



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

**Reações de Biotransformação realizada pelo fungo
endofítico *Glomerella cingulata* e ensaios biológicos.**

Rafael de Oliveira Cardoso

Belém - Pará

2017



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

**Reações de Biotransformação realizada pelo fungo
endofítico *Glomerella cingulata* e ensaios biológicos.**

Rafael de Oliveira Cardoso

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado para obtenção do título
de Químico Industrial, Faculdade de
Química, Instituto de Ciências
Exatas e Naturais, Universidade
Federal do Pará. Orientado: Prof.
Msc. Manoel Leão Lopes Júnior

Belém - Pará

2017



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

Rafael de Oliveira Cardoso

**Reações de biotransformações realizada pelo fungo
endofítico *Glomerella cingulata* e ensaios biológicos**

Apresentado em: ___/___/_____

Banca examinadora

Prof. Msc. Manoel Leão Lopes Júnior
Campus Tocantins Cametá/UFPA - Orientador

Prof. Dr. Marivaldo José Costa Corrêa
FQ – ICEN –UFPA - Membro

Prof. Msc. Dalglish Gomes de Oliveira
SEDUC/PA – Membro

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Raimundo Santos Pinheiro Cardoso e Alda Maria Gonçalves de Oliveira que são minha base para continuar tentando acima de tudo.

Ao meu padrasto Leno Almeida Moraes por ser meu segundo pai, ao meu irmão Samuel de Oliveira Cardoso que divide todas as minhas conquistas e fracassos.

Ao meu orientador o Prof. Msc. Manoel Leão Lopes Júnior pela dedicação e paciência, junto com seus ensinamentos e orientações.

Agradecendo aos Profs. Drs. Marivaldo José Costa Corrêa e Lourivaldo da Silva Santos pela minha iniciação na área da pesquisa e por seus preceitos.

Deixo também uma dedicatória aos colegas de laboratório Williams Ribeiro, Fabiane Trindade, Luely Guerra, Otávio Rocha, Fábio Rodrigues e aos recém chegados Dalglish Gomes, Carol Guedes, Karla Bezerra e Jéssica Viana pelos momentos agradáveis que passamos na UFPA.

Aos meus colegas e amigos do curso de Química, Carlos Vinicius Miranda, Mauro Pinho, Kamila Gonçalves, Carla Rafaela Fonseca, Marco Roberto Bastos, Juliana Santos, Rebeca Castanho e Clarissa Cruz pelos pouco mais de quatro anos de batalha que tivemos e por tudo que superamos para chegarmos até aqui.

RESUMO

Este trabalho descreve o estudo do potencial de biotransformação do fungo *Glomerella cingulata* associado como endofítico da espécie *Virola surinamensis* frente a compostos aromáticos. O endófito *G. cingulata* foi reativado em placas de Petri pela de técnica de repiques. Partindo do fungo cultivado em placas, preparou-se o meio para biotransformação; o extrato de malte. A reação de biocatálise foi feita com quatro substratos em duplicata a 4-nitroacetofenona, (2E) -1,3-difenil-prop-2-en-1-ona, 6-metoxi-7-hidroxycumarina e 9,10-antracenediona. Os extratos foram analisados por Cromatografia em Camada Delgada Comparativa (CCDC) e Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio-1 (RMN de ^1H) os resultados mostraram-se satisfatório para os substratos 4-nitroacetofenona o que originou o álcool 4-nitrofeniletanol (**S1**) como produto e (2E) - 1,3-difenil-prop-2-en-1-ona formando a 1,3-difenil-propan-1-ona (**S2**). Foram realizados ensaios biológicos com as substâncias isoladas **S1** e **S2** frente a quatro bactérias, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis* e *Klebsiella pneumoniae*, mas apenas para *Enterococcus faecali* nas concentrações de 500 a 7, 8125 $\mu\text{g/mL}$ houve atividade bactericida com a substância **S2**. Esses resultados mostraram a eficácia da utilização de fungos endofíticos em reações de biotransformação como biocatalisadores e de seus produtos de biocatálise como agentes biológicos.

Palavras-chave: *Glomerella cingulata*. *Virola surinamensis*. fungo endofítico, biotransformação, ensaio biológico.

ABSTRACT

This work describes the biotransformation potential study of *Glomerella cingulata* associated as endophytic from *Virola surinamensis* species through aromatic compounds. The endophytic *G. cingulata* was reactivated on Petri dishes applying ringing techniques. Starting from fungus cultivated on Petri dishes, we have prepared the culture medium to biotransformation, it was malt extract. The biocatalysis reaction has been done with four substrates in duplicate, they are: 4-nitroacetophenone, (2E)-1,3-diphenyl-prop-2-en-1-one, 6-methoxy-7-hydroxycoumarin and 9,10-anthracenedione. These extracts were analysed by Thin Layer Chromatography (TLC) and Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy (H^1 NMR) where we obtained satisfactory results for 4-nitroacetophenone substrates that gave rise to 4-nitrophenylethanol (**S1**) alcohol as its product and (2E)-1,3-diphenyl-prop-2-en-1-one providing another compound identified as 1,3-diphenyl-propan-1-one (**S2**). We have carried out biological assays with isolated substances (S1) and (S2) through four bacteria, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis* and *Klebsiella pneumoniae*, but the assay only showed bactericidal activity to *Enterococcus faecalis* with concentration values varying from 500 to 7,8125 $\mu\text{g/mL}$ of (S2) substance. These results demonstrated the effectiveness of the fungus utilization in biotransformation reactions as biocatalyst and from its biocatalysis products as biological agents.

KEYWORD: *Glomerella cingulata*, *Virola surinamensis*, Endophytic fungus, Biotransformation, Biological assay.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	8
2. OBJETIVOS	10
2.1 GERAL	10
2.1. ESPECÍFICOS	10
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	11
3.1. PRODUTOS NATURAIS	11
3.2. A ESPÉCIE VIROLA SURINAMENSIS.	13
3.2.1. Classificação Taxonômica (CREMERS, 1994).	13
3.2.2. Descrição da Espécie.	13
3.3. FUNGO ENDOFÍTICO	16
3.4. Espécie <i>Glomerella cingulata</i>	18
3.4.1. Classificação Taxonômica (SPAULDING & SCHRENK, 1980)	18
3.5. BIOCATÁLISE	21
3.6. 4-NITROACETOFENONA	23
3.7. CHALCONA C	23
3.8. ESCOPOLETINA	24
3.9. ANTRAQUINONA	25
4. DESENVOLVIMENTO	26
4.1. MATERIAIS	26
4.1.1. Equipamentos	26
4.1.2. Solventes	26
4.1.3. Substratos	26
4.1.4. Meios de cultivo utilizados	26
4.1.5. Técnicas cromatográficas utilizadas	27
4.1.6. Solventes deuterados utilizados na análise de ^1H	27
4.1.7. Material utilizado no ensaio antimicrobiano	27
4.1.8. Microrganismos	27
4.2. MÉTODOS	28
4.2.1. Preparação do meio reacional para biotransformação	28
4.2.2. Adição do fungo endofítico e dos substratos ao meio reacional	28
4.2.3. Obtenção dos extratos	29
4.2.4. Fracionamento do extrato	30
4.2.5. Ensaio biológico	31
4.2.5.1. Teste antimicrobiano	31
4.2.5.2. Preparo do meio de cultivo BHI (Infuso Cérebro Coração)	31
4.2.6. Preparo do meio de cultivo Agar BHI (Infuso Cérebro Coração)	31
4.2.7. Ativação das bactérias	31
4.2.8. Padronização das culturas	31
4.2.9. Preparo das amostras	31
4.2.10. Preparo do antibiótico controle	32

4.2.11. Ensaio para medir a CIM (Concentração Inibitória Mínima) -----	32
4.2.12. Tipo de atividade -----	32
5. RESULTADOS E DISCUSSÕES -----	33
5.1. REAÇÕES DE BIOTRANSFORMAÇÃO.-----	33
5.1.2. Estrutura dos substratos-----	33
As estruturas dos substratos utilizados no processo de biotransformação são representadas pela figura 13. -----	33
5.1.3. Reação de Biotransformação com 4-Nitroacetofenona. -----	34
5.1.4. Reação de Biotransformação com a (2E)-1,3-difenil-prop-2-en-1-ona.-	36
5.1.5. Reação de Biotransformação com Escopoletina.-----	38
5.1.6. Reação de Biotransformação com Antraquinona.-----	38
5.2. ENSAIO ANTIMICROBIANO -----	39
5.2.2. Análise dos resultados do ensaio biológico com o produto das biotransformações.-----	39
6. CONCLUSÕES -----	40
REFERÊNCIAS	

1. INTRODUÇÃO

Por sua extensa área de floresta o Brasil tem sido um grande percussor de estudos na área de produtos naturais, tendo como principal objetivo a obtenção de novas substâncias de interesse comercial. Detentor da maior floresta tropical do mundo, pesquisadores de diversas partes do planeta tem cada vez mais interesse em explorar a biodiversidade em busca dessas substâncias (COSTA, 2009).

Pesquisas nessa área têm crescido ao longo dos anos e, a floresta amazônica por sua grande biodiversidade pode possuir uma grande reserva de espécies desconhecidas de flora. Nesse patamar podemos levar em consideração a diversidade de microrganismos presentes nessas plantas e as infinitas substâncias por eles produzidas, por sua facilidade de manipulação os metabólitos produzidos por microrganismos, em especial fungos endofíticos, têm tido um recente crescimento em pesquisas farmacológicas e biotecnológicas (PASTORE, 2006).

Com estudos realizados em química de produtos naturais foi possível descobrir inúmeras substâncias de atividades biológicas, futuramente poderão ser utilizadas pela indústria farmacêutica como medicamentos no tratamento de diversas doenças como câncer, diabetes e até mesmo a AIDS. As plantas e os microrganismos terrestres são os organismos que mais têm contribuído para a obtenção desse tipo de substâncias, um exemplo desses compostos são as substâncias oriundas desses metabólitos como a aspirina, morfina, paclitaxel, penicilinas entre outras (COSTA, 2009).

Embora o avanço desses estudos químicos e biológicos muita ainda há de ser feito, pois ainda existem espécies de plantas e microrganismos sem algum tipo de estudo ou até mesmo classificação. Isso gera uma enorme expectativa por parte dos pesquisadores na busca por novos compostos de estrutura bem diversificadas e de classes variadas, que podem possuir atividades contra inúmeras enfermidades. Para melhorar esse quadro, o estudo das espécies deve ser incentivado a fim de aumentar o conhecimento das espécies e sobre os microrganismos associados a elas como também pelos compostos a ambos associados, com intuito de explorar o potencial em pesquisas voltadas a atividade biológica (SILVA, 2009).

Toda essa necessidade fez com que surgissem métodos no qual permitiu agilizar a obtenção dessas novas moléculas, tornando de fundamental importância para o desenvolvimento das pesquisas. Não é de hoje que se utilizam

biocatalisadores em reações de química orgânica, e isso têm se tornado uma tendência mundial nos últimos anos e diversas são as fontes enzimáticas para as mesmas, como exemplo as plantas e os microrganismos (SHAW, 2003).

Essas reações enzimáticas provenientes de microrganismos são conhecidas como reações de biotransformação ou biocatálise que são processos que consistem na conversão química catalisada por enzimas sobre substratos naturais ou sintéticos (SHAW, 2003). Os processos biocatalíticos utilizando células íntegras ou enzimas isoladas têm encontrado diversas aplicações, especificamente nas indústrias químicas, agroquímicas e farmacêutica (PINHEIRO, 2007; HUISMAN, 2002).

2. OBJETIVOS

2.1 GERAL

Realizar um estudo do potencial de biotransformação do fungo endofítico *Glomerella cingulata* isolado da planta amazônica *Virola surinamensis*, frente a substratos orgânicos e realizar ensaio biológico com os produtos obtidos.

