



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS  
REDE DE BIODIVERSIDADE E BIOTECNOLOGIA DA  
AMAZÔNIA LEGAL  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIODIVERSIDADE E BIOTECNOLOGIA**

**BIOTRANSFORMAÇÃO DA QUERCETINA E PRODUÇÃO DE  
METABÓLITOS ATIVOS POR *Penicillium* sp. 392 (GhG2 2.1) ISOLADO  
DE *Gustavia elliptica* M. (LECYTHIDACEAE)**

**KETLEN CHRISTINE OHSE**

**MANAUS - AM  
2019**

**KETLEN CHRISTINE OHSE**

**BIOTRANSFORMAÇÃO DA QUERCETINA E PRODUÇÃO DE  
METABÓLITOS ATIVOS POR *Penicillium* sp. 392 (GhG2 2.1) ISOLADO  
DE *Gustavia elliptica* M. (LECYTHIDACEAE)**

Tese de doutorado apresentada ao Curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia da Rede BIONORTE, na Universidade Federal do Amazonas, como requisito parcial para obtenção do Título de Doutor em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Emerson Silva Lima

Co-orientadora: Profa. Dra. Antonia Queiroz Lima de Souza

Colaborador: Prof. Dr. Afonso Duarte Leão de Souza

**MANAUS - AM  
2019**

## Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

O38b Ohse, Ketlen Christine  
Biotransformação da quercetina e produção de metabólitos ativos por *Penicillium* sp. 392 (GhG2 2.1) isolado de *Gustavia elliptica* M. (LECYTHIDACEAE) / Ketlen Christine Ohse. 2019  
102 f.: il. color; 31 cm.

Orientadora: Emerson Silva Lima  
Coorientadora: Antonia Queiroz Lima de Souza  
Coorientador: Afonso Duarte Leão de Souza  
Tese (Doutorado em Biodiversidade e Biotecnologia da Rede Bionorte) - Universidade Federal do Amazonas.

1. bioconversão. 2. fungo endofítico. 3. antiglicante. 4. anti-inflamatório. 5. Amazônia. I. Lima, Emerson Silva II. Universidade Federal do Amazonas III. Título

KETLEN CHRISTINE OHSE

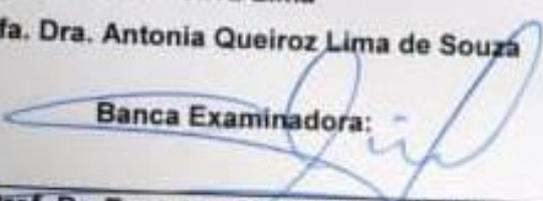
**"BIOTRANSFORMAÇÃO DA QUERCETINA E PRODUÇÃO DE  
METABÓLITOS ATIVOS POR *PENICILLIUM* SP. 392 (GHG2 2.1) ISOLADO  
DE *GUSTAVIA ELLIPTICA* M. (LECYTHIDACEAE)"**

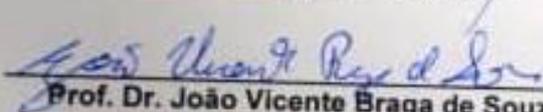
Tese de doutorado apresentada ao Curso de  
Doutorado do Programa de Pós-Graduação em  
Biodiversidade e Biotecnologia da Rede de  
Biodiversidade e Biotecnologia da Amazônia  
Legal, na Universidade do Estado do  
Amazonas, como requisito para obtenção do  
título de Doutora em Biotecnologia.

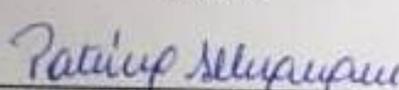
Orientador (a): **Prof. Dr. Emerson Silva Lima**

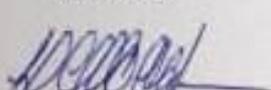
Coorientador(a): **Profa. Dra. Antonia Queiroz Lima de Souza**

Banca Examinadora:

  
\_\_\_\_\_  
**Prof. Dr. Emerson Silva Lima (UFAM)**  
Presidente da banca

  
\_\_\_\_\_  
**Prof. Dr. João Vicente Braga de Souza (INPA)**  
Membro

  
\_\_\_\_\_  
**Profa. Dra. Patricia Melchionna Albuquerque (UEA)**  
Membro

  
\_\_\_\_\_  
**Prof. Dr. Luiz Antonio Mendonça Alves da Costa (UFRR)**  
Membro

  
\_\_\_\_\_  
**Prof. Dr. Bruno Nicolau Paulino (UFAM)**  
Membro

**MANAUS –AMAZONAS**

Julho/2019

*A TUA forte voz fez o caos virar jardim... 🎵*

*(Dreyko Neves)*

*Dedicatória*

*Dedico cada linha desse trabalho aos meus  
amores: Filipe e Ricardo, Maks e Ivete.*

*Àquele que me mantém: DEUS.*

## AGRADECIMENTOS

Ao Eterno Criador que me mantém: doador de vida e liberdade a todos que nEle creem.

A minha amada família: filhos, marido, pais, avós, tios, primos, sogros, cunhados: pelo cuidado, amor e compreensão. Todos, sempre, na torcida (rs)!

De maneira especial, agradeço a minha mãe: incansável e forte, extensão de mim no cuidado diário com meus filhos. Pelas inúmeras vezes que saí cedo e cheguei tarde e as crianças não me viam porque estavam dormindo, mas a senhora estava com eles, com amor e paciência. Obrigada por cuidar da gente, em tudo! Também agradeço ao meu pai do coração, Edimar, ainda que geograficamente distante, sempre está presente, preocupado e dispensando cuidado e carinho.

Ao meu amado esposo Maks, com quem compartilho minhas alegrias e dores. Quantas coisas já superamos juntos! Por cuidar dos nossos queridinhos na minha ausência, pelo incentivo e apoio quando eu mesma não tinha mais forças de continuar. Amo você além do mar... (Ich liebe dich♥)

Aos meus bebezotes amados, as duas surpresas mais lindas que ganhei durante esse doutorado: Filipe e Ricardo, que me impulsionam a ser um ser humano melhor e não desistir facilmente.

À CAPES pela bolsa de estudos concedida. À UFAM, onde desenvolvi toda a pesquisa e realizei disciplinas, agradeço pela infraestrutura e ambiente.

Ao Programa de Pós Graduação em Biotecnologia e Biodiversidade – REDE BIONORTE, sede estadual e coordenação geral, aos professores e colegas pela convivência e respeito.

Ao meu Orientador: Prof. Dr. Emerson Silva Lima, por me permitir prosseguir como sua orientanda e ter dado a uma desconhecida a oportunidade de realizar um sonho. Professor: muito, muito obrigada pela paciência e compreensão! Desde o simples fato de você assinar minhas frequências ao provimento de tudo que esteve ao seu alcance para realização dessa pesquisa. Agradeço!

A minha co-orientadora: Profa. Dra. Antonia Queiroz Lima de Souza, por toda atenção, cuidado, dedicação, amizade, por disponibilizar a mim tempo e recursos. Nenhum gesto meu pode expressar a gratidão e o carinho que tenho pela senhora.

Ao Professor Dr. Afonso Duarte Leão de Souza, pela orientação “adotiva”, paciência em ensinar química pra uma bióloga, pelo convívio harmonioso, por alavancar meu trabalho quando eu pensei em desistir e se dispor a colaborar com tempo, conhecimento e recursos. Meu profundo respeito, gratidão e admiração.

Aos colegas do Laboratório de Atividade Biológica – BIOPHAR, por toda ajuda que recebi durante o doutorado, especialmente ao Léo, Márcia, Rosilene, Rodrigo e Patrícia.

A Central Analítica, onde desempenhei maior parte da pesquisa. Lugar de pessoas que me receberam e acolheram muito bem. À secretária, Rosângela, por sua disponibilidade e atenção.

Aos colegas do Labmicra (minha segunda casa), onde realizei a maior parte do trabalho: agradeço pela convivência, contribuições e confraternizações. Aprendi muito com cada um de vocês: Adriana, Débora, Fátima, Sarinha, Marta, Dolores, Francisca, Paulo, Luiz Paulo, Rachid, Gabriel, Anny, Rafael, Katak, Ana Paula, Ellisson e Kamila...

Ao LABCEN, onde sempre fui bem recebida e realizei todas as análises químicas. Agradeço ao Dr. Felipe por toda ajuda e contribuição. Aos queridos: Bruna, Elza e Richardson, pela amizade e ensinamentos de química (rs); Carla e Jaqueline, por me ajudar quando precisei.

Ao NMRLab: Dr. Marcos e o MSc. Kidney, por me permitirem o uso deste laboratório e assim, contribuírem com essa pesquisa.

Ao LAEQ: Dra. Rita Nunomura e os colegas Lílian, Marcos, Rochelly, Ingridy, Paulo Alexandre, pela ajuda nas inúmeras vezes que precisei usar o laboratório.

Ao Prof. Dr. Bruno Paulino, da FCF, pelas contribuições e trocas de ideia durante a adequação dos experimentos.

A Dra. Patrícia Orlandi e a técnica Ivanildes Bastos, da FIOCRUZ Amazônia – Instituto Leônidas e Maria Deane, pela realização de alguns ensaios biológicos no Laboratório de Diagnóstico e Controle de Doenças Infecciosas na Amazônia- DCDIA.

A amiga que o doutorado me deu: Gabi Gorayeb. Obrigada por toda ajuda desde o início e enquanto estive de licença maternidade. Pela amizade de construirmos e leveza da nossa convivência fraternal. Agradeço!

Agradeço a Dona Olga (tia da limpeza) por sempre estar disposta a ajudar e pela agradável convivência.

Aos amigos/irmãos que sempre estiveram ao meu lado (ao longo da vida...), presentes, orando, torcendo e contribuindo de algum modo: Aldenora, Lidiane e Neildo, Laudelina, Flávia e Dona Gracinha, Gemairie, Ariane, Oriona, Letícia, Gi Moura, Paulinha. Obrigada!!

Aos meus queridos avós, sempre presentes e amorosos desde que nasci, mas aos quais tive a infelicidade de dar adeus nos últimos meses que antecederam minha defesa: Tales e Maria (*in memoriam*).

Enfim, meu profundo agradecimento àqueles que fizeram parte dessa conquista. Que eu possa retribuir esse investimento de alguma forma, ainda que sutilmente, à população: principal merecedora dos benefícios que a ciência pode gerar.

## RESUMO

A biotransformação é uma ferramenta eficaz para modificar as estruturas naturais e produzir bioativos de interesse industrial. Muitos microrganismos têm sido utilizados em processos de biotransformação de produtos naturais, originando metabólitos já conhecidos ou novos, inclusive com o uso de fungos endofíticos. Nesse aspecto, foi proposto obter derivados bioativos de quercetina por meio de biotransformação realizada por *Penicillium* sp. A partir de amostras preservadas de *Penicillium* sp. Realizou-se biotransformação de quercetina em diferentes meios e condições. Foi adicionada a quercetina em cada amostra com microrganismo (exceto nos controles negativos), contendo meio mineral, tampão pH 7,5 e água. Após a biotransformação essas amostras foram submetidas as análises espectrométricas em HPLC MS-DAD e RMN 1D e 2D. Foram realizados ensaios para detecção de atividade anti-inflamatória, antiglicação, antimicrobiana e avaliação da citotoxicidade. Foi observada a biotransformação da quercetina no meio mineral, após dois dias de indução da molécula, nas amostras MBt e MicMBt, quando submetidas aos parâmetros ideais de pH 7,5; tempo e temperatura de agitação de 24h a 48h após adição de quercetina em 28 °C e 120 rpm; concentração do substrato quercetina de 100 mg/100 mL; nível de açúcar no meio de cultivo reduzido em 1/4; nível de quantidade de células nos meios ( $18 \times 10^8$ /mL) e cultivo a partir de suspensão de conídeos. Nos ensaios para teste antimicrobiano, as amostras apresentaram baixa atividade inibitória com halo de 6mm a 12 mm em bactérias gram-positivas e 8 mm em gram-negativas na concentração 5mg/mL. No ensaio antiglicante as duas frações contendo substância majoritária identificadas apresentaram alto índice de inibição na via da frutose, sendo os valores de  $IC_{50}$  para MicMBt  $11,00 \pm 0,75$  e para MBt  $17,17 \pm 0,51$   $\mu\text{g/mL}$ , quando comparadas ao padrão aminoguanidina ( $28,60 \pm 1,35$   $\mu\text{g/mL}$ ). Para atividade anti-inflamatória as frações apresentaram-se como inibidores da ativação de macrófagos, quando monitorados por produção de óxido nítrico. Quanto a citotoxicidade, as frações apresentaram baixa toxicidade até a concentração de 50  $\mu\text{g/mL}$ . A biotransformação da quercetina por *Penicillium* sp (392) produziu como compostos majoritários o éster 3,4-di-hidroxibenzoato de metila e a substância 2-((3,4-di-hidroxibenzoil)oxi)-4,6-di-hidroxi ácido benzoico, identificadas como moléculas majoritárias, as quais foram responsáveis pelas atividades antiglicantes e anti-inflamatórias em modelos *in vitro*. O presente trabalho foi pioneiro no estudo de biotransformação de flavonóides por fungos endofíticos da Região Amazônica, cuja perspectiva principal é produzir derivados que sejam potencialmente ativos em modelos biológicos.

**Palavras-chave:** bioconversão, fungo endofítico, antiglicante, anti-inflamatório, compostos fenólicos, Amazônia.

## ABSTRACT

Biotransformation is an effective tool for modifying natural structures and producing bioactive products of industrial interest. Many microorganisms have been used in processes of biotransformation of natural products, originating metabolites already known or new, including with the use of endophytic fungi. In this regard, it was proposed to obtain bioactive derivatives of quercetin through biotransformation performed by *Penicillium* sp. From preserved samples of *Penicillium* sp. Biotransformation of quercetin was carried out in different media and conditions. Quercetin was added to each sample with a microorganism (except in the negative controls), containing mineral medium, buffer pH 7.5 and water. After biotransformation, these samples were submitted to spectrophotometric analyzes in HPLC MS-DAD and 1D and 2D NMR. Tests were performed to detect anti-inflammatory, anti-glycation, antimicrobial activity and evaluation of cytotoxicity. The biotransformation of quercetin in the mineral medium was observed after two days of induction of the molecule, in the MBt and MicMBt samples, when submitted to the ideal parameters of pH 7.5; stirring time and temperature from 24h to 48h after adding quercetin at 28 °C and 120 rpm; concentration of quercetin substrate of 100 mg/100 ml; sugar level in the culture medium reduced by 1/4; level of quantity of cells in the media ( $18 \times 10^8$ /ml) and cultivation from conidia suspension. In the tests for antimicrobial testing, the samples showed low inhibitory activity with a halo of 6 mm to 12 mm in gram-positive bacteria and 8 mm in gram-negative bacteria at a concentration of 5 mg/ml. The anti-glycation assay, the two fractions containing the major substance identified had a high rate of inhibition in the fructose pathway, with IC<sub>50</sub> values for MicMBt  $11.00 \pm 0.75$  and for MBt  $17.17 \pm 0.51$  µg/ml, when compared to the aminoguanidine standard ( $28.60 \pm 1.35$  µg/ml). In anti-inflammatory activity, fractions were shown to inhibit macrophage activation when monitored for nitric oxide production. Regarding the cytotoxicity, the fractions showed low toxicity up to a concentration of 50 µg/ml. The biotransformation of quercetin by *Penicillium* sp (392) produced as major compounds the methyl 3,4-dihydroxybenzoate ester and the substance 2 - ((3,4-dihydroxybenzoyl)oxy)-4,6-dihydroxy benzoic acid, identified as major molecules, which were responsible for anti-glycant and anti-inflammatory activities in vitro models. The present work was a pioneer in the study of biotransformation of flavonoids by endophytic fungi from the Amazon Region, whose main perspective is to produce derivatives that are potentially active in biological models.

**Key-words:** bioconvesion, endophytic fungus, anti-glycante, anti-inflammatory, phenolic compounds, Amazonia.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b>	Biotransformação da deidroepiandrosterana	<b>23</b>
<b>Figura 2</b>	Biotransformação da Progesterona	<b>24</b>
<b>Figura 3</b>	Biotransformação do Albendazol	<b>24</b>
<b>Figura 4</b>	Biotransformação da Tioridazina e seus metabólitos	<b>25</b>
<b>Figura 5</b>	Compostos produzidos a partir da biotransformação de $\alpha$ -pineno	<b>26</b>
<b>Figura 6</b>	Estrutura de um Flavonóide	<b>27</b>
<b>Figura 7</b>	Estrutura química da Quercetina	<b>29</b>
<b>Figura 8</b>	Fluxograma do experimento de biotransformação com a linhagem <i>Penicillium</i> sp. 392	<b>32</b>
<b>Figura 9</b>	Fluxograma do ensaio de biotransformação com <i>Penicillium</i> sp. 392 em modo agitado.	<b>37</b>
<b>Figura 10</b>	Fluxograma do ensaio de biotransformação, em maior quantidade, com <i>Penicillium</i> sp. 392 em modo agitado.	<b>38</b>
<b>Figura 11</b>	Cultivo em placa de petri (A) frente e (B) fundo: aspecto morfológico após crescimento de <i>Penicillium</i> sp (392), com 5 dias de cultivo.	<b>45</b>
<b>Figura 12</b>	Cultivo em meio líquido BD (Batata Dextrose), reduzido de glicose, realizado a partir de suspensão de esporos, com crescimento de 5 dias, sob agitação a 28 °C	<b>46</b>
<b>Figura 13</b>	Espectros de UV (PDA) da biotransformação por <i>Penicillium</i> sp. 392	<b>49</b>
<b>Figura 14</b>	Espectros de massas (MS) da biotransformação por <i>Penicillium</i> sp. 392	<b>50</b>
<b>Figura 15</b>	Espectros de UV (PDA) da biotransformação por <i>Penicillium</i> sp. 392	<b>52</b>
<b>Figura 16</b>	Espectro de RMN de $H^1$ da amostra MBt a 500 MHz, em MeOD	<b>54</b>
<b>Figura 17</b>	Espectro de RMN de $C^{13}$ da amostra MBt a 500 MHz, em MeOD	<b>54</b>
<b>Figura 18</b>	Espectros de RMN de COSY (A), HSQC (B) e HMBC (C)	<b>56</b>
<b>Figura 19</b>	3,4-dihidroxi-benzoato de metila: substância majoritária obtida a partir da biotransformação de Quercetina por <i>Penicillium</i> sp, em meio reacional mineral.	<b>57</b>
<b>Figura 20</b>	2-((3,4-dihidroxibenzoil)oxi)-4,6-dihidroxi ácido benzoico: substância majoritária obtida a partir da biotransformação de Quercetina por <i>Penicillium</i> sp. 392, em meio reacional mineral, em presença de micélio – fração 30%.	<b>60</b>
<b>Figura 21</b>	Representação do mecanismo proposto para reação decorrente da biotransformação, incluindo o processo oxidativo, hidrólise e metilação	<b>61</b>
<b>Figura 22</b>	Comparação entre espectros de RMN de $1H$ das amostras MicMBt fração 30%, MBT e seus controles quercetina e meio reacional sem quercetina a 500 MHz.	<b>63</b>
<b>Figura 23</b>	Espectro de RMN de $H1$ da amostra MicMBt a 500 MHz, em Acetona	<b>63</b>
<b>Figura 24</b>	Espectro de RMN de $C13$ da amostra MicMBt fração 50% a 500 MHz, em Acetona.	<b>63</b>
<b>Figura 25</b>	Espectros de RMN de COSY (A), HSQC (B) e HMBC (C) da amostra MicMBt	<b>64</b>
<b>Figura 26</b>	Comparação entre as biotransformações, com diferentes meios e os controles	<b>65</b>
<b>Figura 27</b>	Resultados do ensaio de glicação	<b>69</b>
<b>Figura 28</b>	Efeito das frações dos derivados obtidos da biotransformação de quercetina por <i>Penicillium</i> sp. (392) sobre a viabilidade de macrófagos J774A.1 avaliado pelo método do MTT	<b>71</b>
<b>Figura 29</b>	Teste de determinação de nitritos - Efeito das frações dos derivados obtidos da biotransformação de quercetina por <i>Penicillium</i> sp. 392 na produção de NO em macrófagos murino RAW 264.7	<b>72</b>

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b>	Comparação de reações de biotransformações utilizando três linhagens de fungos endofíticos e três substâncias naturais	<b>35</b>
<b>Tabela 2</b>	Linhagens bacterianas utilizadas no ensaio de atividade antibacteriana	<b>42</b>
<b>Tabela 3</b>	Lista de amostras e controles utilizados	<b>47</b>
<b>Tabela 4</b>	Atribuições de $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$ do 3,4-dihidroxibenzoato de metila	<b>55</b>
<b>Tabela 5</b>	Atribuições de $^{13}\text{C}$ e $^1\text{H}$ de o 2-((3,4-dihidroxibenzoil)oxi)-4,6-dihidroxiácido benzóico ou Depsídeo	<b>59</b>
<b>Tabela 6</b>	Níveis de atividade antiglicante <i>in vitro</i>	<b>66</b>
<b>Tabela 7</b>	Critério de avaliação da atividade antimicrobiana, pelo método de difusão em ágar	<b>74</b>
<b>Tabela 8</b>	Amostras testadas com bactérias Gram-negativas	<b>74</b>
<b>Tabela 9</b>	Amostras testadas com bactérias Gram-positivas	<b>74</b>

## LISTA DE SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIACÕES

$\alpha$  - Alfa

AGEs - *Advanced Glycated End-Products* (Produtos Finais da Glicação Avançada)

BDA – Batata, Dextrose, Ágar

BSA – Albumina Sérica Bovina

CCD- Cromatografia em Camada Delgada

Hz – Hertz

LaBMicrA – Laboratório de Bioensaios e Microrganismos da Amazônia

LPS – Lipopolissacarídeos

m/z – massa carga

PCA – Análise de Componentes Principais

Rf – Fator de reação

RMN  $^1\text{H}$  – Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio

SPE – Extração de Fase Sólida

1D 2D Unidimensional - Bidimensional

J- Constante de acoplamento

COSY - Correlated Spectroscopy

$\delta$ - Deslocamento químico

DMSO - Dimetilsulfóxido

DEPT- Distortionless Enhancement by Polarization Transfer

d- Duplete

dd- Duplo duplete

ddd- Duplo duplo duplete

ddt- Duplo duplo tripleto

dq- Duplo quadruplete

dt- Duplo tripleto

HMBC- Heteronuclear Multiple Bond Correlation

HSQC- Heteronuclear Multiple Quantum Coherence

m- Multipleteo

RMN  $^{13}\text{C}$ - Ressonância magnética nuclear de  $^{13}\text{C}$

RMN  $^1\text{H}$ - Ressonância magnética nuclear de  $^1\text{H}$

s- Simpleto

TMS- Tetrametilsilano

t- Tripleto

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>13</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	<b>16</b>
	2.1 Biodiversidade de Fungos Amazônicos	16
	2.2 Endofítico: <i>Penicilium</i> sp. (392)	17
	2.3 Metabolismo Microbiano	18
	2.4 Biotransformação	19
	2.5 Biotransformação como modelo para síntese de fármacos	22
	2.6 Flavonóides	26
	2.7 Quercetina – bioflavonoide	28
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>30</b>
	3.1 Geral	30
	3.2 Específicos	30
<b>4</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>31</b>
	4.1 Planejamento Experimental	32
	4.2 Seleção de linhagem de Ascomiceto	33
	4.3 Biotransformação com <i>Penicillium</i> sp. 392	35
	4.4 Análise dos produtos da biotransformação por LC-MS	39
	4.5 Fracionamentos em coluna cromatográfica de vidro de fase reversa e extração em fase sólida (SPE)	39
	4.6 Análise por Ressonância Magnética Nuclear (RMN)	40
	4.7 Atividades Biológicas dos derivados obtidos das biotransformações	40
	4.7.1 Ensaio de Brometo tiazolil azul de tetrazólio (MTT)	40
	4.7.2 Determinação de nitrito (NO <sub>2</sub> )	41
	4.7.3 Atividade antibacteriana pelo método de difusão em ágar	42
	4.7.4 Inibição da formação de produtos avançados de glicação (AGES) <i>in vitro</i>	43
	4.8 Análise estatística	44
<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>45</b>
	5.1 Seleção da linhagem de <i>Penicillium</i> sp	45
	5.2 Padronização da biotransformação	46
	5.3 Análise dos produtos da biotransformação por HPLC, obtenção das frações, rendimento e purificação por SPE	46

5.4	Identificação por RMN dos derivados da quercetina obtidos por biotransformação	52
5.4.1	Identificação da substância majoritária das amostras MBt (fração 40% e 50%) e MicMBt (fração 30%)	53
5.4.2	Identificação da segunda substância majoritária da amostra MicMBt (fração 30%)	58
5.5	Análise das biotransformações na inibição da formação de (AGEs) <i>in vitro</i>	65
5.6	Atividade anti-inflamatória <i>in vitro</i>	69
5.7	Atividade antimicrobiana	72
<b>6</b>	<b>CONCLUSÕES</b> .....	<b>75</b>
<b>9</b>	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>76</b>
	<b>ANEXOS</b>	<b>88</b>

## INTRODUÇÃO

Biotransformações são reações químicas realizadas por um agente biológico, onde ocorre a conversão de um substrato, sendo esta, na maioria das vezes uma substância orgânica, em um ou mais produtos (DEMIRJIAN; SHAH; MORÍS-VARAS, 1999). Para Alfarrá e Omar (2013), biotransformação é uma combinação de reações bioquímicas para transformar as estruturas dos compostos orgânicos ou sintéticos, utilizando microrganismos e/ou suas enzimas isoladas, desenvolvendo a quimiodiversidade.

Estratégias biotecnológicas para a produção de flavonóides têm atraído um interesse considerável porque permitem produzir novos flavonóides que não existem na natureza. A biotransformação é uma estratégia com grande potencial para produzir novos flavonóides bioativos (BARTMAŃSKA et al., 2013). Abordagens biológicas disponíveis para a produção de flavonóides bioativos incluem biotransformação microbiológica, engenharia enzimática e engenharia metabólica (HOSODA et al, 2013; LUDWIG-MÜLLER et al, 2014; XIAO et al., 2014). É significativo usar microrganismos para efetuar reações na síntese assimétrica de flavonóides bioativos (SHIMODA et al., 2010).

A biotransformação é uma abordagem satisfatória para modificar as estruturas naturais e produzir bioativos de flavonoides e de outras classes de substâncias. A aplicação de microrganismos para a biotransformação de chalconas, por exemplo, pode formar muitos novos flavonoides, por meio de ciclização, hidroxilação, redução, metilação e reações de desidrogenação. Cepas de *Cunninghamella*, *Penicillium* e *Aspergillus* são muito populares para converter flavonóides e eles podem executar muitas reações, tais como hidroxilação, desidroxilação, O-metilação, O-desmetilação, glicosilação, desglicosilação, desidrogenação, hidrogenação, ciclização e redução (CAO et al., 2015).

Os microrganismos são fontes de substâncias bioativas usadas na medicina e na

agricultura e por isso, esforços têm sido feitos na busca por esses metabólitos. Tais microrganismos são cultiváveis e o cultivo por processos submersos podem ser otimizados, levando ao aumento na produção de substâncias bioativas potencialmente úteis como fármacos (GUNATILAKA, 2006). Muitos novos produtos transformados foram obtidos a partir de sesquiterpenos, triterpenos e esteróides, indicando que a transformação microbiana é uma abordagem importante para a diversidade estrutural de produtos naturais ou para melhorar as propriedades físico-químicas (CHEN et al., 2015).

Dentre esses microrganismos, os endofíticos (vivem no interior de tecidos de plantas e animais) são capazes de produzir uma variedade de metabólitos secundários com atividades biológicas (MASUREKAR, 1992; WEBER et al., 2007). Os fungos do gênero *Penicillium* são conhecidos pela produção de antibióticos por seu metabólito penicilina, que ainda é amplamente utilizado na clínica desde sua descoberta em 1920. E em outros trabalhos, verificou-se que são excelentes produtores de celulasas com  $\beta$ -glucosidase, sendo capazes de produzir uma matriz complexa de enzimas capazes de degradar completamente a celulose (VAISHNAV et al., 2018). Décadas depois, os metabólitos bioativos desse gênero ainda são atraentes e estudos de biotransformação de capsaicina por esse fungo demonstraram sua capacidade de hidroxilação, metilação, redução, rearranjo e epoxilação (XIU et al., 2017).

A partir de um *screening*, contendo diferentes linhagens de Ascomycetos endofíticos e três diferentes moléculas/compostos naturais (Rutina, Quercetina e Estigmasterol), realizaram-se bioensaios a fim de verificar a viabilidade do processo de biotransformação dessas moléculas pelos diferentes fungos endofíticos. A partir dessa observação verificou-se que algumas combinações desses ascomycetos endofíticos com essas moléculas apresentaram resultados satisfatórios, sendo possível detectar em alguns desses experimentos, ocorrência de biotransformação. Baseados nesse piloto foram escolhidos os melhores resultados e estes foram explorados neste aspecto biotecnológico, considerando que são linhagens isoladas de

plantas da Região Amazônica, as moléculas utilizadas são biologicamente ativas e, além disso, é importante gerar derivados da quercetina mais simples e que sejam menos metabolizados no organismo.

## **REVISÃO DA LITERATURA**

### **2.1 Biodiversidade de Fungos Amazônicos**

Estima-se que existam cerca de 1,5 milhões de espécies de fungos, e desse número são conhecidas pelos micologistas somente cerca de 69.000 espécies. Devido à ação predatória do meio ambiente, várias espécies de fungos estão sendo extintas antes mesmo de serem conhecidas, causando prejuízo ao equilíbrio ecológico, além de não se obter conhecimento do potencial biotecnológico dessas espécies. Foram agrupados em um reino a parte - Reino Fungi – por apresentarem características peculiares que os diferem tanto de animais como de vegetais, além do grande número de espécies encontradas por todo o planeta (COELHO; RIBEIRO DA SILVA, 2006).

O Brasil detém cerca de 20% da biodiversidade mundial, principalmente, na floresta Amazônica, a maior do Planeta e fonte inestimável de matérias-primas nos mais variados setores. Apesar da imensa diversidade biológica amazônica, as espécies que a compõem e suas relações filogenéticas são pouco conhecidas, muito menos seus microrganismos e suas interações com outros seres (SOUZA et al., 2004).

Os fungos existentes no Brasil ainda são pouco estudados, especialmente na Região Norte. Destacam-se pelo maior número de espécies os estados de São Paulo. Apesar dos dados referentes ao Amazonas e ao Pará, observa-se que a Região Norte carece de coletores e estudiosos de fungos, pois, nos demais estados, o número de registros é baixo. Além desses, destacam-se ainda a Região Centro-Oeste, o Maranhão e o Espírito Santo como locais em que pouco se conhece acerca da diversidade micológica (FORZZA, et al., 2010).

Os trópicos abrigam a maior parte da diversidade de fungos desconhecida. Entretanto, a falta de padronização entre estudos limita a compreensão de como a diversidade de fungos está organizada no espaço em diferentes escalas, uma informação imprescindível para o

planejamento da conservação da biodiversidade. Espera-se que novas espécies sejam encontradas em nichos pouco ou não explorados, considerando as florestas tropicais (OLIVEIRA et al., 2008).

