



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ
CENTRO DE CIÊNCIAS DA NATUREZA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

**ESTUDO DE BIOTRANSFORMAÇÕES ENANTIOSELETIVAS A PARTIR DE
MICRO-ORGANISMOS DO SOLO DA CAATINGA PIAUIENSE**

ESPEDITO DE SOUSA SARAIVA

Teresina - PI

2018

ESPEDITO DE SOUSA SARAIVA

**ESTUDO DE BIOTRANSFORMAÇÕES ENANTIOSELETIVAS A PARTIR DE
MICRO-ORGANISMOS DO SOLO DA CAATINGA PIAUIENSE**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal do Piauí – UFPI, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Química.

Área de concentração: Química Orgânica

Orientadora: Prof.^a Dra. Chistiane Mendes Feitosa

Co-orientadora: Prof^a Dra. Lidiane da Silva Araújo

Teresina - PI

2018

FICHA CATALOGRÁFICA

Serviço de Processamento Técnico da Universidade Federal do Piauí Biblioteca
Setorial do CCN

S243e Saraiva, Espedito de Sousa.

Estudo de biotransformações enantiosseletivas a partir de micro-organismos do solo da caatinga piauiense / Espedito de Sousa Saraiva. – Teresina, 2018.

106f. il. color

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Piauí, Centro de Ciências da Natureza, Pós-Graduação em Química, 2018.

Orientadora: Profa. Dra. Chistiane Mendes Feitosa.

Co-orientadora: Profa. Dra. Lidiane da Silva Araújo.

1. Química Orgânica. 2. Biotransformação . 3. Micro-organismo. 4. Farmacologia I. Título

CDD 547

ESPEDITO DE SOUSA SARAIVA

**ESTUDO DE BIOTRANSFORMAÇÕES ENANTIOSELETIVAS A PARTIR DE
MICRO-ORGANISMOS DO SOLO DA CAATINGA PIAUIENSE**

Defesa de Dissertação submetida à Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal do Piauí, como um dos requisitos para a o grau de mestre em Química.

Aprovada em 26/04/2018

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Chistiane Mendes Feitosa – (Orientadora)

Prof^a. Dr^a. – Allana Kellen Lima Santos Pereira (Examinador Externo)

Prof^a. Dr^a. Samya Danielle L. Freitas

DEDICATÓRIA

À Deus primeiramente, pois sem ele não teria conseguido forças para continuar.

Aos meus pais e meu irmão pelo incentivo e sinceridade.

À minha vó Chica, que sempre me impulsiona para continuar adiante.

Aos meus amigos que estiveram sempre ao meu lado em todos os momentos.

À minha querida orientadora e coorientadora, que desde o começo da pesquisa depositaram sua confiança, me incentivaram e me deram suporte.

AGRADECIMENTOS

*Primeiramente a Deus, pois sem a fé que tenho nele nenhum de meus esforços seriam possíveis, em seguida aos meus pais **Maria Delzuita de Sousa Saraiva e Benedito Rodrigues Saraiva** e ao meu irmão **Thiago**, à minha cunhada **Joelma** e meus sobrinhos queridos **Guilherme e Maria Emanuelle**, e minha **Vó Chica** por conviverem ao meu lado, por ajudarem e incentivarem sempre.*

*Agradeço à minha orientadora professora **Chistiane Mendes Feitosa** e coorientadora professora **Lidiane da Silva Araújo** pelo aprendizado e pelo direcionamento na minha carreira da pesquisa científica. Muito obrigado!*

*Agradeço também aos colegas de laboratório do **LPNNEX**, **Ana Paula, Felipe, Antônio, Ronaldo, Layana, Suyanne** e aos que eu não me lembrei de citar por estarem sempre presentes nesta jornada.*

*Ao suporte feito pelo **CNPq, FAPEPI e CAPES**, pelo apoio financeiro, onde as pesquisas foram financiadas através de recursos conseguidos por aprovação de projeto.*

*Meus respeitosos agradecimentos aos professores que engrandeceram minha bagagem cognitiva e minha pesquisa repassando seus conhecimentos adquiridos e pela contribuição da professora **Allana Kellen Lima Santos** que muito me incentivou a continuar meus estudos e a professora **Mitra Mobin**.*

Meu muito obrigado a quem esteve comigo e quem colaborou indiretamente em todos os aspectos da vida. Por fim, agradeço em especial àqueles que sempre me apoiaram incondicionalmente, que apostaram em mim mais do que ninguém e que seguramente são os que mais compartilham da minha alegria.

Que eu nunca finalize a busca pelo aprendizado e evolução pessoal e profissional...