2.1. ESPECÍFICOS

- Reativar o microrganismo;
- Cultivar o microrganismo em meio líquido;
- Realizar reações de biotransformações utilizando o microrganismo como biocatalisador;
- Purificação do produto de biotransformação;
- Identificar a estrutura química das substâncias obtidas utilizando métodos físicos usuais (Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio -1);
- Avaliar o potencial Antimicrobiano das substâncias isoladas.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

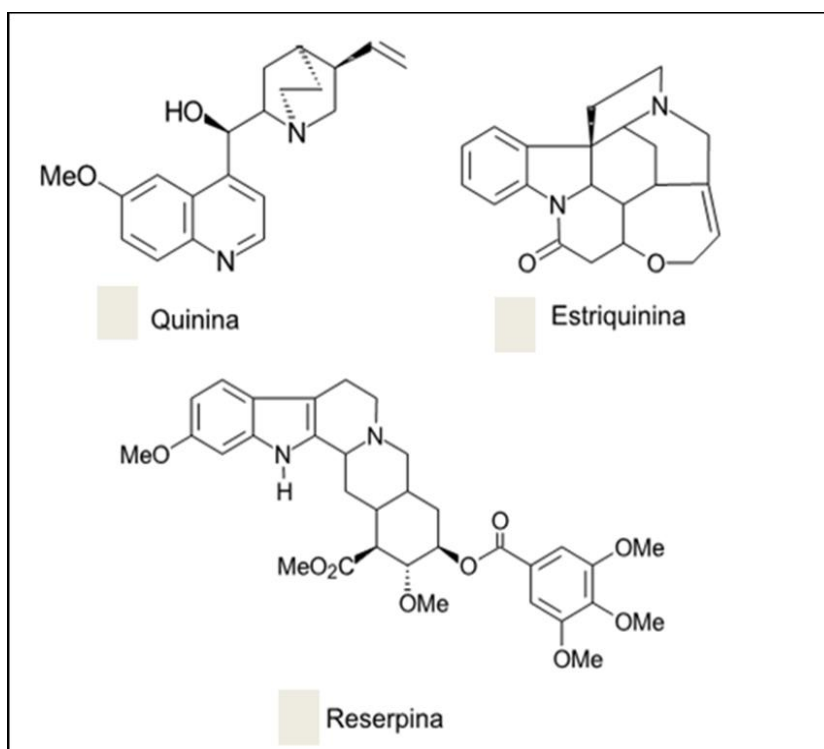
3.1. PRODUTOS NATURAIS

Os estudos científicos envolvendo produtos naturais mostram uma grande evolução em tecnologia, o que pode ocasionar uma redução na relação número de vegetais existentes/espécies estudadas. Dentre elas, destacam-se: técnicas de isolamento, evolução em técnicas espectrométricas para a identificação estrutural de moléculas, semisíntese e biosíntese e avaliação biológica. É relatado historicamente o desenvolvimento da área de produtos naturais no Brasil através de trabalhos “*Um olhar holístico sobre a química de produtos naturais Brasileira*” e “*Produtos naturais: atualidades, desafios e perspectivas*” (PINTO et al., 2002; 2003).

As primeiras descrições sobre plantas medicinais feitas pelo homem remontam às sagradas escrituras. Durante o período anterior a era cristã que ficou conhecida como civilização grega, vários filósofos podem ser destacados por suas obras sobre produtos naturais. Dentre esses, sobressaem-se Hipócrates, considerado o pai da medicina moderna, que caracterizou por tomar a natureza como guia na escolha dos remédios (*Natura medicatrix*) e Teofrasto, discípulo de Aristóteles, que escreveu vários livros sobre a história das plantas (VALLE, J. R.; 1978).

No final dos anos vinte e de toda a década de trinta se caracterizou pelo grande número de trabalhos sobre isolamentos e identificação de substâncias da natureza, principalmente de classe esteroideal. Tudo graças principalmente aos estudos de Wieland e Windaus e colaboradores (1903-1932), o principal representante da classe, o colesterol, teve sua estrutura determinada. No entanto, sua síntese só foi realizada por Robinson e Woodward em 1951. Seu trabalho foi mais expressivo quando sintetizou os alcalóides: quinina (1945), estriquinina (1954) e reserpina (1958), estruturas representadas pela figura 1, p. 12 (WOODWARD, R. B. et al., 1951).

Figura 1. Estrutura de representantes dos alcalóides. Fonte: PINTO et al, 2002.



Nos últimos 15 anos, o progresso científico de pesquisas com Produtos Naturais em todo o mundo, pode ser acompanhado por periódicos, como: *Phytochemistry*; *Journal of Natural Products*; *Natural Products Reports*; *Planta Medica*; *Journal of Ethnopharmacology*; *Phytotherapy Research*; bem como, pelo surgimento de novos periódicos nacionais: *Revista Brasileira de Farmacognosia*; *Revista Fitos*, e o retorno do *Journal of the Brazilian Chemical Society* e também da revista *Química Nova*, dentre tantos outros. Sem mencionar o surgimento de novos livros de análise e de divulgação científica, mas todos são de igual importância para o empreendimento de pesquisas de Produtos Naturais.

3.2.A ESPÉCIE *VIROLA SURINAMENSIS*.

3.2.1. Classificação Taxonômica (CREMERS, 1994).

Quadro 1. Taxonomia da espécie vegetal *Virola surinamensis*.

Reino:	<i>Plantae</i>
Filo:	<i>Tracheophyta</i>
Classe:	<i>Magnoliopsida</i>
Ordem:	<i>Magnoliales</i>
Família:	<i>Myristicaceae</i>
Gênero:	<i>Virola</i>
Espécie:	<i>Virola surinamensis</i>

3.2.2. Descrição da Espécie.

A *Virola surinamensis* é vulgarmente conhecida no Brasil como, ucuúba, ucuúba-da-várzea, ucuúba-branca, ucuúba-verdadeira, ucuúba-amarela, noz-moscada, bicuíba e andiroba. É também conhecida nos países sul-americanos como guingumadou, guingumadou de montagne, yayamadou, baboen, bambien, cumala. Na Espanha é chamada de muscade de Pará, cumala blanca, virola e cova longa (RODRIGUES *et al*, 1972).

O nome ucuúba vem da língua tupi, “uku” (gordura, graxa, sebo) e “uba” (árvore, planta), na Amazônia para a maioria dessas espécies aplica-se o gênero *Virola* que significa árvore que produz substâncias gordurosas. A *Virola* é uma espécie perenifólica, seletiva higrófita que quando adulta pode chegar a 35m de altura com 60 a 90 cm de diâmetro (RIZZINI, 1978).

Enquadra-se no modelo Massart, sendo determinada por um tronco monopodial, de onde saem os galhos, formando uma copa reduzida e pouco ramificada. Sua casca tem cor castanho-amarelado com partes acinzentadas e esbranquiçadas, lisa e ligeiramente enrugada e estriada no sentido vertical do tronco. Pode-se ser encontrada desde as Antilhas até o Brasil, passando por

Tobago. Venezuela e Bolívia, na Amazônia brasileira ocorre no estuário do rio Amazonas, onde é uma espécie majoritária (RODRIGUES, 1972).

Essa espécie levantou interesse quando em 1971 Schultes e Holmsted descreveram o uso da *Virola* pelos índios no preparo de uma bebida chamada “rapé” um alucinógeno obtido da resina da casca do vegetal, também utilizada como veneno em suas flechas de caça. Esse efeito alucinógeno foi atribuído a presença de alcalóides indólicos triptaminérgicos (LOPES et al. 1983).

Na medicina popular é utilizada como cicatrizante em infecções de pele; o chá de suas folhas (figura 2, p. 14) é utilizado nas cólicas e dispepsias, a infusão das folhas é usada internamente contra inflamações e febres. No Estado de Tocantins existem relatos do uso da seiva da *V. surinamensis*, para o tratamento de câncer, inflamações, infecções, gastrites e úlceras, além do uso das cascas no tratamento de aftas, hemorróidas e úlceras (PAIXÃO e HIRUMA-LIMA, 2000).

Figura 2. Folhas de *Virola surinamensis*.
Fonte: Smithsonian Tropical Research Institute.

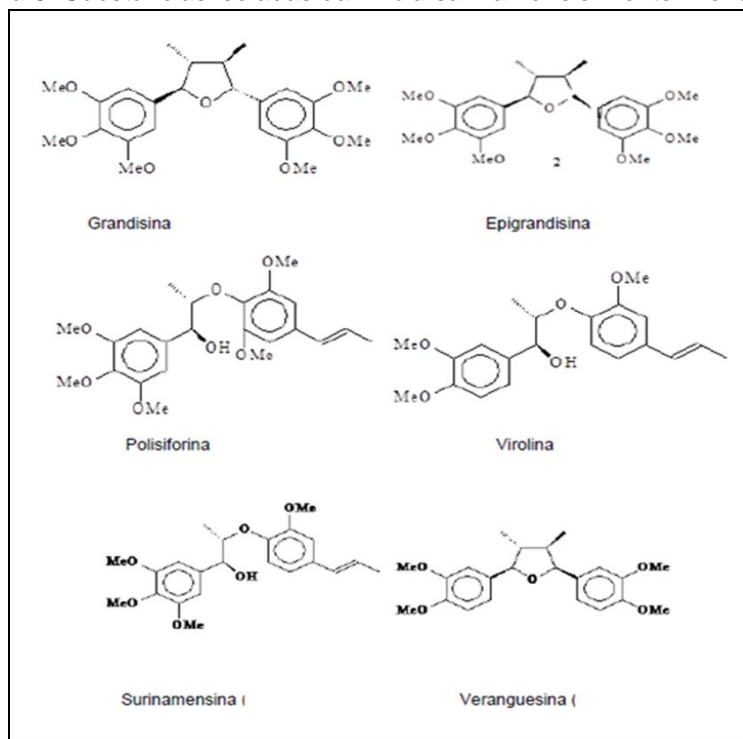


Essa espécie levantou interesse quando em 1971 Schultes e Holmsted descreveram o uso da *Virola* pelos índios no preparo de uma bebida chamada “rapé” um alucinógeno obtido da resina da casca do vegetal, também utilizada como veneno em suas flechas de caça. Esse efeito alucinógeno foi atribuído a presença de alcalóides indólicos triptaminérgicos (LOPES et al. 1983).

Na medicina popular é utilizada como cicatrizante em infecções de pele; o chá de suas folhas (figura 2, p. 14) é utilizado nas cólicas e dispepsias, a infusão das folhas é usada internamente contra inflamações e febres. No Estado de Tocantins existem relatos do uso da seiva da *V. surinamensis*, para o tratamento de câncer, inflamações, infecções, gastrites e úlceras, além do uso das cascas no tratamento de aftas, hemorróidas e úlceras (PAIXÃO e HIRUMA-LIMA, 2000).

Diversos grupos de substâncias como ácidos graxos, alcalóides, flavonóides, lignóides, policetídeos, taninos e terpenos foram isolados e identificados principalmente das sementes, folhas e cascas de espécies de *Virola*. Dentre estas substâncias destacam-se as seguintes neolignan: Grandisina, Epigrandisina, Polisiforina, Virolina, Surinamensina e Veranguesina, figura 3 p. 15 (REZENDE; KATO, 2002).

Figura 3. Substâncias isoladas da *Virola surinamensis*. Fonte: Rezende, 2002.



3.3. FUNGO ENDOFÍTICO

Assim como as plantas são de grande importância para o ser humano, contribuindo para sua sobrevivência, os fungos devem ter o mesmo destaque em estudos, pois são especificamente benéficos para os seres humanos, sendo usados industrialmente na produção de medicamentos, vitaminas, ácidos orgânicos, bebidas alcoólicas, e em outros produtos de interesse econômico (MURRAY et al, 1992).

Uma das maiores descobertas biotecnológicas até o presente momento foi a da penicilina. Este metabólito fúngico, obtido através do fungo deuteromiceto *Penicillium notatum*, foi descoberto por Fleming em 1929, o que salvou a vida de milhões de pessoas portadoras de infecções bacterianas (CORRÊA, 2004).