## **2.2 Endofítico: *Penicillium* sp.**

Os fungos endofíticos são considerados como uma ferramenta eficiente para produção de metabólitos com atividades biológicas interessantes e um alto nível de diversidade química (SCHULZ E BOYLE, 2005; ZHANG et al., 2006). Por isso, na busca por novos catalisadores, microrganismos têm sido empregados na descoberta de enzimas para desenvolvimento da biocatálise em escala industrial. Os fungos produzem enzimas que normalmente são extracelulares, o que facilita sua recuperação do meio de fermentação. Em particular, os microrganismos isolados em território brasileiro já demonstraram excelente potencial biocatalisador frente a diferentes substratos (BORGES et al, 2007).

Microrganismos endofíticos são todos aqueles que podem ou não crescer em meios de cultura e que habitam o interior de tecidos e órgãos vegetais sem causar prejuízos ao seu hospedeiro e sem produzir estruturas externas emergindo dos vegetais (AZEVEDO e ARAÚJO, 2007). Dessa maneira, podem estar incluídos como microrganismos endofíticos colonizadores com comportamento neutro ou simbiote, e ainda aqueles que transitam colonizando ora de forma endofítica, ora de forma epifítica (AZEVEDO, 1999).

O uso de fungos endofíticos em biotransformações é vantajoso, pois pode gerar possíveis metabólitos com aplicação farmacológica para melhoramento e/ou de novas entidades químicas. Visto que o mercado mundial não cessa em lançar novos fármacos, são necessárias novas metodologias para geração de seus metabólitos. Dentre as aplicações de biotransformações com microrganismos destaca-se produção da corticosterona (derivado da cortisona), através da ação de microrganismos na deoxicorticosterona (HENCH et al., 1949),

onde promoveram a hidroxilação na posição 11 $\alpha$ -hidroxiprogesterona, o que foi decisivo para síntese de hormônios adrenocorticoides de modo economicamente viável (PETERSON et al., 1952).

Essa variedade de substâncias isoladas demonstra que esse grupo de microrganismos são promissores na busca de substâncias bioativas e, especialmente o gênero *Penicillium*, que tem sido pouco explorado quanto a sua diversidade metabólica em ensaios envolvendo biotransformação, quando comparado ao gênero *Aspergillus*, por exemplo.

### **2.3 Metabolismo Microbiano**

O uso de microrganismos para o estudo do metabolismo foi intensificado a partir da década de 70 quando o Modelo Microbiano do Metabolismo Animal foi proposto por Smith e Rosazza. Desde então, tanto bactérias quanto fungos, têm sido utilizados para mimetizar o metabolismo de xenobióticos em mamíferos. Isso porque tais microrganismos possuem sistemas de enzimas metabolizadoras semelhantes às aquelas presentes nos sistemas de mamíferos, os citocromos P450 (SMITH e ROSAZZA, 1983). Conseqüentemente, o metabolismo de xenobióticos em ambos os sistemas resulta com frequência nos mesmos metabólitos, e por isso recebem a denominação - Modelo Microbiano. Tal modelo é comumente empregado de forma alternativa e complementar no estudo do metabolismo de fármacos, visto que não requer uso de animais de laboratório, as culturas são de fácil manuseio e baixo custo, além das reações ocorrerem em condições brandas de pH e temperatura (AZERAD, 1999).

Na pesquisa e desenvolvimento de fármacos, a utilização de microrganismos para obtenção de derivados potencialmente ativos ou menos tóxicos que as moléculas de partida é amplamente discutida. A vantagem mais relatada da utilização de fungos ao invés da síntese

química convencional é a seletividade das reações, tais microrganismos possuem enzimas com diferentes graus de quimio, régio e estereosseletividade (ASHA e VIDYAVATHI, 2010). Além disso, as biotransformações com fungos representam uma importante via para a introdução de grupos funcionais na molécula (VENISETTY e CIDDI 2003).

Muitos microrganismos têm sido utilizados em processos de biotransformação de produtos naturais, originando metabólitos já conhecidos ou novos metabólitos. Estas moléculas podem ser substratos para semi-síntese e como vantagem, obter produtos mais específicos e poucos efeitos secundários (MANOSROI; ABE; MANOSROI, 1999).

## **2.4 Biotransformação**

A biotransformação é um conjunto de alterações químicas (ou estruturais) que as substâncias sofrem no organismo, geralmente, ocasionadas por processos enzimáticos (reações bioquímicas), com o objetivo de formar derivados mais polares, hidrossolúveis e potencialmente ativos e que sejam capazes de catalisar a transformação do substrato de modo menos complexo (MÜLLER, 2009).

A disseminação no uso de enzimas e células inteiras na química orgânica para modelos de bioconversão foi impulsionado pelos estudos em laboratórios acadêmicos e industriais sobre a utilização de microrganismos para modificar núcleos esteroidais, a exemplo disso, Mamoli e Vercellone prepararam a testosterona a partir da deidroepiandrosterona utilizando microrganismos. Esse trabalho viabilizou o desenvolvimento da produção dos hormônios sintéticos.

No Brasil, país com uma das maiores biodiversidades de plantas do mundo, existe pouco relato sobre trabalhos químicos envolvendo substâncias produzidas por fungos endofíticos e biotransformação envolvendo fungos. Transformações microbianas (também

conhecidas por biotransformações ou bioconversões) são reações de compostos orgânicos catalisados por microrganismos. É claro que os verdadeiros catalisadores destas reações são as enzimas sintetizadas pelas células desses microrganismos (ARAÚJO et al., 2013). E é neste contexto que se classifica biotransformação como conversões químicas catalisadas por enzimas ou microrganismos sobre substratos.

De acordo com Fáber, K. (1997), as vantagens do uso das enzimas na obtenção de produtos de biotransformação podem ser enumeradas: 1- as enzimas são catalisadores muito eficientes; 2-as enzimas são ambientalmente aceitáveis (degradáveis); 3-trabalham em condições reacionais suaves; 4-possuem uma alta tolerância a substratos; 5-podem catalisar um largo espectro de reações.

Alguns biocatalisadores podem realizar reações difíceis de se obter em química orgânica, principalmente quanto as suas seletividades, tais como: quimiosseletividade, onde algumas enzimas podem reagir com um único grupo funcional, mesmo na presença de outros grupos químicos reativos. Isto facilita o processo de purificação; regiosseletividade e diastereosseletividade, em que, devido à sua estrutura tridimensional complexa, as enzimas podem distinguir entre grupos funcionais que estão quimicamente situados em diferentes regiões da mesma molécula substrato (SWEERS, H.M., et al, 1986); enantiosseletividade, onde quase todas as enzimas são formadas de L-aminoácidos e portanto são catalisadores quirais e como consequência, qualquer tipo de quiralidade presente na molécula substrato é "reconhecida" na formação do complexo enzima-substrato. Dessa forma, um substrato pró-quiral pode ser transformado em um produto opticamente ativo e ambos os enantiômeros de um substrato racêmico podem reagir a velocidades diferentes (FÁBER, K., 1997).

A molécula de um determinado composto é modificada por transformações de grupos funcionais, com ou sem degradação do esqueleto carbônico. Estas alterações resultam na

formação de novos produtos que são difíceis, em algumas situações, de serem obtidos por processos químicos convencionais. É possível que as reações de biotransformações estereosseletivas, produzam produtos de alto valor agregado, ou seja, intermediários de fármacos, fármacos, ingredientes alimentares, produtos e intermediários agroquímicos, dentre outros. A biotransformação tem sido uma ferramenta alternativa com grande potencialidade, especialmente para desenvolvimento de tecnologias sustentáveis, na produção de produtos químicos e fármacos (DEMIRJIAN; SHAH; MORÍS-VARAS, 1999).

Por outro lado, o uso de biocatalizadores, principalmente quando se trata de microrganismos, apresenta ainda muitas dúvidas e isso se deve em parte, ao uso recente de suas aplicações e à complexidade que os sistemas biológicos apresentam, com rotas metabólicas complexas e comportamento do microrganismo. Muito falta para elucidar sobre os mecanismos de biotransformação, as enzimas envolvidas nestes processos e sobre a fisiologia dos microrganismos utilizados (WANG et al., 2013).

As biotransformações por meio de fungos tem sido objeto de intensas pesquisas como por exemplo: a modificação do 6-metilflavona pelo fungo entomopatogênico *Isaria fumosorosea* formando os seguintes produtos 6-metil-flavona-8-O-P-D- (4"-O-metil)-glucopiranósido e 6-metil-flavona-4'-O-P-D-( 4"- O-metil)- glucopiranido (DYMARSKA et al.,2017) e a bioconverção do Ácido Asiático (*Centella asiática*) pelo fungo *Alternaria longipes* produziu três novos derivados: ácido 2 $\alpha$ ,3 $\beta$ ,23,30-tetrahidroxiurs-12-en-28-oico, ácido 2 $\alpha$ ,3 $\beta$ ,22 $\beta$ ,23-tetrahidroxiurs-12-en-28-oico e ácido 2 $\alpha$ ,3 $\beta$ ,22 $\beta$ ,23,30-pentahidroxiurs-12-en-28-oico (FLORES, 2013). Muitos outros exemplos de biossíntese de flavanóides, terpenos e fármacos apresentam sucesso na produção de novas estruturas com atividades de interesse farmacológico, cosmético e industrial.

## 2.5 Biotransformação como modelo para síntese de fármacos

Os fármacos são compostos químicos estranhos ao organismo e que uma vez administrados podem ser eliminados inalterados ou biotransformados em metabólitos mais polares. O estudo do metabolismo é um processo complexo que inclui questões relativas à estabilidade metabólica, identificação dos metabólitos, identificação da enzima envolvida e propriedades de inibição da enzima (BRAGA et al, 2012).

O metabolismo dos fármacos pode ser dividido em reações de fase I e reações de fase II. Na fase I os compostos são modificados por oxidação, redução ou hidrólise, sendo tais reações catalisadas pelas enzimas do sistema microsomal hepático, também conhecidas como oxidases de função mista. Este sistema é composto pelo citocromo P450 (CYP450), citocromo b5 e a enzima NADPH citocromo P450 redutase. A introdução de grupos funcionais (-OH, -COOH, -SH, -O-, -NH<sub>2</sub>) pelas enzimas de fase I tem a finalidade de aumentar a polaridade dos compostos, a fim de facilitar a excreção pelo organismo (FURA, 2006).

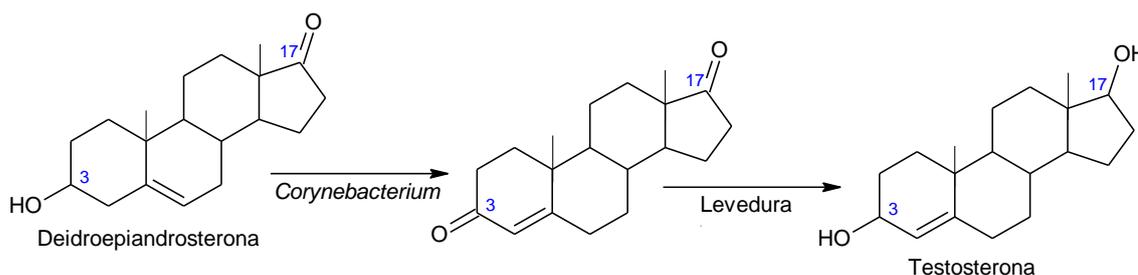
As reações de fase II são conhecidas como reações de conjugação e geralmente levam à formação de produtos farmacologicamente inativos e polares. Os grupamentos envolvidos com mais frequência são glicuronil, glicil, sulfato, metil e acetil. As enzimas de fase II incluem superfamílias de enzimas que catalisam reações de conjugação como glutathione-S-transferase, UDP-glucuronil transferase, sulfotransferases, N-acetiltransferase e metiltransferases (ASHA; VIDYAVATHI, 2010).

É importante conhecer o papel dos metabólitos, pois reações de biotransformação podem ser acompanhadas de vários eventos, tais como a formação de metabólitos quimicamente estáveis, desprovidos de atividades farmacológicas ou toxicológicas; geração de metabólitos químio-reativos os quais resultam em ação toxicológica. E ainda conduzir à

formação de metabólitos quimicamente estáveis com atividade farmacológica (FURA, 2006; TURPEINEN et al., 2006). Esse tipo de metabólito, quando identificado e comparado ao fármaco original, após realização dos estudos de atividade e segurança pode chegar a categoria de candidato protótipo a fármaco e posteriormente fármaco (BARREIRO e FRAGA, 2008).

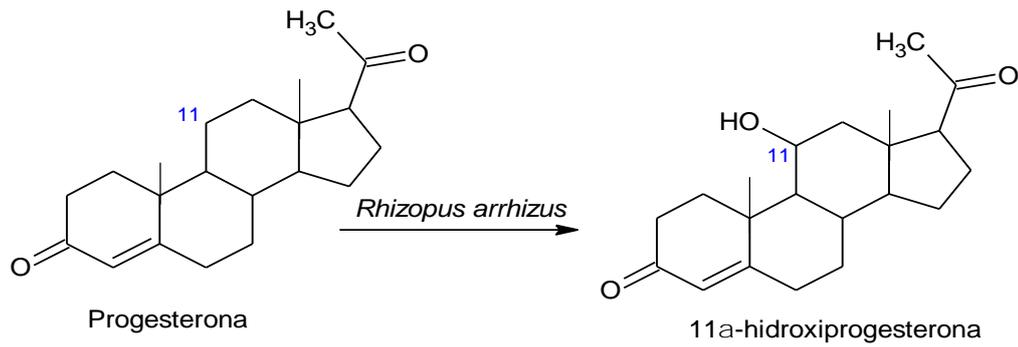
Tradicionalmente o estudo de metabolismo de fármacos tem se apoiado na utilização de sistemas como modelo, para prever os intermediários e produtos do metabolismo de xenobióticos em humanos (PIEPER et al., 2009).

O progresso no uso de enzimas e células inteiras na química orgânica sintética foi impulsionado pelos estudos em laboratórios acadêmicos e industriais sobre a utilização de microrganismos para modificar núcleos esteroidais (PETERSON; MURRAY, 1952). De acordo com Stoudt (1960), em 1937 Mamoli e Vercellone prepararam a testosterona a partir da deidroepiandrosterona utilizando microrganismos, conforme esquematizado na Figura 1. Esse trabalho viabilizou o desenvolvimento sintético da produção de hormônios.



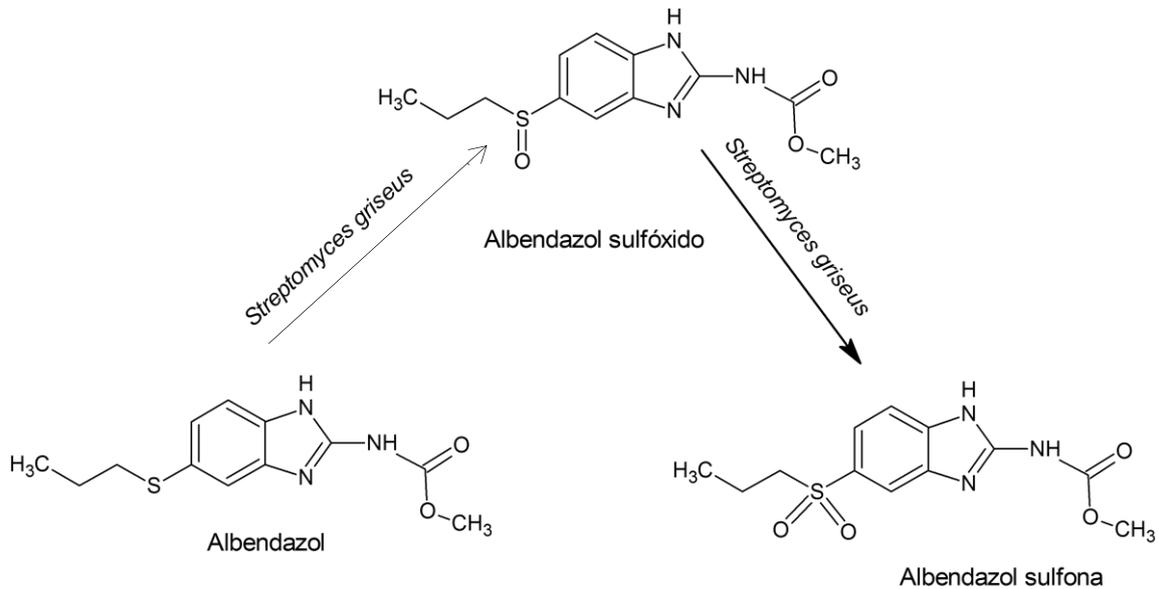
**Figura 1** – Biotransformação da deidroepiandrosterona.

Peterson e Murray (1952) promoveram a hidroxilação da ligação C–H não ativada da progesterona, realizando a bioconversão para 11  $\alpha$ -hidroxiprogesterona pelo fungo *Rhizopus arrhizus*, como demonstrado na Figura 2.



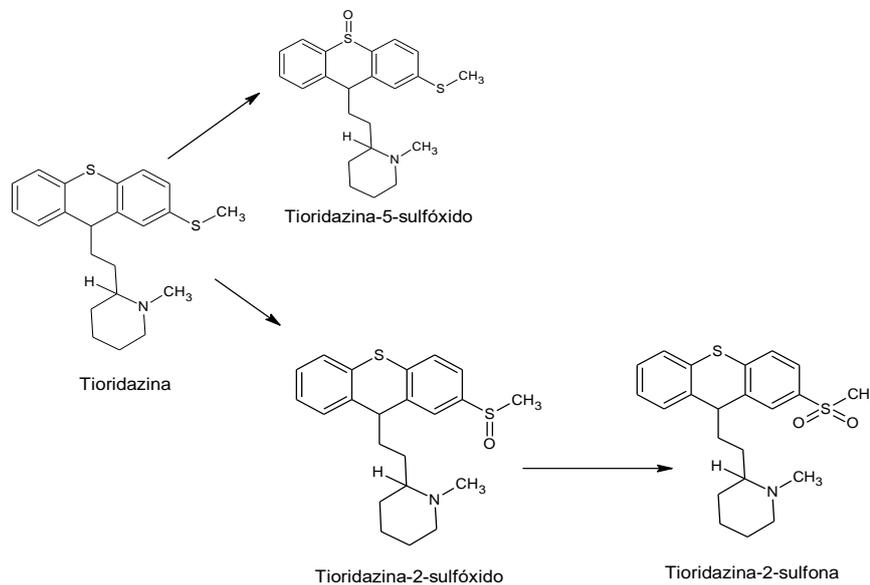
**Figura 2** – Biotransformação da Progesterona.

Na aplicação do modelo microbiano do metabolismo, também é possível citar o estudo do biotransformação do fármaco albendazol. A bactéria *Streptomyces griseus* bioconverteu o albendazol em dois metabólitos: albendazol sulfóxido e albendazol sulfona, semelhantes aos metabólitos produzidos em mamíferos (Figura 3) (PRASAD; GIRISHAM; REDDY, 2010).



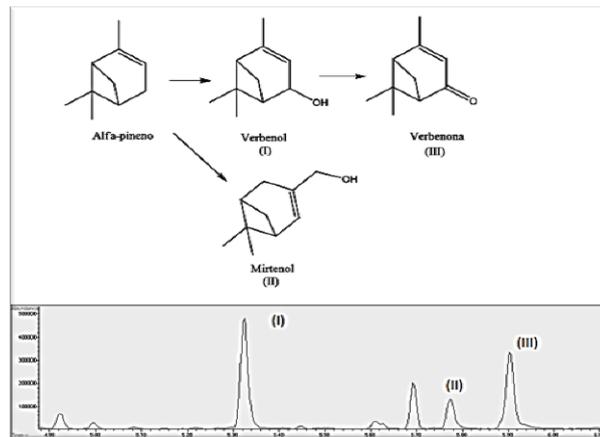
**Figura 3** - Biotransformação do Albendazol

Os estudos de biotransformação de fármacos podem caracterizar metabólitos ativos ou novos intermediários úteis para a indústria farmacêutica. Cita-se como exemplo a tioridazina, que sofre S-oxidação formando derivados sulfóxidos. A sulfoxidação do grupo tioetil forma o metabólito tioridazina-2-sulfóxido e a sulfoxidação no anel tiazina forma a tioridazina-5-sulfóxido. Posteriormente, a tioridazina e tioridazina-2-sulfóxido podem sofrer uma oxidação a sulfona e formar a tioridazina-2-sulfona, conforme demonstrado na Figura 4 (ZEHNDER et al., 1962; GRUENKE; CRAIG, 1975).



**Figura 4** – Biotransformação da Tioridazina e seus metabólitos.

Outro exemplo de biotransformação é a de (-) -  $\alpha$ -pineno em verbenona, cis-verbenol e mirtenol por uma cepa de fungo não identificada (linhagem LB GM F6), após 96 h (Paulino 2014).

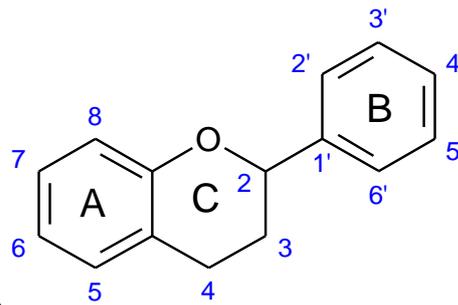


**Figura 5** Compostos produzidos a partir da biotransformação de  $\alpha$ -pineno, pela linhagem LBG M F6.

## 2.6 Flavonóides

Mais de 4000 variedades de flavonóides foram identificados e podem ser classificados de acordo com sua estrutura em função do grau de substituição e de oxidação. Flavonóide é a designação dada a um grande grupo de metabólitos secundários da classe dos polifenóis, componentes de baixo peso molecular encontrados em diversas espécies vegetais (NIJVELDT, 2001).

Quimicamente falando, os flavonoides (Figura 6) são compostos tricíclicos possuindo dois anéis aromáticos (anéis A e B), sendo que o C contém o grupamento pirona, já o A possui benzoi. Também possui grupamentos de hidroxila nas posições 5 e 7 e o anel B possui cinamoil, com grupamento de hidroxilas na posição 3', 4', 5'. Tem origem biossintética mista, ou seja, se compõe por subunidade derivadas de duas ou mais vias biossintéticas (KARABIN et al., 2014).



**Figura 6** – Estrutura de um Flavonóide

Flavonóides contidos em vinhos tintos, entre eles a quercetina (3,5,7,3',4' pentahidroxiavonona), têm sido associados à saúde cardiovascular devido, provavelmente, ao seu efeito antioxidante (HAVSTEEN, 2002). A quercetina é descrita como o mais abundante dos flavonóides e um potente antioxidante *in vitro* e o mais potente removedor de espécies reativas de oxigênio, incluindo o ânion superóxido (CUSHNIE & LAMB, 2005) e espécies reativas de nitrogênio como o radical óxido nítrico (VAN ACKER et al., 1995; HAENEN & BAST, 1999). Outras atividades biológicas têm sido atribuídas ao flavonóide quercetina, entre estas: capacidade anti-inflamatória (READ 1995; ORSOLIC et al., 2004) e anti-hipertensiva (EDWARDS et al., 2007).

A busca de meios alternativos para a obtenção de substâncias com atividades biológicas significantes, por exemplo os flavonóides, tem aumentado com o desenvolvimento da química dos microrganismos, associada à biologia molecular. Os microrganismos são capazes de realizar diferentes tipos de reações químicas nos mais variados compostos orgânicos. Dessa forma, microrganismos endofíticos de plantas hospedeiras reconhecidamente produtoras de flavonóides e/ou seus precursores biossintéticos devem ser potencialmente boas fontes de enzimas para essas conversões (KARABIN et al., 2014).

Pesquisas recentes têm explorado diversidade biológica e atividade farmacológica de

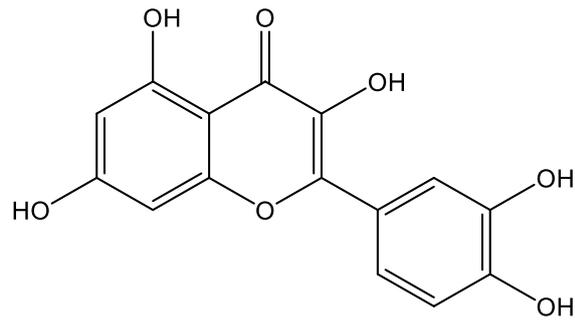
flavonóides naturais, por exemplo, atividade antioxidante (ESCRICHE et al., 2014), atividade antidiabética (CAO et al., 2015; LIU; JU; XIA, 2014), a atividade anti-inflamatória (LIU; JU; XIA, 2014), atividade anti-fúngica (BARRECA et al., 2014), atividade anti-câncer (SANTOS et al., 2013; SCHNEKENBURGER; DICATO; DIEDERICH, 2014), atividade anticoagulante (LIAO; LUO; KONG, 2013) e atividade antiobesidade (KIM et al., 2014).

Na literatura podem-se encontrar exemplos de sucesso de bioconversão de flavanóides por fungos de gênero *Penicillium* e *Trichoderma*. O *Penicillium chermesinum* biotransformou de modo eficiente a flavanona em 6-hidroxi-flavanona e 4'-hidroxi-flavanona (KOSTRZEWA-SUSŁOW et al., 2008 e 2010).

Considerando essas perspectivas em estudos com flavonoides glicosilados, estima-se a Quercetina, como um bioflavonoide que ao sofrer modificações ou ser biotransformado, pode tornar-se um metabólito mais ativo ou adquirir outras atividades de importância farmacológica (ERLUND et al., 2000).

## 2.7 Quercetina

A Quercetina (Figura 7) é um flavanóide, da subclasse dos flavanóis, sendo pertencente a um grupo de compostos fenólicos que foram isolados pela primeira vez em 1936 por Szent-Gyorgyi, conhecida por sua atividade antioxidante, possui função cardioprotetora contra muitas doenças, incluindo a redução da pressão arterial, comprovada através de estudos *in vivo*; outras atividades como proteção contra arterosclerose, certos tipos de melanoma, doenças pulmonares, estresse oxidativo, disfunção das células endoteliais e insuficiência cardíaca também foram observadas durante o estudo (PATEL et al., 2018).



**Figura 7** – Estrutura química da Quercetina

A quercetina tem atividades antimicrobianas, antivirais, antioxidantes e anti-inflamatórias com efeitos antioxidantes e sequestradores de radicais livres (DOGAN et al., 2015; GUTTERIDGE, 1995). No entanto, a quercetina também pode ser degradada por moléculas reativas e tal degradação oxidativa da quercetina *in vitro* tem mostrado a formação de um intermediário de orto-semiquinona de radical livre, que pode posteriormente ser alterado para a molécula derivada ou para uma orto-quinona próxima à formação de locais reativos de oxigênio (METODIEWA et al., 1999; BOOTS et al., 2003).

## OBJETIVOS

### 3.1 Geral:

- Obter e identificar derivados bioativos da biotransformação de Quercetina realizada por *Penicillium* sp., isolado de *Gustavia elliptica* M. (Lecythidaceae).

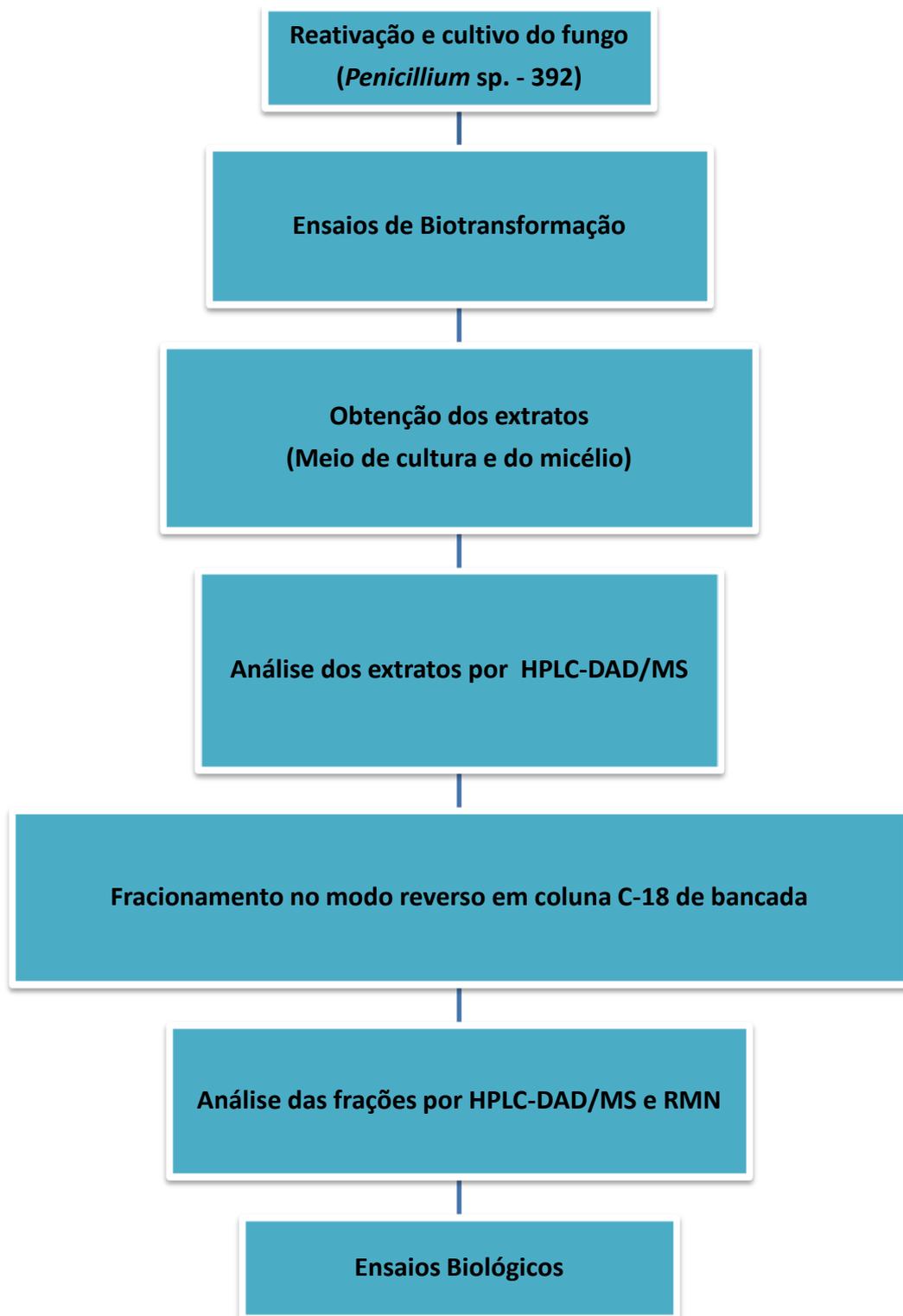
### 3.2 Específicos:

- Selecionar linhagens de microrganismos endofíticos capazes de biotransformar a quercetina;
- Padronizar o processo de biotransformação da quercetina, obtidos a partir da sua bioconversão por *Penicillium* sp. 392 (GhG2 2.1);
- Avaliar atividades anti-inflamatória, antiglicante, citotóxica e antimicrobiana de frações majoritárias dos derivados obtidos a partir da biotransformação da quercetina;
- Purificar, identificar e caracterizar os derivados da biotransformação de quercetina.

## MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Planejamento Experimental

As atividades experimentais de biotransformação foram organizadas em três etapas: a primeira consistiu na seleção de linhagens de ascomicetos da coleção de trabalho do Laboratório de Bioensaios e Microrganismos da Amazônia da Central Analítica do Centro de Apoio Multidisciplinar da Universidade Federal do Amazonas (LabMicrA/UFAM). Na segunda etapa, após ensaios preliminares foi selecionada a linhagem *Penicillium* sp. (392) e a molécula de Quercetina, a fim de obter as biotransformações. Tais procedimentos foram executados no Laboratório anteriormente citado e as análises químicas dessas biotransformações foram realizadas no Laboratório de Espectrometria de Massas e HPLC (LEMAH) e Laboratório de Ressonância Magnética Nuclear (NMRLab), na Central Analítica do Centro de Apoio Multidisciplinar da Universidade Federal do Amazonas. Na terceira etapa foram executados os testes biológicos *in vitro* dos extratos e frações contendo os produtos de biotransformação. Esses ensaios foram feitos no laboratório de atividade biológica (Biophar), na Faculdade de Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal do Amazonas e alguns outros ensaios biológicos no Laboratório de Diagnóstico e Controle de Doenças Infecciosas na Amazônia - DCDIA na FIOCRUZ Amazônia – Instituto Leônidas e Maria Deane. A Figura 8 representa o delineamento experimental geral deste trabalho.



**Figura 8** - Fluxograma geral do experimento de biotransformação com a linhagem *Penicillium* sp. 392, resumindo as etapas executadas.

#### 4.2 Seleção da linhagem de ascomiceto

Inicialmente foi realizado um *screening* com cinco linhagens de ascomicetos e 3 substâncias diferentes (cumarina, rutina e estigmasterol), em condições diferentes das que foram adotadas na padronização final desse trabalho. Dada a forma de análise do processo de biotransformação não ser suficiente para afirmar que houve o consumo das moléculas por *Guignardia* sp., foi necessário descontinuar esse experimento e readaptar à novas condições de análise. Por isso, desta triagem, foram escolhidas três linhagens (das cinco, anteriormente citadas) de ascomicetos endofíticos e três compostos naturais (rutina, quercetina e estigmasterol) a fim de encontrar a combinação microrganismo-molécula que apresentasse os melhores resultados de biotransformação. A partir de amostras preservadas dos fungos *Guignardia* sp., *Trichoderma* sp. e *Penicillium* sp., realizou-se a reativação. Fragmentos desses preservados foram repicados e cultivados para crescimento em placas de Petri contendo BDA, por cinco dias em temperatura de 28 °C.

Em triplicata, para cada fungo e molécula, em Erlenmeyer de 250 mL foram adicionados 100 mL de caldo de batata dextrose, com glicose reduzida a 1/4 (5 mg), e 5 fragmentos de 5 mm x 5 mm do meio de cultura contendo o micélio do fungo. Os fungos foram cultivados a temperatura ambiente (28 °C) no meio líquido em condições estáticas na BOD por 14 dias, pois foi o tempo em que a taxa de açúcar reduziu-se a zero, sendo diariamente monitorado. Após a confirmação da ausência de glicose na amostra (medição realizada por fita universal *Uriclin*® 10 da *Laborclin*), o micélio foi separado do meio por filtração com pressão reduzida em membrana de celulose com porosidade de 0,45 µm. Todo o experimento foi realizado em cabine de segurança biológica A2 da *Fiterflux*®.

No meio líquido filtrado foi adicionado 10 mg da molécula previamente solubilizada em DMSO estéril (exceto nos controles do fungo sem o substrato e no controle do meio - negativo). Os micélios foram transferidos para erlenmeyer limpos, contendo 100 mL de

tampão fosfato pH 8,0, aos quais foram introduzidos 10 mg de cada molécula. Os erlenmeyers contendo o micélio foram submetidos à agitação (120 rpm a 28 °C). Durante o período de agitação foram realizadas leituras diárias em espectrômetro de massas, por inserção direta com fonte eletrospray durante três dias. No quarto dia foi encerrada a reação e as réplicas de cada tipo foram reunidas. As amostras contendo micélio e tampão foram filtradas novamente a vácuo em membrana de celulose de porosidade 0,45 µm. Adicionou-se NaCl (30 g/100 mL) em todas as amostras para precipitar as proteínas e as mesmas foram ajustadas para pH 6, particionadas separadamente com AcOET (3x 1/3 do volume), concentradas em rotaevaporador *Fisatom*® modelo 801, com banho-maria *Fisatom*® modelo 550 e um sistema resfriador de líquidos de circuito fechado *Fisatom*® modelo 850, secados em capela de exaustão, pesados em balança analítica *Orbital*® AY220, com precisão de 0,0001 g e armazenadas sob refrigeração (8 °C). Essas amostras foram analisadas em HPLC-DAD/MS. Após esses experimentos preliminares foi escolhida a linhagem *Penicillium* sp. 392 e a quercetina para a continuidade dos estudos, considerando que foi essa combinação de fungo e molécula que apresentou os melhores resultados preliminares (Tabela 1), baseado nas análises químicas, no tempo de cultivo do *Penicillium* sp. (tempo menor, comparado a *Guignardia* sp.). A escolha desse fungo e composto considerou a importância da busca por derivados da quercetina que sejam compostos bioativos em modelos *in vivo*, tendo em vista as atividades biológicas *in vitro* descritas para esta molécula e substâncias coadjuvantes que contribuam para o tratamento de doenças como diabetes.

**Tabela 1** - Comparação de reações de biotransformações utilizando três linhagens de fungos endofíticos e três substâncias naturais. (Sendo: Não = Substância não consumida e Sim = Substância consumida, indicando presença e ausência da substância, visualizada pelo seu respectivo pico de massa, detectado por análise *full scan* MS;).

<b>Análise preliminar de biotransformação</b>				
	<b>1 dia</b>	<b>2 dia</b>	<b>3 dia</b>	<b>4 dia</b>
Trichoderma/tampão/rutina	Sim	Sim	Sim	
Trichoderma/tampão/estigmasterol			Não detectado	
Trichoderma/tampão/quercetina	Não	Não	Não	
Trichoderma/meio/rutina	Não	Não	Não	
Trichoderma/meio/estigmasterol	Sim	Sim	Sim	Evoluindo o consumo
Trichoderma/meio/quercetina	Não	Não	Não	
Penicillium/tampão/rutina	Não	Sim	Sim	
Penicillium/tampão/estigmasterol	Sim	Sim	Sim	Evoluindo o consumo
Penicillium/tampão/quercetina	Sim	Sim	Sim	
Penicillium/meio/rutina	Sim	Sim	Sim	
Penicillium/meio/estigmasterol	Sim	Sim	Sim	Evoluindo consumo
Penicillium/meio/quercetina	Sim	Sim	Sim	
Guignardia/meio/quercetina	Não	Sim	Sim	Evoluindo consumo
Guignardia/meio /rutina	Não	Sim	Sim	
Guignardia/meio /estigmasterol	Não	Não	Não	

### 4.3 Biotransformação com o *Penicillium* sp. 392

A linhagem selecionada para o experimento de biotransformação foi isolada de *Gustavia elliptica* (Lecythidaceae) (SISGEN – N° Registro: ABEA94F), por Almeida (2014) e está depositada na coleção de trabalho de microrganismos do LabMicrA (Central Analítica da UFAM).

#### 4.3.1 Reativação da linhagem de *Penicillium* sp. 392

Para a realização dos experimentos, o fungo *Penicillium* sp. (392) foi reativado, a partir do estoque em tubos de ensaio no meio de cultura BDA (Batata, Dextrose, Ágar), sendo inoculado em três pontos equidistantes em placas de Petri, conforme protocolo padrão do LabMicrA (SOUZA, 2006). Para garantir as condições estéreis, os meios de cultivos e os materiais utilizados em todos os experimentos a serem descritos neste trabalho foram esterilizados em autoclave a 121 °C e 1 atm durante 12 a 20 min, antes do início de qualquer

procedimento e todos os procedimentos foram executados em cabine de segurança biológica A2 da *Fiterflux*®.

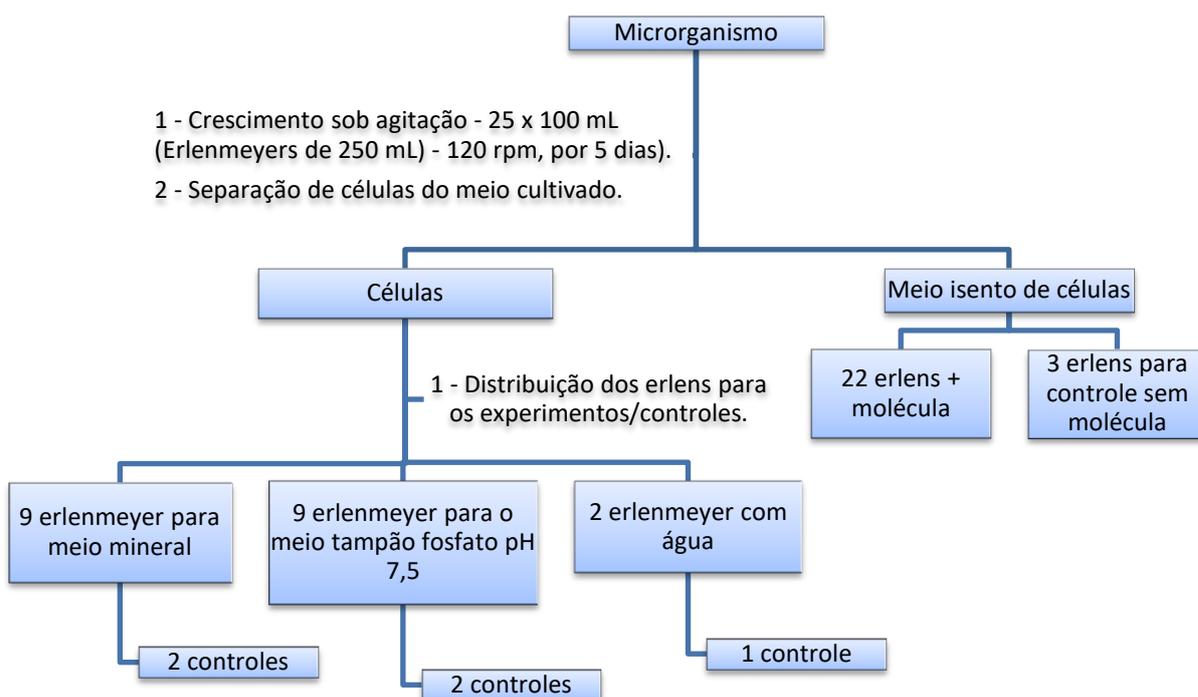
Após cinco dias do crescimento em placa a 28 °C fez-se suspensão de conídios em água com glicerol 20%, considerando a escala nefelométrica de Mc Farland de número 6 para turvação. Essa suspensão estoque de conídios foi guardada para todos os experimentos de biotransformação que serão apresentados a seguir.

#### **4.3.2 Cultivo de *Penicillium* sp. 392 e biotransformação**

Transferiu-se 30 uL da suspensão estoque de conídeos para cada um de 25 Erlenmeyers de 250 mL, contendo 100 mL de meio BD. Os erlenmeyers foram submetidos à agitação em incubadora com agitação orbital da *Solab*® durante cinco dias, a 120 rpm, na mesma temperatura de reativação. Após o período de cinco dias de incubação, o conteúdo de cada erlenmeyer foi pré-filtrado a vácuo em funil de büchner e papel de filtro, para separar o micélio do meio líquido, que em seguida, foi filtrado em sistema de filtração com membrana de celulose (0,45 µm). Cada micélio foi transferido para novos erlenmeyers: nove contendo 100 mL de meio mineral com fonte de carbono reduzida, nove com meio tampão fosfato pH 7,5 e dois com água destilada autoclavada.

Para o controle total dos experimentos, incluindo o controle das condições de cultivo do fungo e principalmente do processo de biotransformação da quercetina, foram preparados: dois erlenmeyers contendo apenas meio BD, cinco erlenmeyers contendo o meio BD e o fungo, dois erlenmeyers para cada um dos meios utilizados para a biotransformação juntamente com a molécula e três erlenmeyers contendo o meio BD após o crescimento inicial, isento de células e sem molécula. Em cada Erlenmeyer utilizado para a biotransformação, foi adicionado 50 mg de quercetina (concentração de 50 mg/100 mL). Esses frascos foram submetidos à agitação (120 rpm a 28 °C), por um período de até 48 h, e

monitorados por espectrometria de massas a cada 12 h, em inserção direta e em HPLC MS-DAD, com retirada de uma alíquota de 20  $\mu$ L de cada amostra. Transcorrido o tempo de reação enzimática e o consumo da molécula em 48 horas, separou-se o micélio por filtração a vácuo em membrana milipore (0,45  $\mu$ m), o qual foi transferido para Erlenmeyer contendo 100 mL de Metanol e Acetato de Etila (1:1), para maceração por 24 h. O filtrado da biotransformação foi extraído por partição líquido-líquido com Acetato de Etila (AcOEt) (3x50 mL), concentrado em rotaevaporador *Fisatom*<sup>®</sup> modelo 801, com banho-maria *Fisatom*<sup>®</sup> modelo 550 e um sistema resfriador de líquidos de circuito fechado *Fisatom*<sup>®</sup> modelo 850 e submetidos a secagem em capela de exaustão. No esquema (Figura 9) apresenta-se um resumo das etapas realizadas no ensaio de biotransformação.

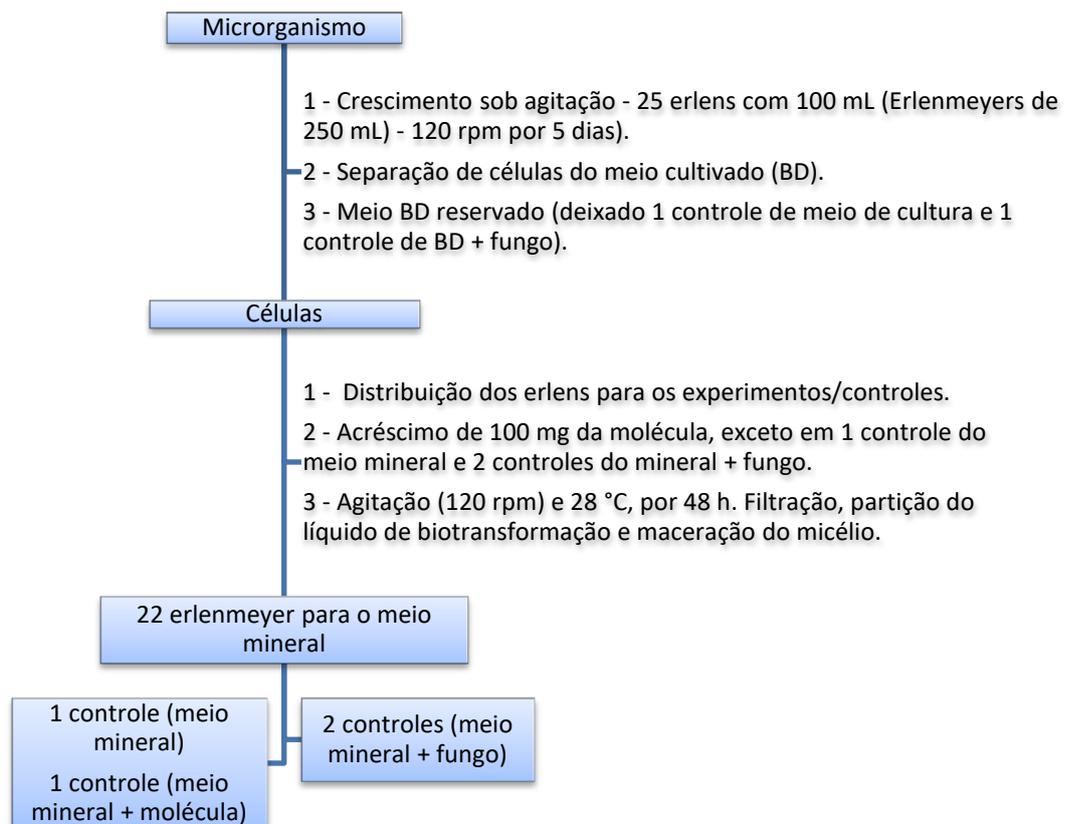


**Figura 9** - Fluxograma do ensaio de biotransformação com *Penicillium* sp. 392 em modo agitado.

A biotransformação acima descrita foi realizada em duas etapas (experimento com células e experimento com o caldo filtrado, isento de células – intra e extracelular, respectivamente), um procedimento que consiste em se cultivar o fungo em meio de cultura

apropriado, mas com fonte de carbono reduzida e, posteriormente, acrescentar o composto/molécula a ser biotransformado. Isso permite que as duas etapas sejam padronizadas separadamente, de acordo com as condições fisiológicas do microrganismo investigado.

Para aumento do rendimento dos extratos obtidos, realizou-se um novo ensaio em escala ampliada (Figura 10), seguindo o mesmo protocolo padronizado, com pequenas adaptações, porém, apenas utilizando para o cultivo o meio mineral, em que os resultados de biotransformação foram mais expressivos, quando comparados ao experimento paralelo que foi realizado com *Guignardia* sp., por exemplo.



**Figura 10** - Fluxograma do ensaio de biotransformação intracelular, em maior quantidade, com *Penicillium* sp. 392 em modo agitado.

#### 4.4 Análise dos produtos da biotransformação por LC-MS

Para a análise de LC-DAD-APCI-MS dos produtos da bioconversão utilizou-se um sistema HPLC, modelo Acella (*Thermo Scientific*®), acoplado a um espectrômetro de massas do tipo triplo-quadrupolo, modelo TSQ Quantum Acess (*Thermo scientific*®), monitorando na faixa de m/z 100-1000 e de UV, na faixa de 200-500. Utilizou-se uma coluna C18 (5µm, 150 x 4,60 mm) *Phenomenex*®, eluída em fluxo de 1 mL/min de mistura de metanol (B) e água ultrapura (A), em eluição gradiente: B de 45-100% em 10 min, seguido de 100% por 15 min, retornando de 100%-45% em 5,5 min, e condicionando a 45% por 5 min antes das análises sucessivas, cujos parâmetros foram: 450 a temperatura de vaporização, 35 a pressão de gás e 3 a pressão de gás auxiliar. Durante a aquisição e processamento, o software *Xcalibur*® versão 1.0 (*Thermo scientific*®) foi utilizado para análise dos dados gerados.

#### 4.5 Fracionamentos em coluna cromatográfica de vidro (fase reversa) e extração em fase sólida (SPE)

Para fracionamento e purificação dos extratos obtidos após a biotransformação, utilizou uma coluna de vidro, de 30 cm, com fase reversa (C18) de 12 cm. A fase foi condicionada com MeOH 30% e em seguida a pastilha contendo a amostra misturada na mesma fase foi inserida na coluna. Para a extração e arraste dos compostos, utilizou-se 48 mL de MeOH aquoso em ordem crescente de força, nas concentrações de: MeOH 30%, MeOH 40%, MeOH 50%, MeOH 70% (2x 48 mL) e MeOH 100 % (3x 48 mL). Cada fração foi coletada e posteriormente concentrada (a 45 °C) em rotaevaporador para retirar o máximo de metanol possível. Em seguida realizou-se a extração em fase sólida (*Solid Phase Extraction-SPE*) para remover da solução hidroalcoólica o composto residual e os produtos da biotransformação. Para a extração em SPE foi utilizada uma mini coluna contendo 100 mg de sílica gel C18. Cada coluna de sílica foi ativada com MeOH 100% e condicionada com 3 mL

de MeOH 3%. Em seguida, cada amostra foi adicionada e filtrada a vácuo, em cuba de SPE para a retenção pela fase, realizando-se por fim a extração do material retido com 3 mL de MeOH. Todas as frações foram analisadas por LC-MS, conforme item anterior, e por RMN, como passamos a descrever.

#### **4.6 Análise por Ressonância Magnética Nuclear (RMN)**

Para as análises deste trabalho, foi utilizado o equipamento de Ressonância Magnética Nuclear (*Bruker Avance IIIHD, 500,13 MHz*, sonda *BBFO Plus SmartProbe™*), do Laboratório de Ressonância Magnética Nuclear (NMR Lab) da UFAM. Os espectros de RMN foram obtidos nos modos: unidimensionais (RMN de  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  e DEPT135) e bidimensionais (HSQC, HMBC e COSY). Os deslocamentos químicos foram expressos em ppm ( $\delta$ ) e as constantes de acoplamento ( $J$ ) foram registradas em (Hz). Para aquisição e processamento dos espectros, utilizou-se o programa *TopSpin 4.0.6*. De todas as frações analisadas, algumas foram solubilizados em 500  $\mu\text{L}$  de Metanol deuterado ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ) com o tetrametilsilano (TMS) como referência. Algumas também foram analisadas em acetona deuterada. O preparo de amostras seguiu o protocolo padronizado no NMR Lab, e uma alíquota de 15,0 mg de cada fração de extrato foi dissolvida e transferida para tubos próprios para análise em RMN.

#### **4.7 Atividades Biológicas dos derivados obtidos das biotransformações (anti-inflamatória *in vitro*, Produtos Glicosados e Antimicrobiano)**

As amostras, cujo perfil cromatográfico apresentou biotransformação indicando derivados, foram submetidas com seus respectivos controles a ensaios para detecção de atividade anti-inflamatória, citotoxicidade, produtos glicosados e antimicrobiano.

##### **4.7.1 Ensaio de Brometo tiazolil azul de tetrazólio (MTT)**

O ensaio colorimétrico do Brometo tiazolil azul de tetrazólio (MTT) (Sigma-Aldrich, Brasil Ltda) foi realizado de acordo com Mosmann (1983), baseado na redução enzimática do MTT para formação de cristais de formazan pela mitocôndria e enzimas desidrogenases celulares. As células de macrófagos murino J774A.1 foram plaqueadas na concentração de  $1 \times 10^6$  células/poços em placas de 96 poços e deixadas em incubadora de CO<sub>2</sub> em atmosfera de 37 °C por 24 h, após esse período as células foram expostas as concentrações de 1, 5, 10 e 20 µg/mL do composto nitroestireno NPA por 24 h.

Após o tempo de incubação a 37 °C o meio de cultura foi removido e as células foram lavadas com 100 µL de tampão PBS 0,1 M com pH 7.4, em seguida adicionado 100 µL de MTT (1:1 mg/mL) diluído em meio de cultura RPMI 1640 e incubado por 3 h a 37° C, decorrido esse tempo as células foram ressuspensas com DMSO: isopropanol (1:1) em cada poço e finalmente as placas foram agitadas delicadamente em um agitador orbital por 15 min a temperatura ambiente para solubilização dos cristais de formazan originados a partir da reação do MTT com enzimas mitocondriais em células viáveis.

Na última etapa a densidade óptica dos poços foi medida em leitor de microplaca (DTX 800, *Beckman Colter*) em 570 nm e os valores de absorbância das células tratadas com o NPA foram comparados com os valores de absorbância obtidos a partir das células controle sem tratamento.

#### **4.7.2 Determinação de nitrito (NO<sub>2</sub>)**

A produção de NO<sup>•</sup> foi medida pela dosagem de seus produtos de degradação, nitrito, mais estáveis, utilizando o reagente de Griess. Foi quantificado por espectrofotômetro a 550 nm (GREEN *et al.*, 1982). Para a determinação da produção de NO<sup>•</sup>, 100 µL do sobrenadante celular foi submetido à reação com igual volume do reagente de Griess. Pouco antes do uso, as soluções foram adicionadas na proporção 1:1, formando o reagente de Griess propriamente

dito. Após o período de incubação de 10 min as amostras foram lidas em leitor de microplacas (DTX 800, Beckman) a 560 nm. O cálculo das concentrações de nitrito foi realizado com base em curva padrão utilizando diferentes concentrações de  $\text{NaNO}_3$  (15  $\mu\text{M}$  até 1000  $\mu\text{M}$ ).

#### 4.7.3 Atividade antibacteriana pelo método de difusão em ágar – técnica do poço

O ensaio de atividade bacteriana foi realizado no Laboratório de Diagnóstico e Controle de Doenças Infecciosas na Amazônia- DCDIA do Instituto Leônidas & Maria Deane – FIOCRUZ AMAZÔNIA.

As amostras BDBt, CtMF, MicMBt, MicBDBt, BDBt, MBt, CtTF foram solubilizadas em dimetilsulfóxido (DMSO) 10%. Concentração inicial da amostra de 3 mg/mL no poço. E as amostras CtMF na concentração inicial 3 mg/ml e MBt concentração inicial 3,5 mg/ml no poço.

As linhagens bacterianas utilizadas (Tabela 2) pertencem à bacterioteca da Plataforma de Bioensaios Biotecnológicos (RPT11H), do Instituto Leônidas e Maria Deane (ILMD) – Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), Manaus-AM, Brasil. Estas espécies foram indicadas numa reunião da ONU como patógenos de interesse mundial, que a partir de 2020 podem se tornar epidemias mundiais, caso não exista um maior controle hospitalar e também novos medicamentos para o controle destas.

**Tabela 2** – Linhagens bacterianas utilizadas no ensaio de atividade antibacteriana

<i>Escherichia coli</i>	Butantã: K12-DH52;
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	ATCC 4352-083;
<i>Serratia marcescens</i>	ATCC 14756-131;
<i>Pseudomonas putida</i> (oralis)	ATCC 15175-113;
<i>Salmonella entérica Choleraesuis</i>	ATCC 10708-028;
<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i> (CT)	ATCC 6051;
<i>Enterococcus faecalis</i> (Streptococcus faecalis)	ATCC 4083;
<i>Streptococcus mutans</i>	ATCC 25175;
<i>Listeria monocytogenes</i>	ATCC 15313;
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 80958.

As linhagens foram cultivadas previamente em caldo *Brain Heart Infusion* (BHI) (HIMEDIA). As culturas microbianas foram, então, diluídas em meio de cultura conforme a escala de 0,5 de McFarland ( $1,5 \times 10^8$  UFC mL). Todos os ensaios foram feitos em triplicata.

A determinação da atividade antibacteriana foi realizada pelo método de difusão em ágar, pela técnica do poço, segundo Grove e Randall (1955), com modificações. As amostras testadas foram solubilizadas em dimetilsulfoxido (DMSO) 10%. Utilizou-se o meio de cultura Ágar Müeller Hinton (AMH) (HIMEDIA) para a realização dos testes. Como controle positivo foram utilizadas as drogas TIENAM (imipenem + cilastatina sódica) na concentração de 500 µg/mL. As placas foram incubadas a 37 °C por 24 h, e então foi adicionado às placas uma solução corante de cloreto de trifetil tetrazólio (CTT) a 0,01% acrescido de 0,1% de ágar bacteriológico, ocorrendo uma reincubação por 30 minutos. Após a conversão de coloração na sobrecamada foi feita a medição dos halos de inibição.

#### **4.7.4 Inibição da formação de produtos avançados de glicação (AGES) *in vitro*: via oxidativa e via não oxidativa (KIHO, et. al., 2004)**

Para a via oxidativa, a atividade antiglicante foi determinada de acordo com Kiho (2004), com modificações. A reação foi efetuada em triplicata com concentrações de: Albumina (BSA) 10 mg/mL, Glioxal 30 mM, e 1 mg/mL do extrato. As soluções de glioxal e BSA foram diluídas em tampão fosfato (0,2 M, pH 7.4), contendo azida de sódio 3 mM como agente antimicrobiano. Os 300 µL da mistura total da reação foram compostos por: BSA (135 µL), glioxal (135 µL) e extrato diluído em DMSO (30 µL) sendo incubados a 37 °C durante 24 h (em condições estéreis e no escuro). Após a incubação, cada amostra foi analisada no leitor de microplaca com intensidade da fluorescência (emissão  $\lambda 330\text{nm}$  e excitação  $\lambda 420\text{nm}$ ). A quercetina foi utilizada como padrão e o DMSO como controle negativo. Os resultados

foram expressos em percentual de inibição e a CI50 foi calculada utilizando o programa *GraphPad Prism 6.0*.

Para a via não oxidativa, a atividade antiglicante foi determinada seguindo o mesmo protocolo de Kiho et al. 2004, com modificações. Seguiu-se os mesmos critérios usados no ensaio por via oxidativa, com exceção do glioxal que foi trocado pela frutose (0,1 mM) e o tempo de incubação aumentou para 120 h.

$$\% \text{ inibição} = 100 - [\text{FluorA} / \text{FLuorC}] \times 100$$

Onde: Fluor A = Fluorescência da Amostra  
Fluor C = Fluorescência do Controle

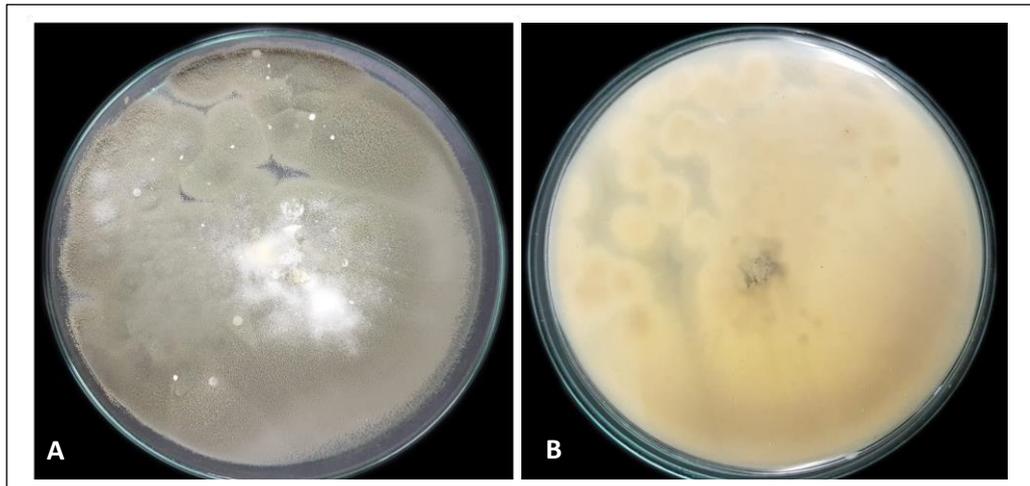
#### **4.8 Análise Estatística**

Os resultados foram expressos como média  $\pm$  D.P.M. (Desvio Padrão da Média). Os ensaios foram analisados por ANOVA (análise da variância) seguido por teste de comparação múltiplas de Tukey. O valor de  $p < 0.05$  foi considerado estatisticamente significativo. Os dados paramétricos e não-paramétricos foram calculados através do programa de estatística *GraphPad Prisma* (versão 6.0).

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Seleção da linhagem de *Penicillium* sp.

Após a seleção de três linhagens de fungos endofíticos da coleção de trabalho de Microrganismos do LabMicrA, a Figura 11 apresenta a reativação efetiva, em cultivo sólido sendo frente (A) e verso (B) da placa e na Figura 12, o cultivo líquido efetivo em BD a partir de suspensão de conídeos, apresentando aspectos morfológicos do *Penicillium* sp. (392) utilizado nesta pesquisa.



