM) da Universidade Federal do Pará (UFPA), onde permaneceram para o desenvolvimento das hifas.

### 4.2.2 *Meio de cultivo para a reação de biotransformação*

Para realizar a reação de biotransformação foi utilizado como meio de cultivo o extrato de malte, que foi escolhido por ser considerado o melhor meio em que o fungo se desenvolveu. Para o seu preparo foram utilizados 500 mL de água destilada, 5 g de D-glicose anidra e 0,5 g de Peptona. O meio foi homogeneizado e distribuído em 5 frascos de Erlenmeyer de 250 mL, contendo cada um 100 mL do meio, em seguida foi esterilizado em autoclave durante 15 minutos a 121° C.

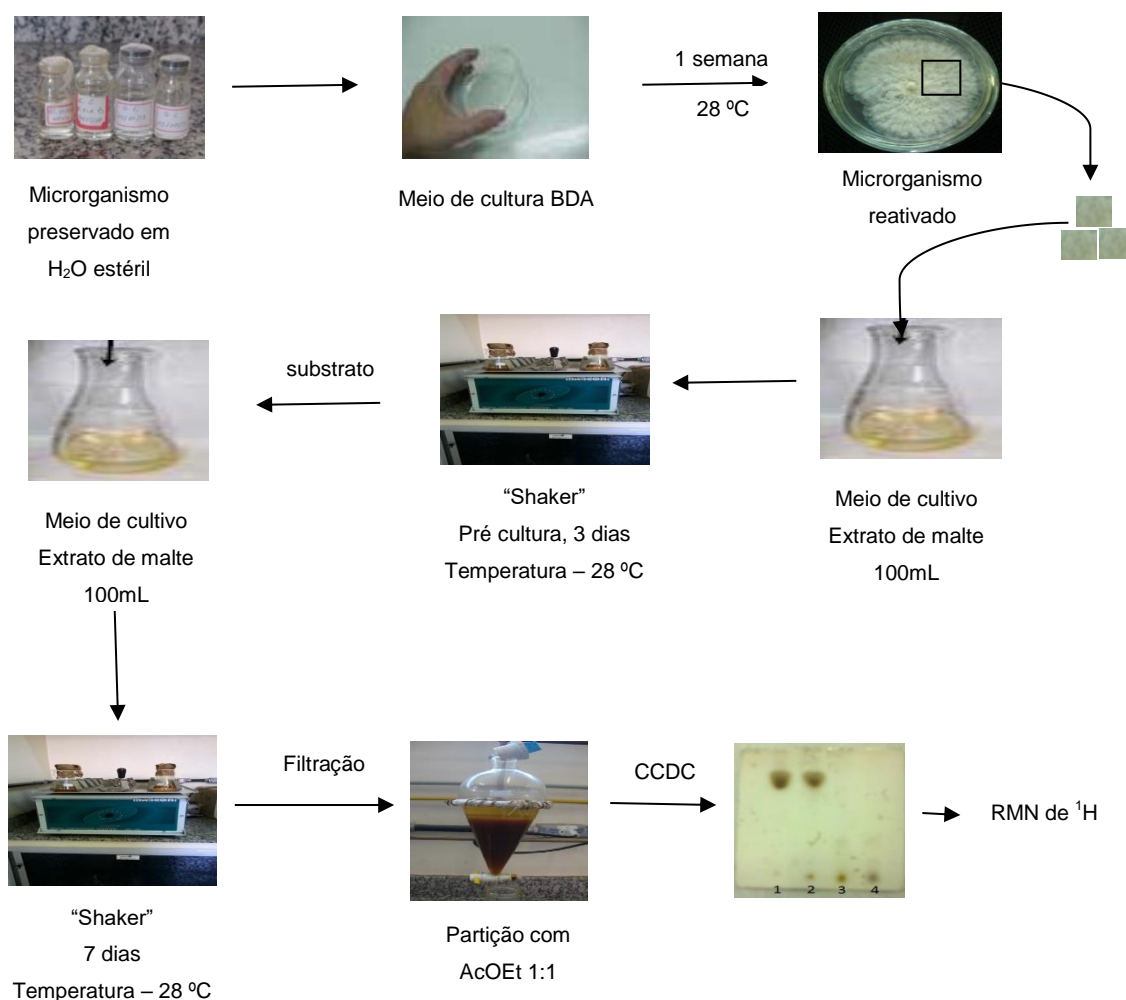
### 4.2.3 *Adição do fungo e do substrato ao sistema reacional para Biotransformação*

Para o estudo de biotransformação fragmentos de BDA contendo micélio fúngico foram inoculados nos frascos Erlenmeyer previamente esterilizados, os quais foram incubados sob agitação (125 rpm) a temperatura de 28 °C por um período de três dias. Após esse período os substratos foram adicionados na concentração de 0,5 mg.mL<sup>-1</sup> (substrato/meio de cultivo). Foram utilizados substratos

de origem sintéticas como as chalconas (2E)-1-(4-metóxfenil)-3-(3,4,5 trimetóxfenil)-prop-2-en-1-ona (**A**) e (2E)-1-(4-metóxfenil)-3-(2,3,4-trimetóxfenil)-prop-2-en-1-ona (**B**) solubilizadas em 50  $\mu\text{L}$  de dimetilsufóxido. Os frascos com o meio de reação e os de controle foram colocados à mesa agitadora orbitalar, por mais sete dias mantendo-se as condições de agitação e temperatura. Ao final de dez dias o meio de reação foi submetido a avaliação de biotransformação.

Frascos contendo apenas o meio de cultura (controle do meio de cultura), meio de cultura e o substrato (controle do substrato) e o meio de cultura e o fungo (controle microbiano) foram incubados sob as mesmas condições. Essa metodologia foi realizada em triplicata e é ilustrada na figura 14.

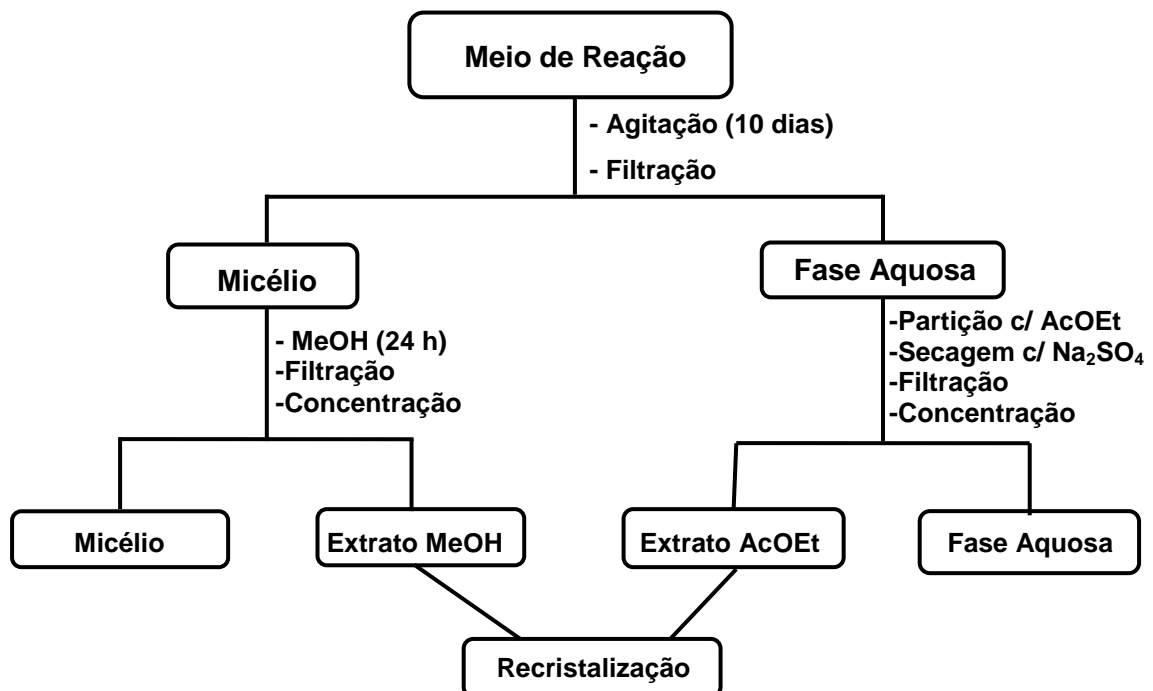
**Figura 14.** Ilustração do procedimento geral utilizado para as reações de biotransformação.