Apesar da descoberta e da importância dos fungos para os seres humanos, apenas a partir de 1969 os fungos passaram a ser classificados como um reino a parte, junto com os reinos, vegetal e animal denominado reino fungi, ficando difícil definir os fungos tal são sua diversidade. Porém, possuem características em comum que os distingue dos outros seres vivos: não sintetizam clorofila; necessitam de material orgânico para viver, sendo sua nutrição feita por absorção de nutrientes devido à presença de enzimas que são produzidas por eles e que degradam produtos como, por exemplo, celulose e amido; não apresentam celulose em sua parede celular, exceto em alguns fungos aquáticos; e não armazenam amido como substância de reserva (PELCZAR et al, 1981).

De acordo com Araújo (2009), o reino dos fungos é um dos mais numerosos. Estima-se que existam pelo menos um milhão e quinhentos mil espécies de fungos espalhados pelo mundo, sendo muito mais do que as espécies de vegetais e animais, excluindo-se os insetos. E o mais incrível, acrescenta, apenas cerca de 70.000 espécies de fungos foram até hoje descritas, ou seja, menos de 5% das possivelmente existentes. Então, um futuro promissor ao se trabalhar com fungos é esperado, pois, nestas espécies descritas, já existem muitas de grande importância, como as que entram na fabricação de alimentos, incluindo bebidas, de ácidos orgânicos, de fármacos e inúmeros outros produtos. Pode-se imaginar o que se espera com a descoberta de novas espécies com distintas propriedades potencialmente de valor biotecnológico.

Segundo Redlin e Carris (1996) as interações entre fungos e plantas podem ocorrer de forma benéfica, negativa ou neutra. A simbiose é a relação em que os dois organismos são beneficiados, enquanto que a relação em que o organismo invade de maneira adversa o habitat do outro, denomina-se antagonismo. Os fungos, entre os microrganismos, considerados o segundo maior grupo de organismos no mundo após os insetos, são os que se encontram mais freqüentemente associados às plantas (PINTO et al, 2002).

Fungos endofíticos representam um importante e quantificável componente da biodiversidade fúngica e também são conhecidos por influenciar a estrutura e a diversidade das comunidades de plantas hospedeiras. Os microrganismos endofíticos mais frequentemente isolados são sem dúvida, os fungos, indicando que a maior parte das plantas conhecidas não foi ainda totalmente estudada em relação à condição de hospedeiro para fungos desse tipo (GONTHIER et al, 2006; KRINGS et al, 2007; SANDERS ,2004;).

Para Arnold (2000) os fungos endofíticos têm atraído especial atenção nas últimas décadas por muitas razões, mas, em especial, por duas principais: a *primeira*: são isolados de praticamente todas as plantas estudadas com grande diversidade. Existem relatos de endófitos sendo isolados de plantas crescendo em diferentes ambientes como pastagens, florestas tropicais, manguezais e áreas agricultáveis; a *segunda*: fungos endofíticos possuem interação mutualística com a planta hospedeira, que proporcionam nutrientes e proteção para o fungo e recebe em troca compostos químicos, tais como enzimas, alcalóides e antibióticos, que resultam em benefícios para a proteção da planta hospedeira (ARAÚJO; AZEVEDO, 2007).

Essa associação mutualística com fungos endofíticos, sintetizando compostos que protegem as plantas de insetos e mamíferos herbívoros via síntese de alcalóides tóxicos, está bem estabelecida e tem sido objeto de numerosos estudos (BREEN, 1994; BUSH et. al, 1997; CLAY, 1988).

3.4. Espécie *Glomerella cingulata*

3.4.1. Classificação Taxonômica (Base de dados global da OEPP)

Quadro 2. Taxonomia da espécie fúngica *Glomerella cingulata*.

Reino:	<i>Fungi</i>
Filo:	<i>Ascomycota</i>
Classe:	<i>Sordariomycetes</i>
Ordem:	<i>Phyllachorales</i>
Família:	<i>Glomerellaceae</i>
Gênero:	<i>Glomerella</i>
Espécie:	<i>Glomerella cingulata</i>

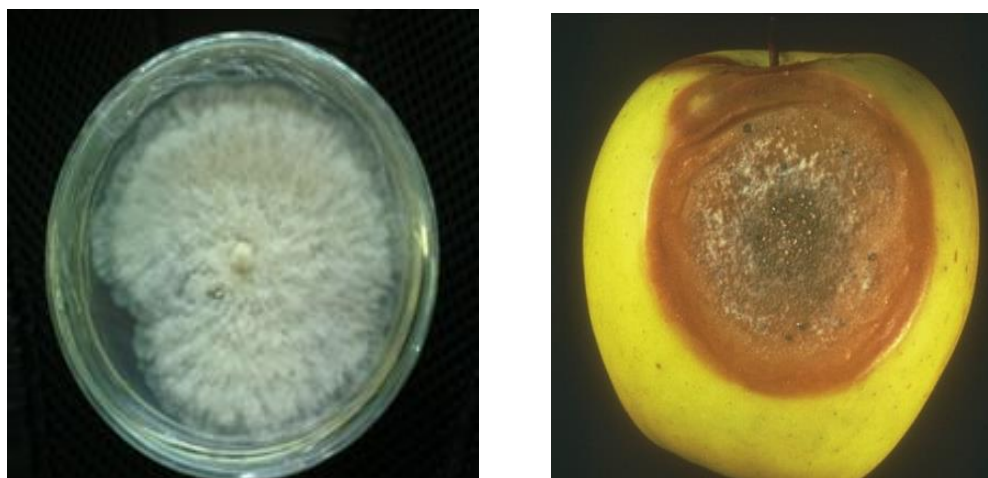
Em sua fase assexuada o fungo é classificado na classe dos Ascomicetos e na ordem Diaportales, foi denominado inicialmente como *Glomerella lindemuthianum*. E mais recentemente foi substituído pelo nome de *Glomerella cingulata* por Spaulding & V. Scherenk. Nessa fase o fungo produz o corpo de frutificação mais ou menos arredondado, o canal do peritécio é forrado por paráfises hialinas e filiformes. A parede do peritécio é inicialmente hialina e, a medida que envelhece, torna-se enegrecida a partir do ápice (BAILEY et al, 1992; ROCA et al, 2003).

O microrganismo apresenta micélio septado ramificado e sua coloração varia à medida que envelhece, muda de hialina a quase negra. Pertencente a classe dos conídios são pluricelulares, de alongados a cilíndricos, eretos, sem ramificação e medem por volta de 40 a 60 µm de comprimento. Geralmente apresentam em sua área central uma região clara semelhante a um vacúolo, ao se germinar pode emitir de um a quatro tubos germinativos sendo mais requentes dois, os quais formam apressórios em seus ápices para penetração do hospedeiro (CHAVES, 1980).

Essa espécie tem como característica a ocorrência patogênica na forma da antracnose (figura 4, p. 19), doença que é caracterizada pelo aparecimento de pontos encovados de várias cores em folhas, necrose nas nervuras, caules, frutos ou flores, muitas vezes ocasionando ressecamento e a morte dos tecidos. A infecção é mais frequente nas regiões de clima quente e úmido, sendo responsável por importantes perdas econômicas em diversas culturas (SARTORATO, 1988).

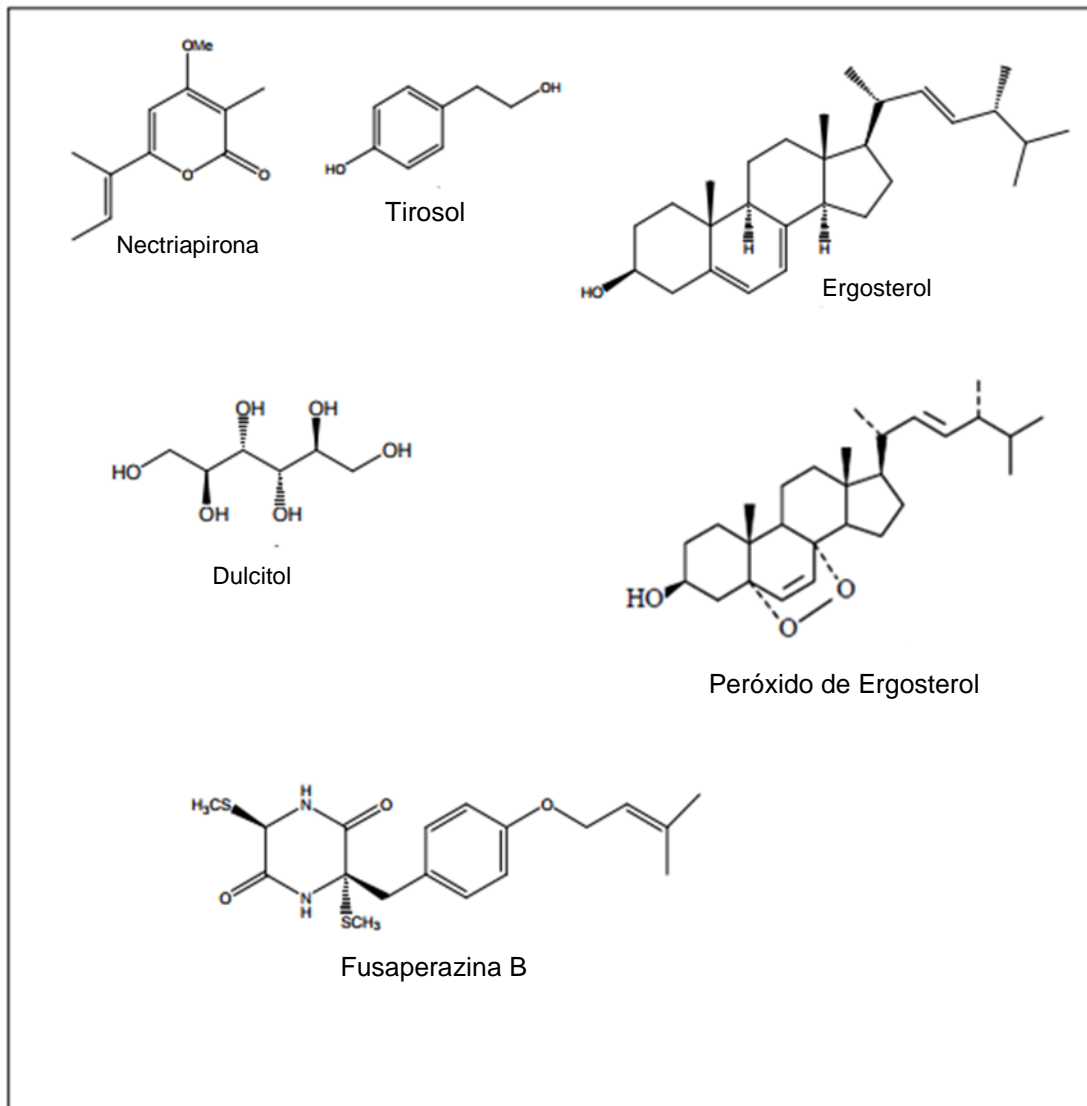
Os sintomas da antracnose aparecem em todos os órgãos aéreos da planta e raramente nas raízes. O hipocótilo das plântulas é infectado geralmente por esporos, provenientes dos cotilédones, trazidos pela lavagem das chuvas. As lesões formadas no hipocótilo iniciam-se por pequenas manchas escuras que gradualmente se estendem por quase toda a planta, atingindo tamanhos consideráveis. Posteriormente, estas lesões tornam-se deprimidas e de coloração marrom-escuro (VIEIRA, 1983).

Figura 4. *Glomerella cingulata* em placa de Petri (à esquerda) e na forma de antracnose (à direita).



Existem poucos trabalhos na literatura referentes ao estudo da biomassa do fungo *Glomerella cingulata*, onde algumas substâncias isoladas são relatadas como a Nectriapirona, o Tirosol, o Ergosterol, o Dulcitol, o peróxido de Ergosterol e a Fusaperasina B, figura 5 p. 20 (GUIMARÃES, 2006).

Figura 5. Substâncias produzidas pelo fungo *Glomerella cingulata*. Fonte: Guimarães, 2006.



3.5. BIOCATÁLISE

Shaw (2003) conceituou as biocatálises ou biotransformações como sendo conversões químicas catalisadas por enzimas sobre substratos naturais ou sintéticos. Os processos biocatalíticos utilizando células íntegras ou enzimas isoladas têm encontrado diversas aplicações, especificamente nas indústrias químicas, agroquímicas e farmacêutica (HUISMAN, 2002; PINHEIRO, 2007).