**Figura 11** – Cultivo em placa de petri (A) frente e (B) fundo: aspecto morfológico após crescimento de *Penicillium* sp (392), com 5 dias de cultivo;



**Figura 12** - Cultivo em meio líquido BD (Batata Dextrose), reduzido de glicose, realizado a partir de suspensão de esporos, com crescimento de 5 dias, sob agitação a 28 °C.

## 5.2 Padronização da biotransformação

Após diferentes experimentos, onde foram testadas condições ideais na busca por eficácia do bioprocesso, foi observada a biotransformação da quercetina no meio mineral. Essa análise foi determinada após dois dias de indução da molécula, nas amostras MBt e MicMBt, quando submetidas aos parâmetros mais eficazes, sendo eles: pH 7,5; tempo e temperatura de agitação de 24h a 48h após adição de quercetina, em 28 °C e 120 rpm; tipo de meio: mineral; concentração máxima do substrato quercetina no meio (100 mg/100 mL) para obtenção de alto rendimento de extratos; nível de açúcar no meio de cultivo reduzido em 1/4; nível de quantidade de células nos meios ( $18 \times 10^8$  UFC/mL, aproximadamente) e cultivo a partir de suspensão de conídios por cinco dias ou antes que os micélios esporulem.

## 5.3 Análise dos produtos da biotransformação por HPLC, obtenção das frações, rendimento e purificação por SPE

Ao longo dos experimentos, a metodologia de biotransformação sofreu alteração a fim de alcançar os resultados desejados e foi, portanto, aprimorada considerando a repetição da

mesma em maior quantidade (ver item 4.3.2). Após cuidadosa avaliação dos dados obtidos, verificou-se que apenas a inserção direta no espectrômetro de massas não seria adequada para detectar os eventuais produtos de biotransformação, uma das possíveis causas de frustração das primeiras metodologias. Por isto, as análises foram realizadas via HPLC utilizando um sistema LC-DAD-MS, gerando resultados em que foi possível detectar as biotransformações ocorridas e cada provável substância derivada, com base na análise preliminar das massas ( $m/z$ ) e das correspondentes absorções ( $\lambda_{\text{máx}}$ ) para cada amostra analisada, considerando os seus controles e padrões, conforme se discute a seguir.

As amostras geradas a partir das biotransformações e seus controles foram listados com seus respectivos códigos na tabela 3. Ao longo do texto, vamos utilizar os códigos como consta, para se referir a cada amostra.

**Tabela 3** – Lista de amostras e controles utilizados neste trabalho, com massa (quantidade) e códigos de identificação, após fracionamento em coluna de baixa resolução e purificação em SPE C18.

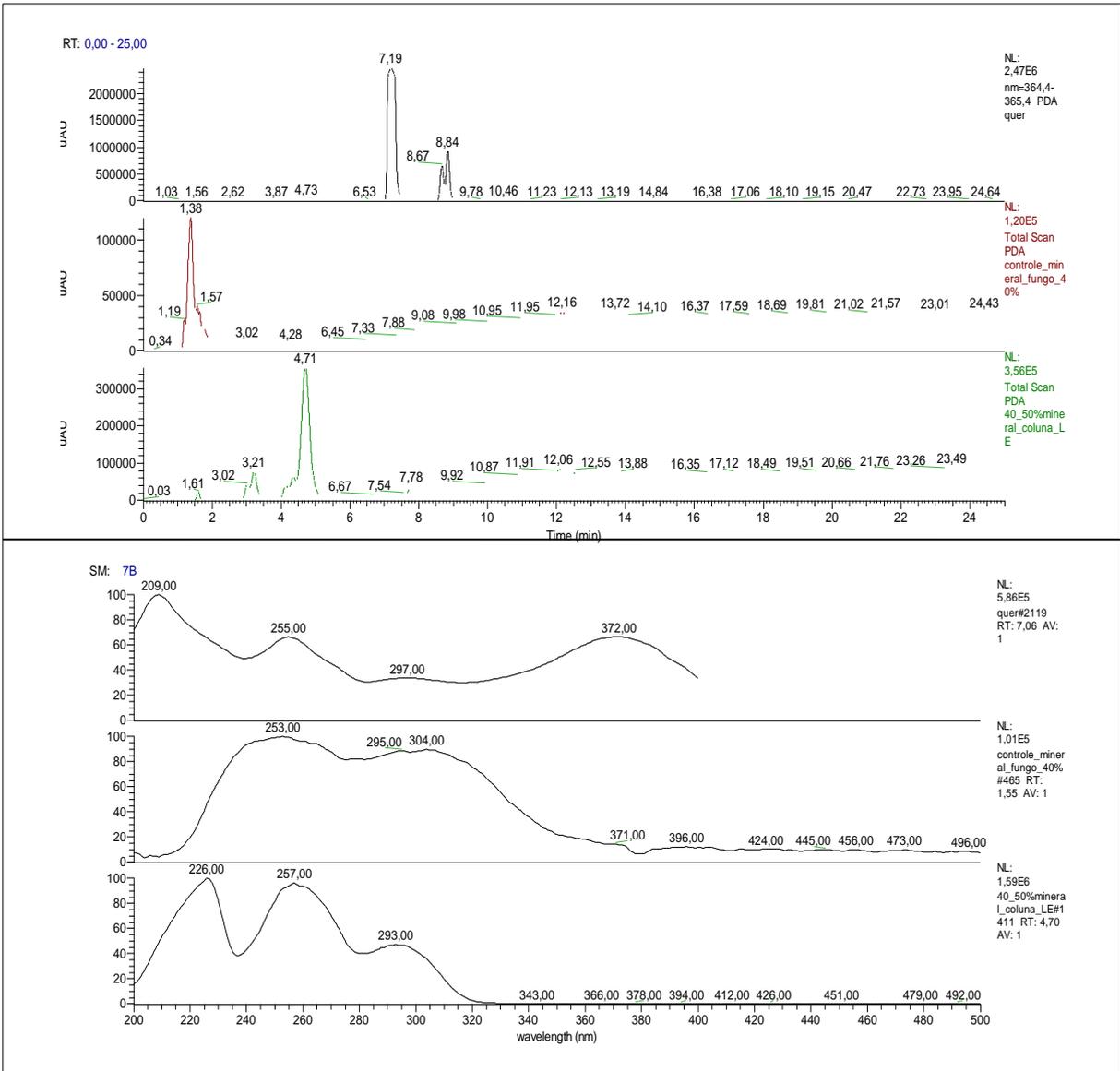
Amostras*	Quantidade (mg)	Código
Biotransformação pelo Micélio no meio Mineral	26	MicMBt
Controle do Fungo em meio Mineral	8,1	Ct.MF
Controle do Fungo em BD	4,6	Ct.BDF
Controle do Fungo em Tampão pH 7,5	8,2	CtTpF
Biotransformação em BD isento de células	6	BDBt
Biotransformação pelo fungo em Água	7	ABt
Biotransformação pelo fungo em Tampão pH 7,5	1,7	TpBt
Biotransformação pelo fungo em meio Mineral	21,2	MBt
Controle do BD isento de células	5,2	CtBDBt

\*Todas obtidas após 2 dias de experimento a contar da adição da molécula (exceto nos controles).

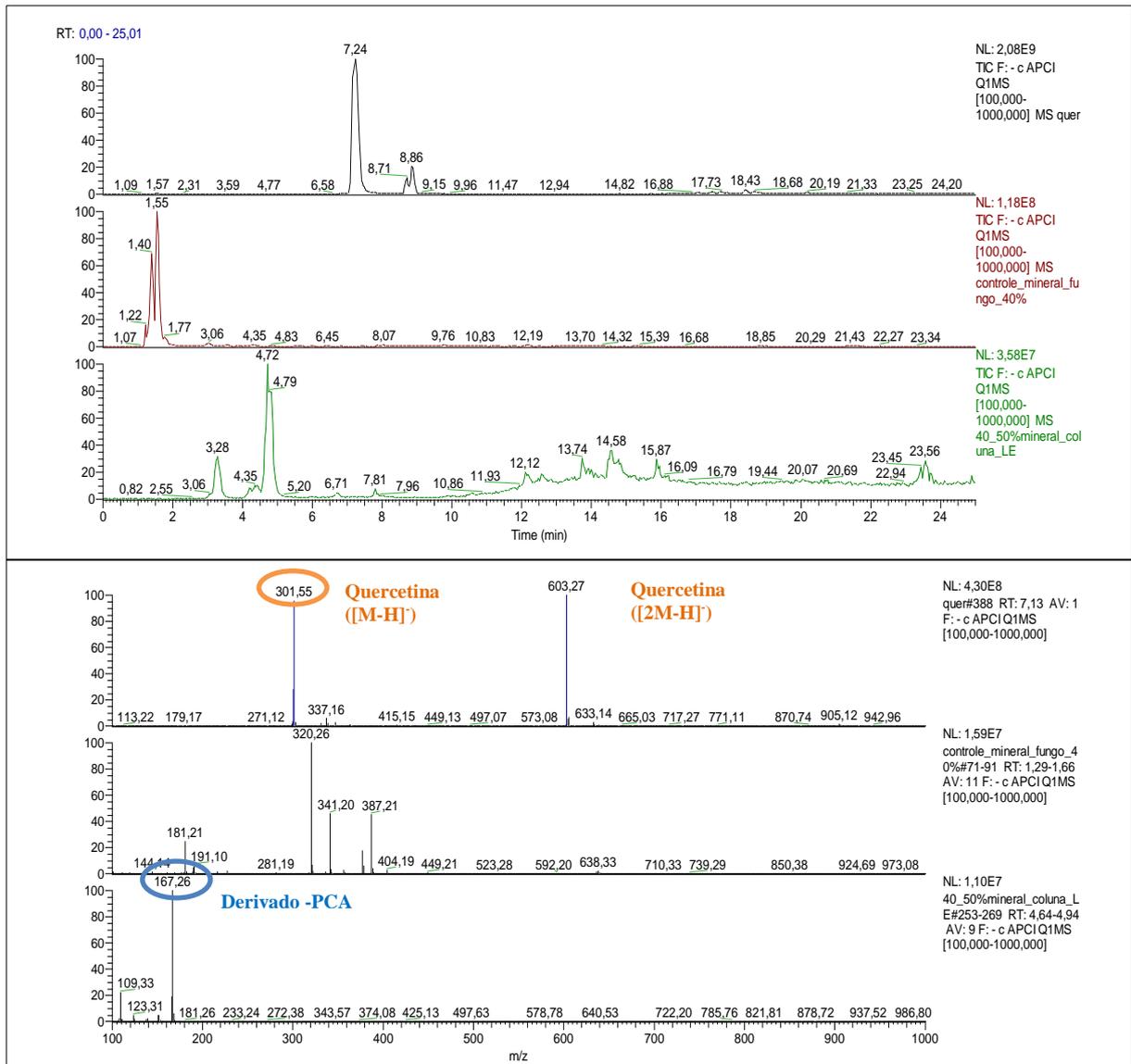
Nas figuras 13 e 14 estão representadas as análises instrumentais da biotransformação da quercetina por *Penicillium* sp. 392 em meio líquido mineral, após 5 dias de crescimento preliminar do fungo em BD e 2 dias de adição da molécula (100 mg/100 mL). Foram analisados por meio dos cromatogramas e respectivos espectros no UV (Figura 13) e espectros de massas (Figura 13): a quercetina, como referência para as análises e o controle

do fungo no meio mineral (CtMF), em comparação com a amostra de biotransformação em meio mineral (MBt) para confirmar se a formação dos picos, das possíveis substâncias derivadas era, de fato produto de bioconversão da molécula, ou era do metabolismo fúngico.

Na figura 13 podemos verificar, no primeiro cromatograma a Quercetina – o pico em 7,1 minutos indica esse substrato; no segundo cromatograma, o meio mineral cultivado 2 dias pelo fungo (previamente crescido em meio BD por 5 dias) revela picos correspondentes a substâncias de seu próprio metabolismo; no terceiro cromatograma, a biotransformação da quercetina pelo fungo (previamente crescido em BD por 5 dias) após 2 dias de adicionado junto com a molécula no meio mineral - o pico em 4,7 min corresponde ao possível derivado de biotransformação. Na figura 14, as mesmas amostras, mas apresentando os espectros de massas - no último espectro está destacado o íon de  $m/z$  167 do possível derivado de biotransformação em meio mineral.



**Figura 13** - Espectros de UV (PDA) da biotransformação por *Penicillium* sp. 392 - Primeiro cromatograma: amostra da quercetina - pico em 7,1 min; Segundo cromatograma: controle negativo do fungo em meio mineral, – o pico em 1,38 minutos corresponde a um metabólito não identificado do fungo. Terceiro cromatograma: biotransformação da quercetina pelo fungo em meio mineral–o pico em 4,7 minutos indica um possível derivado. Abaixo os respectivos espectros de absorvância no UV, indicando os  $\lambda_{m\acute{a}x}$  de cada pico principal das amostras.

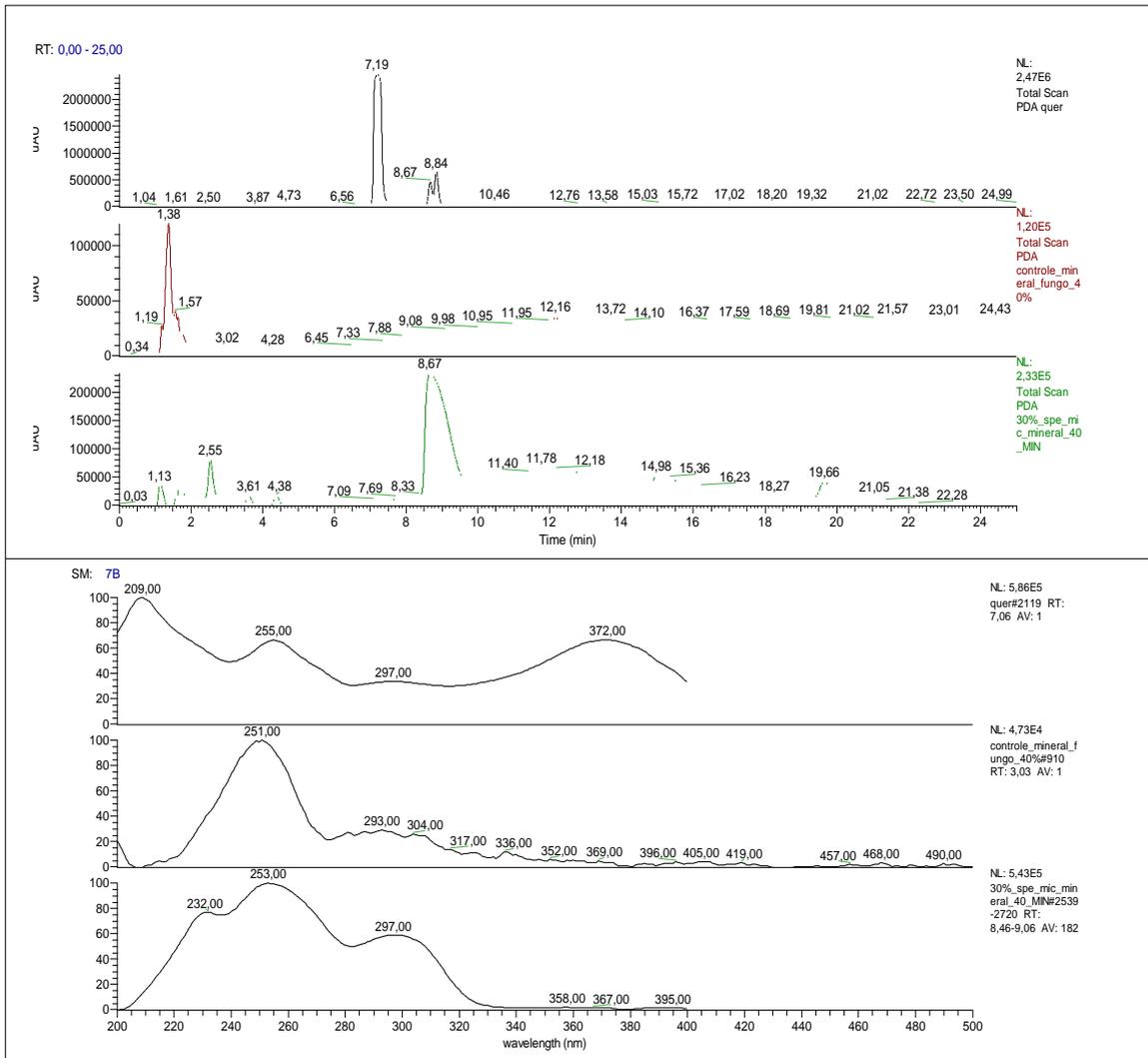


**Figura 14** – Espectros de massas (MS) da biotransformação por *Penicillium* sp. 392 - Primeiro cromatograma: amostra da quercetina - pico em 7,1 min; Segundo cromatograma: controle negativo do fungo em meio mineral, – o pico em 1,56 minutos corresponde a um metabólito não identificado do fungo. Terceiro cromatograma: biotransformação da quercetina pelo fungo em meio mineral–o pico em 4,7 minutos indica um possível derivado. Abaixo os respectivos espectros de massas por MS, indicando cada pico principal das amostras.

Na figura 15 estão representadas as análises instrumentais da biotransformação da quercetina por *Penicillium* sp. 392 do micélio em meio líquido mineral, após 5 dias de crescimento preliminar do fungo em BD e 2 dias de adição da molécula (100 mg/100 mL).

Foram analisados por meio dos cromatogramas e respectivos espectros no UV (Figura 15) e espectros de massas (que em decorrência do equipamento ter apresentado problemas técnicos, esse espectro não pode ser realizado e será divulgado na versão final deste trabalho): a quercetina, como referência para as análises e o controle do fungo no meio mineral (CtMF), em comparação com a amostra de biotransformação de com micélio em meio mineral (MicMBt) para confirmar se a formação dos picos, das possíveis substâncias derivadas era, de fato produto de bioconversão da molécula, ou era do metabolismo fúngico.

Na figura 15 podemos verificar, no primeiro cromatograma a Quercetina – o pico em 7,1 minutos indica esse substrato; no segundo cromatograma, o meio mineral cultivado 2 dias pelo fungo (previamente crescido em meio BD por 5 dias) revela picos correspondentes a substâncias de seu próprio metabolismo; no terceiro cromatograma, a biotransformação da quercetina pelo fungo (previamente crescido em BD por 5 dias) após 2 dias de adicionado junto com a molécula no meio mineral com micélio - o pico em 8,6 min corresponde ao possível derivado de biotransformação. A massa correspondente a esse possível derivado de biotransformação em meio mineral é 306 u, determinada pelos resultados de RMN.



**Figura 15** - Espectros de UV (PDA) da biotransformação por *Penicillium* sp. 392 - Primeiro cromatograma: amostra da quercetina - pico em 7,1 min; Segundo cromatograma: controle negativo do fungo em meio mineral, – o pico em 1,38 minutos corresponde a um metabólito não identificado do fungo. Terceiro cromatograma: biotransformação da quercetina pelo fungo em meio mineral – o pico em 8,6 minutos indica um possível derivado. Abaixo os respectivos espectros de absorvância no UV, indicando os  $\lambda_{max}$  de cada pico principal das amostras.

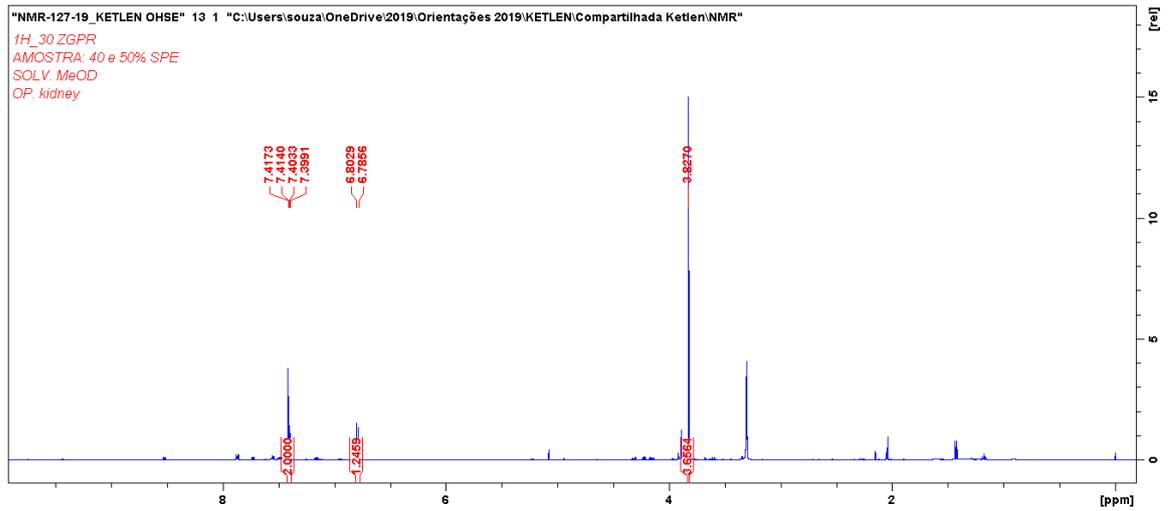
#### 5.4 Identificação por RMN dos derivados da quercetina obtidos por biotransformação

Os espectros de RMN 1D e 2D das amostras, com substância majoritária das frações, identificadas, seguem.

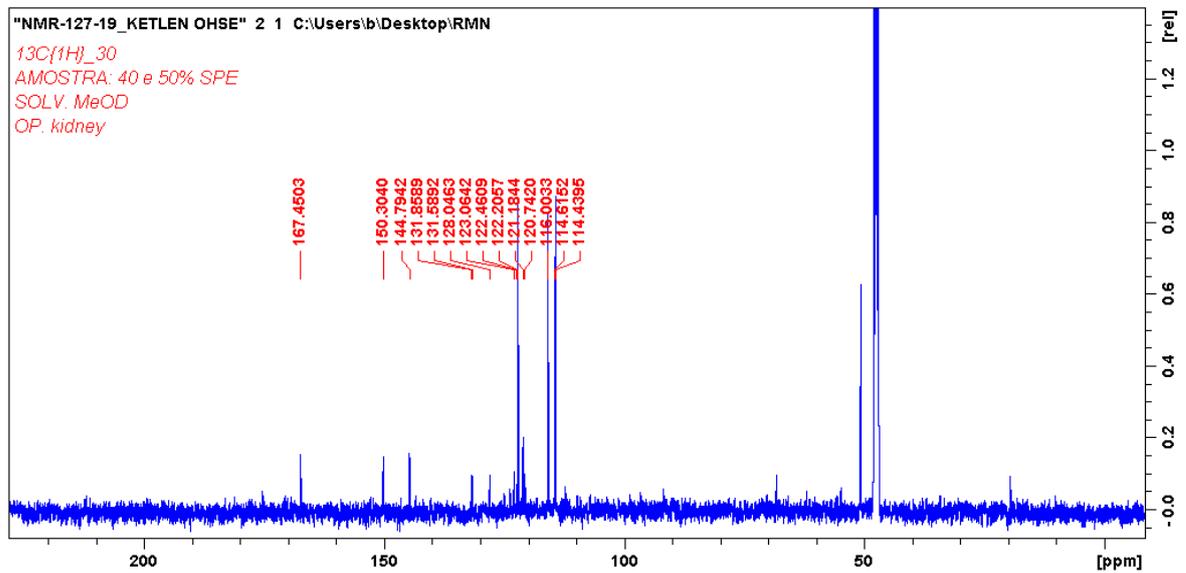
#### 5.4.1 Identificação da substância majoritária das amostras MBt (fração 40% e 50%) e MicMBt (fração 30%)

As amostras MBt (biotransformação pelo fungo em meio mineral) e MicMBt (biotransformação pelas enzimas do interior do micélio no meio mineral, após dois dias de incubação com 100 mg de quercetina), apresentaram através dos dados de RMN de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$  (1D e 2D) o 3,4-dihidroxibenzoato de metila como molécula majoritária. Esse resultado da biotransformação de quercetina pelo *Penicillium* sp. 392 é coerente com os dados das análises por HPLC-DAD/MS das mesmas amostras, que apresentaram um pico cromatográfico majoritário, correspondente ao íon de  $m/z$  167, no modo negativo, de uma substância de massa 168 u. Essa massa é a própria massa molecular do 3,4-dihidroxibenzoato de metila, cujo  $\lambda_{\text{máx}}$  também é coerente com os observados nas Figuras 12 e 13.

No espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da amostra MBt, obtido em metanol foram observados sinais de baixa e de alta intensidades, indicando a presença de compostos minoritários, porém os sinais correspondentes ao derivado da quercetina, os mais intensos, estão bem definidos, sem sobreposições, passíveis de serem identificados (Figura 16). Dentre os sinais de alta intensidade foi observado um com deslocamento químico em  $\delta$  3,83, típico de hidrogênios de metoxila. Outros sinais foram observados na região característica de hidrogênios aromáticos, em  $\delta$  6,69, 7,41 e 7,42. Estes sinais estão dispostos na tabela 7, onde também estão registrados os deslocamentos químicos de  $^{13}\text{C}$  (Figura 17) e as correlações observadas no HSQC, HMBC e COSY (Figura 18) para o 3,4-dihidroxibenzoato de metila.



**Figura 16** – Espectro de RMN de  $H^1$  da amostra MBt a 500 MHz, em MeOD.

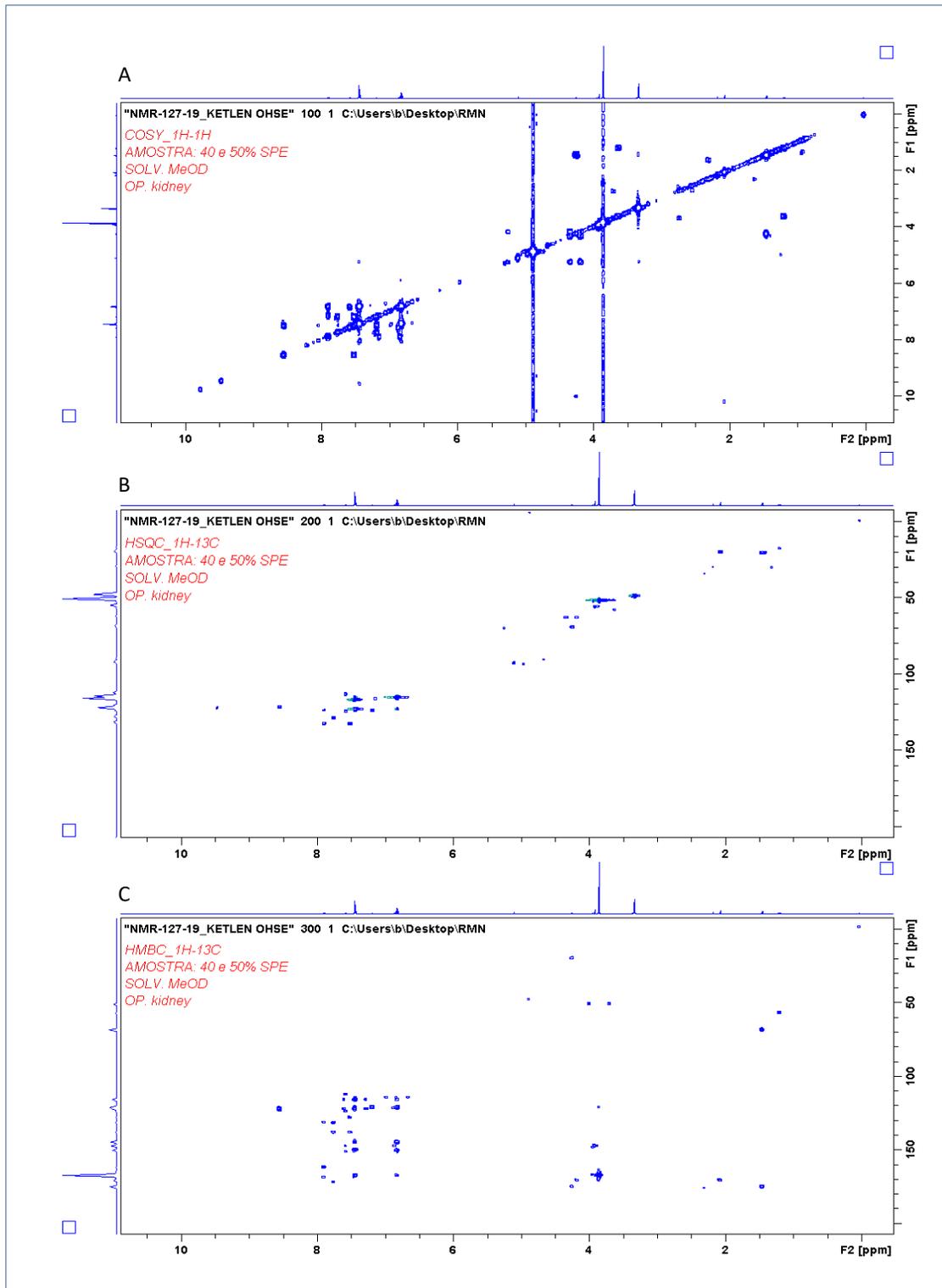


**Figura 17** – Espectro de RMN de  $C^{13}$  da amostra MBt a 500 MHz, em MeOD.

**Tabela 4** – Atribuições de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  do 3,4-dihidroxi benzoato de metila de amostra de biotransformação\* em comparação com os dados da literatura (Aminah et al., 2017)

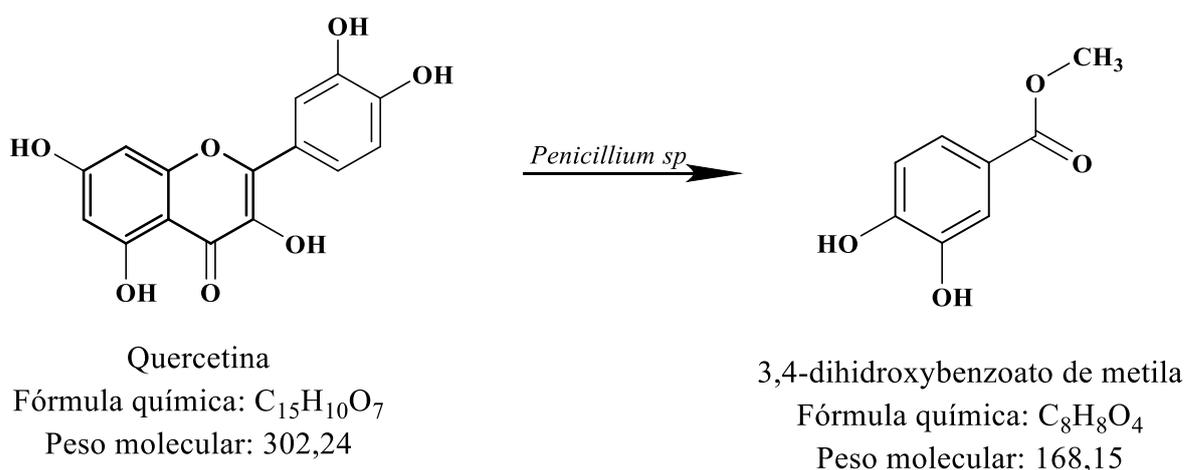
C/H	$\delta_{\text{H}}$ (mult. J Hz)	COSY	$\delta^{13}\text{C}/\text{HSQC}$	HMBC	3,4-dihidroxi benzoato de metila (Aminah et al., 2017)	
					$\delta_{\text{H}}$ (mult. J Hz)	$\delta^{13}\text{C}/\text{HSQC}$
1			122,6			122,6
2	7,42, d, 1H		117,4	123,6, 146,2	6,91(d, 2,4)	116,5
3			146,2			142,9
4			151,7			148,6
5	6,79, d, 1H	7,41	115,8	122,6, 146,2, 151,7, 168,9 fr	7,57(d, 7,6)	114,8
6	7,41, dd, 1H	6,79	123,6	117,4, 151,7, 168,9	7,56(dd, 7,6; 2,4)	123,8
C=O			168,9			167,5
MeO	3,83, s, 3H		52,2	122,6 fr, 168,9	3,88 (s)	52,1

\*Amostra MBt obtida de experimento de biotransformação da quercetina pelo *Penicillium* sp. 392.