“A verdadeira motivação vem de realização, desenvolvimento pessoal, satisfação no trabalho e reconhecimento.”

Frederick Herzberg

SUMÁRIO

	PÁG
RESUMO	
ABSTRACT	
1 Introdução	10
2 Objetivos	12
2.1 Objetivos Gerais	12
2.2 Objetivos Específicos	12
Referências	13
CAPÍTULO I	15
RESUMO	16
ABSTRACT	17
1 INTRODUÇÃO	18
2 REVISÃO DE LITERATURA	19
2.1 <i>Caatinga</i>	19
2.2 <i>Química Verde e Biocatálise</i>	20
2.3 <i>Vantagens e Desvantagens da Biocatálise</i>	23
2.3.1 <i>Vantagens</i>	23
2.3.2 <i>Desvantagens</i>	24
2.4 <i>Enzimas</i>	25
2.5 <i>Oxidoredutases</i>	27
2.6 <i>ADH E suas aplicações</i>	29
3 PARTE EXPERIMENTAL	31
3.1 EQUIPAMENTOS E MATERIAIS	31
3.2 MICRO-ORGANISMOS	32
3.2.1 <i>Isolamento de micro-organismos do solo da Caatinga piauiense</i>	32
3.2.2 <i>Avaliação do espectro de atividade enzimática enantiosseletiva de micro-organismos</i>	33
3.2.3 <i>Análise das reações de biocatálise</i>	34
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	34
4.1 <i>Coleta de solo</i>	34
4.2 <i>Avaliação da atividade enzimática dos micro-organismos</i>	37
4.2.1 <i>biorredução da 4-metilacetofenona</i>	37
4.2.2 <i>Avaliação da atividade enzimática dos fungos da Caatinga piauiense em biorredução da 4-metilacetofenona</i>	39
5 CONCLUSÃO	40
REFERÊNCIAS	41
CAPÍTULO II	46
RESUMO	47
ABSTRACT	48
1 INTRODUÇÃO	49
2 METODOLOGIA	50

3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	50
3.1	<i>3.1. Principais metabólitos encontrados em fungos</i>	50
3.2	<i>3.2. Alcaloídes</i>	51
3.3	<i>3.3. Esteróides</i>	56
3.4	<i>3.4. Terpenos</i>	61
3.5	<i>3.5. Quinonas</i>	64
3.6	<i>3.6. Flavonóides</i>	68
	<i>ATIVIDADES FARMACOLÓGICAS APRESENTADAS POR FUNGOS.</i>	
3.7	69
4	CONSIDERAÇÕES E PERSPECTIVAS	70
	REFERÊNCIAS	71
	CAPÍTULO I	76
	RESUMO	77
	ABSTRACT	78
1	Introdução	79
2	<i>ENSAIOS IN VITRO</i>	79
2.1	<i>Ensaio radical DPPH</i>	79
2.2	<i>Ensaio radical ABTS•+</i>	80
2.3	<i>Níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)</i>	82
2.4	<i>Atividade de superóxido dismutase (SOD)</i>	84
2.5	<i>Atividade da catalase (CAT)</i>	85
2.6	<i>Atividade da glutatona</i>	86
2.7	<i>Determinação da concentração de glutatona reduzida (GSH)</i>	87
2.8	<i>Glutatina Peroxidase (GSHPx)</i>	88
2.9	<i>Radical nitrito</i>	89
	REFERENCIAS	91
	ANEXOS	95

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

AA	Atividade antioxidante
ABTS	2,2-azinobis-(3-etil-benzotiazolin-6-ácido sulfônico)
ADH:	Álcool desidrogenase
Af	Absorção final
Ai	Absorção inicial
BHT	hidroxitolueno butilado
CAT	Catalase
CE	Concentração efetiva
CLAE-FR	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência em fase reversa
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DPPH:	2,2-difenil-1-picril-hidrazil
GO	glutaciona oxidase
GPx	Glutaciona peroxidase
GR	Glutaciona redutase
GSH	Glutaciona reduzida
GSHPx	Glutatina Peroxidase
GSSG	Glutaciona dissulfeto
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência
MDA	Malondialdeído
MCBE7	Meio de cultivo
NADH	Nicotinamida adenina dinucleótido
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
NED	N-(1-naftil)etilenodiamina
NPS	Nitroprussiato de sódio
ONOO	Ânion peroxinitrito altamente reativo
pH	Potencial hidrogênionico
PMS	metossulfato de fenazina
RNS	Espécies reativas de nitrogênio
SNC	Sistema nervoso central
SOD	Superóxido dismutase
TBA	Ácido tiobarbitúrico
TBARS	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
v/v	Razão volume/ volume
XOD	Xantina oxidase