As reações quimio-enzimáticas apresentam a vantagem de serem mais regio-, quimio- e esterosseletivas em relação a reações químicas convencionais, podendo ser efetuadas sob condições brandas, não exigindo altas temperaturas, ácidos ou bases fortes e metais como em reações realizadas sob catálise convencional. Essas características tornam a biocatálise uma alternativa sintética viável dentro dos princípios da química verde, diminuindo o uso de solventes e geração de subprodutos tóxicos ao homem e ao meio ambiente (HANSON. 1997).

A seletividade apresentada pelos catalisadores naturais (quimiosseletividade, enantiosseletividade, regioseletividade), o amplo espectro de substâncias químicas que são aceitas para as reações como substratos, o custo, as condições amenas e ecologicamente corretas, conferem aos mesmos algumas características fundamentais para sua utilização (FABER, 2004).

Sua eficiência em realizar diversas reações químicas, até as mais difíceis de serem obtidas pelos métodos tradicionais, como a modificação de grupos pouco ativados e a introdução de funções orgânicas (figura 6 p. 22), principalmente hidroxilações em carbono sp^3 remotos a funções pré-existentes, tem sido o grande atrativo para sua aplicação em sínteses químicas multi-etapas (SILVA, 2009).

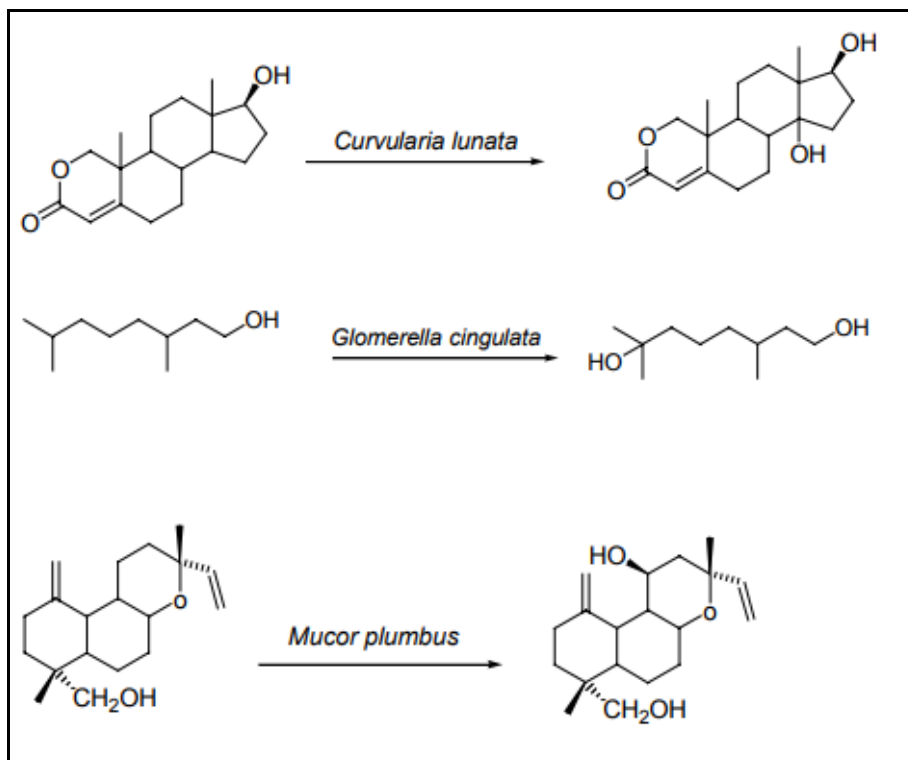
A utilização de biocatalisadores em reações de química orgânica têm se tornado uma tendência mundial nos últimos anos e diversa são as fontes enzimáticas, como plantas e micro-organismos. Dentre as técnicas empregadas em síntese orgânica, a utilização dos micro-organismos isolados de plantas, os chamados micro-organismos endofíticos, se destacam como uma das principais fontes para a obtenção do produto desejado (PINEDO-RIVILLA et al, 2009).

Entre os microrganismos (fungos e bactérias) os fungos são os mais usados, pois apresentam as seguintes vantagens: ciclo de vida curto; possuem um sistema enzimático rico e de fácil manipulação, e são mais acessíveis para se trabalhar. O estudo das reações de biotransformação estabelece uma ponte entre a química e a

bioquímica, podendo ser mais bem definida como: “o uso de sistemas biológicos capazes de promover mudanças químicas em compostos orgânicos que não sejam seus substratos naturais” (ALEU, 2001).

Estudos podem ser feitos sobre em cima do metabolismo dos fungos pra a obtenção de informações sobre as enzimas essenciais para determinados processos que se pretende desenvolver. Um estudo do metabolismo microbiano de oligossacarídeo propiciou o isolamento e identificação de várias glicosidases, além de enzimas envolvidas em reações de transglicosilação as quais podem ser usadas na síntese de glicopeptídeos, o que demonstrou que o estudo de biotransformações pode ser usado para isolar enzimas de determinados grupos (YAMAMOTO, 2012).

Figura 6. Exemplos de substâncias produzidas por biotransformação.
Fonte: (FABER, 1997; NANKAI & MIYAZAWA, 1997)

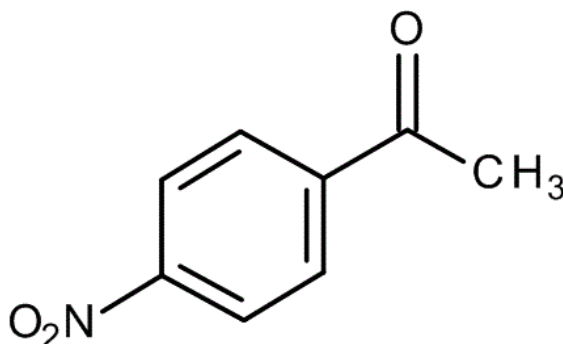


3.6. 4-NITROACETOFENONA

Pode ser obtida através de uma reação de nitração da acetofenona. A 4-nitroacetofenona (figura 7 p. 23) pode ser obtida por inúmeros métodos, na indústria é subproduto da oxidação do etilbenzeno. Algumas resinas de interesse comercial podem ser produzidas pela ação do formaldeído e uma base sobre a acetofenona. Compostos aromáticos são matérias-primas para síntese de produtos farmacêuticos e para compor fragrâncias que se assemelham com amêndoas, cereja, madressilva, jasmim e o morango (BURDOCK, 2005).

Por volta do século XIX e inícios do XX a acetofenona teve uso terapêutico. Era vendida com o nome de hipnótico e antivulsivante e com nome comercial de Hipnona, seus efeitos sedativos eram superiores aos do hirato de cloral e do paraleído, dois sedativos utilizados na época. Esse composto pode ser encontrado naturalmente em várias frutas, como a maçã, o damasco e a banana (NORMAN, 1889).

Figura 7. Estrutura da 4-nitroacetofenona.

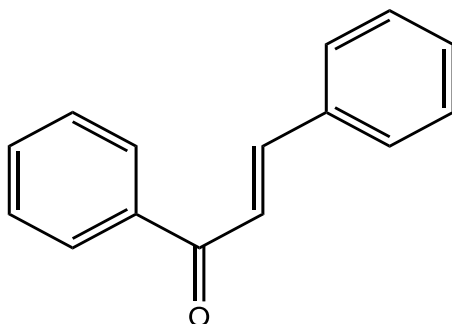


3.7. CHALCONA

As chalconas são quimicamente conhecidas como cetonas aromáticas α,β -insaturadas (figura 8, p. 24), fazendo parte de uma classe de compostos amplamente distribuídos na natureza e que por muitas vezes estão relacionados com a pigmentação das plantas. Chalconas de origem natural tem atraído a atenção de químicos orgânicos e medicinais, devido à sua ampla diversidade atividade biológica (FUNAKOSHI-TAGO et al, 2009).

Em 2013 foi relatado por Ramalho e seus colaboradores o efeito citotóxico de chalconas sintéticas frente a várias linhagens de células tumorais. No mesmo período sintetizaram uma série de compostos da benzalacetofenona que apresentaram propriedades anticancerígenas e antiinflamatórias que podem estar relacionadas com sua atividade antioxidante direta ou os seus efeitos estimulantes sobre as enzimas de defesa endógenas (MAYDT *et al.*, 2013).

Figura 8. Chalcona C ((2E) - 1,3-difenil-prop-2-em-1-ona).

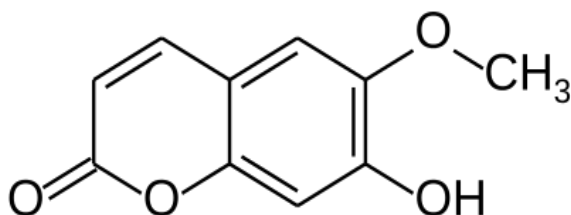


3.8. ESCOPOLETINA

A escopoletina (6-metoxi-7-hidroxycumarina), (figura 9, p. 25) é um composto ativo farmacologicamente. Apresenta ação antiinflamatória, podendo ser isolada de várias espécies vegetais. Seu mecanismo de ação é diretamente ligado a citocinas que regulam a cascata sinal de inflamação, podendo ser uma excelente opção para o tratamento de inflamações crônicas (MOON, 2007).

Possui também ação espasmolítica e seu mecanismo é em partes, atribuído à capacidade de inibir a mobilização de cálcio nos tecidos sensíveis à norepinefrina. Kim (2005) realizou um estudo que mostrou a escopoletina como uma alternativa para o tratamento de tumores, devido a sua habilidade para induzir apoptose em células leucêmicas (KIM, 2005).

Figura 9. Escopoletina (6-metoxi-7-hidroxicumarina).

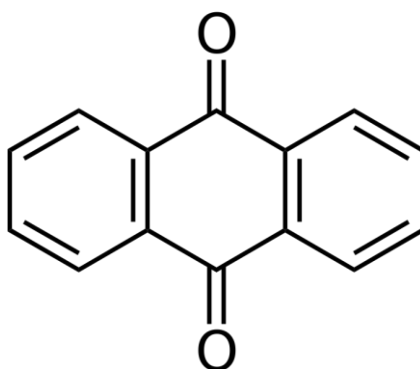


3.9. ANTRAQUINONA

A antraquinona (9,10-antracenediona), (figura10, p. 25) é um composto que foi obtido pela primeira vez em 1897 através da hidrólise do antraceno e, atualmente pode ser produzido pela condensação do anidrido ftálico com o benzeno. É um sólido sublimável, em sua nitração ou sulfonação fornecem intermediários utilizados em corantes (BACH e FIEHN, 1972).

O sal do sulfonato de antraquinona pode estabilizar a celulose em meio alcali aquecido, diminuindo assim a ação das reações não apenas incrementando o rendimento, mas protegendo a celulose da degradação. Pode também ser utilizada indústria do papel auxiliando no ataque à lignina em polpações Kraft (GOMIDE, 1980)

Figura 10. Antraquinona (9,10-antracenediona).



4. DESENVOLVIMENTO

4.1. MATERIAIS

4.1.1. Equipamentos

- **Espectrômetro de Ressonância Magnética Nuclear:** VARIAN modelo MERCURY – 300 (300 MHz para RMN ^1H e 75 MHz para RMN ^{13}C);
- **Câmara de análise de fluorescência por luz ultravioleta:** Cabine tipo SPECTROLINE modelo CM – 10. Luz tipo SPECTROLINE modelo ENF – 260C;
- **Balança Analítica:** SHIMADZU;
- **Autoclave vertical:** Modelo Au PHOENIX;
- **Capela de fluxo laminar:** Modelo PA 320 PACHANE;
- **Agitador Orbital tipo Shaker:** MARCONI.