**Figura 18** - Espectros de RMN de COSY (A), HSQC (B) e HMBC (C), a 500 MHz, em MeOD. Amostra MBt da biotransformação da quercetina pelo *Penicillium* sp. 392 - principal componente: 3,4-di-hidroxibenzoato de metila.

O 3,4-dihidroxibenzoato de metila, representado na figura 19, é um éster metílico resultante da condensação formal do grupo carboxi do ácido 3,4-dihidroxibenzoico com metanol. Esse ácido é um metabólito vegetal, derivado de algum ácido membro dos catecóis, natural, encontrado em verduras, frutas, legumes e plantas medicinais (KAKKAR e BAIS, 2014). Também é conhecido como um éster do ácido protocatecuico (abreviado na literatura como PCA, do inglês *protocatechuic acid*). É um antioxidante, agente neuroprotetor e possui efeitos anti-inflamatórios sobre células normais e cancerígenas, observados em estudo *in vitro* e *in vivo* (LIN et al., 2007).



**Figura 19** – 3,4-dihidroxi-benzoato de metila: substância majoritária obtida a partir da biotransformação de Quercetina por *Penicillium sp*, em meio reacional mineral.

Considerando as atividades comuns existentes na literatura entre os tipos de constituintes funcionais da molécula elucidada (3,4-dihidroxibenzoato de metila) e comparando com as atividades descritas para quercetina, é possível supor que a ação da quercetina no organismo vivo não seja exclusivamente proveniente dela mesma; talvez ela sofra biotransformação depois de entrar em contato com o organismo, por exemplo, na sua ingestão, como ocorrem com xenobióticos, e seus derivados ajam no organismo, trazendo os

benefícios atribuídos a ela (ações antioxidante, anti-inflamatória, inibição de produtos glicosados, etc...). Zenkevich et al., (2007) relatam, por exemplo, a oxidação da quercetina por oxigênio do ar sob condições brandas, considerada uma das reações típicas para este composto e outros flavonóides. Eles observaram esse processo oxidativo não só quando a molécula é submetida a aquecimento, mas também em soluções de bases fortes, em água, água-etanol e soluções básicas (pH ~ 8-10), à temperatura ambiente sem quaisquer iniciadores radicais ou irradiação do meio reacional. Os autores sugerem que a oxidação pode ser considerada um dos caminhos gerais de biotransformação da quercetina e de outros flavonóis e que este processo pode explicar as baixas concentrações destes compostos no sangue (pH = 7,4). Portanto, a oxidação da quercetina, enzimática ou pelo oxigênio do ar, pode ser o caminho inicial no presente experimento, seguindo-se a metilação do fungo e a oxidação do derivado direto, ou seja do ácido 3,4-dihidroxibenzoico, para a produção do 3,4-dihidroxi-benzoato de metila. Deve-se registrar que nas análises dos controles contendo apenas a molécula em meio mineral e sem a presença do *Penicillium* sp. (392), esse derivado não foi detectado. Ou seja, o 3,4-dihidroxibenzoato de metila proveniente da biotransformação da quercetina só foi detectado nas amostras contendo o fungo na presença da molécula (Vide dados RMN e HPLC). Desse modo, no presente trabalho, não podemos considerar que as substâncias geradas sejam apenas produtos da oxidação de quercetina, haja vista, que os controles contendo quercetina, sem a presença do microrganismo, não apresentaram os mesmos compostos.

#### **5.4.2 Identificação da segunda substância majoritária da amostra MicMBt (fração 30%)**

A amostra MicMBt fração 30% (biotransformação pelo micélio no mesmo meio mineral em que foi produzida a substância anterior, obtida após dois dias de incubação com 100 mg de quercetina), apresentou através dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  (1D e 2D) o

ácido 2-((3,4-dihidroxibenzoil)oxi)-4,6-dihidroxibenzoico ou Depsídeo (figura 20), como molécula majoritária. Pela análise dos dados foi possível elucidar a segunda molécula derivada da biotransformação, pois a partir da biotransformação de quercetina por *Penicillium* sp. 392 é possível sugerir que esse Depsídeo possa ser um derivado. Dentre os sinais de alta intensidade foi observado um com deslocamento químico em  $\delta$  7,56. Outros sinais foram observados na região característica de hidrogênios aromáticos, em  $\delta$  6,24 e 6,32. Estes sinais estão dispostos na tabela 8, onde também estão registrados os deslocamentos químicos de  $^{13}\text{C}$  (Figura 23) e as correlações observadas no HSQC, HMBC e COSY (Figura 24). O perfis de RMN apresentaram qualidade de pureza, comparados a seus respectivos controles; sinais de baixa e de alta intensidades, porém bem definidos, sem sobreposições, passíveis de serem identificados. Dentre os sinais de alta intensidade foram observados deslocamento químicos característicos de grupos fenólicos.

A comparação de perfis de espectros de RMN da amostra com o controle é importante para confirmar que esse produto não é, simplesmente, um produto de oxidação da quercetina, haja vista que as condições de experimento contendo fungo e molécula em meio mineral, já colaboram para descartar essa hipótese.

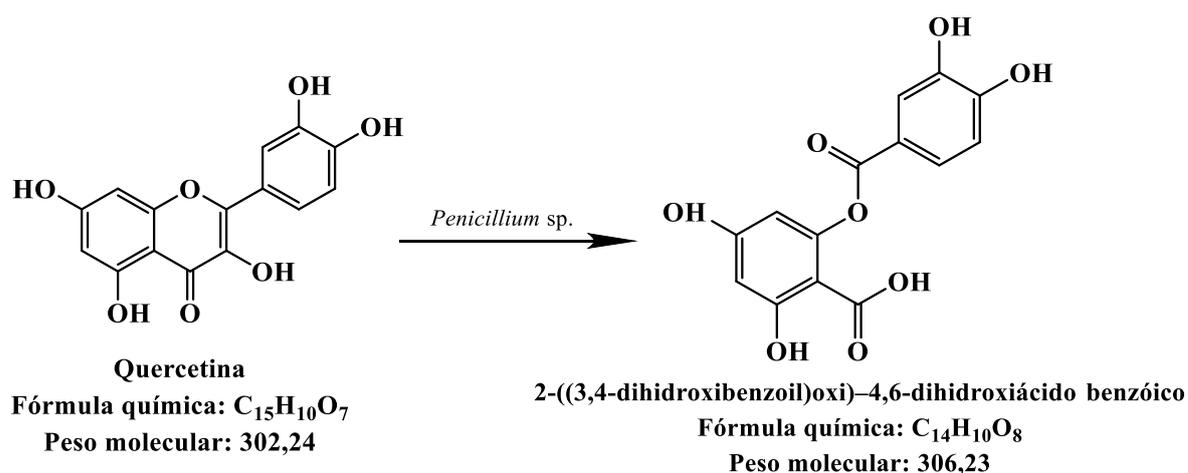
**Tabela 5** – Atribuições de  $^{13}\text{C}$  e  $^1\text{H}$  de o 2-((3,4-dihidroxibenzoil)oxi)-4,6-dihidroxiácido benzóico ou Depsídeo da amostra de biotransformação\* .

C/H	$\delta_{\text{H}}$ (mult.J Hz)	COSY	$\delta^{13}\text{C}$ /HSQC	HMBC
7	6,24 d, 1H		104,5	101,4;154,8; 164,3; 172,0
6	6,32 d, 1H		101,4	100,5; 104,5; 164,3; 166,2; 172,0
4'	6,95 d, 1H	7,56	115,8	122,3; 145,8; 151,4; 165,5
3	7,56 dd, 1H	6,95	124,1	117,7; 145,8; 151,4; 165,5
3'	7,60 d, 1H		117,7	122,3; 124,1; 145,8; 151,4; 165,5

\*Amostra MicMBt obtida de experimento de biotransformação da quercetina pelo *Penicillium* sp. 392.

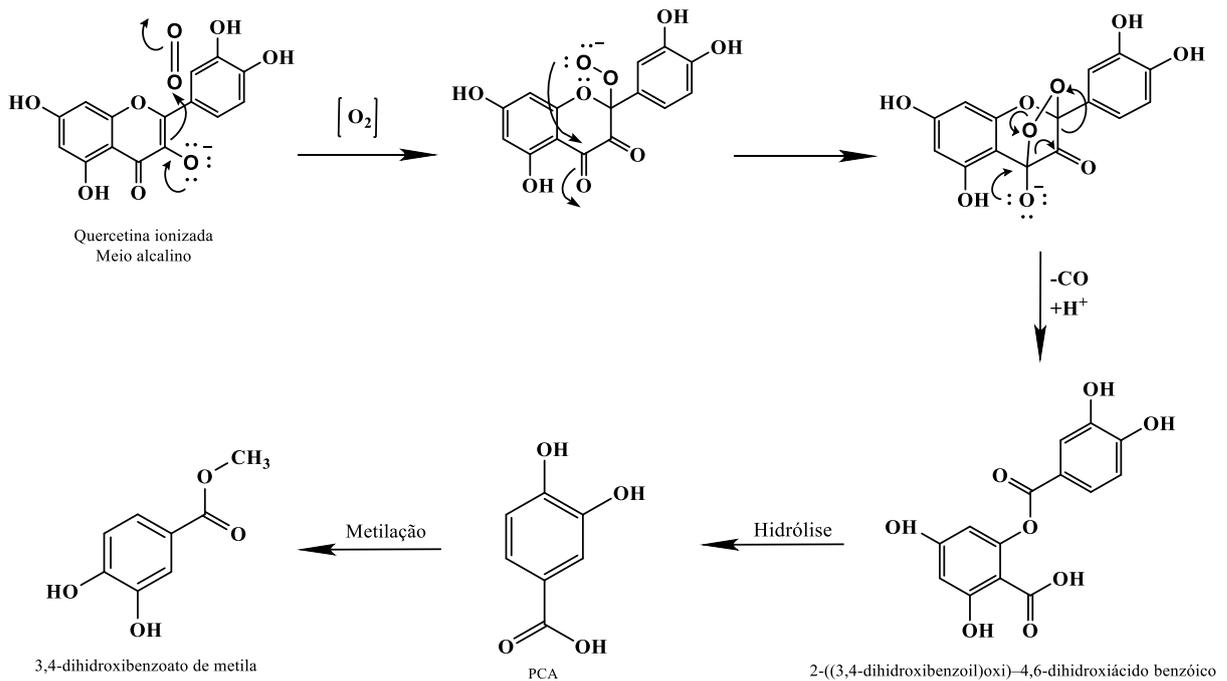
Os Depsídeos são ésteres de duas ou mais unidades de ácidos hidroxibenzoicos e está relacionado às depsidonas, que derivam, biogeneticamente, dos depsídeos através de

acoplamento oxidativo intra-molecular e já foram descritos como metabólitos secundários de líquens e plantas (CARRAZZONI, 2003; TRANCHIMAND et al., 2008). A literatura não relata, até o presente, atividades biológicas relacionadas a esse tipo de substância, mas o associa ao catabolismo enzimático de flavonóides, principalmente quando sintetizado quimicamente (TRANCHIMAND et al., 2008).



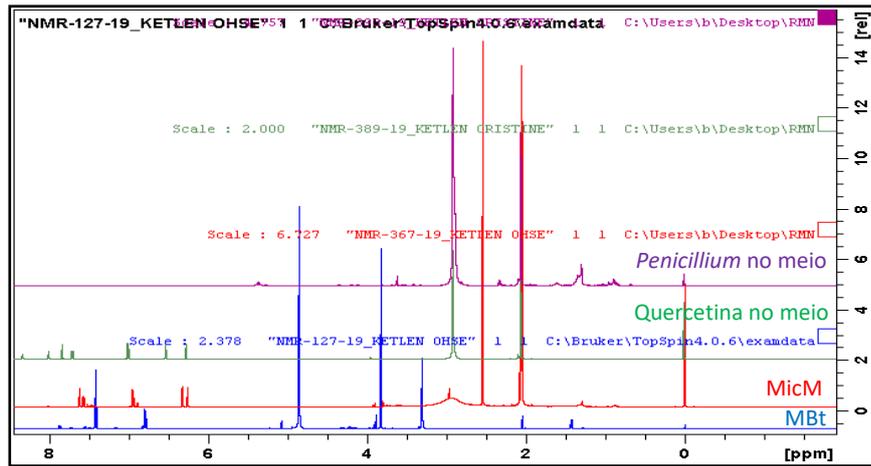
**Figura 20** – 2-((3,4-dihidroxi benzoil)oxi)-4,6-dihidroxi ácido benzoico: substância majoritária obtida a partir da biotransformação de Quercetina por *Penicillium* sp. 392, em meio reacional mineral, em presença de micélio – fração 30%.

Considerando as reações decorrentes do consumo de quercetina por *Penicillium* sp. 392 foi possível propor um mecanismo onde está representada cada etapa dessa biotransformação, incluindo o processo oxidativo da quercetina ionizada, a hidrólise que resulta na formação do PCA e a metilação deste (Figura 21). Zenkevich et al., (2007) relata algo semelhante para quercetina, com várias predições de mecanismo, mas com oxidação pelo oxigênio do ar, o que difere da perspectiva do presente trabalho.

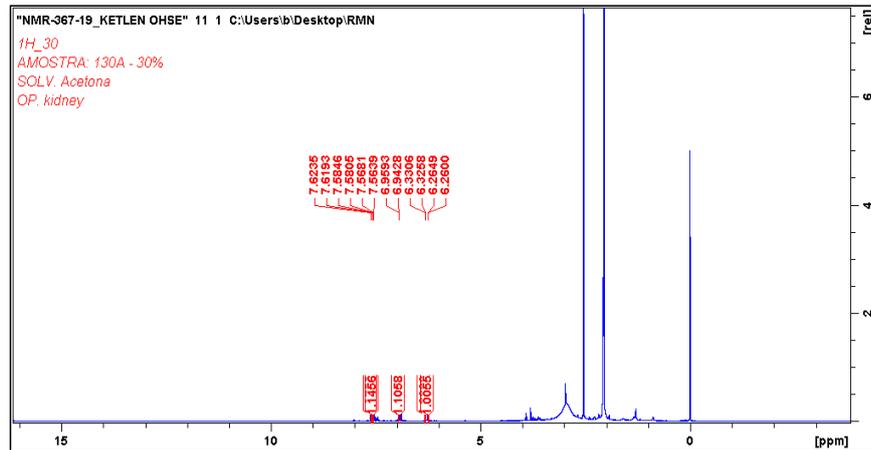


**Figura 21** – Representação do mecanismo proposto para reação decorrente dessa biotransformação, incluindo o processo oxidativo, hidrólise e metilação, produzindo as substâncias 2-((3,4-dihidroxi-benzóil)oxi)-4,6-dihidroxi ácido benzoico e 3,4-dihidroxi-benzoato de metila, a partir da biotransformação de Quercetina por *Penicillium* sp. 392, em meio reacional mineral.

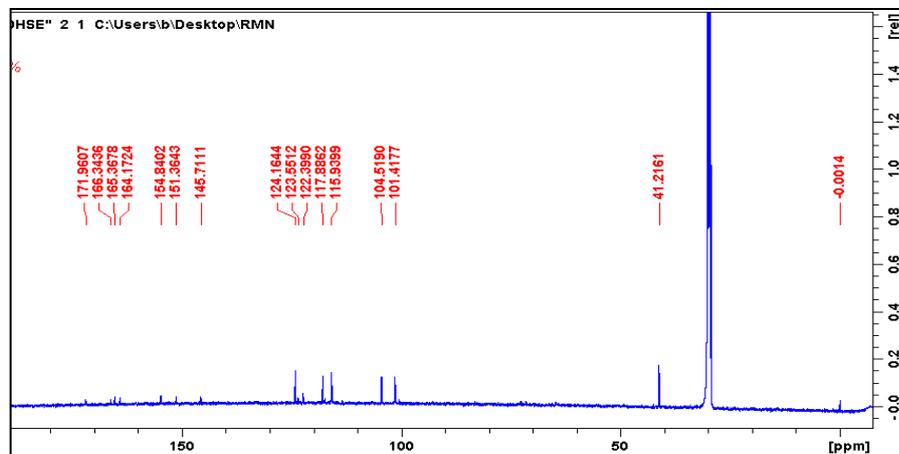
A Quercetina pode atuar como um modificador epigenético, a interação planta-microrganismo pode influenciar a expressão de algumas vias biossintéticas, por isso é importante avaliar e identificar os possíveis efeitos de inibidores em modificadores epigenéticos, pois em alguns casos, esse modificador pode não estar apenas induzindo a expressão ou ativação de vias, mas também pode sofrer biotransformações (Menéndez et al., 2016). Isso é válido e deve ser considerado, pois os controles analisados por RMN, demonstram que amostras contendo quercetina sem a presença de microrganismos ou contendo apenas meio, não apresentaram as substâncias descritas nas biotransformações, o que corrobora a existência de um mecanismo presente de bioconversão desta molécula por *Penicillium* sp. (Figura 22).



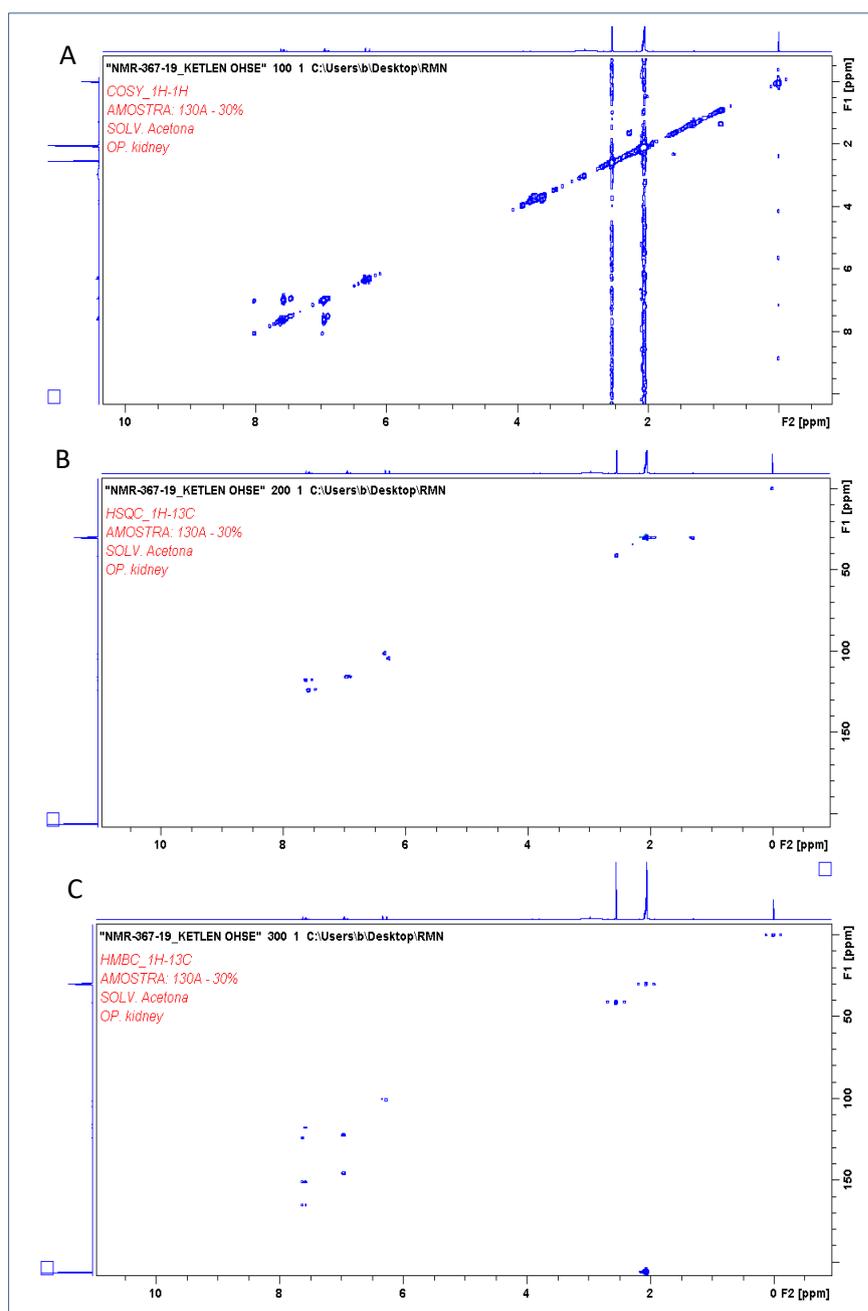
**Figura 22** - Comparação entre espectros de RMN de  $^1\text{H}$  das amostras MicMBt fração 30%, MBT e seus controles quercetina e meio reacional sem quercetina a 500 MHz.



**Figura 23** – Espectro de RMN de  $\text{H}^1$  da amostra MicMBt a 500 MHz, em Acetona



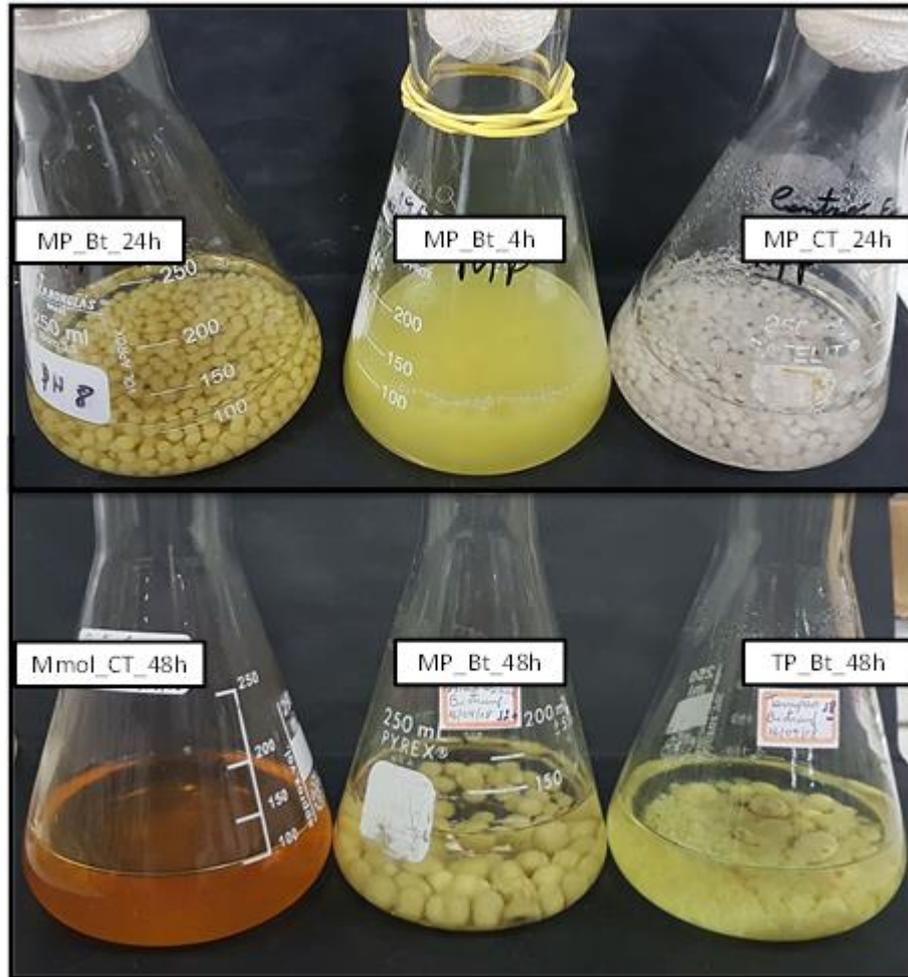
**Figura 24** – Espectro de RMN de  $\text{C}^{13}$  da amostra MicMBt fração 50% a 500 MHz, em Acetona.



**Figura 25** - Espectros de RMN de COSY (A), HSQC (B) e HMBC (C) da amostra MicMBt a 500 MHz, em Acetona. É possível confirmar as correlações existentes entre os átomos e que foram descritas e utilizadas para elucidar o derivado obtido a partir da biotransformação de quercetina por *Penicillium* sp. 392: 2-((3,4-di-hidroxibenzoil)oxi)-4,6-di-hidroxi ácido benzoico ou Depsídeo.

É possível inferir que ambas as substâncias foram provenientes de dois tipos de biotransformações: intracelular e extracelular. Na intracelular o processo de bioconversão pode ter ocorrido por difusão ou englobamento do substrato pelo microrganismo, seguindo-se

o seu metabolismo e a obtenção das substâncias. Esse aspecto foi visível no experimento em 24h e 48h, comparando as biotransformações em meio mineral, meio tampão e os controles de meio mineral com fungo e meio mineral com molécula sem fungo (Figura 24).



**Figura 26** - Comparação entre as biotransformações, com diferentes meios e os controles. Demonstrando a visibilidade de quercetina no experimento, em meio mineral e meio tampão, com presença de células – micélio; e meio mineral sem células, onde: MP\_Bt\_24h é a biotransformação em meio mineral com células e quercetina após 24h; MP\_Bt\_4h é biotransformação em meio mineral com células e quercetina ainda em suspensão após 4h; MP\_CT\_24h é Controle de fungo em meio mineral; Mmol\_CT\_48h é controle de meio mineral com quercetina após 48h; MP\_Bt\_48h é biotransformação em meio mineral com células e quercetina após 48h, indicando que a molécula não está mais em suspensão; TP\_Bt\_48h é a biotransformação em meio tampão com células e quercetina após 48h, indicando que a neste meio ainda há molécula em suspensão.

### 5.5 Análise das biotransformações na inibição da formação de (AGEs) *in vitro*

Os produtos finais da glicação avançada constituem grande variedade de substâncias formadas a partir de interações amino carbonilo, de natureza não-enzimática, entre açúcares redutores ou lipídeos oxidados e proteínas, aminofosfolipídeos ou ácidos nucléicos. Dada a importância de se estudar fontes naturais de inibidores de formação de AGEs e considerando também que Rutina é descrita como um antiglicante natural, podendo agir nas fases iniciais e tardias da glicação competindo por aminogrupos, atenuando a glicoxidação e/ou estresse oxidativo pelo sequestro de radicais livres (SEARA et al, 2008). Após as análises químicas, verificou-se que algumas das réplicas biológicas das biotransformações de Quercetina pelo endofítico *Penicillium* sp, 392, apresentaram maior atividade antiglicante considerando testes envolvendo diferentes extratos de amostras que foram biotransformadas após 48 horas de inóculo, comparadas com o padrão aminoguanidina e controles de amostras com fungos e isentas de quercetina (Tabela 6).

Essa comparação entre amostras que tinham a presença de quercetina, molécula usada como substrato para o fungo e que foi metabolizada, com grupos controles contendo apenas meio mineral (A), meio mineral e fungo isento de molécula (B) e meio mineral com molécula (C), é importante para verificar que as atividades descritas nos bioensaios podem ser efetivamente dos possíveis derivados dos extratos biotransformados, cujas frações analisadas apresentaram promissor potencial antiglicante. Entretanto, apenas o isolamento dessas frações poderá confirmar se o derivado obtido como substância isolada também apresentará essa atividade.

De acordo com os resultados obtidos, as amostras na concentração 100 µg/mL não mostraram inibição maior do que 50% pela via oxidativa. Entretanto, as amostras 1,2,7,10,12 e 13 mostram atividade promissora nesta concentração. Na concentração que inibe 50% de AGEs (CI50), podemos observar que a amostra 7 (MicMBt) (11±0,75 µg/mL) e a amostra 12

(MBt) ( $17,17 \pm 0,51 \mu\text{g/mL}$ ) apresentaram maior atividade que o própria aminoguanidina ( $28,6 \pm 1,35 \mu\text{g/mL}$ ), que foi o padrão usado neste bioensaio. A amostra 12 (MBt), refere-se à substância 3,4-di-hidroxibenzoato de metila ou PCA (Ácido Protocatecuico), identificada quimicamente por RMN 1D e 2D, conforme descrito no **sub-item 5.3.1**. Enquanto a amostra 7 (MicMBt) refere-se à substância identificada como 2-((3,4-di-hidroxibenzoil)oxi)-4,6-di-hidroxi ácido benzoico ou Depsídeo, conforme **sub-item 5.3.2**.

**Tabela 6** – Níveis de atividade antiglicante *in vitro* por via oxidativa e não oxidativa dos extratos de amostras biotransformadas

100ug/mL	Via Oxidativa Glicoxal	Via Não Oxidativa Frutose	
	% inibição Media/Desvpad	% inibição Media/Desvpad	CI 50 $\mu\text{g/mL}$ Media/Desvpad
1	10,31 $\pm$ 2,53	73,34 $\pm$ 1,22	60,63 $\pm$ 0,59
2	5,69 $\pm$ 1,76	67,19 $\pm$ 0,62	61,93 $\pm$ 1,01
3	25,97 $\pm$ 1,89	0,14 $\pm$ 3,75	
4	13,40 $\pm$ 4,15	35,88 $\pm$ 22,00	
5	0,84 $\pm$ 0,76	0,40 $\pm$ 8,53	
6	0,03 $\pm$ 1,86	0,36 $\pm$ 2,46	
<b>7 (MicMBt)</b>	40,82 $\pm$ 1,20	68,42 $\pm$ 1,18	11,00 $\pm$ 0,75
8	19,43 $\pm$ 5,82	0,58 $\pm$ 2,34	
9	0,87 $\pm$ 2,96	5,67 $\pm$ 2,14	
10	29,20 $\pm$ 0,88	66,97 $\pm$ 2,08	29,80 $\pm$ 0,26
11	0,92 $\pm$ 2,44	2,15 $\pm$ 3,55	
<b>12 (MBt)</b>	49,71 $\pm$ 1,95	60,02 $\pm$ 5,31	17,17 $\pm$ 0,51
13	15,99 $\pm$ 3,02	67,28 $\pm$ 0,36	30,73 $\pm$ 0,83
14	19,92 $\pm$ 0,39	0,69 $\pm$ 2,09	
Quercetina	84,95 $\pm$ 0,26	-----	-----
Aminoguanidina	-----	77,44 $\pm$ 2,15	28,60 $\pm$ 1,35

A glicação é uma reação não enzimática irreversível que forma os produtos finais da glicação avançada (AGEs), estes AGEs são altamente reativos que podem modificar as estruturas das proteínas alterando sua função. Este processo acontece por duas vias: a via oxidativa e a via não oxidativa. Os resultados alcançados neste trabalho foram melhores na via não oxidativa, e por isso as curvas existentes foram apresentadas apenas para esta via,

demonstrando que há possível relação de atividade biológica desses derivados como agentes antioxidantes, protegendo células do estresse oxidativo (SINGH et al., 2014).