#### 4.2.4 Obtenções dos extratos reacionais da biotransformação

Após o período de dez dias os sistemas de reação foram filtrados à vácuo, os filtrados foram particionados com acetato de etila duas vezes na proporção 1:1, em seguida a fase orgânica foi secada com sulfato de sódio anidro ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ), depois filtrado e concentrado em evaporador rotativo, obtendo-se o extrato acetato de etila (figura 15). Aos frascos que continham a biomassa fúngica foram adicionados metanol e permaneceram durante 24 horas, com a finalidade de eliminar os esporos e evitar o risco de contaminação. Após esse tempo, os sistemas foram filtrados e concentrados, obtendo assim o extrato metanólico. Os frascos com o micélio eliminado foram deixados na capela para que volatizasse o solvente ainda existente, e após esse procedimento os frascos passaram pelo processo de descontaminação em autoclave durante 45 minutos a  $121^\circ \text{C}$ . Abaixo pode-se observar o fluxograma da reação de biotransformação.

**Figura 15.** Fluxograma da reação de Biotransformação



Todos os extratos obtidos foram analisados por CCDC, onde foram eluidos em Hex/AcOEt 30 % (Hexano:Acetato de Etila 70:30). O parâmetro utilizado para atestar a ocorrência ou não do processo de biotransformação consistiu na comparação entre os espectros de RMN de  $^1\text{H}$  dos produtos obtidos com os espectros dos substratos testados.

Para a purificação dos produtos das chalconas (diidrochalconas) foi utilizada a técnica de recristalização, assim foram obtidos os produtos **S1** e **S2**.

### 4.3 Teste antimicrobiano

Quatro cepas bacterianas foram usadas nos ensaios: *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Escherichia coli* (ATCC 8739), *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212) e *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 70063). As referidas cepas foram obtidas mediante solicitação à Fundação Osvaldo Cruz (Rio de Janeiro - RJ). As cepas liofilizadas foram suspensas em meios de cultura indicado pelo Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS). Utilizando-se a metodologia de suspensão e armazenamento preconizada por aquele instituto. As cepas foram armazenadas no laboratório de genética –Departamento de Biologia Molecular/CCB da – UFPA. Repiques das cepas foram cedidos ao grupo de pesquisa em Química de Produtos Naturais da Faculdade de Química da Unifesspa.

As cepas foram cedidas ao grupo de pesquisa pela Prof<sup>a</sup> Dr. Marilene Nunes Oliveira, docente da Unifesspa.

#### 4.3.1 Preparo do meio de cultivo BHI

Para o preparo do meio de cultivo BHI (Infuso Cérebro Coração) em 300 mL de meio de cultivo foram utilizados 11,1 g de meio de cultura BHI.

#### 4.3.2 Preparo do meio de cultivo Ágar BHI

Já no preparo do meio de cultivo Ágar BHI (Infuso Cérebro Coração) foram utilizados 13,5 g de ágar bacteriológico em 300 mL de caldo BHI. Após a dissolução o meio foi esterilizado em autoclave a 121 °C durante 15 minutos.

#### **4.3.3** *Ativação das bactérias*

As bactérias testadas nos ensaios foram ativadas em placa de Petri de 9 cm de diâmetro, contendo ágar BHI, por um período de 24 h. Após esse período foram transferidas, com auxílio de uma haste bacteriológica estéril, aproximadamente três colônias de cada bactéria para um tubo de ensaio contendo 3 mL do caldo BHI e incubadas por mais um período de 24 h. Suas concentrações foram padronizadas para se obter uma cultura com aproximadamente  $1,0 \times 10^8$  UFC. Após atingir essa concentração realizou-se diluições até alcançar a concentração de  $1,0 \times 10^4$  UFC.

#### **4.3.4** *Padronização das culturas*

Primeiramente preparou-se uma solução de sulfato de bário numa concentração referente a  $1,0 \times 10^8$  UFC/mL. Para se obter essa concentração foi necessário fazer uma mistura das soluções de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  1% (9,95 mL) e  $\text{BaCl}_2$  1% (0,05 mL). Feito isso, comparou-se o grau de turvação do tubo de ensaio contendo a bactéria com o padrão sulfato de bário. Com essa padronização o tubo contendo a bactéria apresentou uma concentração aproximadamente de  $1,0 \times 10^8$  UFC.

#### **4.3.5** *Preparo das amostras*

Para os produtos da biotransformação foram utilizados 1 mg para serem testadas, as amostras foram solubilizadas em 100  $\mu\text{L}$  de DMSO, contidos em um tubo de Eppendorf em seguida agitou-se no Vortex para homogeneizar a solução. Em seguida foram adicionados 900  $\mu\text{L}$  de caldo BHI esterilizado e agitou-se novamente a solução. Desta forma foram obtidas soluções estoque na concentração de 1 mg/mL.

#### **4.3.6** *Preparo do antibiótico controle*

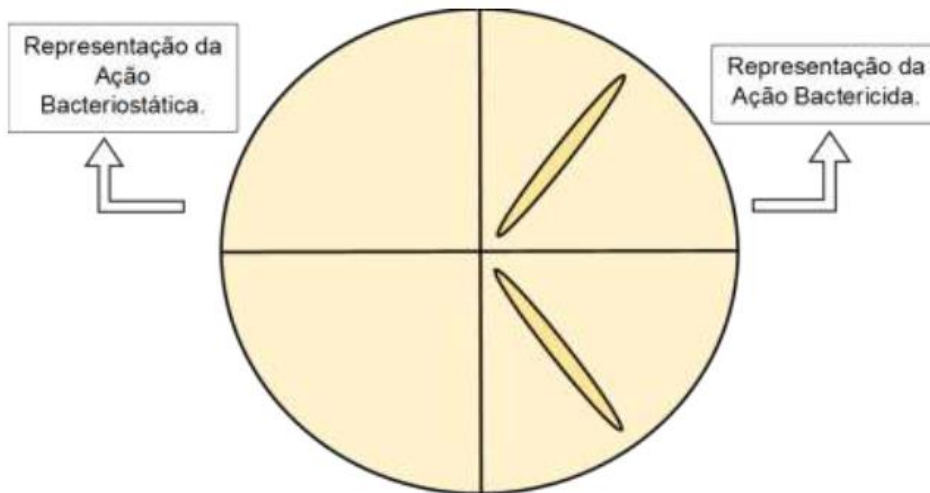
Pesou-se 1 mg do antibiótico Cloridrato de ciprofloxacino e dissolveu-se em 1 mL de água destilada estéril. Desta solução, pipetou-se 5  $\mu\text{L}$  e diluiu-se em