4.1.2. Solventes

- **Acetato de Etila (ISOFAR);**
- **Hexano (DINÂMICA);**
- **Metanol (DINÂMICA);**
- **DMSO (DINÂMICA).**

4.1.3. Substratos

- **4-nitroacetofenona (SIGMA);**
- **(2E) - 1,3-difenil-prop-2-en-1-ona;**
- **Escopoletina;**
- **Antraquinona.**

4.1.4. Meios de cultivo utilizados

- **B.D.A (Batata, glicose e Agar);**
- **Extrato de Malte (Batata inglesa, glicose e levedura);**
- **B.H.I (Infuso Cérebro Coração);**
- **AGAR B.H.I (BHI e Agar).**

4.1.5. Técnicas cromatográficas utilizadas

- **Cromatografia em Camada Delgada (CCD); Cromatoplasmas de sílica gel** 60 HF254 espessura 0,2 mm em suporte de Alumínio (MERCK);
- **Coluna Cromatográfica em sílica gel.**

4.1.6. Solventes deuterados utilizados na análise de rmn de ^1H

- **Clorofórmio-D** (Cambridge Isotope Laboratories);

4.1.7. Material utilizado no ensaio antimicrobiano

- **Placa de Elisa 96 poços** (KASVI);
- **TTC** (Cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazóico) (NEON);
- **Cloridrato de ciprofloxacino** (Medley®).

4.1.8. Microrganismos

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^a Dr. Marilene Nunes Oliveira, docente da Unifesspa.

4.2. MÉTODOS

Fragmentos do fungo foram reativados de vidro de penicilina da micoteca da UFPA e repicados de forma asséptica em placa de Petri, utilizando como meio de cultivo o BDA semi-sólido (batata, dextrose e ágar), onde para o preparo do meio foram utilizados 20 g de batata, 2 g de glicose e 2 g de Agar para 100 mL de água destilada. A solução foi esterilizada em autoclave por 15 minutos a 121 °C.

Cerca de 20 mL da solução foi distribuída para cada placa de Petri e foi deixada em repouso a temperatura ambiente para que o meio ficasse semi-sólido. Em seguida foi inoculado, em capela de fluxo laminar, um micélio para cada placa e foram levadas ao BOD (Biochemical Oxygen Demand) a 27°C, onde permaneceram por sete dias para o seu desenvolvimento, para serem inoculados no meio de cultura líquida, nas reações de biotransformações.

O fungo endofítico *Glomerella cingulata* reativado foi armazenado em triplicata conforme a metodologia descrita na literatura (CASTELLANI, 1939).

4.2.1. Preparação do meio reacional para biotransformação

Já com o fungo devidamente reativado, preparou-se o meio líquido para o início da biocatálise. Para reação de biotransformação foi utilizado como meio de cultivo extrato de malte. Foram preparados 500 mL de meio solubilizando em balão de fundo chato com água destilada, 10 g de d-glicose anidra, 100 g de batata inglesa, adicionando-se extrato de levedura a 2%(v/v). O meio foi transferido para frascos de Erlenmeyer e esterilizado em autoclave por 15 minutos a 121°C.

4.2.2. Adição do fungo endofítico e dos substratos ao meio reacional

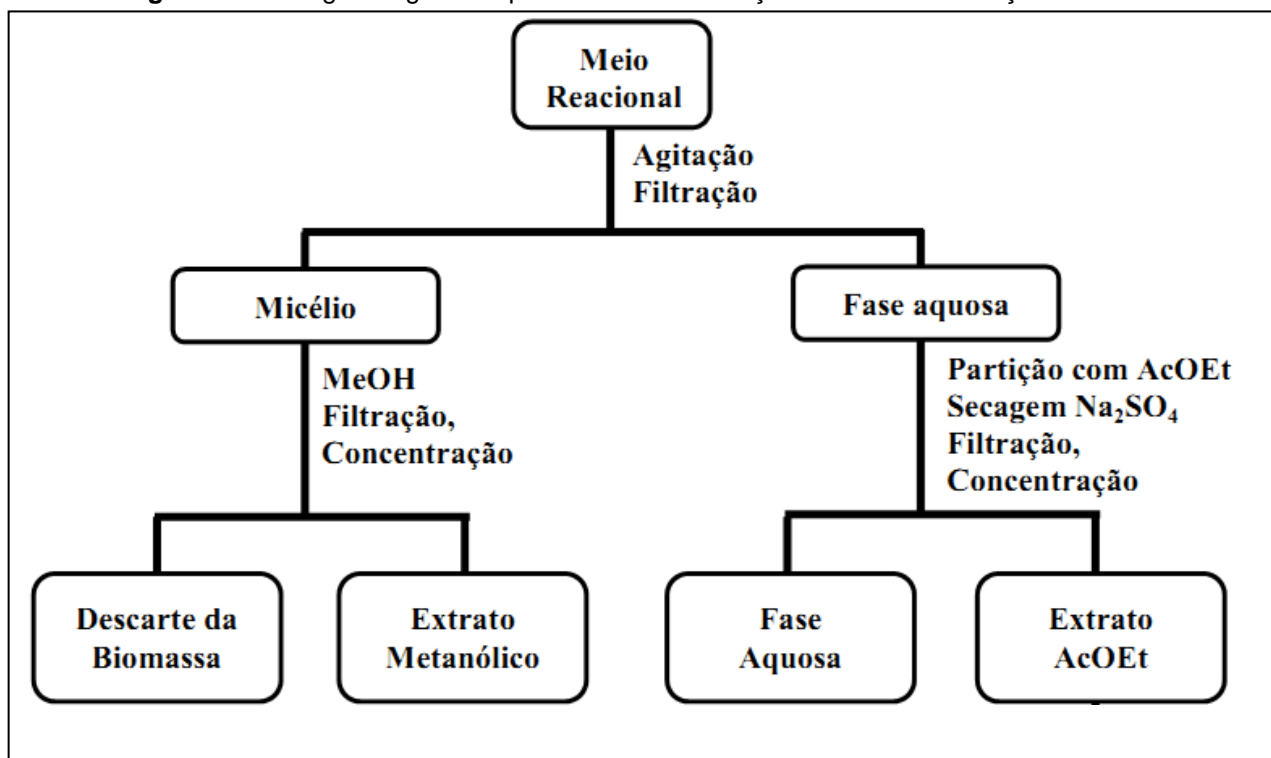
Foram preparados 5 frascos de Erlenmeyer de 250 mL, em seguida foi adicionado 3 pellets do fungo com 150 mg do substrato solubilizado, ficando quatro para controle, onde em dois deles foram adicionados ao meio de cultura o fungo e o substrato, em outro foi adicionado no meio de cultura somente o fungo, e por fim um frasco permaneceu apenas com o meio de cultura. Todos os frascos com os sistemas reacionais e os de controle foram colocados à mesa agitadora orbital,

permanecendo sob agitação por dez dias. Esse procedimento foi feito para cada substrato.

4.2.3. Obtenção dos extratos

Após o período de agitação, os meios reacionais foram filtrados. O filtrado foi submetido à partição líquido-líquido com acetato de etila na proporção de 1:1. A fase acetato de etila resultante foi adicionado sulfato de sódio anidro (Na_2SO_4), e concentrado em evaporador rotativo, obtendo-se o extrato acetato de etila. Ao micélio foi adicionando metanol, ficando em repouso durante 3 a 4 horas resultando em extrato metanólico. A figura 11 descreve o procedimento utilizado.

Figura 11. Fluxograma geral do procedimento de reação de biotransformação realizado.

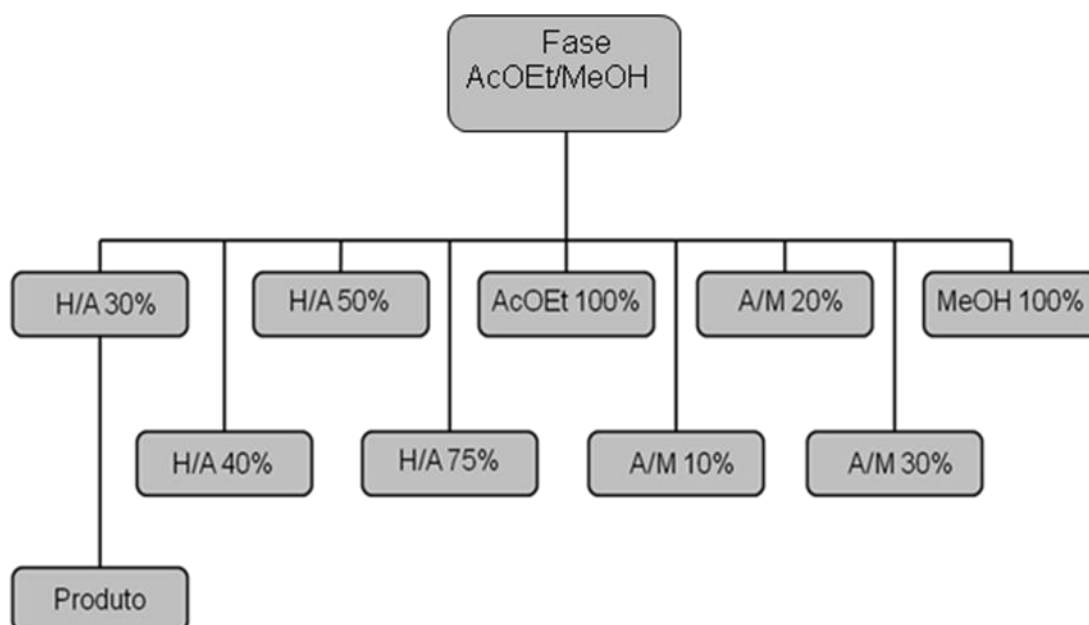


4.2.4. Fracionamento do extrato

O extrato Metanólico e AcOEt obtidos foram unidos em um único extrato e em seguida foram fracionados por cromatografia em coluna com via úmida (CCVU) em gel de sílica, e analisados por cromatografia em camada delgada comparativa utilizando o sistema H/A 30 % e submetidos a Ressonância Magnética Nuclear de H^1 .

Para a purificação do produto da chalcona foi utilizada a técnica de recristalização, assim foi obtido o produto 1,3-difenil-propan-1-ona. Enquanto que para a purificação do produto da 4-nitroacetofenona foi realizado o fracionamento em coluna de sílica gel em ordem crescente de polaridade, o produto da 4-nitroacetofenona foi isolado na fração H/A 30%, sendo obtido o produto 4-nitro-1-feniletanol como pode ser observado o fluxograma (figura 12).

Figura 12. Fluxograma do processo de fracionamento dos extratos da biotransformação da 4-nitroacetofenona.



4.2.5. Ensaio biológico

4.2.5.1. Teste antimicrobiano

4.2.5.2. Preparo do meio de cultivo BHI (Infuso Cérebro Coração)

Para 300 mL de meio são utilizados 11,1 g de meio de cultura BHI.

4.2.6. Preparo do meio de cultivo Agar BHI (Infuso Cérebro Coração)

Foram utilizados 13,5 g de Agar bacteriológico em 300 mL de caldo BHI. Após essas dissoluções todos os meios foram esterilizados em autoclave a 121 °C durante 15 minutos.

4.2.7. Ativação das bactérias

As bactérias testadas nos ensaios foram ativadas em placa de Petri de 9 cm de diâmetro, contendo Agar 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 realizaram-se diluições até alcançar a concentração de $1,0 \times 10^4$ UFC.

4.2.8. 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 H_2SO_4 1% (9,95 mL) e BaCl_2 1% (0,05 mL). Feito isso se comparou 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 apresentara uma concentração aproximadamente de $1,0 \times 10^8$ UFC.

4.2.9. Preparo das amostras

Para os extratos e as substâncias foi utilizado de massa 1 mg a serem testadas, dissolveu-se em 100 μL de DMSO, contidos em um tubo de Eppendorf e agitou-se (Vortex) para homogeneizar a solução. Em seguida foram adicionados 900 μL de caldo BHI esterilizado e agitou-se novamente a solução.

4.2.10. 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 µL e dilui-se em 995 µL de caldo BHI, contido em um tubo de Eppendorf. Obteve-se assim uma concentração de 5 µL/mL.