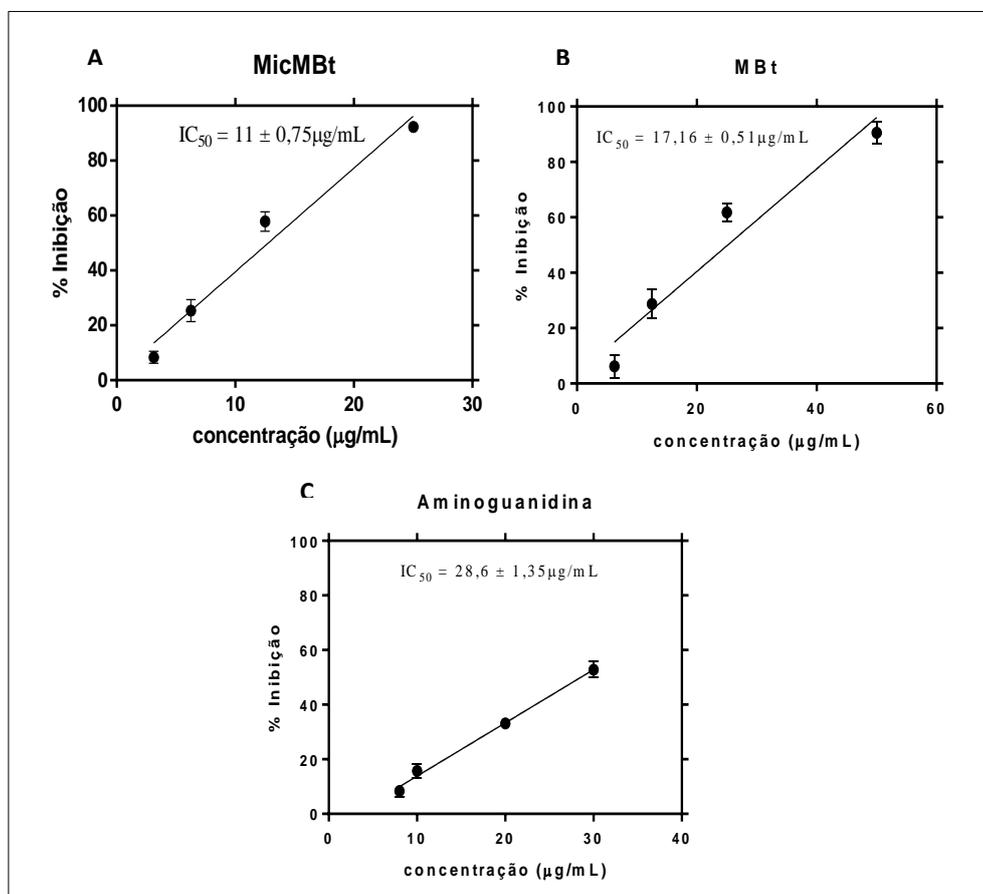
Em um estudo realizado por Al-Musayeb et al. (2011), sobre as atividades biológicas e triagem farmacológicas de constituintes fenólicos de uma planta (*Cordia sinensis*), sendo um desses constituintes isolados, o 3,4-di-hidroxibenzoato de metila, os autores também descreveram essa substância (isolado de planta como metabólito secundário) com característica inibitória para glicação (68% de inibição), potencial antioxidante provavelmente devido à maior lipofilicidade, que é um fator principal na neutralização da lipoperoxidação (REIS et al., 2010) e anti-inflamatório (55% de inibição). É possível que haja uma relação entre os processos de oxidação e antiglicação de substâncias fenólicas, assim como ocorrem em alguns flavonóides (RAHBAR e FIGAROLLA, 2003).

O 3,4-di-hidroxibenzoato de metila ou PCA é um composto fenólico com algumas atividades biológicas descritas: antioxidante (AMINAH et al, 2017), anti-inflamatória e citotoxicidade (AMEERAMJA e PERUMAL, 2016). No entanto, não há relatos de sua interação direta ou contribuição como inibidor de produtos glicosados provenientes de estudos com biotransformação associados à *Penicillium* e quercetina.

Para a segunda substância majoritária, 2-((3,4-di-hidroxibenzoil)oxi)-4,6-di-hidroxi ácido benzoico ou Depsídeo, produto da biotransformação em meio líquido ou enzimático, isento de células, a literatura não relata, até o presente, dados que demonstrem ou confirmem o resultado que estão apresentados nesta pesquisa, quanto ao potencial de inibição de produtos glicosados. No entanto, por se tratar também de um composto fenólico, fundamenta-se nisso, que o depsídeo pode ser considerado neste aspecto, como um possível antioxidante que carrega as mesmas características do PCA, devido a sua estrutura química, pois depsídeos são

ésteres de duas ou mais unidades de ácidos hidroxibenzoicos e estão relacionados a acoplamentos oxidativos intramoleculares (VIEIRA et al., 1998; CARRAZZONI, 2003).

Desse modo, os resultados dos testes *in vitro* para esta atividade no presente trabalho, indicam que as amostras MBt (60% de inibição) e MicBt (68% de inibição), respectivamente Depsídeo e PCA, apresentaram potencial de inibição contra produtos de glicação, quando comparados ao padrão aminoguanidina (Figura 27).



**Figura 27** – A: curva de diluição da amostra 7 (MicMbt) - extrato biotransformado do micélio em meio mineral. Resultados expressos em média e desvio padrão ( $R^2=0,9988$ ); B: curva de diluição da amostra 12 (Mbt) - extrato biotransformado da amostra líquida isenta de células, em meio mineral. Resultados expressos em média e desvio padrão ( $R^2=0,9925$ ); C: curva de diluição da aminoguanidina, padrão utilizado nessa reação ( $R^2=0,9907$ ).

Tal resposta biológica requer importante interesse de continuidade em ensaios *in vivo*, a fim de demonstrar o mesmo que resultou das análises dessas frações *in vitro*, confirmando e ainda, procurando formas de potencializar essas atividades inerentes a essas biotransformações, considerando suas classes de compostos químicos.

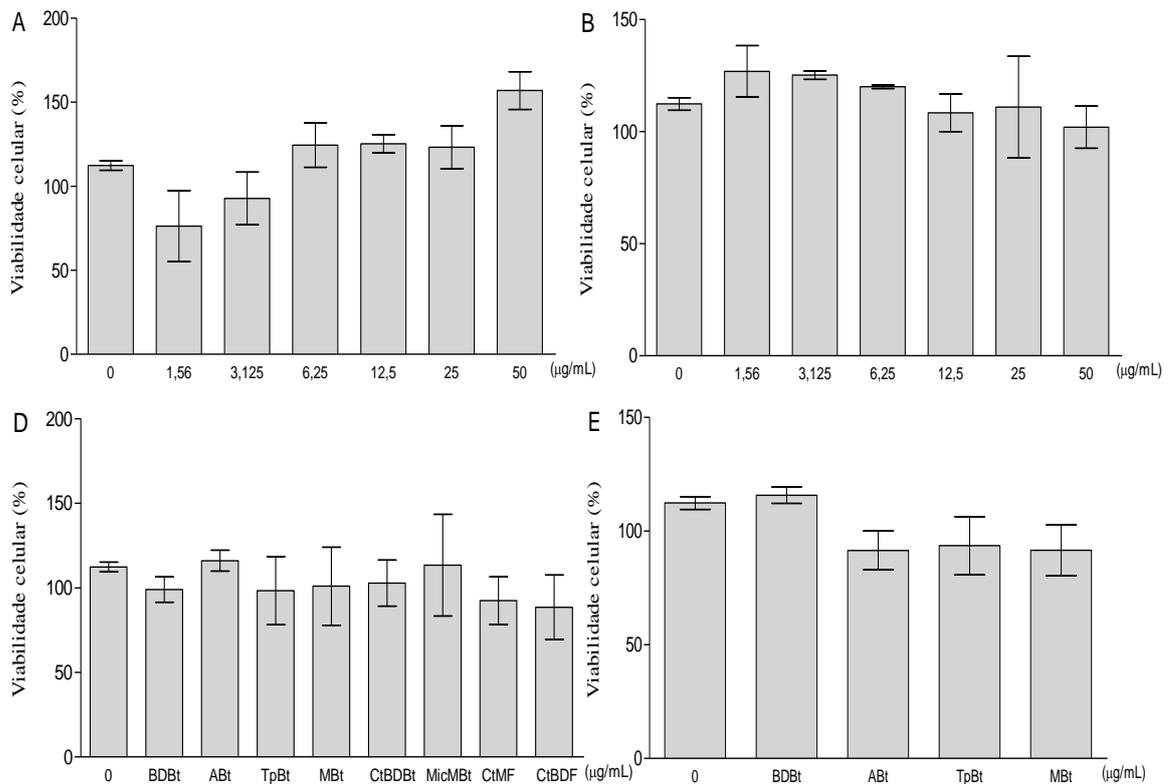
## **5.6 Atividade anti-inflamatória *in vitro***

Assim como nos ensaios de inibição de produtos glicados, as duas substâncias majoritárias: MBt (3,4-di-hidroxibenzoato de metila ou PCA) e MicMBt (2-((3,4-dihidroxibenzoil)oxi)-4,6-di-hidroxi ácido benzoico ou Depsídeo), provenientes das biotransformações, foram testadas quanto sua atividade anti-inflamatória *in vitro*, para verificar a viabilidade celular e a citotoxicidade. As análises indicaram que ambas as substâncias apresentaram bons resultados e estão descritos a seguir.

### **5.6.1 Ensaio de Viabilidade celular: Brometo tiazolil azul de tetrazólio (MTT) e Determinação de nitrito (NO<sub>2</sub>)**

Para o teste de viabilidade celular (MTT) das frações dos derivados obtidos da biotransformação de quercetina por *Penicillium* sp. (392) sobre a viabilidade de macrófagos, onde células viáveis com metabolismo ativo convertem o reagente MTT em um produto de coloração roxa, enquanto células mortas não são capazes de realizar essa conversão.

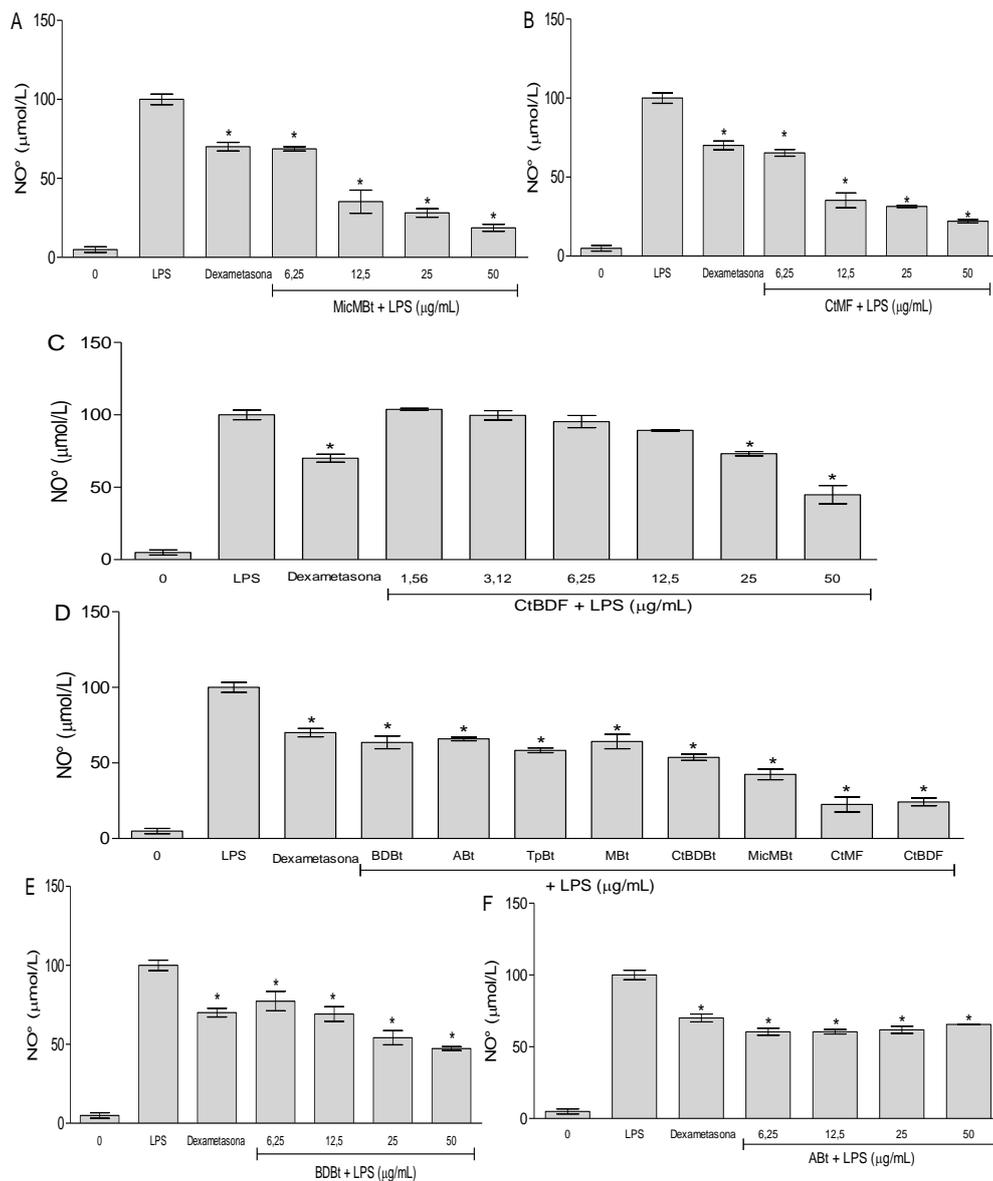
Utilizando concentrações que variaram entre 1,56 a 50 µg/mL, a exposição das células às frações de extratos testados, aumentou a viabilidade celular na concentração de 50 µg/mL. A viabilidade celular foi superior a 90%, principalmente nas amostras BDBt, ABt, TpBt, MBt (Figura 28).



**Figura 28** – Teste de viabilidade celular (MTT) - Efeito das frações dos derivados obtidos da biotransformação de quercetina por *Penicillium* sp. (392) sobre a viabilidade de macrófagos J774A.1 avaliado pelo método do MTT. (A) BDBt; (B) ABt; (D) BDBt, ABt, TpBt, MBt, CtBDBt, MicMBt, CtMF, CtBDF (na concentração única de 50 µg/mL) e (E) BDBt, ABt, TpBt, MBt (cujas amostras foram as mais viáveis). As células foram incubadas com as frações/extratos por 24 h. Os valores correspondem à média ± E.P.M. de três experimentos independentes, em triplicatas. \*  $p < 0,05$  quando comparado com o grupo controle negativo por ANOVA (análise da variância) seguido por teste de comparação múltipla Tukey.

Os extratos fracionados das biotransformações e seus controles foram avaliados quanto à capacidade de inibição da produção de  $\text{NO}^*$  em linhagem de macrófago murino J774A.1 ativado com 1 µg/mL de LPS. Os compostos MicMBt, CtMF, CtBDF, BDBt, ABt, TpBt, MBt, CtBDBt, MicMBt, CtMF e CtBDF foram testados nas concentrações de 6.2, 12, 25 e 50 µg/mL e utilizado como controle positivo o LPS, como controle negativo o fármaco padrão Dexametasona.

As amostras MicMBt e CtMF apresentaram capacidade de inibição da produção de óxido nítrico nas concentrações de 6,2, 12, 25 e 50  $\mu\text{g/mL}$  ( $p < 0.05$  e  $p < 0.001$ ), onde o potencial de inibição registrado para MicMBt foi  $42,43562 \pm 6,065021 \mu\text{mol/L}$ , enquanto que na concentração de 6,2  $\mu\text{g/mL}$  não houve inibição de  $\text{NO}^\bullet$  quando comparados ao padrão Dexametasona e controle LPS, demonstrando que não houve indicativo de efeito citotóxico e que tal efeito é realmente de cada substância amostral testada (Figura 29).



**Figura 29** - Teste de determinação de nitritos - Efeito das frações dos derivados obtidos da biotransformação de quercetina por *Penicillium* sp. 392 na produção de  $\text{NO}$  em macrófagos murino J774A.1 estimulados com LPS. (A) MicMBt; (B) CtMF; (C) CtBDF; (D) BDBt, ABt, TpBt, MBt, CtBDBt, MicMBt, CtMF, CtBDF (na concentração única de 50  $\mu\text{g/mL}$ ); (E) BDBt; (F) ABt. A quantificação de nitrito foi mensurada em sobrenadantes de macrófagos murinos J774A.1, após

estimulado com 1 µg/mL de LPS utilizando reagente de Griess. Cada valor é a média ± E.P.M. de três experimentos independentes. A análise estatística foi realizada usando o teste de comparações múltiplas Tukey –  $p < 0,05$ , quando comparado ao controle (com LPS).

Portanto, verificou-se que dentre as amostras testadas, cuja média±DP indicam inibição celular, BDBt ( $115,7383 \pm 3,578966$ ), ABt ( $91,495 \pm 8,534807$ ), TpBt ( $93,58096 \pm 12,78057$ ) e MBt ( $91,54391 \pm 11,1822$ ) foram viáveis, apresentando atividade anti-inflamatória superior a 90%. Todas essas amostras são resultantes de biotransformações em meio líquido isento de células, que correspondem a biotransformação extracelular (caldo enzimático com metabólicos dos fungos). Os valores, quando comparado ao grupo controle negativo indicaram confiabilidade de 95%.

O éster identificado no presente trabalho, 3,4-di-hidroxibenzoato de metila é descrito com alguns efeitos farmacológicos, tais como: atividades antioxidantes, antitumorais e anti-inflamatórias (KAKKAR e BAIS, 2014). É considerado inibidor da produção de citocinas inflamatórias induzidas por LPS em macrófagos e supressor da ativação funcional de células dendríticas humanas (DEL CORNO et al., 2014). Além disso, possui efeitos anti-inflamatórios nos HGFs estimulados por LPS através da inibição da citocina inflamatória IL-6 e da quimiocina IL-8, podendo ser um agente terapêutico para doença periodontal (WANG et al., 2015).

### **5.7 Atividade antimicrobiana**

Como não existe um padrão sobre o nível aceitável para determinar a eficácia de extratos utilizou-se como critério para a determinação da atividade antimicrobiana a presença de halo de inibição igual ou superior a cinco milímetros (AL-HEBSHI et al, 2006; OSTROSKY et al, 2008) (Tabela 7).

**Tabela 7** - Critério de avaliação da atividade antimicrobiana, pelo método de difusão em ágar.

Diâmetro (mm)	Resultado
Acima 20	Boa atividade
Entre 15 a 20 mm	Moderada atividade
Entre 5 a 15mm	Pouca atividade
Ausência do halo	Inativo

De acordo com os resultados obtidos, algumas amostras apresentaram atividade na concentração testada 3mg/mL no teste de difusão em ágar (Tabela 8 e 9), considerada atividade baixa. Considera-se para cada amostra a identificação seguinte: BDBt, CtMF, MicMBt, MicBDBt, BDBt, MBt, CtTF.

**Tabela 8** - Resultados das amostras, testadas frente às bactérias Gram-negativas.

Tipo	Amostras	<i>E. coli</i> (Butantã)	<i>K.</i> <i>pneumoniae</i>	<i>S.</i> <i>marcescens</i>	<i>P. putida</i> (oralis)	<i>S. entérica</i> <i>Choleraesuis</i>
EXTRATOS	BDBt					
	CtMF					
	MicMBt					
	MicBDBt					
	BDBt					
	MBt		8mm			
	CtTF					
	TIENAM	54,66±0,57	25,66±0,57	36,66±0,57	25,66±0,57	33,66±0,57

**Tabela 9** - Resultados das amostras BDBt, CtMF, MicMBt, MicBDBt, BDBt, MBt, CtTF, testadas frente às bactérias Gram-positivas.

Tipo	Amostras	<i>B. subtilis</i> (CT)	<i>E. faecalis</i>	<i>S. mutans</i>	<i>L. monocytogenes</i>	<i>S. aureus</i>
EXTRATOS	BDBt					
	CtMF					
	MicMBt	10±1,00		9,33±0,57		9±1,00
	MicBDBt					
	BDBt					8mm
	MBt	12mm		6mm		10mm
	CtTF					
	TIENAM	27,66±0,57	30,66±0,57	19,66±0,57	47,66±0,57	27,66±0,57

Desse modo, é possível constatar que as amostras MicMBt, MBt e BDBt, apresentaram atividade na concentração testada 3 mg/mL no teste de difusão em ágar, indicando potencial antimicrobiano para as substâncias principais e majoritárias, produtos das biotransformações, tanto em presença de micélio, quanto no caldo enzimático composto de metabólitos secundários.

Semaming et al. (2015) descrevem efeito antimicrobiano para que experimentos *in vitro* realizados por Liu et al., (2008) e Yin e Chao (2008), onde o ácido protocatecuico (PCA), precursor do éster 3,4-di-hidroxibenzoato de metila, age contra bactérias gram-positivas e gram-negativas.

Além disso, acredita-se que essa capacidade de inibir o crescimento bacteriano, aumente os efeitos sinérgicos dos antibióticos e dessa forma reduz a resistência aos fármacos. Tais atividades antimicrobianas têm sido propostas como aplicações promissoras tanto na proteção da saúde quanto na preservação de alimentos, pois atua diminuindo a oxidação lipídica, a fim de evitar doenças de origem alimentar (JAYARAMAN et al., 2010; YIN e CHAO, 2008).

## CONCLUSÕES

- Dentre os ascomicetos testados, o fungo do gênero *Penicillium* foi escolhido para a biotransformação da quercetina porque apresentou as melhores condições nos testes preliminares de *screening* para continuidade da biotransformação.
- Os melhores parâmetros para a biotransformação da quercetina pelo *Penicillium* sp. (392) foram: o meio mineral, após dois dias de indução da molécula, pH 7,5; tempo e temperatura de agitação de 24h a 48h após adição de quercetina, em 28 °C e 120 rpm; tipo de meio; concentração do substrato quercetina no meio (100 mg/100 mL); nível de açúcar no meio de cultivo reduzido em 1/4; nível de quantidade de células nos meios ( $18 \times 10^8$  UFC/mL, aproximadamente) e cultivo a partir de suspensão de conídeos por cinco dias ou antes que os micélios esporulem.
- As frações mais purificadas apresentaram baixa atividade antimicrobiana e citotóxica e elevado potencial antiglicante e anti-inflamatório em modelos *in vitro*.
- A partir da biotransformação da quercetina por *Penicillium* sp. 392, um endofítico isolado na Amazônia, foram identificadas as substâncias 3,4-di-hidroxibenzoato de metila, um éster do ácido protocatecuico (PCA) e 2-((3,4-di-hidroxibenzoil) oxi) – 4,6-di-hidroxi ácido benzoico.
- A linhagem utilizada na biotransformação está em processo de identificação molecular;
- Foi a primeira descrição de ação da bioconversão da quercetina por *Penicillium* sp., um fungo endofítico isolado na Região Amazônica.

## 9 REFERÊNCIAS

AL-HEBSHI, N.; AL-HARONI, M.; SKAUG, N. In vitro antimicrobial and resistance-modifying activities of aqueous crude khat extracts against oral microorganisms. *Archives of Oral Biology*, v. 51, n. 3, p. 183-188, 2006.

AL-MUSAYEIB, N., PERVEEN, S., ITRAT, F. Muhammad Nasir 3 and Ajaz Hussain. Antioxidant, Anti-Glycation and Anti-Inflammatory Activities of Phenolic Constituents from *Cordia sinensis*. *Molecules* n. 16, p. 10214-10226, 2011. doi:10.3390/molecules161210214

ALFARRA, H. Y.; OMAR, M. N. Microbial Transformation of Natural Products. **Greener Journal of Biological Sciences**, v. 3 (10), p. 357–364, 2013.

AMINAH, N. S.; YULVIA, A.; TANJUNG, M. Methyl-3,4-dihydroxybenzoate and 9-10-dihydrophenanthrene-2,4,7-triol two phenolic compounds from *Dioscorea alata L.* and their antioxidant activity. **AIP Conference Proceedings** 1888, 020050, 2017. <https://doi.org/10.1063/1.5004327>

AMEERAMJA, J.; PERUMAL, E. Protocatechuic acid methyl ester ameliorates fluoride toxicity in A549 cells. **Food Chem Toxicol.** 2016. doi: 10.1016/j.fct.2016.12.024

ARAÚJO, K. C. F. et al. Bioconversion of quercetin and rutin and the cytotoxicity activities of the transformed products. **Food and Chemical Toxicology**, v. 51, n. 1, p. 93–96, 2013.

AZERAD, R. Microbial models for drug metabolism. In: *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, ed. K. Faber, T. Scheper, p. 169-218. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag, 1999.

AZEVEDO, J. L. Botânica: uma ciência básica ou aplicada? **Revista Brasileira de Botânica**, suplement. 2, v. 22, p. 225-229, 1999.

AZEVEDO, J. L.; ARAÚJO, W. L. Endophytic fungi of tropical plants: diversity and biotechnological aspects. In: GANGULI, B. N.; DESHMUKH, S. K. **Fungi: multifaceted microbes**. p. 189-207. 2007.

BARBOSA, J, H, P; OLIVEIRA, SUZANA L; SEARA, L. T. Os papeis do produto final de glicação

avançada (AGEs) no desencadeamento das complicações vasculares do diabetes. **Arqu Bras Endocrinol Metab**, v. 6, p. 940 – 950, 2008.

BARRECA, D. et al. Biochemical and antimicrobial activity of phloretin and its glycosilated derivatives present in apple and kumquat. **Food Chemistry**, v. 160, p. 292–297, 2014.

BARTMAŃSKA A, TRONINA T, HUSZCZA E. Biotransformation of the phytoestrogen 8-prenylnaringenin. **Z Naturforsch C**.v.65, p:603-606, 2010.

BIERHAUS A, HOFMAN MA, ZIEGLER R, NAUROTH PP. AGEs and their interaction with AGE-receptors in vascular disease and diabetes mellitus. I. The AGE concept. **Cardiovasc Res**. n.37, v.3, p. 586-600, 1998.

BIERHAUS, A. et al. AGEs and their interaction with AGE-receptors in vascular disease and diabetes mellitus. I. The AGE concept. **Cardiovasc Res.**, v. 37, n. 3, p. 586–600, 1998.

BOOTS AW, KUBBEN N, HAENEN GRMM, BAST A. Oxidized quercetin reacts with thiols rather than with ascorbate: Implication for quercetin supplementation. **Biochem Biophys Res Commun**. 308:v560-565, 2003.

BORGES, K.B.; BORGES, W.D.S.; PUPO, M.T. et al. Endophytic fungi as models for the stereoselective biotransformation of thioridazine. **Appl Microbiol Biotechnol**. v. 77, p.669. 2007 doi:10.1007/s00253-007-1171-x

BRAGA, R. C., Alves, V. M., FRAGA, C. A. M., Barreiro E. J., Oliveira, O., Andrade C. H. Combination of docking, molecular dynamics and quantum mechanical calculations for Metabolism prediction of 3,4-Methylenedioxybenzoyl-2-thienylhydrazine. *Journal of Molecular Modeling*, v. 18, n. 5, p. 2065-2078, 2012

CAO, H. et al. Microbial biotransformation of bioactive flavonoids. **Biotechnology Advances**, v. 33, n. 1, p. 214–223, 2015.

CARRAZZONI, E. P. . Estudo químico de líquens - VIII. Isolamento dos constituintes químicos da *Cladonia sprucey*. **Química & Tecnologia**, Unicap/Recife, v. 2/2, p. 32-35, 2003.

CHAO, C.Y.; YIN, M.C. Antibacterial effects of roselle calyx extracts and protocatechuic acid in ground beef and apple juice. **Foodborne Pathogens and Disease**. v. 6, n. 2, p. 201–206, 2009.

CHEN, L.X., ZHAO, Q., ZHANG, M., LIANG, Y.Y., MA, J.H., ZHANG, X., DING, L.Q., ZHAO, F., QIU, F. Biotransformation of curcumenol by *Mucor polymorphosporus*. **J. Nat. Prod.** v. 78, p. 674–680, 2015.

CUSHNIE, T.P., LAMB, A.J. Antimicrobial activity of flavonoids. *Int. J. Antimicrob. Agents* v. 26, p.343–356, 2005.

DE ARAUJO MEMB, FRANCO YEM, ALBERTO TG, SOBREIRO MA, CONRADO MA, PRIOLLI DG, et al. Enzymatic de-glycosylation of rutin improves its antioxidant and antiproliferative activities. **Food Chem.** v.141, p.266–73, 2013.

DEMIRJIAN, D.; SHAH, P.; MORÍS-VARAS, F. Screening for Novel Enzymes. **Biocatalysis - From Discovery to Application**, v. 200, p. 1–29, 1999.

DEL CORNO, M.; B. VARANO; B. SCAZZOCCHIO, C. FILESI, R. MASELLA, AND S. GESSANI. Protocatechuic acid inhibits human dendritic cell functional activation: role of PPAR gamma up-modulation. **Immunobiology**. n. 219: p. 416–424, 2014.

DOĞAN Z, KOCAHAN S, ERDEMLI E, KÖSE E, YILMAZ , EKINCIOĞLU Z, EKINCI N, TÜRKÖZ Y. Effect of chemotherapy exposure prior to pregnancy on fetal brain tissue and the potential protective role of quercetin. **Cytotechnology**. 67: 1031–1038, 2015.

DYMARSKA, M.; GRZESZCZUK, J.; URBANIAK, M.; JANECZKO, T.; STĘPIEŃ, Ł.; KOSTRZEWA-SUSŁOW, E. Glycosylation of 6-methylflavone by the strain *Isaria fumosorosea* KCH J2. *PLoS ONE*, 2017.

EDWARDS, R., L., LYON, T., LITWIN, S.E., RABOVSKY, A., SYMONS, J.D., JALILI, T. Quercetin reduces blood pressure in hypertensive subjects. **J. Nutr.** 137, p. 2405–11, 2007.

ERLUND, I.; KOSONEN, T.; ALFTHAN, G.; MAENPAA, J.; PERTTUNEN, K.; KENRAALI, J., et al. Pharmacokinetics of quercetin from quercetin aglycone and rutin in healthy volunteers. **Eur J Clin**

**Pharmacol.** v.56,p.545–53, 2000.

ESCRICHE, I. et al. Suitability of antioxidant capacity, flavonoids and phenolic acids for floral authentication of honey. Impact of industrial thermal treatment. **Food Chemistry**, v. 142, p. 135–143, 2014.

FABER, K. **Biotransformations in organic chemistry**. 3. cd. Germany: Springer-Verlag, p. V, 1997.

FORZZA RC, et al. *Catálogo das Plantas e Fungos do Brasil*, 2010. 2 vols. Andrea Jakobsson Estúdio e Rio de Janeiro Botanical Garden.