#### 4.3.8 Tipo de atividade

Após a leitura feita com a adição do corante TTC (cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólico), as cavidades que não apresentaram coloração avermelhada foram inoculadas para uma placa de petri contendo o meio de cultura ágar BHI e incubadas por 37°C em um período de 24 horas. Onde se observa que houve o impedimento do crescimento da bactéria, indica que o extrato ou substância possui um efeito bacteriostático a essa concentração, e onde a bactéria não apresentou crescimento, indica que o extrato ou substância possui efeito bactericida. Na figura 17 ilustra-se o comportamento das bactérias diante do crescimento microbiano, onde se pode classifica-lo como efeito bactericida ou bacteriostático.

**Figura 17.** Representação da Concentração Bactericida

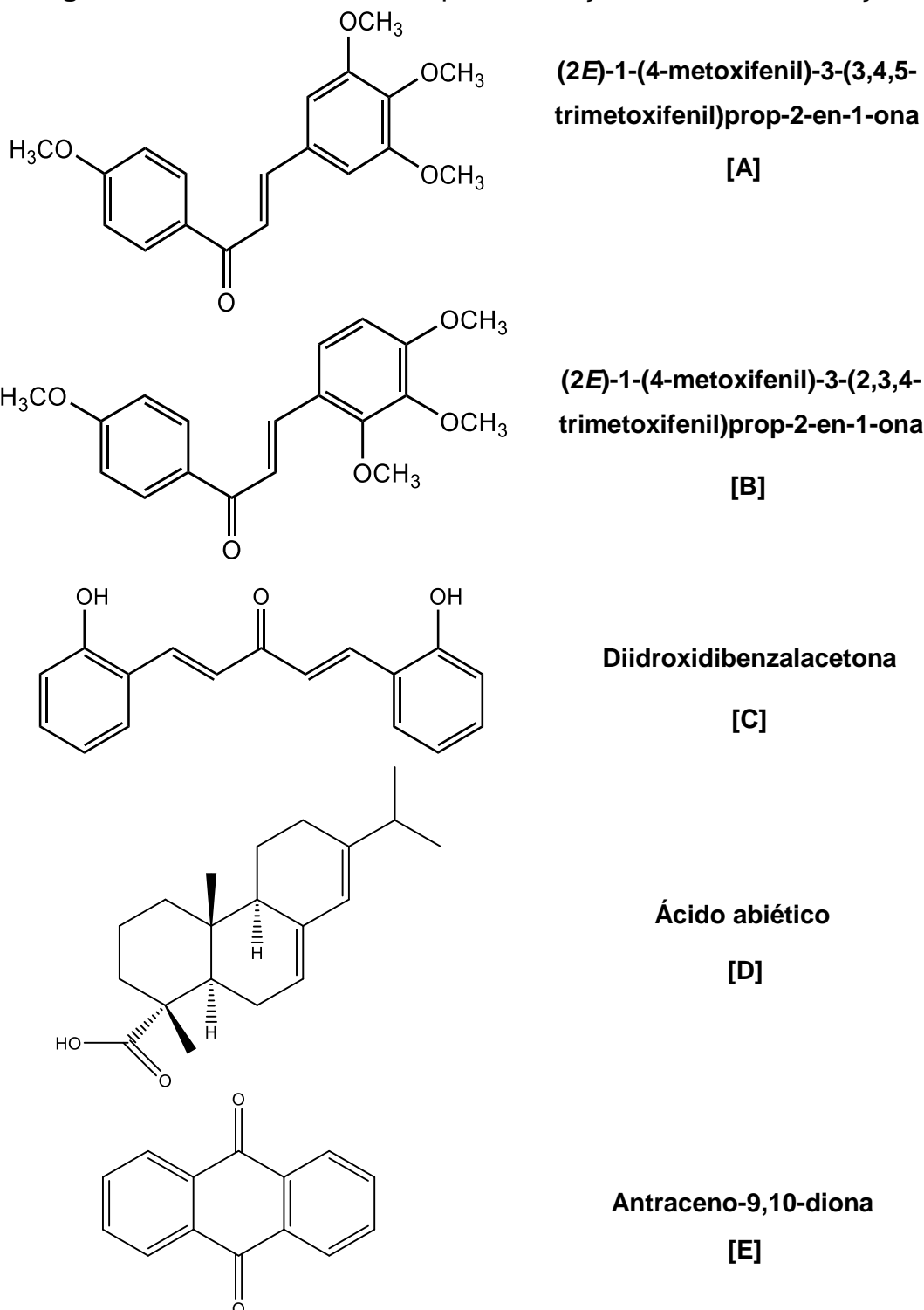


## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Produtos das Reações de Biotransformação

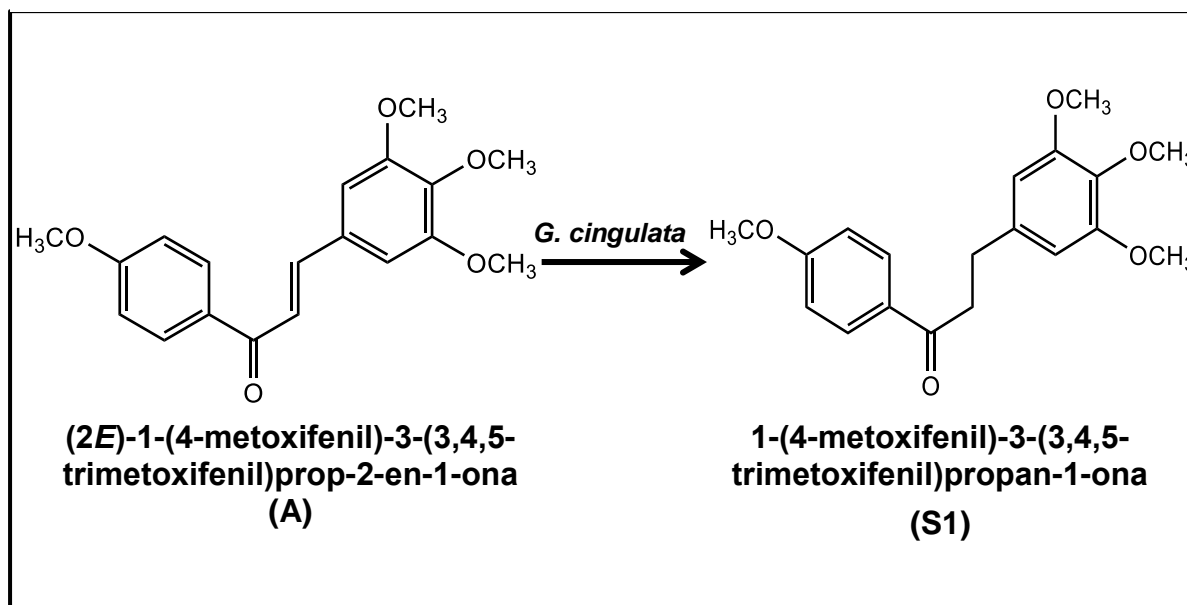
As estruturas dos substratos (A-E) utilizados no processo biocatalítico encontram-se ilustrados a seguir na figura 18:

**Figura 18.** Substratos utilizados para as reações de biotransformação



## 5.2 Biotransformação do substrato A.

**Figura 19.** Esquema de biotransformação da (2E)-1-(4-metoxifenil)-3-(3,4,5-trimetoxifenil) prop-2-en-1-ona (A).



O esquema (figura 19) descreve a reação de biotransformação. Após o período de reação, o extrato obtido foi analisado por RMN  $^1\text{H}$  (figura 21, p. 39), onde se verificou a formação de um produto por meio da comparação do espectro de RMN  $^1\text{H}$  do substrato (figura 20, p. 38) com o espectro do meio reacional da biotransformação. É observado o aparecimento de dois sinais tripletos na região em  $\delta_H$  3,20 (*t*, Hz, 2H- $\alpha$ ) e em  $\delta_H$  3,00 (*t*, 2H- $\beta$ ) sinais referentes aos hidrogênios metínicos  $\alpha$ - $\beta$ -carbonilado. O aparecimento desses sinais confirmam a biotransformação do substrato A, para a substância 1-(4-metoxifenil)-3-(3,4,5-trimetoxifenil)propan-1-ona (S1).

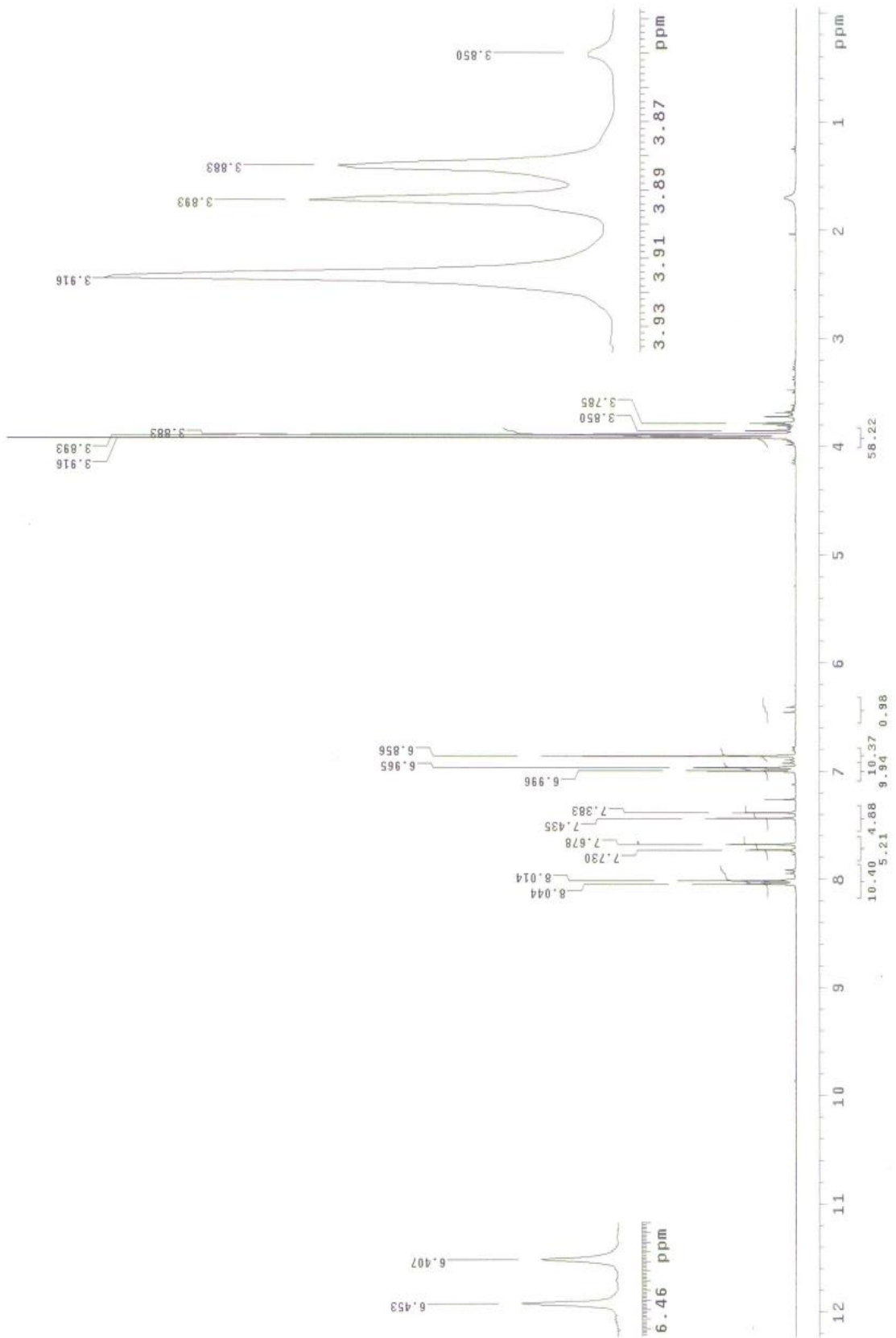
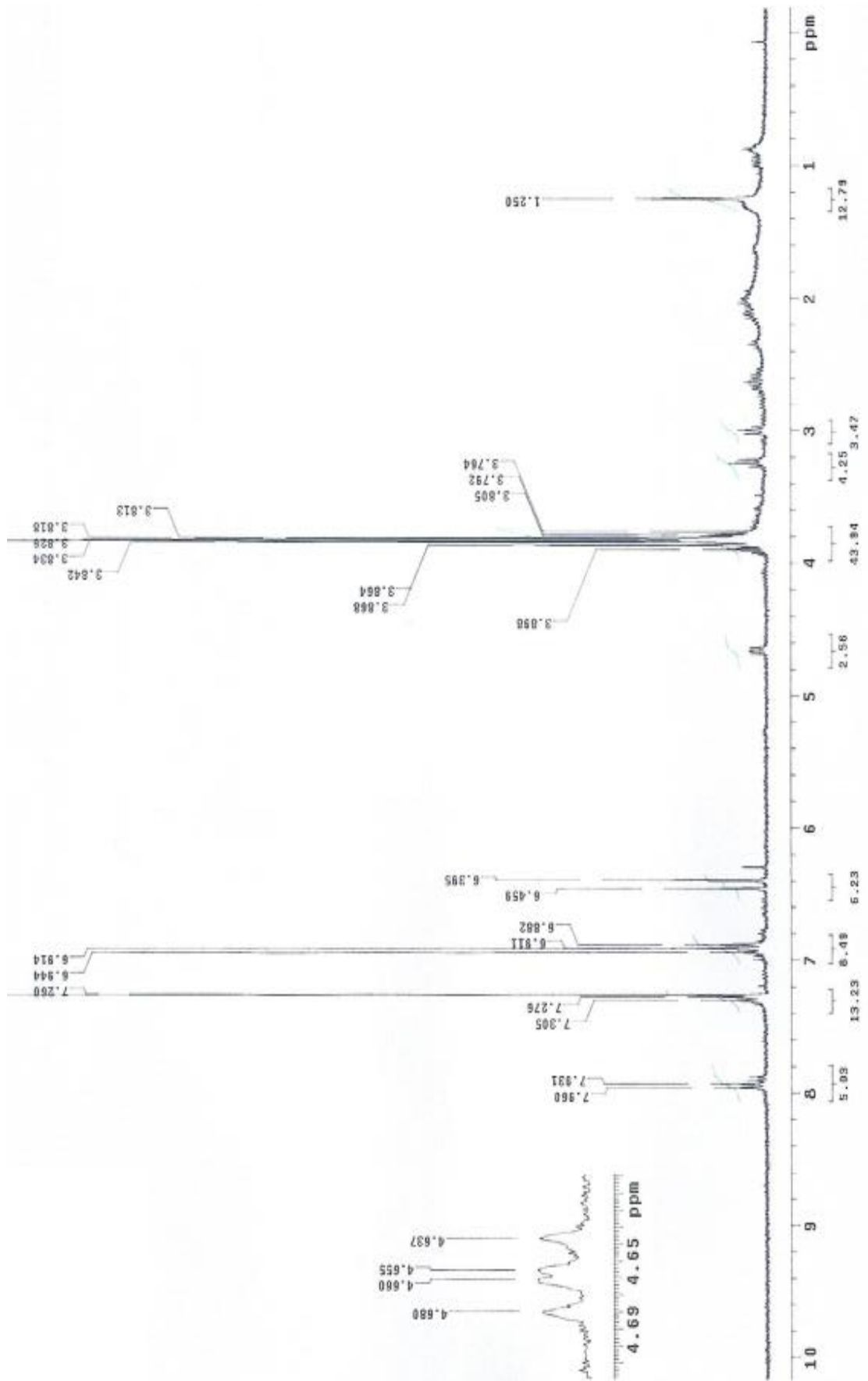
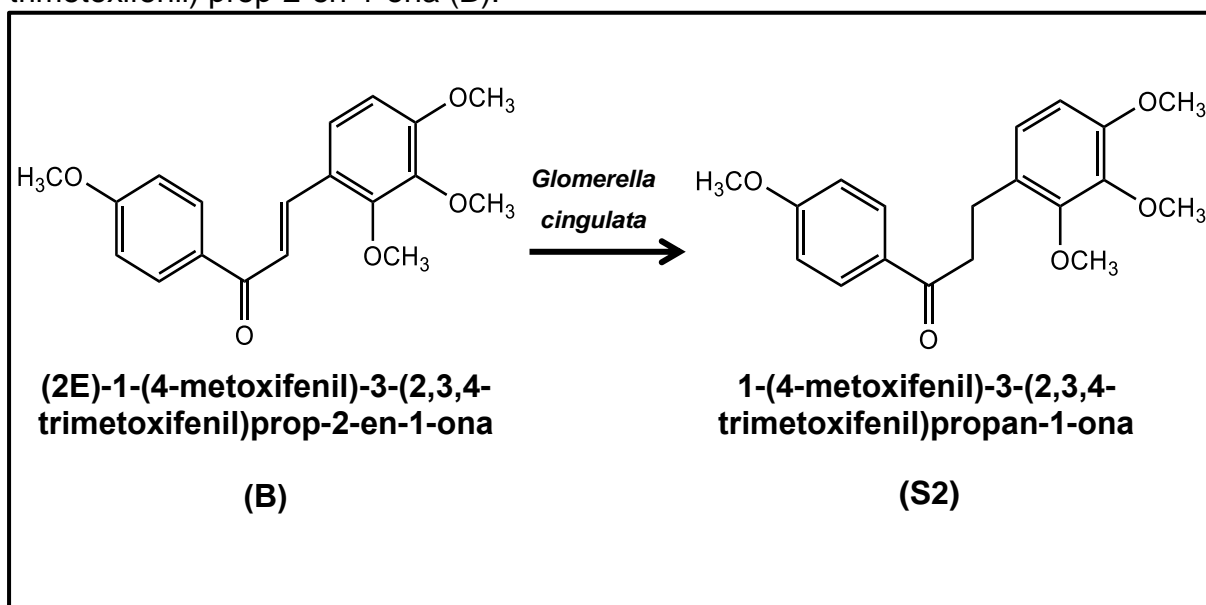
**Figura 20.** Espectros de RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) do substrato **A**.