4.2.11. Ensaio para medir a CIM (Concentração Inibitória Mínima)

Nas placas de Elisa de 96 furos foram adicionados 100 µL de caldo BHI em cada cavidade. Em seguida acrescentou-se na primeira cavidade de cada coluna 100 µL da solução contendo a amostra a ser testada e homogeneizou-se essa solução. Após isso foram realizadas sucessivas diluições, retirando-se 100 µL da primeira cavidade (cavidade A) transferindo esse volume para a próxima (cavidade B), homogeneizando, esse procedimento é repetido até a penúltima cavidade da placa de Elisa, de onde são retirados 100 µL e descartados. A última linha da placa é usada como um controle do meio usado não acrescentando nessa a amostra a ser testada. Por fim em cada cavidade adicionou-se 5 µL da suspensão bacteriana e incubou-se as placas a 37 °C por 24 h. A leitura dos resultados foi feita com TTC (cloreto de 2,3,5- trifeniltetrazólico).

4.2.12. Tipo de atividade

Nas cavidades onde não apresentou coloração vermelha, os extratos foram novamente inoculados em placa de Petri contendo meio de cultura Agar BHI e incubadas a 37 °C por 24 h. Onde houve impedimento do crescimento da bactéria, indica que o extrato ou substância possui efeito bacteriostático a essa concentração e onde a bactéria não apresentou crescimento, indica que o extrato ou substância possui efeito bactericida.

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

A seguir serão apresentados os resultados obtidos das reações de biotransformação do fungo endofítico frente aos substratos orgânicos 4-nitroacetofenona, (2E) - 1,3-difenil-prop-2-en-1-ona, escopoletina e antraquinona, assim como as discussões acerca dos ensaios biológicos com os produtos obtidos.

5.1. REAÇÕES DE BIOTRANSFORMAÇÃO.

5.1.2. Estrutura dos substratos

As estruturas dos substratos utilizados no processo de biotransformação são representadas pela figura 13.

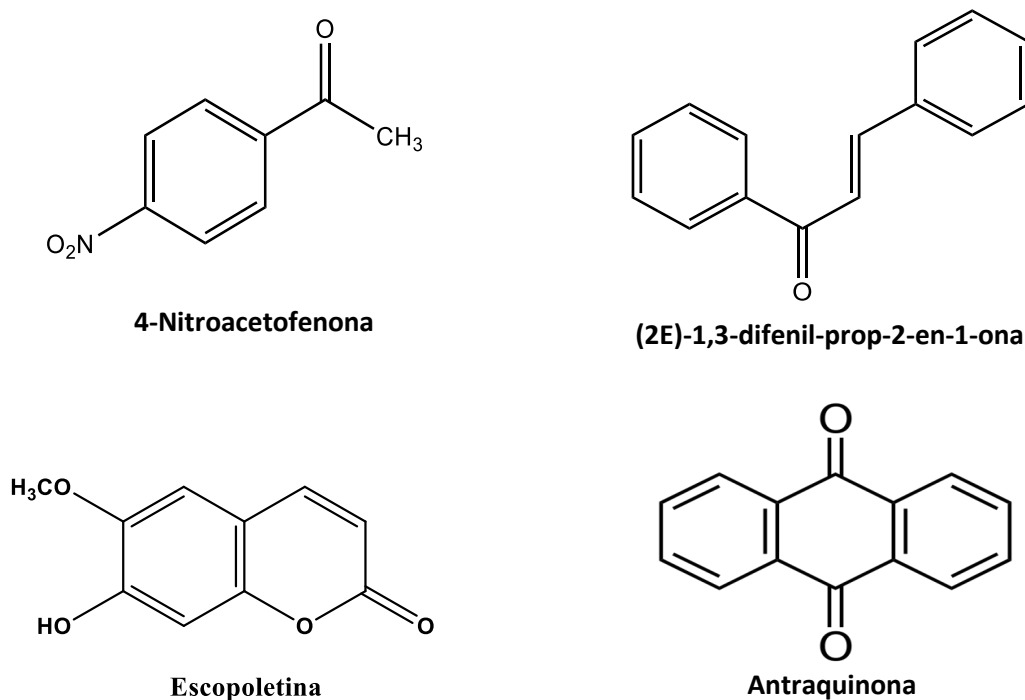


Figura 13. Estrutura dos substratos utilizados nas reações de biotransformação.

5.1.3. Reação de Biotransformação com 4-Nitroacetofenona.

Para a análise da reação de biocatálise utilizou-se o espectro de RMN¹H do substrato (figura 15, p. 35) em comparação com o espectro de RMN¹H do extrato reacional (figura 16, p. 35), onde foi observado a formação de um produto. No espectro do produto é observado um sinal quarteto na região δH 5,00 (1H, q, $J=6,6$ Hz) referente ao hidrogênio oximetínico, uma sinal duplete em δH 1,52 (3H, d, $J=6,6$ Hz) referente aos hidrogênios metílicos. Esses sinais confirmam a alteração do substrato e a formação de um novo produto, o álcool 4-nitro-1-feniletanol (**S1**), para esse houve uma redução da carbonila para a formação do produto final.

Figura 14. Redução do substrato e formação de S1.

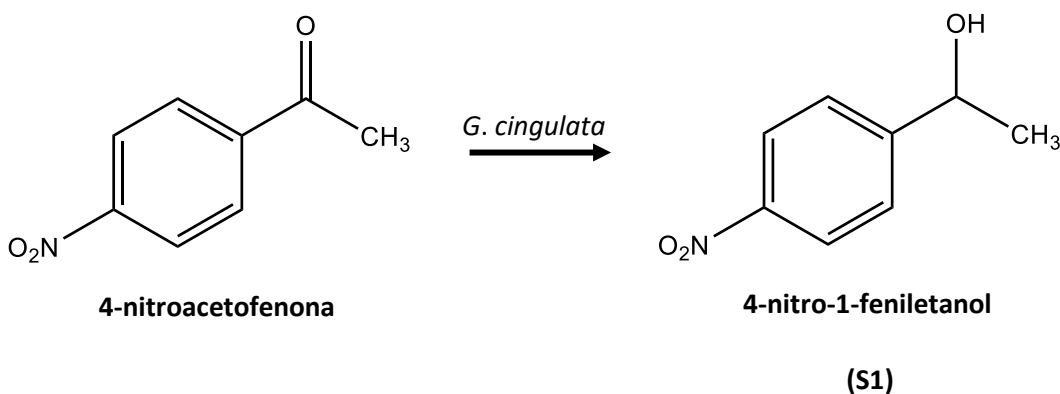


Figura 15: Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) do substrato.

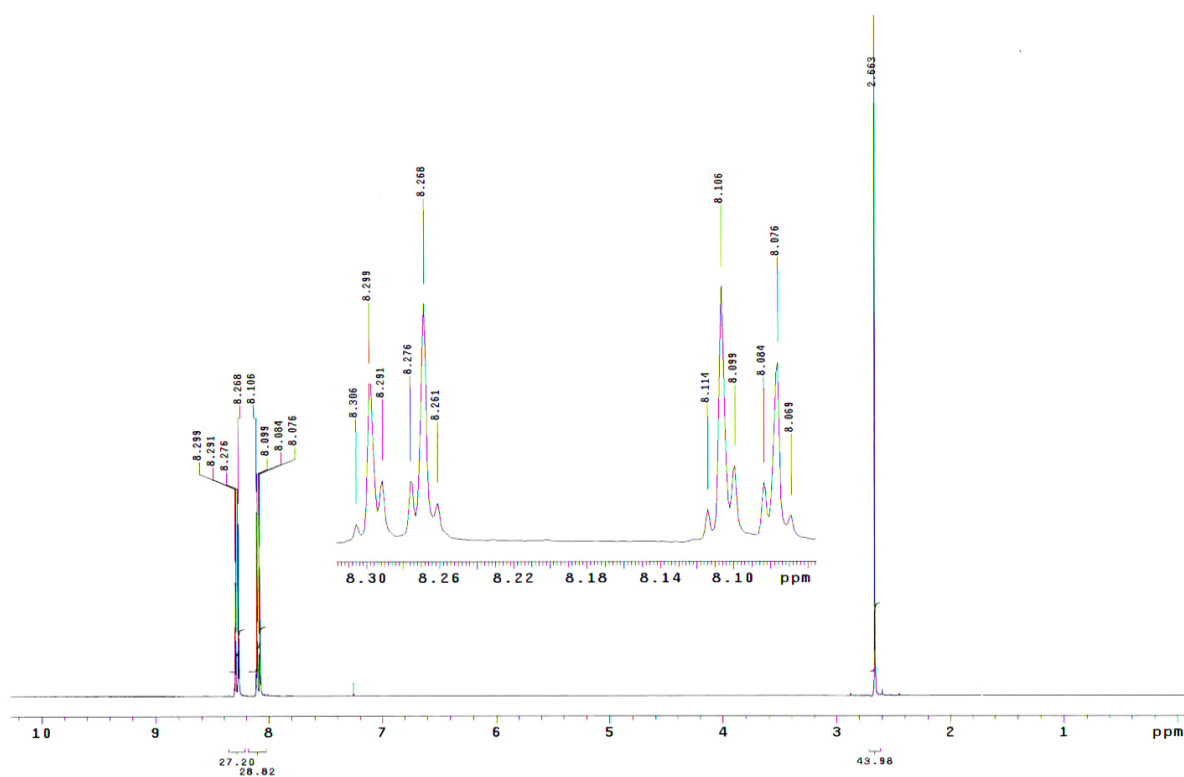
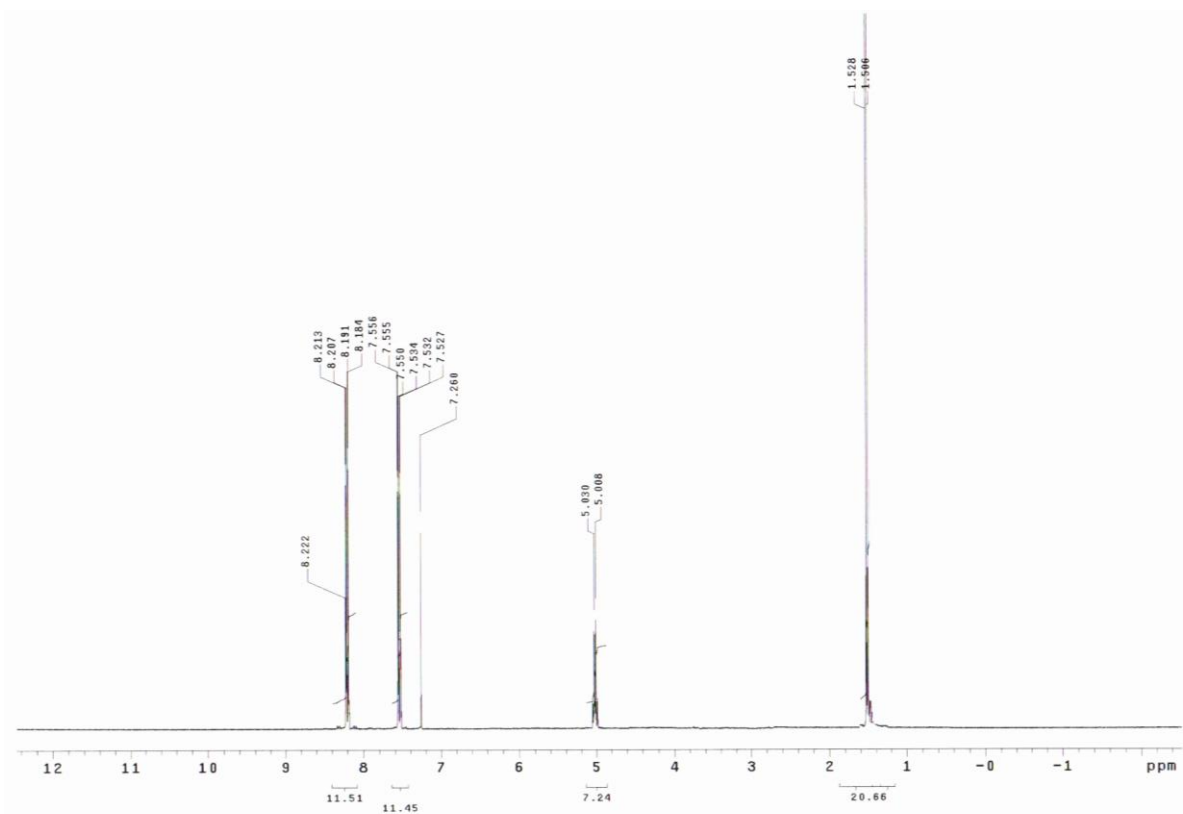


Figura 16: Espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) de S1.