OBS.: as abreviaturas e os símbolos utilizados neste trabalho e que não constam nesta relação, encontram-se descritas no texto ou são convenções adotadas universalmente.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

Figura 1	As faces do termo “reduzir” para a Química Verde.....	21
	Diagrama da coordenada de uma reação catalisada por enzima com	
Figura 2	uma reação não catalisada.....	26
Figura 3	Regeneração enzimática de cofatores.....	27
	Setores industriais em que os produtos de biotransformações industriais	
Figura 4	são usados.....	29
Figura 5	Oxidação de álcoois através de desidrogenases.	29
Figura 6	Mecanismo da redução promovida pelo NADH e NADPH.....	30
Figura 7	Reação de biorredução da Acetofenona.....	31
	Redução de 2-etil-1-fenilprop-2-en-1-ona adsorvida em Amberlite™	
Figura 8	XAD-7 por <i>P. Stipitis</i>	31
	Repique de micro-organismos em placas de Petri com auxílio de uma	
Figura 9	alça de platina.....	33
	Resumo da etapa de avaliação do espectro de atividade enzimática	
Figura 10	enantiosseletiva dos micro-organismos.....	34

CAPÍTULO 2

		PÁG.
Figura 1	Estruturas dos alcalóides isolados do fungo <i>Penicillium citrinum</i>	51
Figura 2	Estruturas dos alcalóides isolados do fungo <i>Hericium erinaceus</i>	52
Figura 3	Estruturas dos alcalóides isolados do fungo <i>Paecilomyces variotii</i>	53
	Estrutura de um alcalóide indólico de micro-organismos das raízes de	
Figura 4	<i>Nerium indicum</i>	53
Figura 5	Estruturas dos alcalóides isolados do fungo <i>Penicillium oxalicum</i>	54
Figura 6	Estruturas de compostos isolados de <i>Diaporthe phaseolorum</i> SKS019....	55
Figura 7	Estrutura do composto isolado de <i>Cordyceps sp</i>	56
	Estruturas dos esteróides isolados do fungo <i>Penicillium chrysogenum</i>	
Figura 8	QEN-24S.....	57
	Estruturas dos esteróides isolados do fungo <i>Hymenoscyphus</i>	
Figura 9	<i>pseudoalbidus</i>	58
Figura 10	Estruturas dos compostos isolados do fungo <i>Emericella varicolor</i>	60
Figura 11	Estruturas dos terpenos isolados do fungo <i>Aspergillus insuetus</i>	62
Figura 12	Estruturas dos compostos isolados do fungo <i>Hypoxylon rickii</i>	63
Figura 13	Estruturas dos compostos isolados do fungo <i>Ulocladium sp</i>	64
Figura 14	Principais esqueletos das quinonas.....	65
Figura 15	Estruturas das quinonas isolados do fungo do gênero <i>Streptomyces</i>	65
Figura 16	Estruturas das quinonas isolados do fungo do <i>Bipolaris sorokiniana</i>	66
Figura 17	Estruturas das quinonas isolados do fungo do <i>Alternaria tenuissima</i>	67
Figura 18	Estruturas das quinonas isolados do fungo do <i>Astrosphaeriella nypae</i>	68

CAPÍTULO 3

		PÁG.
Figura 1	Estrutura química do radical DPPH.....	80
Figura 2	Esquema da reação do ensaio com radical DPPH.....	80

Figura 3	Exemplo de esquema utilizando a reação com radical ABTS•+.....	82
Figura 4	Reação entre o ácido 2-tiobarbitúrico e MDA em condições ácidas.....	83
Figura 5	Atividade enzimática da SOD e CAT.....	84
Figura 6	Reação de inibição da SOD com a produção de radicais pela xantina.....	85
Figura 7	Interconversão da glutathione nas formas reduzida (GSH) e oxidada (GSSG) pela ação da enzima glutathione peroxidase (GSH-Px), glutathione oxidase (GO) e glutathione reductase (GR).....	87
Figura 8	Reação enzimática do DTNB e do produto da sua redução.....	88
Figura 9	Reação colorimétrica de Griess formando um diazo a 540 nm.....	90

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

Tabela 1	Bactérias isoladas de amostras de solo.....	34
Tabela 2	Fungos isolados de amostras de solo.....	36
Tabela 3	Avaliação da atividade enzimática de bactérias na redução da 4-metilacetofenona.....	37
Tabela 4	Avaliação da atividade enzimática dos fungos na redução da 4-metilacetofenona.....	39

SARAIVA, E.S; ARAÚJO, L.S, FEITOSA, C.M. **Estudo de biotransformações enantiosseletivas a partir de micro-organismos do solo da Caatinga piauiense.** Programa de Pós-graduação em Química. Centro de Ciências da Natureza. Departamento de Química, UFPI, 2018.