Figura 21. Espectros de RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de S1.

### 5.3 Biotransformação do substrato B.

**Figura 22.** Esquema de biotransformação (2E)-1-(4-metoxifenil)-3-(2,3,4-trimetoxifenil) prop-2-en-1-ona (B).



A figura 22 descreve a reação de biotransformação do substrato. A análise foi realizada pela comparação dos espectros de RMN  $^1\text{H}$  do substrato (figura 23, p. 41) com o espectro de RMN  $^1\text{H}$  (figura 24, p. 42) do extrato, foi observado o aparecimento de dois sinais tripletos na região em  $\delta_H$  3,19 ( $t$ , Hz,  $2\text{H-}\alpha$ ) e em  $\delta_H$  2,9 ( $t$ ,  $2\text{H-}\beta$ ) referentes aos hidrogênios metilênicos  $\alpha$ - $\beta$ -carbonilado. Esses sinais confirmam a biotransformação do substrato B para 1-(4-metoxifenil)-3-(2,3,4-trimetoxifenil)propan-1-ona (S2).

**Figura 23.** Espectros de RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) do substrato **B**.

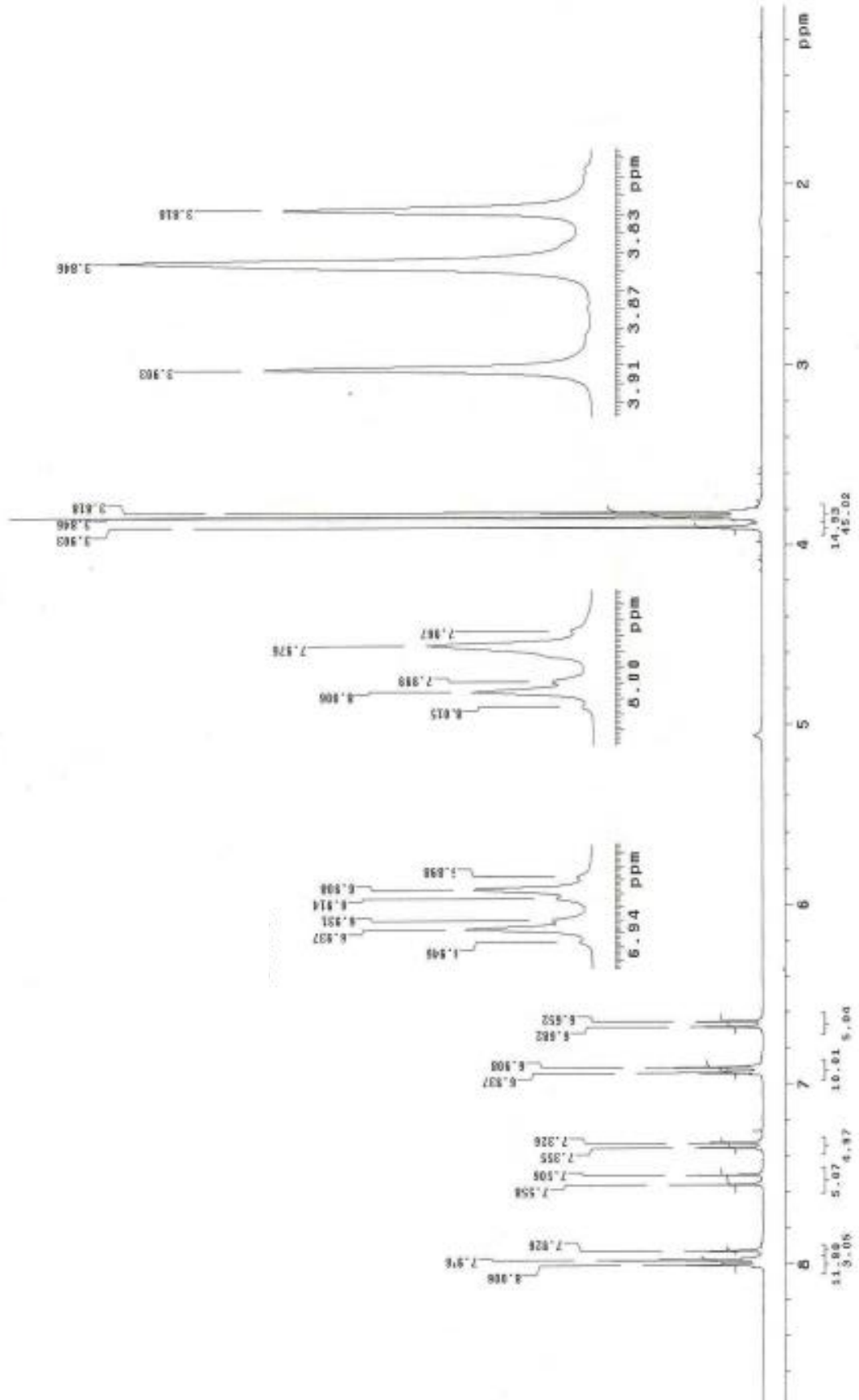
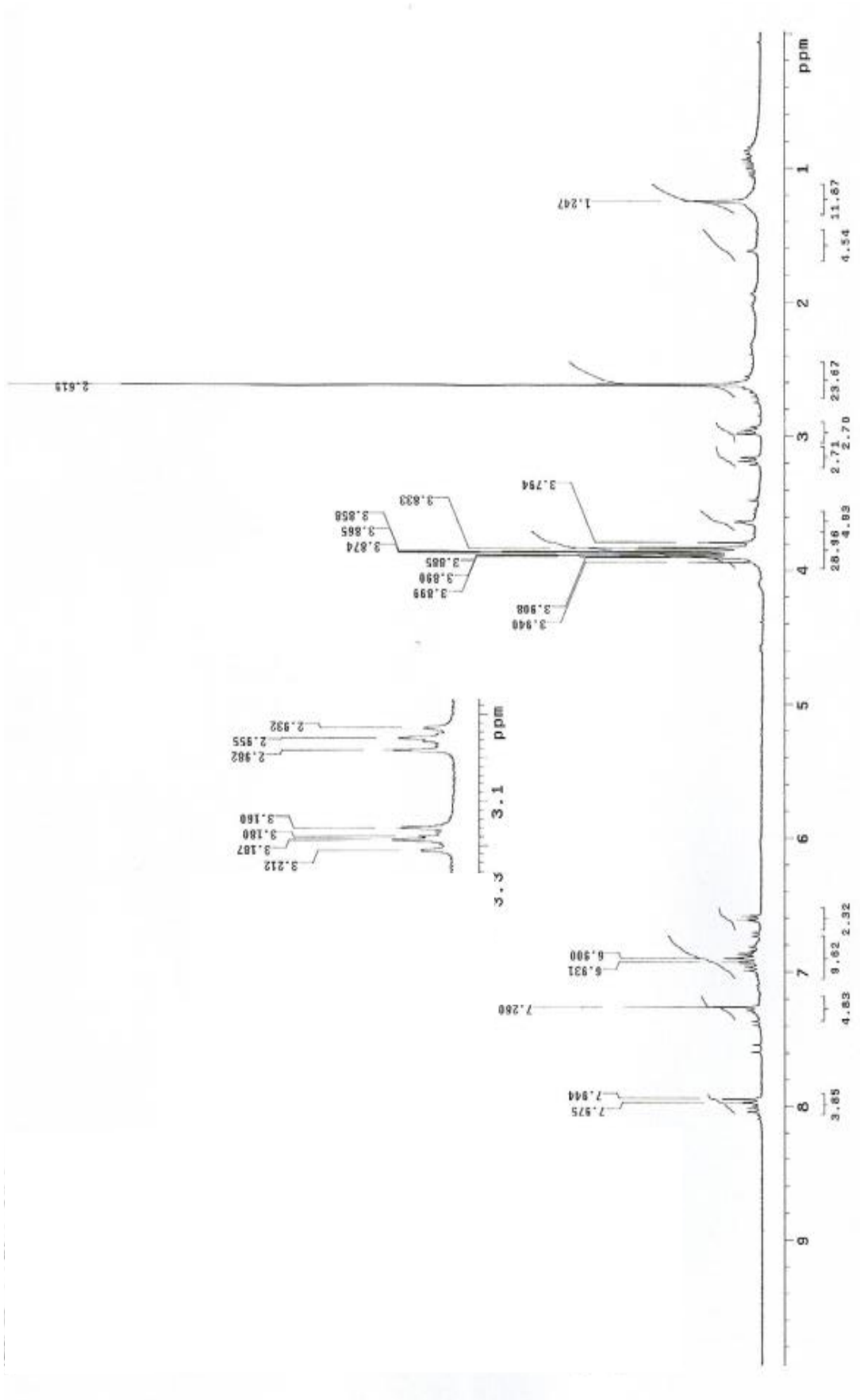


Figura 24. Espectros de RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) de S2.



O fungo *G. cingulata* não foi capaz de realizar reação de biotransformação dos substratos **C**, **D** e **E**. Após análises dos espectros obtidos do meio de reação não foi observada nenhuma alteração em comparação com os espectros dessas substâncias.

#### 5.4 Resultados do Ensaio Antimicrobiano

Os produtos das biotransformações obtidos foram analisados frente as bactérias *Escherichia coli* (ATCC 8739), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212) e *Klebsesia pneumoniae* (ATCC 70063).