FURA, A. Role of pharmacologically active metabolites in drug discovery and development. *Drug Discovery Today*, v 11, n 3-4, p.133-142, 2006.

GREEN, L. C.; WAGNER, D. A.; GLOGOWSKI, J.; SKIPPER, P. L.; WISHNOK, J. S.; TANNENBAUM, S. R. Analysis of nitrate, nitrite, and [<sup>15</sup>N nitrates] in biological fluids. **Analytical Biochemistry**, v. 26, p. 131-138, 1982.

GROVE, D. C.; RANDALL, W. A., 1955. *Assay Methods of Antibiotic: a Laboratory Manual*. Medical Encyclopedia, New York.

GRUENKE, L. D.; CRAIG, J. C. Identification of a metabolite of thioridazine and mesoridazine from human plasma. *Research Communications in Chemical Pathology & Pharmacology*, v. 10, n. 2, p. 221-225, 1975.

GUARDIA, T.; ROTELLI, A. E.; JUAREZ, A. Q.; PELZER, L. E., Anti-inflammatory properties os plant flavonoids. Effect of rutin, quercetin and hiperidin on adjuvant arthritis in rat. **II Pharmacology**, v. 56, p. 683-687.

GUNANTILAKA, A. A. L. No TitleNatural Products from Plant-associated Microorganisms: Distribution, Structural Diversity, Bioactivity, and Implications of Their Occurrence. **J Nat Prod.**, v. 69(3), p. 509–526, 2006.

GUTTERIDGE JM. Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. *Clin Chem*. 41: 1819–1828, 1995.

HAENEN, G.R.M.M., BAST, A. Nitric oxide radical scavenging of flavonoids. **Methods Enzymol**. 301, 490–503, 1999.

HAN, Y., Rutin has therapeutic effect on septic arthritis caused by *Candida albicans*. **International Immunopharmacology**, v. 9, p. 207-211, 2009.

HAVSTEEN, B.H. Biochemical and medical significance of flavonoids. **Pharmacol. Therap.** v. 96, p. 67-202, 2002.

HENCH, P. S. et al. The effect of a hormone of the adrenal cortex (17-hydroxy-11-dehydrocorticosterone: compound E) and of pituitary adrenocortical hormone in arthritis: preliminary report. **Annals of the rheumatic diseases**, v. 8, n. 2, p. 97-104, 1949.

HIDALGO, F. J.; ZAMORA, R. Interplay between the maillard reaction and lipid peroxidation in biochemical systems. **Ann N Y Acad Sci.**, v. 1043, p. 284-9, 2005.

HOSODA R, HORIO Y, SHIMODA K, HAMADA M, HAMADA H, HAMADA H. Regioselective hydroxylation and glucosylation of flavanones with cultured plant cells of *Eucalyptus perriniana*. **Nat Prod Commun.** v 8, p. 905-6, 2013.

HUEBSCHMANN, A. G. et al. Diabetes and glycoxidation end products. **Diabetes Care**, v. 29, n. 6, p. 1420-32, 2006.

JAY, D.; HITOMI, H.; GRIENGLING, K. K. Oxidative stress and diabetic cardiovascular complications. **Free Radic Biol Med**, v. 40, n. 2, p. 183-92, 2006.

JAKUS V, RIETBROCK N. Advanced glycation end products and the progress of diabetic vascular complications. **Physiol Res.** n.53, v.2, p.131-42, 2004.

JAYARAMAN, P.; SAKHARKAR, M. K.; LIM, C. S.; TANG, T. H.; SAKHARKAR, K. R. Activity and interactions of antibiotic and phytochemical combinations against *Pseudomonas aeruginosa* in vitro. **International Journal of Biological Sciences.** v. 6, n. 6, p. 556-568. 2010.

KAKKAR, S.; BAIS, S. A Review on Protocatechuic Acid and Its Pharmacological Potential. **ISRN Pharmacol**, v. 2014, p. 1-9, 2014.

KARABIN, M. et al. Biotransformations and biological activities of hop flavonoids. **Biotechnology Advances**, v. 33, n. 6, p. 1063-1090, 2014.

KIHO, T.; USUI, S.; HIRANO, K.; AIZAWA, K.; INAKUMA, T. Tomato paste fraction inhibiting

the formation of advanced glycation end-products. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, v. 68, n. 1, p. 200-5, Jan 2004. >.

KIM H, BARTLEY GE, ARVIK T, LIPSON R, NAH SY, SEO K, et al. Dietary supplementation of chardonnay grape seed flour reduces plasma cholesterol concentration, hepatic steatosis, and abdominal fat content in high-fat diet-induced obese hamsters. **J Agric Food Chem.** v.62, p.1919–25, 2014.

KUMAGAI, Y.; NAKATANI, S.; ONODERA, H.; NAGATOMO, A.; NISHIDA, N.; MATSUURA, Y.; KOBATA, K.; WADA, M. Anti-glycation effects of pomegranate (*Punica granatum L.*) fruit extract and its components in vivo and in vitro. **J Agric Food Chem.** v.9; n.63(35), p.7760-4, 2015.doi: 10.1021/acs.jafc.5b02766.

LIN H.H., CHEN, J.H., HUANG, C.C., WANG, C.J. Apoptotic effect of 3,4-dihydroxybenzoic acid on human gastric carcinoma cells involving JNK/p38 MAPK signaling activation. **Int J Cancer.** v.120, n.11, p. 2306–2316. 2007. PMID 17304508. doi:10.1002/ijc.22571

LIU, W. H.; HSU, C. C.; YIN, M. C. In vitro anti-Helicobacter pylori activity of diallyl sulphides and protocatechuic acid. **Phytotherapy Research.** v. 22, n. 1, p. 53–57. 2008.

LIU M, YIN H, LIU G, DONG JJ, QIAN ZH, MIAO JL. Xanthohumol, a Prenylated Chalcone from Beer Hops, Acts as an alpha-Glucosidase Inhibitor in Vitro. **J Agric Food Chem;** v.62, p.5548–54, 2014a.

LIU, S.; JU, J.; XIA, G. Identification of the flavonoid 3'-hydroxylase and flavonoid 3',5'-hydroxylase genes from Antarctic moss and their regulation during abiotic stress. **Gene,** v. 543, n. 1, p. 145–152, 2014b.

LIAO, X. L.; LUO, J. G.; KONG, L. Y. Flavonoids from *Millettia nitida* var. *Hirsutissima* with their anticoagulative activities and inhibitory effects on NO production. **Journal of Natural Medicines,** v. 67, n. 4, p. 856–861, 2013.

LUDWIG-MÜLLER J, JAHN L, LIPPERT A, PÜSCHEL J, WALTER A. Improvement of hairy root cultures and plants by changing biosynthetic pathways leading to pharmaceutical metabolites: strategies and applications. **Biotechnol Adv.** v. 32, p.1168–79, 2014.

MACHADO, H., **Atividade dos flavonóides rutina e naringina sobre o tumor ascítico de Erlich “in vivo”**. 2006. 125f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Agrícola, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG, 2005.

MANOSROI, J., ABE, M., AND MANOSROI, A. Biotransformation of steroidal drugs using microorganisms screened from various sites in Chiang Mai, Thailand. *Bioresource Technol.* v. 69, pp. 67–73, 1999.

MASUREKAR, P. S. (1992). Therapeutic Metabolites. In “**Fungal Biotechnology**” pp. 241-302.

MEADE, S. J.; MILLER, A. G.; GERRARD, J. A. The role of dicarbonyl compounds in non-enzymatic crosslinking: a structure-activity study. *Bioorg Med Chem.*, v. 11, n. 5, p. 853–62, 2003.

METODIEWA D, JAISWAL AK CENAS N, DICKANCAITE E, SEGURA- AGUILAR J. Quercetin may act as a cytotoxic prooxidant after its metabolic activation to semiquinone and quinoidal product. *Free Radic Biol Med.* 26: 107–116, 1999.

MONNIER, V. M. Intervention against the Maillard reaction in vivo. *Arch Biochem Biophys.*, v. 419, n. 1, p. 1–15, 2003.

MOSMANN T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods.* 1983;65:55–63. doi: 10.1016/0022-1759(83)90303-4.

MÜLLER, M. Practical Biotransformations. A Beginner’s Guide. Postgraduate Chemistry Series. By Gideon Grogan. *Angewandte Chemie International Edition*, 19 out. 2009

NIJVELDT, R. . Flavonoids : a review of probable mechanism of action and potential applications. *Am J Clin Nutr*, v. 74, p. 418–425, 2001.

NASSIRI-ALS, M.; SHARIATI-RAD, S.; ZAMANSOLTAN, F., Anticonvulsive effects of intracerebroventricular administration of rutin in rats. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry*, v. 32, p. 989-993, 2008

OMOLOLU, P.A.; ROCHA J.B.T.; KADE, I.J. Attachment of rhamnosyl glucoside on quercetin confers potent iron-chelating ability on its antioxidant properties. *Exp Toxicol Pathol.* n.63, p. 249–55, 2011.

ORSOLIC, N., KNEZEVIC, A.H., SVER, L., TERZIC, S., BASIC, I. Immunomodulatory and antimetastatic action of propolis and related polyphenolic compounds. **J. Ethnopharmacol.** 94, 307–315, 2004.

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 (CIM) de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Vol. 18, Pp. 301-307, 2008.

PATHAK, D.; PATHAK, K.; SINGLA, A. K., Flavonoids as medicinal agents: recent advances. **Fitoterapia**, Amsterdam, v. 57, n. 5, p. 371-389, 1991.

PEDRIALI, C. A. Síntese química de derivados hidrossolúveis da rutina: determinação de suas propriedades físico-químicas e avaliação de suas atividades antioxidantes. p. 1–127, 2005.

PETERSON, D. H.; MURRAY, H. C.; S. EPPSTEIN, H.; REINEKE L. M., WEINTRAUB, A; MEISTER P. D.; LEIGH.H. M. Microbiological Transformations of Steroids. I. Introduction of Oxygen at Carbon-11 of Progesterone. **J. Am. Chem. Soc.** n. 74, v. 23, p. 5933–5936, 1952. DOI: 10.1021/ja01143a033

PRASAD, G. S.; GIRISHAM, S.; REDDY, S. M. Microbial transformation of albendazole. **Indian Journal of Experimental Biology**, v. 48, p. 415-420, 2010

POSSIEDE, Y. M. YVELISE MARIA POSSIEDE. ESTUDOS MORFOLÓGICOS e GENÉTICOS em *Guignardia* spp e *Phyllosticta*. **Tese de doutorado. Univerisade Federal do Paraná, 2004.**

RAHBAR, S.; FIGAROLA, J.L. Novel inhibitors of advanced glycation endproducts. **Arch. Biochem. Biophys.** n. 419, p. 63-79, 2003.

RASO, J. et al. Rutina – Estrutura , Metabolismo E Potencial. p. 21–25, 2009.

READ, M.A. Flavonoids: naturally occurring anti-inflammatory agents. **Am. J. Pathol.** 147, 235–237, 1995.

REIS, B.; MARTINS, M.; BARRETO, B.; MILHAZES, N.; GARRIDO, E. M.; SILVA, P.; GARRIDO, J.; BORGES, F. Structure-property-activity relationship of phenolic acids and derivatives. Protocatechuic acid alkyl esters. **J. Agric. Food Chem.** n 58, v 11, p 6986-93.

COELHO, G. D.; RIBEIRO DA SILVA, R. Fungos: Principais grupos e aplicações biotecnológicas. Curso de Capacitação de Monitores e Educadores, Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade Vegetal e Meio Ambiente, São Paulo, 2006, 20p.

RODRIGUES-HEERKLOTZ, KATIA F., DRANDAROV, K., HEERKLOTZ, J., HESSE, M. AND WERNER, C. Guignardic Acid, a Novel Type of Secondary Metabolite Produced by the Endophytic Fungus *Guignardia* sp.: Isolation, Structure Elucidation, and Asymmetric Synthesis. **HCA**, v.84, p. 3766–3772, 2001. doi:10.1002/1522-2675(20011219)84:12<3766::AID-HLCA3766>3.0.CO;2-Z

SANTOS, I. S. et al. Nanoencapsulation of polyphenols for protective effect against colon-rectal cancer. **Biotechnology Advances**, v. 31, n. 5, p. 514–523, 2013.

SANTOS, K. F. R.; OLIVEIRA, T. T.; NAGEM, T. J.; PINTO, A. S.; OLIVEIRA, M. G. A., Hypolipidaemic effects of naringenin, rutin, nicotinic acid and their associations. **Pharmacology Research**, v. 40, n. 6, p. 493-496, 1999.

SEMAMING, Y., PANNENGPETCH, P., CHATTIPAKORN, S. C., & CHATTIPAKORN, N. Pharmacological properties of protocatechuic Acid and its potential roles as complementary medicine. **Evidence-based complementary and alternative medicine : eCAM**. p.593902. 2015. doi:10.1155/2015/593902

Shimoda, K.; Kubota, N.; Taniuchi, K.; Sato, D.; Nakajima, N.; Hamada, H. *et al.* Biotransformation of naringin and naringenin by cultured *Eucalyptus perriniana* cells. **Phytochemistry**, 71, pp. 201-205, 2010.

SINGH VP, BALI A, SINGH N, JAGGI AS. Advanced Glycation End Products and Diabetic Complications. **Korean J Physiol Pharmacol**, v.18, n.1, p.1–14. 2014. 10.4196/kjpp.2014.18.1.1

STOUDT, T. H. The microbiological transformation of steroids. **Advances in Applied Microbiology**, v. 2, p. 183-222, 1960.

SWEERS, H. M.; WONG, C. H. In: FÁBER, K (1997). Biotransformations in organic chemistry. 3<sup>rd</sup> ed. Germany: Springer-Verlag. p.4, 1997.

SCHNEKENBURGER, M.; DICATO, M.; DIEDERICH, M. Plant-derived epigenetic modulators for cancer treatment and prevention. **Biotechnology Advances**, v. 32, n. 6, p. 1123–1132, 2014.

SIVANESAN, A. **The Bitunicate Ascomycetes and their anamorphs**. [s.l.: s.n.].

SOUZA, A.Q.L. et al. Atividade antimicrobiana de fungos endofíticos isolados de plantas tóxicas da Amazônia: *Palicourea longiflora* (Aubl.) Rich e *Strychnos cogens* Benth. *Acta Amazônica* **2004**, 34(2), 185-95.

SOUZA, A. Q. L. DE. Potencial genético e químico dos endófitos de *Murraya paniculata* L. (Jack). p. 128, 2006.

STÉVIGNY, C.; JIWAN, J. L. H.; ROZENBERG, R.; HOFFMANN, E. LECLERCQ, J. Q. Key fragmentation patterns of aporphine alkaloids by electrospray ionization with multistage mass spectrometry. **Rapid Communication in Mass Spectrometry**. v. 18, p. 523-528, 2004.

SCHULZ, B., BOYLE, C. **Mycol. Res.** 109-661, 2005.

SMITH, R. V., ROSAZZA, J. P., Microbial models of mammalian metabolism, *J.Nat.Prod.*, 46, 79-91, 1983.

TRANCHIMAND, S.; ERTEL, G.; GAYDOU, V.; GAUDIN, C.; TRON, T.; IACAZIO, G. Biochemical and molecular characterization of a quercetinase from *Penicillium olsonii*. **Biochimie**. 90. 781-9. 2008. 10.1016/j.biochi.2007.12.004.

TURPEINEN, M., KORHONEN, L. E., TOLONEN, A., USITALO, J., JUVONEN, R., RAUNIO, H., PELKONEN, O. Cytochrome P450 (CYP) inhibition screening: Comparison of three tests. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 29, p.130-138, 2006.

VAN ACKER, S.A., TROMP, M.N., HAENEN, G.R.M.M., VAN DER VIJGH, W.J., BAST, A. Flavonoids as scavengers of nitric oxide radical. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** v.214, p.755–759, 1995.

VAISHNAV, NEHA e SINGH, ANUSUIYA e ADSUL, MUKUND e DIXIT, POOJA e SANDHU, SIMRANJEET e MATHUR, ANSHU e PURI, SURESH e SINGHANIA, REETA. *Penicillium* : The next emerging champion for cellulase production. **Bioresource Technology Reports.** 2010. 10.1016/j.biteb.2018.04.003.

VIALA, P.; RAVAZ, L. Sur la dénomination botanique (*Guignardia bidwellii*) du black-rot. **Bulletin de la Société Mycologique de France.** n.8, p.63-63, 1892.

VIEIRA, I. J.C. et al . A New Depside Isolated from the Bark of *Rauwolfia mattfeldiana*. **J. Braz. Chem. Soc., São Paulo** , v. 9, n. 1, p. 91-95, Feb. 1998. <http://dx.doi.org/10.1590/S0103-50531998000100016>.

WANG, F.-W., YE, Y.-H., DING, H., CHEN, Y.-X., TAN, R.-X. AND SONG, Y.-C. Benzophenones from *Guignardia* sp. IFB-E028, an Endophyte on *Hopea hainanensis*. **Chemistry & Biodiversity.** n. 7, p. 216–220, 2010. doi: 10.1002/cbdv.200800353

WANG, J. et al. Enhancement of the selective enzymatic biotransformation of rutin to isoquercitrin using an ionic liquid as a co-solvent. **Bioresource Technology**, v. 128, p. 156–163, 2013.

WANG, Y.; ZHOU, J.; FU, S.; WANG, C.; ZHOU, B. Preventive Effects of Protocatechuic Acid on LPS-Induced Inflammatory Response in Human Gingival Fibroblasts via Activating PPAR- $\gamma$ . **Inflammation.** n38, v.3, p. 1080–1084. 2015. doi: 10.1007/s10753-014-0073-1

WEBER, R. W. S. et al. Anti- *Candida* metabolites from endophytic fungi. **Phytochemistry**, v. 68, n. 6, p. 886–892, 2007.

WOLFE KL, LIU RH. Cellular antioxidant activity (CAA) assay for assessing antioxidants, foods, and dietary supplements. **J Agr Food Chem.** n.56, p.8896–907, 2007.

XIAO JB, HÖGGER P. Dietary polyphenols and type 2 diabetes: current insights and future perspectives. **Curr Med Chem.** 2014. <http://dx.doi.org/10.2174/0929867321666140706130807>

XIU, X.L.; WANG Y, FAN GJ, CHEN L, SUN CP. Biotransformation of capsaicin by *Penicillium janthinellum* AS 3.510. **Phytochemistry Letters.** v. 19, p. 210-214. 2017. <https://doi.org/10.1016/j.phytol.2017.01.008>.

YIN, M.C.; CHAO, C.Y. Anti-Campylobacter, anti-aerobic, and anti-oxidative effects of roselle calyx extract and protocatechuic acid in ground beef. **International Journal of Food Microbiology.** v. 127, n. 1-2, p. 73–77, 2008.

ZHANG, H.W., SONG, Y.C., TAN, R.X. **Nat. Prod. Rep.** v.23, 753, 2006.

ZENKEVICH, I.G.; ESHCHENKO, A.Y.; MAKAROVA, S.V.; VITENBERG, A.G.; DOBRYAKOV, Y.G.; UTSAL, V.A. Identification of the products of oxidation of quercetin by air oxygen at ambient temperature. . **Molecules.** v. 27, n. 12(3), p.654-72, 2007.

ZEHNDER, K.; KALBERER, F.; KREIS, W.; RUTSCHMANN, J. Metabolism of thioridazine (Mellaril) and one of its pyrrolidine analogues in the rat. **Biochemical Pharmacology,** v.11, n. 7, p.535-550, 1962.

## ANEXO 1

### **Biotransformação (Protocolo adaptado de VASCONCELOS e colaboradores, 2015 – Departamento de Química da UFCE - <http://dx.doi.org/10.5935/0103-5053.20150070>)**

Cultivar os fungos por **5 dias** em placa de petri contendo meio BDA.

1- Separar cerca de 5 fragmentos (5 mm de diâmetro) dos fungos cultivados em placas e transferi-los para os frascos de erlenmeyer de 250 mL, contendo 100 mL de caldo de batata dextrose (24g L<sup>-1</sup>), com redução de açúcar pela metade;

2- Cultivar os fungos em condições estáticas a temperatura ambiente (25 °C), em BOD até que a taxa de açúcar caia a zero (medição diária com a fita universal);

3- Separar o micélio do meio líquido por filtração à vácuo, em membrana de celulose de porosidade de **0,45 µm ou** 0,22 µm. Observar a partir do item 9, o procedimento para o meio líquido (isento de células).

4- Transferir os micélios para novos frascos de erlenmeyer de 250 mL, contendo 100 mL de solução tampão de fosfato pH 8;

5- Adicionar o composto ou molécula (10 mg por erlen, para Rutina e Quercetina e 5 mg por erlen, para Estigmasterol) aos frascos, exceto em 1 frasco das réplicas, que será o CONTROLE SEM MOLÉCULA). Para o CONTROLE DO TAMPÃO com a molécula e sem o fungo usar apenas 2 mg de cada molécula.

6- Submeter esses erlens à agitação (120 rpm a 28 °C), por um período de 2 a 10 dias. Esse período dependerá do acompanhamento por Espectrometria de massas ou por CCD a cada 24h, em inserção direta (para cada molécula: diluir em 80 µL de metanol uma alíquota de 20 µL de um dos frascos e 20 µL do controle sem molécula e comparar). Encerrar a reação ao verificar o consumo da molécula e reunir as réplicas de cada tipo de amostra;

7-Filtrar novamente o micélio, à vácuo em membrana milipore em membrana de celulose de porosidade de **0,45 µm ou** 0,22 µm. Lavar o micélio com metanol e guardar esse metanol de lavagem para posterior análise;

8- Particionar separadamente os líquidos de reação e os controles com Acetato de Etila (AcOEt) (3x 1/3 do volume de cada amostra aquosa a particionar), após adição de NaCl (30 g por 100 mL). Secar a fração AcOEt com Sulfato de Sódio anidro (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), filtrar em papel de filtro e concentrar;

9- Para o Meio líquido Isento de Células: após separação do micélio, acrescentar aos frascos contendo o meio, 5 mg de cada molécula aos frascos, exceto em 1 frasco das réplicas, que será o controle do meio sem molécula). Seguir os passos 6 e 8.

10- Submeter tudo à análise por espectrometria de massas. Utilizar o modo negativo para Rutina e Quercetina e modo positivo e negativo para estigmasterol.

## ANEXO 2

### Artigo 1 – Revisão (MINI)

#### Artigo de revisão (mini-review) Journal of Fungi – MDPI

##### *Mini-Review*

#### **Biotransformação por Ascomicetos**

Ketlen Christine Ohse<sup>1,2</sup>, Gabrielle Gorayeb Santos<sup>2</sup>, Antônia Q. L. Souza<sup>1,3</sup>, Afonso D. L. Souza<sup>1,4</sup> and Emerson Silva Lima<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Programa de Pós-Graduação em biotecnologia e biodiversidade-BIONORTE, Universidade Federal do Amazonas (UFAM), Manaus AM CEP, Brasil; [ketlenohse@gmail.com](mailto:ketlenohse@gmail.com) (K.C.O.)

<sup>2</sup>FCF (Faculdade de Ciências Farmacêuticas)

<sup>3</sup>FCA (Faculdade de Ciências Agrárias),

<sup>4</sup>PPG Química.

E-mails: [ketlenohse@gmail.com](mailto:ketlenohse@gmail.com), [gabriellegorayeb@gmail.com](mailto:gabriellegorayeb@gmail.com), [antoniaqlsouza@gmail.com](mailto:antoniaqlsouza@gmail.com), [souzadq@ufam.edu.br](mailto:souzadq@ufam.edu.br), [eslima@ufam.edu.br](mailto:eslima@ufam.edu.br)

**Resumo:** Os microrganismos contribuem diretamente para a economia mundial. Portanto, à medida que novos microrganismos são isolados em todo o mundo, muitos substratos são utilizados, dando surgimento a novos produtos. Por isso, o potencial total dos microrganismos está longe de ser alcançado. Os ascomicetos filamentosos são interessantes em pesquisa devido ao coquetel de enzimas que podem produzir quando induzidos. Sua relevância é enfatizada ainda mais por ser considerado como substrato econômico. O uso de fungos endofíticos em biotransformações é um campo promissor, pois pode gerar um metabólito de fármacos já existentes e/ou de novas entidades químicas. Visto que o mercado mundial não cessa em lançar novos fármacos, se faz necessário novas metodologias para geração de seus metabólitos. Nesse sentido, apresentamos informações sobre o envolvimento ou utilização de ascomicetos em biotransformações, pois há poucos relatos dessa relação.

**Palavras-chave:** fungos endofíticos, bioconversão, fármacos.

### **1. Introdução**

Os microrganismos, como biocatalisadores metabolicamente versáteis, desempenham um papel crucial na sociedade atual, onde uma variedade de produtos incluindo enzimas, antibióticos, ácidos orgânicos e alimentos humanos são produzidos com sucesso [1]. Assim, os microrganismos contribuem diretamente para a economia mundial. Portanto, à

medida que novos microrganismos são isolados em todo o mundo, muitos substratos são utilizados, dando surgimento a novos produtos. Por isso, o potencial total dos microrganismos está longe de ser alcançado.

Os fungos filamentosos, como os pertencentes aos Zygomycetes e Ascomicetos, apresentam grandes contribuições em setores industriais, como o de alimentos e produtos farmacêuticos.

Os Ascomicetos para a biotecnologia branca podem ser rastreados até a produção de antibióticos por *Penicillium chrysogenum*, que juntamente com *Aspergillus oryzae*, estão entre os mais estudados fungos filamentosos em escala industrial [1].

Os substratos para produção industrial de produtos de valor agregado por ascomicetos incluem principalmente açúcares refinados. Portanto, há interesse crescente em usar outros substratos mais econômicos, como materiais de resíduos industriais principalmente com base nestes resíduos e lignocelulósicos; por isso, considera-se que os ascomicetos podem potencialmente desempenhar um papel crucial como biocatalisador central nestas "biorefinarias de resíduos", dada a sua capacidade de produzir enzimas que podem quebrar essas estruturas recalcitrantes [2].

O uso de ascomicetos, cuja biomassa, normalmente é rica em proteínas e lipídios, pode representar outro produto de valor agregado na biorefinaria, pois seu crescimento filamentoso permite a geração de uma biomassa, comparado ao uso de microrganismos unicelulares, onde não ocorre o mesmo, facilitando a separação do meio [3].

## 2. Potencial enzimático de Ascomicetos e Biotransformação

Os ascomicetos filamentosos são interessantes em pesquisa devido ao coquetel de enzimas que podem produzir quando induzidos. Sua relevância é enfatizada ainda mais por ser considerando como substrato econômico. Os produtos de valor agregado são, em maioria, de celulose ou substratos à base de amido. Durante a última década, utilizava-se apenas algumas enzimas lignocelulolíticas, nomeadamente celulasas ou xilanases. É importante ter uma visão geral de diferentes substratos e parâmetros de cultivo para uma produção melhorada destas enzimas lignocelulolíticas, uma vez

que dominam o recente uso em pesquisa nesta área. Fungos filamentosos têm vantagem sobre microrganismos unicelulares, como bactérias e leveduras devido ao seu sistema enzimático extracelular acoplado com penetração de hifas [4].

Os ascomicetos também podem ser usados para o isolamento de celulasas e enzimas relacionadas, mantendo atividades enzimáticas elevadas que podem servir em diversos setores industriais. As celulasas podem ser utilizadas em indústrias têxteis, papel e celulose, alimentos e ração animal, combustível, química, gestão de resíduos e indústrias farmacêuticas [5].

A produção industrial de celulasas é atualmente dominada por *Trichoderma* spp. e *Aspergillus* spp. Os ascomicetos são indiscutivelmente biocatalisadores potenciais para a conversão de muitos resíduos em produtos de valor agregado. Sua capacidade de sintetizar enzimas para a degradação de materiais à base de lignocelulose provavelmente dará grande atenção pela comunidade científica para a produção de ácidos orgânicos, etanol e enzimas, uma vez que são os substratos de primeira escolha para processos mais baratos [6].

No Brasil, país com uma das maiores biodiversidades de plantas do mundo, existe pouco relato sobre trabalhos químicos envolvendo substâncias produzidas por fungos endofíticos e biotransformação envolvendo fungos. Transformações microbianas (também conhecidas por biotransformações ou bioconversões) são reações de compostos orgânicos catalisadas por microrganismos. É claro que os verdadeiros catalisadores destas reações são as enzimas sintetizadas pelas células desses microrganismos [7]. É neste contexto que se classifica biotransformação como conversões químicas catalisadas por enzimas ou microrganismos sobre substratos não naturais.

As vantagens do uso das enzimas na obtenção de produtos de

biotransformação podem ser enumeradas: 1- as enzimas são catalisadores muito eficientes; 2- as enzimas são ambientalmente aceitáveis (degradáveis); 3- trabalham em condições reacionais suaves; 4- possuem uma alta tolerância a substratos; 5- podem catalisar um largo espectro de reações [8].

Alguns biocatalisadores podem realizar reações impossíveis de se obter em química orgânica, principalmente quanto as suas seletividades, tais como: quimiosseletividade, onde algumas enzimas podem reagir com um único grupo funcional, mesmo na presença de outros grupos químicos reativos. Isto leva a produtos reacionais mais “limpos”, facilitando o processo de purificação; regioseletividade e diastereosseletividade, em que, devido à sua estrutura tridimensional complexa, as enzimas podem distinguir entre grupos funcionais que estão quimicamente situados em diferentes regiões da mesma molécula substrato [9]; enantioseletividade, onde quase todas as enzimas são formadas de L-amino ácidos e portanto são catalisadores quirais e como consequência, qualquer tipo de quiralidade presente na molécula substrato é "reconhecida" na formação do complexo enzima-substrato. Dessa forma, um substrato pró-quiral pode ser transformado em um produto opticamente ativo e ambos os enantiômeros de um substrato racêmico podem reagir a velocidades diferentes [8].

A molécula de um determinado composto é modificada por transformações de grupos funcionais, com ou sem degradação do esqueleto carbônico. Estas alterações resultam na formação de novos produtos úteis que são difíceis ou impossíveis de serem obtidos por processos químicos convencionais. Frequentemente, as reações de biotransformações são estereosseletivas, produzindo grande variedade de produtos de alto valor agregado, ou seja, intermediários de fármacos, fármacos, ingredientes alimentares, produtos e

intermediários agroquímicos, dentre outros. A biotransformação tem sido uma ferramenta alternativa com grande potencialidade, especialmente para desenvolvimento de tecnologias sustentáveis, como a química verde, na produção de produtos químicos e fármacos [10].

Por outro lado, o uso de biocatalisadores, principalmente quando trata-se de microrganismos, apresenta ainda muitas dúvidas sobre o seu completo entendimento. Isto deve-se em parte ao uso recente de suas aplicações e à complexidade que os sistemas biológicos apresentam. Muito ainda falta para elucidar sobre os mecanismos de biotransformação, as enzimas envolvidas nestes processos e sobre a fisiologia dos microrganismos utilizados [11].