5.1.4. Reação de Biotransformação com a (2E)-1,3-difenil-prop-2-en-1-ona.

Para a análise desta reação foram utilizados o espectro de RMN ^1H do substrato (figura 18, p. 37) e o espectro do produto formado (figura 19, p. 37), no espectro do reacional foi observado a presença de dois sinais tripletos na região de aproximadamente δ_{H} 3,35 (t, Hz, 2H- α) e em δ_{H} 3,10 (t, 2H- β) referentes aos hidrogênios metilênicos α - β -carbonilados. O aparecimento desses sinais confirma a biotransformação do substrato para a 1,3-difenil-propan-1-ona (**S2**), a figura 17 representa essa reação.

Figura 17. Reação de redução do substrato e formação de **S2**.

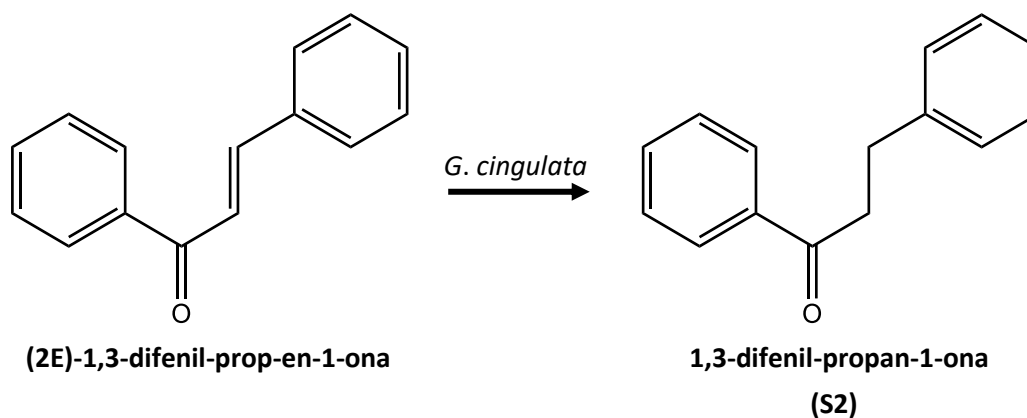


Figura 18: Espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) do substrato.

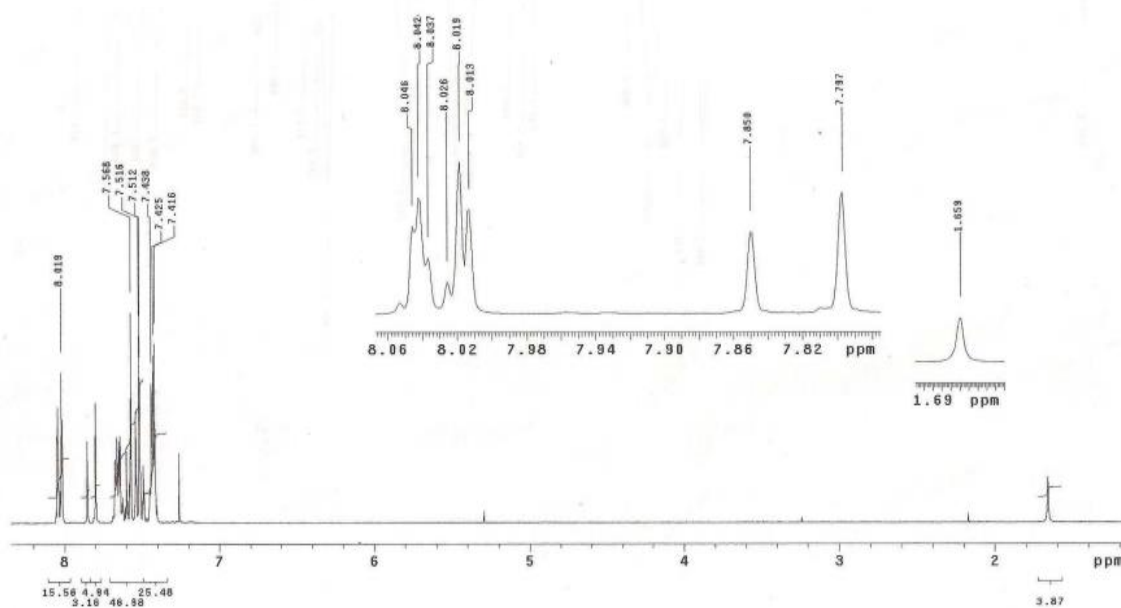
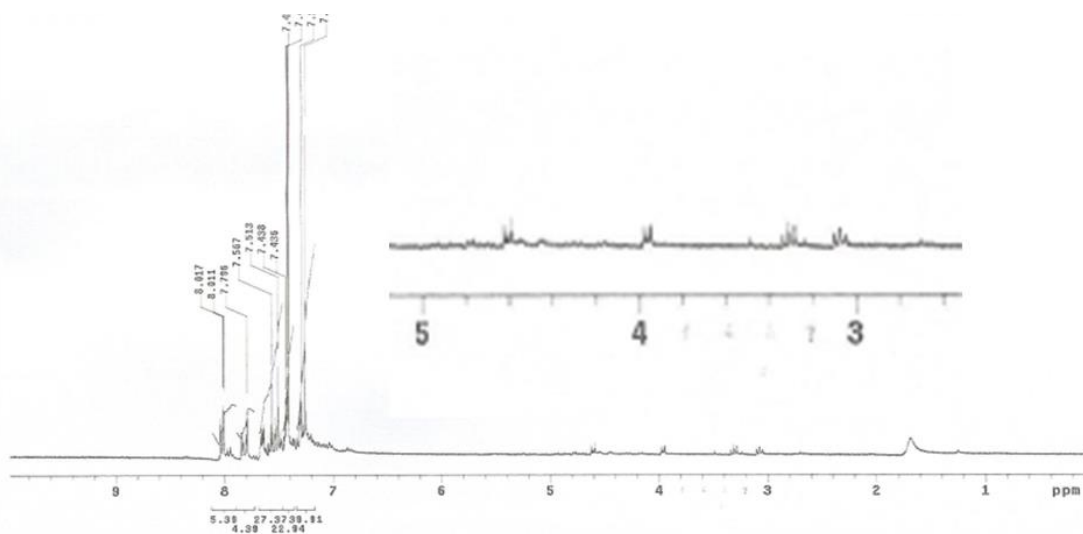


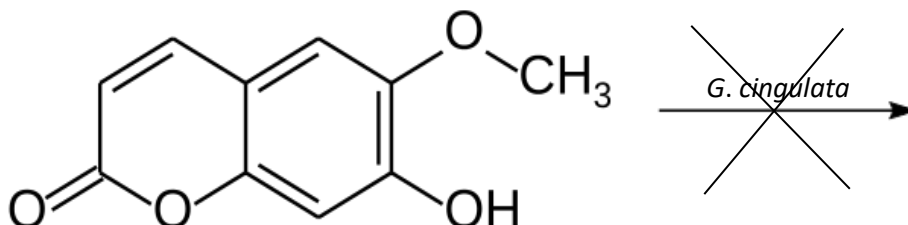
Figura 19: Espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) de S2.



5.1.5. Reação de Biotransformação com Escopoletina.

Após análises dos espectros obtidos foi observado que não houve alteração na estrutura do substrato escopoletina. A figura 20 descreve o mencionado.

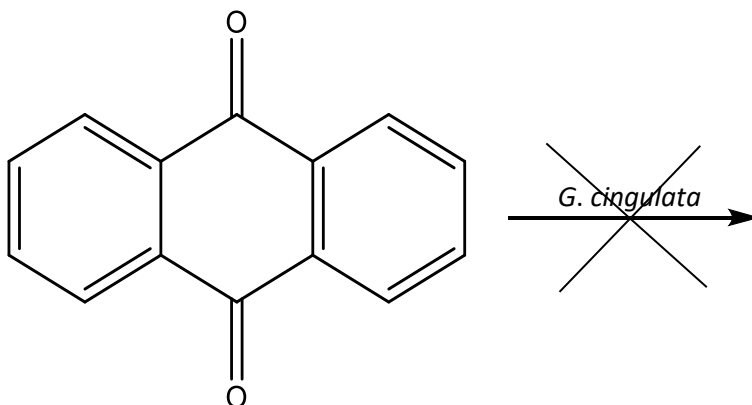
Figura 20: Reação com o substrato escopoletina (6-metoxi-7-hidroxicumarina).



5.1.6. Reação de Biotransformação com Antraquinona.

Com base nos espectros obtidos foi observado que a estrutura da antraquinona não sofreu alteração. Abaixo a figura 21 descreve o mencionado.

Figura 21: Reação com o substrato antraquinona (9,10-antracenediona).



Para os substratos Escopoletina e Antraquinona foram realizadas análises por CCD e por ^1H rmn, através dos resultados observados foi constatado que não houve alterações no substrato, pois os sinais de hidrogênio nos espectros permaneceram iguais para os meios reacionais utilizados.

5.2. ENSAIO ANTIMICROBIANO

5.2.2. Análise dos resultados do ensaio biológico com o produto das biotransformações.

Em relação aos produtos das biotransformações, apenas a substância **S2** mostrou atividade biológica frente à bactéria *E. faecalis*, nas concentrações de 500 a 7,8125 µg/mL (Quadro 3), nas quais apresentaram atividade bactericida. Para as outras bactérias para as mesmas concentrações não houve atividade biológica.

Quadro 3: Resultado Ensaio Antimicrobiano frente à bactéria *Enterococcus faecalis*.

[µg/mL]	S1	S2
500	+	=
250	+	=
125	+	=
62,5	+	=
31,25	+	=
15,625	+	=
7,8125	+	=
Branco	+	+

Nota: (+) Sem atividade; (-) Bacteriostático; (=) Bactericida.

6. CONCLUSÕES

Este trabalho realizou um estudo do potencial biocatalítico do fungo endofítico *Glomerella cingulata* isolado da espécie vegetal *Virola surinamensis* frente a substratos orgânicos. Onde os ensaios biocatalíticos comprovaram um resultado positivo da reação de redução de uma cetona aromática, a 4-nitroacetofenona, em um álcool aromático o 4-nitro-1-feniletanol (**S1**) e na redução da (2E)-1,3-difenil-prop-2-en-1-ona em 1,3-difenil-propan-1-ona (**S2**), demonstrando que o fungo endofítico é eficiente na redução da dupla ligação de sistema carbonílico α,β -insaturados e na redução da carbonila para produção de um álcool.

Os ensaios biológicos foram realizados com os compostos 4-nitro-1-feniletanol (**S1**) e 1,3-difenil-propan-1-ona (**S2**) frente às bactérias *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis* e *Klebsiella pneumoniae* em concentrações de 500 a 7, 8125 $\mu\text{g/mL}$. Onde a cetona aromática 1,3-difenil-propan-1-ona apresentou atividade bactericida contra a bactéria *Enterococcus faecalis* nas referidas concentrações, para as demais não houve atividade biológica tanto com **S1** quanto com o **S2**.

O fungo *Glomerella cingulata* mostrou-se um biocatalizador eficiente na redução de dois dos quatro substratos utilizados. Na redução da chalcona (2E) - 1,3-difenil-prop-2-en-1-ona seus extratos tiveram ação bactericida frente a *E. faecalis* demonstrando um potencial farmacológico de seus extratos de biotransformação.