Nas reações de biotransformação, o fungo endofítico *G. cingulata* mostrou a capacidade de biorredução da ligação dupla  $\alpha,\beta$ -carbonilada das chalconas sintéticas (2E)-1-(4-metóxfenil)-3-(3,4,5-trimetóxfenil)-prop-2-en-1-ona (A) e (2E)-1-(4-metóxfenil)-3-(2,3,4-trimetóxfenil)-prop-2-en-1-ona (B), resultando nas respectivas diidrochalconas 1-(4-metóxfenil)-3-(3,4,5-trimetóxfenil)-propan-1-ona (S1) e 1-(4-metóxfenil)-3-(2,3,4-trimetóxfenil)-propan-1-ona (S2). Após o termino dos testes antimicrobianos foi possível observar que os produtos **S1** e **S2** não apresentaram atividade biológica frente bactérias testadas. Esses resultados demonstram que o fungo é quimiosseletivo nessas reações, reduzindo apenas a ligação dupla C=C do sistema enona das chalconas testadas.

## 6 CONCLUSÃO

Nas reações de biotransformação o fungo endofítico *Glomerella cingulata* mostrou a capacidade de biorredução da dupla ligação  $\alpha,\beta$ -carbonilada das chalconas sintéticas: (2E)-1-(4-metóxfenil)-3-(3,4,5-trimetóxfenil)-prop-2-en-1-ona (A) e (2E)-1-(4-metóxfenil)-3-(2,3,4-trimetóxfenil)-prop-2-en-1-ona (B) resultando nos seus respectivos produtos: 1-(4-metóxfenil)-3-(3,4,5-trimetóxfenil)-propan-1-ona e 1,3-difenil-propan-1-ona (S1) e 1-(4-metóxfenil)-3-(2,3,4-trimetóxfenil)-propan-1-ona (S2). O endófito frente aos substratos sintéticos diidrodibenzalacetona (C), ácido abiético (D) e antraceno-9,10-diona (E), não foi observada através das análises nenhum indicio de modificação estrutural mostrando que o microrganismo não teve a capacidade de realizar reações de biotransformação com essas substâncias.

Os produtos da biotransformação foram vergados a testes biológicos, estes então realizados junto às bactérias *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* e *Klebesia pneumoniae*. Observando-se que para as substâncias S1 e S2 não foram observados resultados satisfatórios frente as bactérias testadas.

Através dos resultados analisados é possível contribuir de maneira significativa para esse universo que ainda está sendo conhecido aos poucos, que é o estudo dos fungos endofíticos, mostrando mais uma vez de forma satisfatória a importância de isolamento de microrganismos para a obtenção de novas substâncias, e na utilização de processos enzimáticos realizados por eles que são cada vez mais importante na indústria de maneira em geral e outras áreas afins.

Tendo em vista a grande biodiversidade da região amazônica e o grande potencial destes endofíticos em reações de biotransformação, assim como a necessidade de metodologias ecologicamente corretas e a aplicação industrial deste processo, espera-se que mais pesquisas sejam desenvolvidas nesta área do conhecimento científico com o intuito de divulgar o potencial biocatalítico de células íntegras de fungos.

## REFERÊNCIAS

ACHILLADELIS, B.; LANDAU, R.; SCRIABINE, A. (Ed.). Pharmaceutical innovation: revolutionizing human health. **Philadelphia: Chemical Heritage Press**, v. 2, p. 148-165, 1999.

ARNOLD, A. E.; LUTZONI, F. "Diversity And Host Range Of Foliar Fungal Endophytes: Are Tropical Leaves Biodiversity Hotspots?" **Fungal Biology Reviews** 21, 51, 2007.

AZEVEDO, J. L.; MACCHERONI JR, W.; PEREIRA, J. O.; ARAÚJO, W. L. Endophytic microorganisms: a review on insect control and recente advances on tropical plants. **Electronic Journal of Biotechnology**, p. 41-65, Vol.3 No.1, 2000.

BAILEY, J.A.; ROWELL, P.M. Viability of *Colletotrichum lindemuthianum* in hypersensitive cells of *Phaseolus vulgaris*. **Physiological Plant Pathology**, 17: 341-345, 1980.

BEATRIZ, A.; LIMA, D. P.; MARQUES, M. R. Biotransformações com Microrganismos em Mato Grosso do Sul: Histórico e Perspectivas. **Revista Ágora**, v.1 n.4. 2005

BORGES, K. B.; BORGES, W. S.; DURAN-PATRON, R.; PUPO, M. T.; BONATO, P. S.; COLLADO, I. G. Stereoselective biotransformations using fungi as biocatalysts. **Tetrahedron Asymmetry**, v. 20, p. 385-397, 2009.

BORGES, F.C.; SANTOS, L.S.; CORRÊA, M.J.C.; OLIVEIRA, M.N.; SOUZA FILHO, A.P.S. **Planta Daninha**, v. 25, n. 1, p. 51-59, 2007.

BORGES, F. C. Estudo Fitoquímico, Alelopático e Farmacológico de Constituintes Químicos das Folhas de *Virola michelii* e *Virola surinamensis*. **Dissertação de Mestrado (Programa de pós-graduação em química), Universidade Federal do Pará**, Belém, 2003.

BRUGGEN, P. VANDER & MARAITE, H. Histopatology of cassava anthracnose disease caused by *Colletotrichum gloeosporioides f.sp. manihotis*. **Parasitica**, v. 43, p. 3-21, 1987.

CESARINO, F. **Informativo técnico rede de sementes da Amazônia Instituto de Pesquisas Científicas e Tecnológicas do Estado do Amapá. Versão impressa** ISSN p. 1679-6500, Nº14, 2006.

CHAPLA, V. M.; BIASETTO, C. R.; ARAÚJO, A. R. Fungos endofíticos: Uma fonte inexplorada e sustentável de novos e bioativos produtos naturais. **Revista Virtual de Química**, v. 5, nº 3, p. 421-437, 2012.

CLARDY, J.; WALSH, C. Lessons from natural molecules. **Nature** vol. 432, 2004

COLLADO, I. Z.; ALEU, J. Biotransformations by botrytis species. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 13, p. 77-93, 2001.

DEMAIN, A. L. Small bugs, big business: the economic power of the microbe. **Biotechnology Advances**, v. 18, p. 499-514, 2000.

DOUBLE, M.; KRUTHIVENTI, A. K.; GAIKAR, V. G. Biotransformation and Bioprocesses. **New York: Marcel Dekker**, p. 371, 2004

FABER, K. Biotransformations in organic chemistry: a textbook. **5th ed. Berlim: Springer**, p. 454, 2004

FENNEL, C. W.; LINDSEY, K. L.; MC GAW, L. J.; SPARG, S. G.; STAFFORD, G. I.; ELGORASHI E. E.; GRACE, O. M.; VAN STADEN, J. Review: Assessing African medicinal plants for efficacy and safety: Pharmacological screening and toxicology. **J. Ethnopharmacol** 94: 205-217, 2004.

GALUPPO, S. C.; CARVALHO, J. O. P. Ecologia, manejo e utilização da *Virola surinamensis* rol. (warb). Belém, **Embrapa Amazônia Oriental**, 2001. 38p.

GONÇALVES, C. C. S.; MARSAIOLI, A. J. Fatos e tendências da biocatálise. **Química Nova**, Vol. 36, N° 10, p. 1587-1590, 2013.