### 3. Filogenia e classificação de Ascomicetos

Ascomycota é grupo irmão de Basidiomycota. Essa relação é suportada pela presença de paredes septadas em membros de ambos os filos, o que divide as hifas em segmentos, pares de núcleos não fundidos nesses segmentos, os quais se fundem dentro do ascoma e no basidioma, o que caracteriza o sub-reino Dikarya. O que sustenta esse sub-reino vem de uma aparente homologia entre estruturas presentes nesses grupos, as quais coordenam mitose simultânea de dois núcleos dicarióticos (Ascomycota – “croziers”; e Basidiomycota – fíbulas) [12].

Estes fungos podem ser unicelulares e multicelulares. A característica fundamental que agrupa todos eles é que eles formam micelas de septo (o citoplasma de suas células é separado por paredes de quitina) e que eles formam um tipo de esporos chamados ascósporos na parte de seu ciclo de reprodução sexual. O organismo haploide (n) forma hifas e, na sua extremidade,

contém células plurinucleadas (n) (ascógenas e anterídio). Quando ocorre a plasmogamia, forma-se o asca, onde os núcleos (2n) se juntarão, antes de formar os ascósporos [13].

Estima-se que existam cerca de 1,5 milhões de espécies de fungos, e desse número são conhecidas pelos micologistas somente cerca de 69.000 espécies. Devido à ação predatória do meio ambiente, várias espécies de fungos estão sendo extintas antes mesmo de serem conhecidas, causando prejuízo ao equilíbrio ecológico, além de não se obter conhecimento do potencial biotecnológico dessas espécies. Foram agrupados em um reino a parte - Reino Fungi – por apresentarem características peculiares que os diferem tanto de animais como de vegetais, além do grande número de espécies encontradas por todo o planeta [14].

O Brasil detém cerca de 20% da biodiversidade mundial, principalmente, na floresta Amazônica, a maior do Planeta e fonte inestimável de matérias-primas nos mais variados setores. Apesar da imensa diversidade biológica amazônica, as espécies que a compõem e suas relações filogenéticas são pouco conhecidas, muito menos seus microrganismos e suas interações com outros seres [15].

Os fungos existentes no Brasil ainda são pouco estudados, especialmente na Região Norte. Destacam-se pelo maior número de espécies os estados de São Paulo (1.161 spp.), Pernambuco (937 spp.), Rio Grande do Sul (856 spp.), Bahia (584 spp.), Paraná (529 spp.), Santa Catarina (482 spp.), Rio de Janeiro (443 spp.), Amazonas (408 spp.), Minas Gerais (399 spp.) e Pará (302 spp.). Apesar dos dados referentes ao Amazonas e ao Pará, observa-se que a Região Norte carece de coletores e estudiosos de fungos, pois, nos demais estados, o número de registros é baixo: Rondônia (116 spp.), Amapá (88 spp.), Roraima (75 spp.), Acre (61 spp.) e Tocantins (5 spp.). Além desses, destacam-se ainda a Região Centro-Oeste (Mato Grosso 135 spp., Goiás 104 spp., Mato

Grosso do Sul 82 spp., Distrito Federal 77 spp.), o Maranhão e o Espírito Santo como locais em que pouco se conhece acerca da diversidade micológica [16].

Dentre as principais características apresentadas por Ascomicetos, podem-se citar os micélios septados, com parede celular contendo quitina e glucanas, e a produção de um tipo especial de esporângio, denominado asco. Características macroscópicas diferem Ascomicetos de outros fungos pertencentes a outras divisões, porém, são as características microscópicas que são diagnósticas para o grupo [17].

Dois estados reprodutivos distintos são produzidos por Ascomicetos, e são conhecidos como teleomorfos ou "estado perfeito" (caracterizados pela produção de esporos sexuais ou ascósporos), e anamorfos ou "estado imperfeito" (quando há formação de esporos assexuais ou conídios). Mesmo sua reprodução sendo realizada através desses dois processos, sua classificação é baseada nas estruturas reprodutivas sexuais [17].

A reprodução sexuada nos ascomicetos envolve a formação de um asco, estrutura em forma de saco, na qual ascósporos [haploides](#), formados após a meiose e mitose. Ascos e ascósporos são estruturas exclusivas que distinguem os ascomicetos de todos os outros fungos. Um ascoma, estrutura vegetativa composta de hifas emaranhadas, pode ter diferentes morfologias: aberto e com forma de taça (apotécio), fechado (cleidostécio), esférico piriforme com um pequeno poro (peritécio), através do qual os ascósporos são liberados. Os ascos normalmente se desenvolvem na superfície interior do ascoma, chamada de himênio ou camada himenial (parte reprodutiva) [18].

#### 4. Ascomicetos endofíticos

Na busca por novos catalisadores, microrganismos, especialmente fungos, tem sido empregados na descoberta de enzimas para desenvolvimento da biocatálise em escala industrial. Os fungos produzem enzimas que normalmente são

extracelulares, o que facilita sua recuperação do meio de fermentação. Em particular, os microrganismos isolados em território brasileiro já demonstraram excelente potencial biocatalisador frente a diferentes substratos [19].

O uso de fungos endofíticos em biotransformações é um campo promissor, pois pode gerar um metabólito de fármacos já existentes e/ou de novas entidades químicas. Visto que o mercado mundial não cessa em lançar novos fármacos, faz-se necessário novas metodologias para geração de seus metabólitos. Dentre as aplicações de biotransformações com microrganismos destaca-se produção da corticosterona (derivado da cortisona), através da ação de microrganismos na deoxicorticosterona [20], onde promoveram a hidroxilação na posição  $11\alpha$ -hidroxiprogesterona, o que foi decisivo para síntese de hormônios adrenocorticoides de modo economicamente viável [21].

O gênero *Guignardia* foi descrito pela primeira vez por [22] compreendendo as formas anamórficas de espécies de *Phyllosticta* e de alguns outros gêneros relacionados [23]. Tanto a forma anamórfica quanto a telemórfica tem sido isolados como fungos endofíticos [24]. O gênero *Guignardia* é um fungo da Classe dos Ascomicetos, Subclasse Loculoascomycetidae, Ordem Dothideales, Família Dothideaceae [25].

Os fungos do gênero *Guignardia* apresentam-se como uma importante fonte em potencial de produtos naturais a ser explorada na medicina, agricultura e na indústria, pois há relatos de que o extrato bruto desse fungo possui potente atividade antimicrobiana (especialmente antifúngica), sendo usada em composições farmacêuticas. O principal metabólito desse extrato é o ácido guignardico [17].

O primeiro produto isolado natural com enxofre, contendo um dímero de benzofenona, chamado guignasulfido, apresentou atividade citotóxica e antibacteriana, além de dois derivados de

benzofenona conhecidos, monometilsulocina e o ácido rizotônico, ambas com atividade antibacteriana [26]. Sesquiterpenos, lactonas, ácido heptelídico e compostos análogos, isolados do extrato bruto de fungos do Gênero *Guignardia* têm sido descritos como compostos antimicrobianos ou possuindo outras bioatividades [27]. Conhecem-se ainda outros isolados desse Gênero como: vermistatina com atividade antifúngica, metoxivermistatina e hidroxivermistatina, com atividade citotóxica [28].

Essa variedade de substâncias isoladas demonstra que esse grupo de microrganismos são promissores na busca de substâncias bioativas e, especialmente o Gênero *Guignardia* ainda é pouco explorado quanto a sua diversidade metabólica.

## 5. Ascomicetos no mundo e no Brasil

Os ascomicetos são fungos do filo Ascomycota (grc.  $\acute{\alpha}\sigma\kappa\acute{o}\varsigma$ = tubo;  $\mu\acute{\upsilon}\kappa\eta\varsigma$ = fungo) que produzem seus esporos (ascósporos) em esporângios específicos chamados ascos. É um grupo monofilético de cerca de 32.300 espécies, ao qual pertencem inclusive a maioria das formas anamórficas, leveduras e formas liquenizadas. Este grupo engloba também a maioria dos fungos patogênicos para as plantas. Na maioria das espécies, os ascos estão contidos numa estrutura chamada de ascoma. Cada asco produz oito ascósporos (ou um múltiplo de 8), que resultam de uma meiose seguida de uma mitose, embora ascos com quatro esporos sejam característicos de algumas espécies. A maioria dos ascomicetos possui sistema somático filamentosos, ou seja, são constituídos por hifas, formadas por filamentos longos e ramificados que, em conjunto com outras hifas formam o micélio. As hifas são tipicamente constituídas por uma parede tubular contendo quitina e  $\beta$ -Glicanos e são divididas por septos regulares, dotados de poros simples. Septos sem poros podem ser

formados na base de estruturas reprodutivas, para isolar porções velhas do micélio ou partes lesionadas, para evitar perda de citoplasma no caso de haver algum dano ou ruptura da membrana celular. Muitas das células são perfuradas centralmente, o que permite que o citoplasma e os núcleos circulem pelas hifas, embora a maioria das células possua um único núcleo [17].

Em Ascomycota, ocorrem grupos microscópicos, como são os casos das leveduras e dos estados anamórficos (também conhecidos como fungos filamentosos), macroscópicos, e formas liquenizadas [29]. De acordo com [30], ocorreriam 2.720 gêneros e 28.650 espécies de fungos no Filo Ascomycota, número este que foi aumentado para 32.267 espécies em 1995, incluindo os fungos liquenizados [31]. No Brasil, não é possível listar-se o número total de Ascomycota, mas em relação a líquens e fungos liquenizados, há registros de aproximadamente 2.300 espécies, número este que foi ampliado para 2.851 espécies e em Mato Grosso do Sul, tem-se listados, um número de 108 espécies [32].

O grupo Ascomycota reúne várias espécies de interesse econômico, como a fermento de cerveja acima mencionado ou o gênero *Penicillium*, que é usado não apenas na produção do antibiótico, mas também intervém na produção de vários produtos alimentos, como o queijo azul ou algumas salsichas. Também neste grupo estão os gêneros *Aspergillus* ou *Candida*, que podem atacar ambos as plantas de interesse econômico e o próprio ser humano. No entanto, existem também algumas espécies de ascomicetos comestíveis, como *Morchella esculenta*, morel ou morilla [33].

No Brasil, em regiões tropicais, formações vegetais do tipo Cerrado tem sido alvo de intensas pesquisas, devido à sua vasta biodiversidade. Esta formação é ainda pouco conhecida em relação aos fungos, embora apresente uma flora substancial e a diversidade fúngica nessa

região foi discutida, enfatizando especialmente os Ascomicetos [34].

Contudo, praticamente todo o material de coletas realizadas no Brasil, foi enviado para especialistas estrangeiros. Desta maneira, atualmente, grande parte do material de referência para estudos dessa biodiversidade encontra-se fora do país [17]

## 6. Atividades biológicas dos produtos da biotransformação

Biotransformações são reações químicas realizadas por um agente biológico, onde ocorre a conversão de um substrato, sendo esta, na maioria das vezes uma substância orgânica, em um ou mais produtos através de catalisadores enzimáticos [35]. A biotransformação é uma combinação de reações bioquímicas para transformar as estruturas dos compostos orgânicos ou sintéticos, utilizando microrganismos e/ou suas enzimas isoladas, desenvolvendo a quimiodiversidade [36].

A biotransformação pode ser, então, compreendida como um conjunto de alterações químicas (ou estruturais) que as substâncias sofrem no organismo, geralmente, ocasionadas por processos enzimáticos, com o objetivo de formar derivados mais polares e mais hidrossolúveis. São capazes de catalisar a transformação do substrato num único passo [37].

Estratégias biotecnológicas para a produção de flavonóides têm atraído um interesse considerável porque permitem produzir novos flavonóides que não existem na natureza. A biotransformação é uma estratégia alternativa com grande potencial para produzir novos flavonóides bioativos [38].

A biotransformação é uma abordagem poderosa para modificar as estruturas naturais e produzir bioativos de flavonóides e de outras classes de substâncias. Produtores microbiológicos

naturais apresentam vantagens, por exemplo, crescendo rapidamente, facilidade de produção em larga escala, favorável ao meio ambiente e livre de solventes. Além disso, a biotransformação melhora a seletividade dos produtos naturais sem quaisquer produtos químicos tóxicos. A aplicação de microrganismos para a biotransformação de chalconas, por exemplo, pode formar muitos novos flavonoides, por meio de ciclização, hidroxilação, redução, metilação e reações de desidrogenação. Cepas de *Cunninghamella*, *Penicillium* e *Aspergillus* são muito populares para converter flavonóides e eles podem executar quase todas as reações com excelentes rendimentos, tais como hidroxilação, desidroxilação, O-metilação, O-desmetilação, glicosilação, desglicosilação, desidrogenação, hidrogenação, ciclização e redução [39].

Os microrganismos são fontes de substâncias bioativas usadas na medicina e na agricultura e por isso, esforços têm sido feitos na busca por esses metabólitos. Tais microrganismos são cultiváveis e o cultivo por processos submersos podem ser otimizados, levando ao aumento na produção de substâncias bioativas potencialmente úteis como fármacos [40].

O uso de microrganismos para o estudo do metabolismo foi intensificado a partir da década de 70 quando o Modelo Microbiano do Metabolismo Animal foi proposto. Desde então, tanto bactérias como fungos tem sido utilizados para mimetizar o metabolismo de xenobióticos em mamíferos. Isso porque tais microrganismos possuem sistemas de enzimas metabolizadoras semelhantes àquelas presentes nos sistemas de mamíferos, os citocromos P450 [41]. Conseqüentemente, o metabolismo de xenobióticos em ambos os sistemas resulta com frequência nos mesmos metabólitos, e por isso recebem a denominação - Modelo Microbiano. Tal modelo é comumente empregado de forma alternativa e complementar no estudo do metabolismo

de fármacos, visto que não requer uso de animais de laboratório, as culturas são de fácil manuseio e baixo custo, além das reações ocorrem em condições brandas de pH e temperatura [42].

Muitos microrganismos têm sido utilizados em processos de biotransformação de produtos naturais, originando metabólitos já conhecidos ou novos metabólitos. Estas moléculas podem ser substratos para semi-síntese e como vantagem, obter produtos mais específicos e poucos efeitos secundários com a geração de resíduos químicos [43].

Biotransformações microbianas se constituem um poderoso arsenal em face na não exigência de condições de pH e temperatura extremos, da diminuição de resíduos tóxicos e obtenção de produtos de maneira mais rápida e em quantidades suficientes para identificação e estudos farmacológicos, em comparação a métodos químicos [44].

Como limitações do modelo microbiano citam-se a necessidade de realização de triagem das cepas, de adequação das condições reacionais e a dificuldade de extração dos compostos isolados quando há grande número de metabólitos formados ocasionando um rendimento diminuído. Dentre esses microrganismos, os endofíticos (vivem no interior do seu hospedeiro) são capazes de produzir uma variedade de metabólitos secundários com atividades biológicas [45,46]. Associado a isso, podemos descrever o gênero *Guignardia*, que ainda é pouco explorado quanto a sua diversidade metabólica. Esse gênero apresenta-se como uma importante fonte de produtos naturais a ser explorada na medicina, agricultura e indústria, pois possui atividade antifúngica e bactericida, cujo principal metabólito derivado é o ácido guignardico [17], usado em composições farmacêuticas.

Os fármacos são compostos químicos estranhos ao organismo e que uma vez administrados podem ser eliminados inalterados ou

biotransformados em metabólitos mais polares. O estudo do metabolismo é um processo complexo que inclui questões relativas à estabilidade metabólica, identificação dos metabólitos, identificação da enzima envolvida e propriedades de inibição da enzima [47].

É importante conhecer o papel dos metabólitos, pois reações de biotransformação podem ser acompanhadas de vários eventos, tais como a formação de metabólitos quimicamente estáveis, desprovidos de atividades farmacológicas ou toxicológicas; geração de metabólitos químio-reativos os quais resultam em ação toxicológica. E ainda conduzir à formação de metabólitos quimicamente estáveis com atividade farmacológica [48,49].

O progresso no uso de enzimas e células inteiras na química orgânica sintética foi impulsionado pelos estudos em laboratórios acadêmicos e industriais sobre a utilização de microrganismos para modificar núcleos esteroidais. Com isso, promoveram a hidroxilação da ligação C–H não ativada da progesterona, realizando a bioconversão para 11  $\alpha$ -hidroxiprogesteronas pelo fungo *Rhizopus arrhizus* [50], como demonstrado na Figura 1.

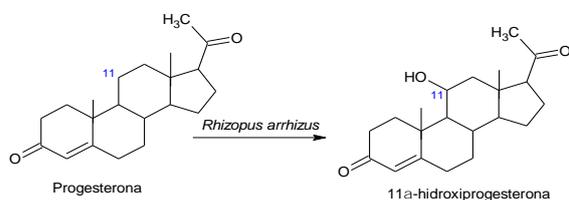


Figura 1. Biotransformação da Progesterona.

Os estudos de biotransformação de fármacos podem caracterizar metabólitos ativos ou novos intermediários úteis para a indústria farmacêutica. Cita-se como

exemplo a tioridazina, que sofre S-oxidação formando derivados sulfóxidos. A sulfoxidação do grupo tioetil forma o metabólito tioridazina-2-sulfóxido e a sulfoxidação no anel tiazina forma a tioridazina-5-sulfóxido. Posteriormente, a tioridazina e tioridazina-2-sulfóxido podem sofrer uma oxidação a sulfona e formar a tioridazina-2-sulfona, conforme demonstrado na Figura 2 [51, 52].

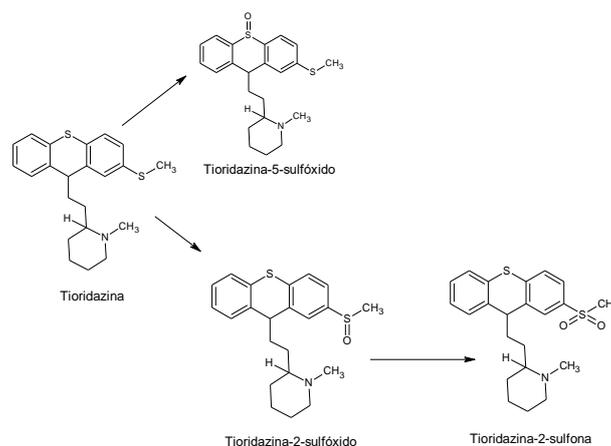


Figura 2. Biotransformação da Tioridazina e seus metabólitos.

## 7. Conclusão

Nesta revisão, gostaríamos de apresentar informações sobre o envolvimento ou utilização de ascomicetos em biotransformações, pois há poucos relatos dessa relação. A interseção de informações sobre características estruturais responsáveis por atividades biológicas e espécies de fungos capazes de ativar as estruturas pode ser extremamente útil para a geração de novos derivados com atividades biológicas aprimoradas. Um dos principais objetivos da química dos produtos naturais é o isolamento de moléculas com propriedades biológicas, com o desenvolvimento de novas estratégias para pesquisa de produtos naturais. A biotransformação representa o processo de segunda geração de escolha na

produção de moléculas pequenas com aplicações farmacêuticas. Avanços no campo da pesquisa de produtos naturais já permitem trabalhar com novas moléculas farmacologicamente ativas, criando moléculas para objetivos específicos.

**Agradecimentos:** Nós agradecemos a Coordenação de Aperfeiçoamento de Nível Superior - CAPES (Projeto PRO-Amazônia) e Universidade Federal do Amazonas – UFAM, pelo financiamento e suporte, respectivamente.

**Conflitos de interesse:** Os autores declaram que não há conflitos de interesse.

## Referências

1. Gibbs, P.A. Growth of filamentous fungi in submerged culture: problems and possible solutions. *Crit. Rev. Biotechnol* **2000**, 20 (1), 17–48.
2. Pandey, A.; Höfer, R.; Larroche, C.; Taherzadeh, M.J.; Nampoothiri, M. Industrial Biorefineries and White Biotechnology. *Elsevier* **2015**, USA.
3. Ferreira, J.A.; Lennartsson, P.R.; Taherzadeh, M.J. Production of ethanol and biomass from thin stillage by *Neurospora intermedia*: a pilot study for process diversification. *Eng. Life Sci.* **2015**.
4. Sharma, R.K.; Arora, D.S. Fungal degradation of lignocellulosic residues: an aspect of improved nutritive quality. *Crit. Rev. Microbiol.* **2015**, 41 (1), 52–60.
5. Jabasingh, S.A.; Nachiyar, C.V. Utilization of pretreated bagasse for the sustainable bioproduction of cellulase by *Aspergillus nidulans* MTCC344 using response surface methodology. *Ind. Crops Prod.* **2011**, 34 (3), 1564–1571.
6. Strobel, G.A. Endophytes as sources of bioactive products. *Microbes Infect.* **2003**, 5:535-544.
7. Araújo, K. C. F. et al. Bioconversion of quercetin and rutin and the cytotoxicity activities of the transformed products. *Food and Chemical Toxicology* **2013**, 51(1), 93–96.
8. Faber, K. *Biotransformations in organic chemistry*. 3. ed. Germany: Springer-Verlag, p. V, **1997**.
9. Sweers, H.M.; Wong, C. H. (1986). In: FÁBER, K. *Biotransformations in organic chemistry*. 3". ed. Germany: Springer-Verlag. **1997**, p.4.
10. Demirjian, D.; Shah, P.; Morís-Varas, F. Screening for Novel Enzymes. *Biocatalysis - From Discovery to Application* **1999**, v. 200, p. 1–29.
11. Wang, J. et al. Enhancement of the selective enzymatic biotransformation of rutin to isoquercitrin using an ionic liquid as a co-solvent. *Bioresource Technology* **2013**, v. 128, p. 156–163.

12. Taylor, John W., Joey Spatafora, and Mary Berbee. *Ascomycota. Sac Fungi*. **2006**, Version 09 October 2006. (<http://tolweb.org/Ascomycota/20521/2006.10.09>)
13. Webster J.; Weber R. W. S. *Introduction to Fungi*. **2007**, 3th ed. p. 229
14. Ribeiro Da Silva, R.; Coelho, G. D. Fungos: Principais grupos e aplicações biotecnológicas. Curso de Capacitação de Monitores e Educadores, Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade Vegetal e Meio Ambiente, São Paulo, 2006, 20p.
15. Souza, A.Q.L. et al. Atividade antimicrobiana de fungos endofíticos isolados de plantas tóxicas da Amazônia: *Palicourea longiflora* (Aubl.) rich e *Strychnos cogens* bentham. *Acta Amazônica* **2004**, 34(2), 185-95.
16. Forzza RC, et al. *Catálogo das Plantas e Fungos do Brasil*, **2010**. 2 vols. Andrea Jakobsson Estúdio e Rio de Janeiro Botanical Garden.
17. Rodrigues-Heerklotz, K.F.; Pfenning, L. - *Diversidade no Reino Fungi: Ascomycota – Ascomycetos*.
18. Raven, P. H., Evert, R. F., Eichhorn, S. E. *Biologia Vegetal*. **2007**, 7ª Edição. Guanabara Koogan. Cap. 14, p. 286-289.
19. Borges, K.B.; Borges, W.D.S.; Pupo, M.T. et al. Endophytic fungi as models for the stereoselective biotransformation of thioridazine. *Appl Microbiol Biotechnol*. v. 77, p.669. 2007 doi:10.1007/s00253-007-1171-x
20. Hench, P. S. et al. The effect of a hormone of the adrenal cortex (17-hydroxy-11-dehydrocorticosterone: compound E) and of pituitary adrenocortical hormone in arthritis: preliminary report. *Annals of the rheumatic diseases*, v. 8, n. 2, p. 97–104, 1949.
21. Peterson, D. H.; Murray, H. C.; S. Eppstein, H.; Reineke L. M., Weintraub, A; Meister P. D.; Leigh.H. M. Microbiological Transformations of Steroids. I. Introduction of Oxygen at Carbon-11 of Progesterone. *J. Am. Chem. Soc.* n. 74, v. 23, p. 5933–5936, 1952. DOI: 10.1021/ja01143a033.
22. Viala, P.; Ravaz, L. Sur la dénomination botanique (*Guignardia bidwellii*) du black-rot. *Bulletin de la Société Mycologique de France*. n.8, p.63-63, 1892.
23. Sivanesan, A. The Bitunicate Ascomycetos and their anamorphs. [s.l: s.n.].
24. Possiede, Y. M. Yvelise Maria Possiede. ESTUDOS MORFOLÓGICOS e GENÉTICOS em *Guignardia* spp e *Phyllosticta*. Tese de doutorado. Univerisade Federal do Paraná, 2004.
25. RODRIGUES-HEERKLOTZ, KATIA F., DRANDAROV, K., HEERKLOTZ, J., HESSE, M. AND WERNER, C. Guignardic Acid, a Novel Type of Secondary Metabolite Produced by the Endophytic Fungus *Guignardia* sp.: Isolation, Structure Elucidation, and Asymmetric Synthesis. *HCA*, v.84, p. 3766–3772, 2002. doi:10.1002/1522-2675(20011219)84:12<3766::AID-HLCA3766>3.0.CO;2-Z

26. WANG, F.-W., YE, Y.-H., DING, H., CHEN, Y.-X., TAN, R.-X. AND SONG, Y.-C. Benzophenones from *Guignardia* sp. IFB-E028, an Endophyte on *Hopea hainanensis*. *Chemistry & Biodiversity*. n. 7, p. 216–220, 2010. doi: 10.1002/cbdv.200800353
27. Calhoun L. A., Findlay J. A., David Miller J., Whitney N. J. (1992). Metabolites toxic to spruce budworm from balsam fir needle endophytes. *Mycol. Res.* 96, 281–286. doi:10.1016/S0953-7562(09)80939-8
28. XIA, X. K.; HUANG, H. R.; SHE, Z. G.; CAI, J. W.; LAN, L.; ZHANG, J. Y.; FU, L. W.; VRIJMOED, L. L. P.; LIN, Y. C. Structural and biological properties of vermistatin and two new vermistatin derivatives Isolated from the marine-mangrove endophytic fungus *Guignardia* sp. No. 4382. *Helv. Chim. Acta*, Switzerland, v. 90, p. 1925-1931, 2007.
29. CAPELARI, M.; GUGLIOTTA, A. M. ; FIGUEIREDO, M. B. O estudo de fungos macroscópicos no Estado de São Paulo. In: JOLY, C. A. ; BICUDO, C. E. M (Eds.). *Biodiversidade do Estado de São Paulo*. São Paulo: FAPESP, 1998. p. 9-35.
30. Hawksworth, D.L., Sutton, B. C. & Ainsworth, G. C. 1983. *Ainsworth & Bisby's Dictionary of the fungi*. 7. ed. Kew, Commonwealth Mycological Institute. 412p.
31. Hawksworth, D.L.; Kirk, P.M., Sutton, B.C. & Pegler, D.N. 1995. *Ainsworth & Bisby's Dictionary of the Fungi*. 8th. edn, CAB International, Wallingford, UK, 616 pp.
32. Marcelli, M.P. 2005. Checklist of Brazilian lichens. Publicação na Internet, pela Universität Hamburg - Institut für Allgemeine Botanik, dentro do programa South American Lichens Online, [http://www.rra.uni-hamburg.de/biologie/ialb/herbar/brazi\\_f2.htm](http://www.rra.uni-hamburg.de/biologie/ialb/herbar/brazi_f2.htm) (Acesso em: 11/2017).
33. HIBBETT, D. S. et al. A higher-level phylogenetic classification of the Fungi. *Mycological Research*. Londres, v.111, 2007.
34. DIANESE, J.C., MEDEIROS, R.B. & SANTOS, L.T.P. Biodiversity of microfungi found on native plants of the Brazilian Cerrado. In: Kevin D. Hyde (Ed.). *Biodiversity of Tropical Microfungi*. Hong Kong University Press. 1997. pp. 367-417.
35. DEMIRJIAN, D.; SHAH, P.; MORÍS-VARAS, F. Screening for Novel Enzymes. *Biocatalysis - From Discovery to Application*, v. 200, p. 1–29, 1999.
36. ALFARRA, H. Y.; OMAR, M. N. Microbial Transformation of Natural Products. *Greener Journal of Biological Sciences*, v. 3 (10), p. 357–364, 2013.
37. MÜLLER, M. *Practical Biotransformations. A Beginner's Guide*. Postgraduate Chemistry Series. By Gideon Grogan. *Angewandte Chemie International Edition*, 19 out. 2009.
38. BARTMAŃSKA A, TRONINA T, HUSZCZA E. Biotransformation of the phytoestrogen 8-prenylnaringenin. *Z Naturforsch C*.v.65, p:603-606, 2010.
39. CAO, H. et al. Microbial biotransformation of bioactive flavonoids. *Biotechnology Advances*, v. 33, n. 1, p. 214–223, 2015.

40. A. A. LESLIE GUNATILAKA. No Title Natural Products from Plant-associated Microorganisms: Distribution, Structural Diversity, Bioactivity, and Implications of Their Occurrence. *J Nat Prod.*, v. 69(3), p. 509–526, 2006.
41. SMITH, R. V., ROSAZZA, J. P., Microbial models of mammalian metabolism, *J.Nat.Prod.*, 46, 79-91, 1983.
42. AZERAD, R. Microbial models for drug metabolism. In: *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, ed. K. Faber, T. Scheper, p. 169-218. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag, 1999.
43. MANOSROI, J., ABE, M., AND MANOSROI, A. Biotransformation of steroidal drugs using microorganisms screened from various sites in Chiang Mai, Thailand. *Bioresource Technol.* v. 69, pp. 67–73, 1999.
44. RATHBONE, D.A.; BRUCE, N.C. Microbial transformation of alkaloids. *Curr Opin Microbiol* 5:274–281, 2002.
45. MASUREKAR, P. S. Therapeutic Metabolites. In “*Fungal Biotechnology*” pp. 241-302. 1992.
46. WEBER, R. W. S. et al. Anti- *Candida* metabolites from endophytic fungi. *Phytochemistry*, v. 68, n. 6, p. 886–892, 2007.
47. BRAGA, R. C., Alves, V. M., FRAGA, C. A. M., Barreiro E. J., Oliveira, O., Andrade C. H. Combination of docking, molecular dynamics and quantum mechanical calculations for Metabolism prediction of 3,4-Methylenedioxybenzoyl-2-thienylhydrazone. *Journal of Molecular Modeling*, v. 18, n. 5, p. 2065-2078, 2012
48. FURA, A. Role of pharmacologically active metabolites in drug discovery and development. *Drug Discovery Today*, v 11, n 3-4, p.133-142, 2006.
49. TURPEINEN, M., Korhonen, L. E., TOLONEN, A., USITALO, J., Juvonen, R., Raunio, H., PELKONEN, O. Cytochrome P450 (CYP) inhibition screening: Comparison of three tests. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 29, p.130-138, 2006.
50. PETERSON, D. H.; MURRAY, H. C. Microbial oxygenation of steroids at carbon 11. *Journal of the American Chemical Society*, v. 74, n. 7, p. 1871-1872, .
51. ZEHNDER, K.; KALBERER, F.; KREIS, W.; RUTSCHMANN, J. Metabolism of thioridazine (Mellaril) and one of its pyrrolidine analogues in the rat. *Biochemical Pharmacology*, v.11, n. 7, p.535-550, 1962.
52. GRUENKE, L. D.; CRAIG, J. C. Identification of a metabolite of thioridazine and mesoridazine from human plasma. *Research Communications in Chemical Pathology & Pharmacology*, v. 10, n. 2, p. 221-225, 1975.