REFERÊNCIAS

- ALEU, J. 2001. Biotransformations by *Botrytis* species. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 13, p. 77-93.
- ARAÚJO, W. L. Genética e Melhoramento de Fungos na Biotecnologia. Disponível em <http://www.ufv.br/dbg/trab2002/MELHOR/MHR004.HTM>, acesso em 24/04/2009.
- ARNOLD, A. E.; MAYNARD, Z.; GILBERT, G. S.; COLEY, P. D.; KURSAR, T. A., 2000. Are Tropical fungal endophytes hyperdiverse?. *Ecology Letters*, vol. 3, p. 267-274.
- AZEVEDO, J. L.; ARAÚJO, W. L. Diversity and applications of endophytic fungi isolated from tropical plants. In: GANGULI, B. N.; DESHMUKH, S. K. (Eds.). *Fungi: multifaceted microbes*. New Delhi: Anamaya Publishers, 2007.
- BACH, B. & FIEHN, G.; Neuer möglichkeiten Zur Kohlehydratstabilisierung in alkalischen Holzaufschlub. *Zellstoff und Papier* 21: 3-7. 1972.
- BAILEY, J. A.; JEGER, M. J. *Colletotrichum: biology, pathology and control*. Wallingford: C. A. B. International/British Society for Plant Pathology, p. 338. 1992.
- BERG, M. E. van den. Plantas medicinais da Amazônia: contribuição ao seu conhecimento sistemático. 2ª Ed. Belém: PR/MCT/CNPq – Museu Paraense Emilio Goeldi, 1993.
- BREEN, J. P. Acremonium-endophyte interactions with enhanced plant resistance to insects. *Annual Review of Entomology*, v.39, p.401-423, 1994.
- BURDOCK; GEORGE A.; Fenaroli's Handbook of Flavor ingredients, 2005. ISBN 0849330343 5th ed., CRC Press, p. 15
- BUSH, L. P.; WILKINSON, H. H.; SCHARDL, C. L. Bioprotective alkaloids of grass-fungal endophyte symbioses. *Plant Physiology*, v.114, p.1-7, 1997.
- CARDWELL, N. M. E.; CORNFORTH, J. W.; DUFF, S. R.; HOLTERMANN, H.; ROBINSON, R.; *Chem. Ind.* 1951, 389; *J. Chem. Soc.* 1953, 361.
- CASTELLANI, A. Viability of mold culture off ungi in destiled water. *American journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v – 42, p. 225, 1939.

CHAVES, G. La antracnosis. In: SCHUARTZ, H. F.; GALVEZ, G. E. (Ed.) Problemas de producion de frijol: enfermedades, insectos, limitaciones edáficas y climáticos de *Phaseolus vulgaris*. Cali: CIAT, 1980. p. 37-53. control. Wallingford: C. AB. International, 1992. p. 1-26.

CLAY, K. Fungal endophytes of grasses: a defensive mutualism between plants and fungi. *Ecology*, v.69, p.10-16, 1988.

CORRÊA, J. C. Antibióticos no dia-a-dia. 3ª. Ed. Rubio. Rio de Janeiro. 2004.

COSTA, P. R. R. Produtos Naturais como ponto de partida para a descoberta de novas substâncias bioativas: candidatos a fármacos co ação antiofídica, anticâncer e antiparasitária. *Revista Virtual de Química*, n. 1, p. 58-66, 2009.

CREMERS, G. 1994. Annotations to: Threatened plants of French Guiana (South America).

ESPOSITO, E.; AZEVEDO, J. L., 2010. Fungos uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia, 2ª Ed. Universidade de Caxias do Sul – RS.

FABER, K. 2004. *Biotransformations in Organic Chemistry*. 5th ed.; Springer-Verlag, New York.

FABER, K. *Biotransformations in Organic Chemistry*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 1997.

FUNAKOSHI-TAGO, M.; TANABE, S.; TAGO, K.; ITOH, H.; MASHINO, T.; (2009) Licochalcone A potently inhibits tumor necrosis factor alpha-induced nuclear factor-kappaB activation through the direct inhibition of IkappaB kinase complex activation. *Molecular pharmacology* 76: 745-753.

GIRI, A.; DHINGRA, V.; GIRI, C. C.; SINGH, A.; WARD, O. P.; NARASU, M. L. 2001. Biotransformations using plant cell, organ cultures and enzyme systems: current trends and future prospects. *Biotechnology advances*. n.19.

GOMIDE, J. A. e RUBENS, C. O. Eficiência da antaquinona na polpação alcalina do eucalipto. *Publicação da Universidade Federal de Viçosa*, p. 67-71.

GOMIDE, J. A. E RUBENS, C. O. Eficiência da antaquinona na polpação alcalina do eucalipto. *Publicação da Universidade Federal de Viçosa*, p. 67-71. 1980.

GONTHIER, P.; GENNARO, M.; NICOLOTTI, G. 2006. Effects of water stress on the endophytic mycota of *Quercus robur*. *Fungal Div.*, 21: 69-80.

GUIMARÃES, D. O. 2006. Prospecção química e biológica em fungos endifíticos associados a *Viguiera arenaria* (Asteraceae). (Tese de Doutorado), Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, p. 80.

HANSON, J. R. An Introduction in Biotransformation in Organic Chemistry, Oxford University Press, New York, 1997

<https://gd.eppo.int/taxon/GLOMCI>

HUISMAN, G. W.; GRAY, D. Current Opinion in Biotechnology, 2002, 13:352.

IKAN, R. *Natural products: A laboratory guide*. Jerusalém, Israel Universities Press, 1969, 301p.

KIM, E. K. Scopoletin induces apoptosis in human promyeloleukemic cells, accompanied by activations of nuclear factor kappa B and caspase-3. *Lite Sciences*, v. 77, n. 7, p.824-836, 2005.

KRINGS, M.; TAYLOR, T. N.; HASS, H.; KERP, H.; DOTZLER, N.; HERMSEN, E. J. 2007. Fungal endophytes in a 400-million-yr-old plant: infection pathways, special distribution, and host response. *New Phytol*, 174: 648-757.

LOPES, L.M.X.; YOSHIDA, M.; GOTTLIEB, O.R. Dibenzylbutyrolactone lignans from *Virola sebifera*. *Phytochemistry*, v.22, n.6, p.1516-1518, 1983.

MOON, P. D. Use of scopoletin to inhibit the production of inflammatory cytokines through inhibition of the I kappa B/NF-kappa B signal cascade in the human mast cell line HMC-1. *European Journal of Pharmacology*, v. 555, n. 2-3, p. 218-225, 2007.

MURRAY, F. R; LATCH, G. C. M; SCOTT, D. B. Transformação de azevém perene *Lolium perenne*, usando endófito *Acremonium* geneticamente modificados. *Mol. General Gen.* v. 233, p. 1-9, 1992.

NANKAY, H.; MIYAZAWA, M.; Hydroxylation of Two Saturated Acyclic Monoterpenoids Tetrahydrogeraniol and Tetrahydrolavandulol by the Plant Pathogenic Fungus *Glomerella cingulata*. *Journal Natural Products*, v. 60, p. 287-2889, 1997.

NORMAN, CONOLLY. («Cases illustrating the sedative effects of acetophenone». *Journal of Mental Science*. 32: 519, 1889.

PAIXÃO, L.B.; HIRUMA-LIMA, A.C. *Virola surinamensis* (Rol.) Warb.: Um estudo etnofarmacológico. *Anais do XIV Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil*, p. 109 , 2000.

PASTORE, J. F. B. Polygalaceae Hoffmannsegg e Link no Distrito Federal, Brasil. Dissertação (Mestrado em Botânica) - Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília, Brasília (2006), 216 f.

PELCZAR, M.; REID, R.; CHAN, E. C. S. Infecções humanas transmitidas pelos alimentos e pela água. In: PELCZAR, M.; REID, R.; CHAN, E. C. S. *Microbiologia*. São Paulo: McGraw-Hill do Brasil, v. 2, p. 689-722, 1981.

PETRINI, O. 1991. Fungal endophytes of tree leaves. In: ANDREWS, J. H.; HIRANO, S. S. (Eds.). *Microbial Ecology of Leaves Springer-Verlag*, New York. p. 179-187.

PINEDO-RIVILLA, C.; CAFÊU, M. C.; CASATEJADA, J. A.; ARAUJO, R. A.; COLLADO, I. G. 2009. Asymmetric microbial reduction of ketones: absolute configuration of trans – 4 – ethyl – 1 - (1S-hydroxyethyl)cyclohexanol. *Tetrahedron: Asymmetry*, v. 20, p. 2666-2672.

PINHEIRO, L.; MARSAIOLI, A. J. *Journal of molecular Catalysis B: Enzymatic*, 44, 78,2007.

PINTO, A. C.; REZENDE, C. M.; GARCEZ, F. R.; EPIFANIO, R. A. 2003. Um olhar holístico sobre a química de produtos naturais Brasileira. *Revista Química Nova*, v. 26, p. 966-971.

PINTO, A. C.; SILVA, D. H. S.; BOLZANI, V. S. 2002. Produtos Naturais: Atualidades, Desafios e perspectivas. *Revista Química Nova*, v. 25, p. 45-61.

PINTO, T.J.A.; KANEKO, T.M.; OHARA, M.T. Controle biológico de qualidade de produtos farmacêuticos, correlatos e cosméticos. São Paulo: Atheneu, 2000, p. 75-95.

- RAMALHO, S. D.; BERNADES, A.; DEMETRIUS, G.; NODA-PEREZ, C.; VIEIRA, P. C.; (2013) Synthetic chalcone derivatives as inhibitors of cathepsins K and B, and their cytotoxic evaluation. *Chem Biodivers* 10: 1999 - 2006.
- REDLIN, S. C.; CARRIS, L. M. Endophytic Fungi in Grass and evolution. *Journal of the Torrey Botanical Society*, v- 124, n. 2, p. 216, 1996.
- REZENDE, R.K.; KATO, M.J. Dibenzylbutane and arytetralonelignans from seeds of *Virola sebifera*. *Phytochemistry*, v.61, p.427-432, 2002.
- RIZZINI, C. T. Árvores e madeiras úteis do Brasil: manual de dendrologia brasileira. 2. ed. São Paulo: E. Blücher, 1978. 296 p.
- ROCA, M. M. G.; DAVIDE, L. C.; MENDES-COSTA, M. C. Cytogenetics of *Colletotrichum lindemuthianum* (*Glomerella cingulata* f. sp. *phaseoli*). *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, v. 28, n. 4, p. 367-373, jul./ago. 2003.
- RODRIGUES, W. A. A ucuúba-de-várzea e suas aplicações. *Acta Amazônica*, Manaus, V. 2, n. 2, p. 29-47, 1972.
- ROENGSUMRAN, S.; PETSOM, A.; SOMMIT, D.; VILAIVAN, T. Labdane diterpenoids from *Croton oblongifolius*. *Phytochemistry*, v. 50, p. 449-453, 1999.
- SANDERS, I. R. 2004. Plant and arbuscular mycorrhizal fungal diversity – are we looking at the relevant levels of diversity and are using the right techniques? *New Phytol.*, 16: 415-418.
- SARTORATO, A. Antracnose. In: ZIMMERMANN, M. J. de O. et al. *Cultura do feijoeiro: fatores que afetam a produtividade*. Piracicaba: Potafós, 1988 p. 457-477.
- SHAW, N. M.; KAREN, T. R.; KIENER, A. *Advanced Synthesis Catalysis*, 345 (4), 425, 2003.
- SILVA, B. F. 2009. Estudo do potencial enzimático de micro-organismos endofíticos para a biotransformação de produtos naturais e análogos sintéticos. (Tese de Doutorado), Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, p. 3.

SUTTON, B. C.; The genus *Glomerella* and its Anamorph *Colletotrichum*. In: BAILEY, J. A.; JEGER, M. G. (Ed.). *Colletotrichum: biology, pathology and control*. Wallingford: C. AB. International, 1992. p. 1-26.

VALLE, J. R.; A Farmacologia no Brasil, Antecedentes e Perspectivas, Academia de Ciências do Estado de São Paulo: São Paulo, 1978.

VIEIRA, C.; Doenças e pragas do feijoeiro. Viçosa: UFV, 1983. p. 231.

WOODWARD, R. B.; SONDEHEIMER, F.; TAUB, D.; HEUSLER, K.; MCLAMORE, W. M.; *J. Am. Chem. Soc.* 1951, 73, 2403; *ibid* 3547; *ibid* 1952, 74, 4223;

YAMAMOTO, K. Biological analysis of the microbial metabolism of hetero-oligosaccharides in application to glycotecnology. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, v.76, p.1815-1827, 2012.