HUISMAN, G.W.; GRAY, D. Towards novel processes for the fine-chemical and pharmaceutical industries. **Current Opinion Biotechnology** 13:352–358, 2002

JALGAONWALA, R. B.; MOHITE, B. V.; MAHAJAN, R. T. J. Natural products from plant associated endophytic fungi: a review. **Journal of Microbiology and Biotechnology Research**. V. 1, n. 21, 2011.

KHARWAR, R. N.; MISHRA, A.; GOND, S. K.; STIERLE, A.; STIERLE, D. Anticancer compounds derived from fungal endophytes: Their importance and future challenges. **Natural Product Reports** 28(7), 1208-28 2011.

LAUMEN, K.; KITTELMANN, M.; GHISALBA, O. J. Chemo-enzymatic approaches for the creation of novel chiral building blocks and reagents for pharmaceutical applications. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, 19–20,55–66, 2002.

LIU, Y.; LI, Y.; LIU, Z.; LI, L.; QU, J.; MA, S.; CHEN, R.; DAI, J.; YU, S. Sesquiterpenes from the endophyte *Glomerella cingulata*. **Journal Natural Products**, v. 80, p. 2609-2614, 2017.

LOPES, N. P.; SANTOS, P. A dos.; KATO, M. J.; YOSHIDA, M. New butenolides in plantlets of *Virola surinamensis* (Myristicaceae). **Chemical Pharmaceutical Bulletin**, v52, No10, p. 1255—1257, 2004.

LOPES N. P.; KATO M. J.; ANDRADE, E. Antimalarial use of volatile oil from leaves of *Virola surinamensis* (Rol.) Warb. by Waiãpi Amazon Indians. **Journal Ethnopharmacology**, 67: 313–319. 1999

MORAES, T. M.; KUSHIMA, H.; MOLEIRO, F C.; SANTOS, R. C.; MACHADO R L R.; MARQUES, M O. M.; VILEGAS, W; HIRUMA-LIMA, C A. Effects of limonene and essential oil from *Citrus aurantium* on gastric mucosa: Role of prostaglandins and

gastric mucus secretion. **Chemico-Biological Interactions**, v. 180, p. 499-505, 2009.

MULLER, G. M.; SCHMIT, J. P. Fungal biodiversity: what do we know, **What can we predict Biodiversity and Conservation**, v. 16, n. 1, p. 1-5, Jan. 2007.

MUSSI-DIAS, V.; ARAÚJO, A.C.O.; SILVEIRA, S.F.; ROCABADO, J.M.A. ;ARAÚJO, K.L. Fungos endofíticos associados a plantas medicinais, **Revista Brasileira de Plantas Medicinai**, Botucatu, v.14, n.2, p.261-266, 2012

NELSON D. L.; COX M. M.; *Lehninger: Principles of Biochemistry*, USA, **Saunders Publishing College**, 3<sup>a</sup>ed. 2000.

NEVES, E. J. M., Biomassa e Acúmulo de Nutrientes nos diferentes compartimentos de Ceiba Pentandra(L.) Gaertn e Virola surinamensis (Rol.) Warb Plantadas na Amazônia Ocidental Brasileira. **Tese de doutorado (Curso de Pós-Graduação em Engenharia Florestal), Universidade Federal do Paraná**, Curitiba, 1999

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M.; SNADER, K. M. The influence of natural products upon drug Discovery. **Natural Products Reports**, v. 17, p. 215–234, 2000.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M.; HOLBECK, S. ; SAUSVILLE, E. A. Natural products and derivatives as leads to cell cycle pathway targets in cancer chemotherapy. **Current Cancer Drug Targets**, v. 2, p 279–308, 2002.

OLIVEIRA, K. B.; OLIVEIRA, B. H. Obtenção de substâncias bioativas através da biotransformação de produtos naturais. **Revista eletrônica de farmácia**, v. 9, p. 3, 2012.

OSTROSKY, E. A.; MIZUMOTO, M. K.; LIMA, M. E. L.; KANEKO, T. M.; NISHIKAWA, S. O.; FREITAS, B. R. “Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração mínima inibitória (CMI) de plantas medicinais” **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.18, n.2, p.301-307, 2008

PINÃ-RODRIGUES, MÁRQUEZ, F. C.; LOPES, B. M. Potencial Alelopático De Mimosa Caesalpinaefolia Benth Sobre Sementes De Tabebuia Alba (Cham.) SandW. **Floresta e ambiente**, Rio de Janeiro, V. 8, n.1, p.130 - 136, 2001.

PINHEIRO, L.; MARSAIOLI, A. J. Microbial monooxygenases applied to fragrance compounds. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v.44, p. 78–86, 2007

RODRIGUEZ, R. J.; WHITE JR , J. F.; ARNOLD, A. E.; REDMAN, R. S. Fungal endophytes: diversity and functional roles. **New Phytologist**, Seattle-WA- USA, University of Washington, v. 182, p. 314–330, 2009.

SCHULTES, R. E.; HOLMSTEDT, B. Miscellaneous notes on Myristicaceous plants of South America. **Lloydia**, v. 34: p. 61–78, 1971.

SCRIABINE, A. Discovery and development of major drugs currently in use. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects** v. 1830, p. 3670-3695, 2013

SHIRANE, N.; HASHIMOTO, Y.; UEDA, K.; TAKENAKA, H.; KATOH, K. Sterol analysis of DMI-resistant and -sensitive strains of *Venturia inaequalis*, **Phytochemistry**, 43, p. 99-104, 1996.

SOMENSI, A. Desreplicação dos metabólitos secundários produzidos por *Phomopsis stipata*, um endófito de *Styrax camporum* (Styracaceae). **Dissertação de Mestrado. (Núcleo de Bioensaio, Biosíntese e Ecofisiologia de Produtos Naturais). Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2012.**

TAN, R. X.; ZOU, W. X. Endophytes: a rich source of functional metabolites, **Journal of Natural Products Report**. v. 18, p. 448, 2001

VALDERRAMA, J.C. M "Distribution of flavo noids in the Myristicaceae"  
**Phytochemistry** 55(6): 505-511,2000

VEIGA, A.; ALBUQUERQUE, K.; CORREA, M. E.; BRIGIDO, H.; SILVA E SILVA, J.; CAMPOS, M.; SILVEIRA, F.; SANTOS, L.; DOLABELA, M. *Leishmania amazonensis* and *Leishmania chagasi*: *In vitro* leishmanicide activity of *Virola surinamensis* (rol.) warb. **Experimental Parasitology**, v. 175, p. 68-73, 2017

Yu, L.; Guo, Y.; Li, Y.; Li, G.; Li, M.; Luo J.; Xiong, W.; Qin, W. Identifying bacterial secreted proteins by fusing new features into Chou's pseudo-amino acid composition. **Journal of Theoretical Biology**. v. 267, p. 1-6, 2010.

ZHANG, W. et al. Bamboozled again! Inadverted isolation of fungi rDNA sequences from bamboos (Poaceae: Bambusoideae). **Molecular Phylogentics and Evolution**. v. 8, n. 2, p. 205-217, 1997.

ZHANG, J.; CHENG, Z. -H.; YU, B. -Y; CORDELL, G. A.; QIU, S. X. Novel biotransformation of pentacyclic triterpenoid acids by *Norcardia* sp. NTTL 5646, **Tetrahedron Letters**, 46, p. 2337-2340, 2005.