RESUMO

A enorme biodiversidade do Brasil explica o enorme potencial para a descoberta de medicamentos baseados em produtos naturais, assim os micro-organismos (bactérias e fungos), por exemplo, estão relacionados à produção de várias micromoléculas bioativas para fins de interesse farmacológico e como novos biocatalisadores. O presente trabalho teve como objetivo buscar estudar biotransformações enantiosseletivas a partir de micro-organismos isolados de amostras de solo da Caatinga piauiense direcionados para atividades farmacológicas. Os micro-organismos foram obtidos pelo processo de isolamento de amostras do solo coletadas nas cidades de Teresina e Campo Maior localizadas no estado do Piauí. A partir das amostras coletadas foram obtidas 10 amostras em Teresina e 10 amostras na Fazendinha, interior de Campo Maior. Dessas amostras foram isoladas um total de 64 colônias de micro-organismos, sendo 47 bactérias e 17 fungos. Testou-se a ação desses micro-organismos sobre o substrato 4-metilacetofenona. Os produtos foram analisados por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência para verificar a conversão do substrato em álcool. Realizamos a avaliação do espectro de atividade enzimática dos micro-organismos em reações de redução enantiosseletiva, e para isso empregamos um derivado *para*-substituído do (*R,S*)-1-(fenil)etanol. Das 47 bactérias testadas na biorredução da 4-metilacetofenona, 16 bactérias apresentaram oxirredutases que catalisaram a redução da cetona a seu correspondente (*R*) ou (*S*)-1-(4-metilfenil) etanol de moderada a elevadas concentrações (80 até >99%). Oito, dos 17 fungos testados na biorredução da 4-metilacetofenona, apresentaram oxirredutases que catalisaram a redução da cetona à seu correspondente álcool com elevada concentração do (*R*) ou (*S*)-1-(4-metilfenil)etanol (87-97%). Com destaque ao fungo FZFG5, cuja excelente concentração do álcool foi 97%. Foram identificados 3 fungos, dos quais através do microcultivo foi possível chegar-se as espécies *Curvularia clavata* Jain, *Aspergillus Níger* V. Tiegh e *Rhizopus oryzae* Went & Prinsen Geerlig.

Conclui-se que, em geral, os micro-organismos testados e com atividade enzimática apresentaram boa capacidade de redução do substrato 4-metilacetofenona em experimentos de biotransformação. Contribuindo assim para o conhecimento de espécies de micro-organismos com potencial biocatalítico e novas tecnologias.

Palavras-chave: Atividades farmacológicas, biotransformação, Caatinga, micro-organismos, oxirredutases.

SARAIVA, E.S; ARAÚJO, L.S, FEITOSA, C.M. **Study of enantioselective biotransformations from microorganisms in the Caatinga piauiense soil.** Graduate Program in Chemistry. Center of Natural Sciences. Department of Chemistry, UFPI, 2018.

ABSTRACT

The enormous biodiversity of Brazil explains the enormous potential for the discovery of medicines based on natural products, so microorganisms (bacteria and fungi), for example, are related to the production of several bioactive micro-molecules for pharmacological purposes and as new biocatalysts . The present work aimed to study enantioselective biotransformations from microorganisms isolated from soil samples from Caatinga piauiense aimed at pharmacological activities. The microorganisms were obtained by the process of isolation of soil samples collected in the cities of Teresina and Campo Maior located in the state of Piauí. From the collected samples were obtained 10 samples in Teresina and 10 samples in Fazendinha, interior of Campo Maior. From these samples, a total of 64 colonies of microorganisms were isolated, being 47 bacteria and 17 fungi. The action of these microorganisms on the substrate 4-methylacetophenone was tested. The products were analyzed by High Performance Liquid Chromatography to verify the conversion of the substrate into alcohol. We also performed the evaluation of the spectrum of enzymatic activity of the microorganisms in enantioselective reduction reactions, using a substituted derivative of (R, S) -1- (phenyl) ethanol. Of the 47 bacteria tested in the biorreduction of 4-methylacetophenone, 16 bacteria had oxirreductases that catalyzed the reduction of the ketone to its corresponding (R) or (S) -1- (4-methylphenyl) ethanol from moderate to high concentrations (80 to > 99 %). Eight of the 17 fungi tested in the biorreduction of 4-methylacetophenone presented oxirreductases that catalyzed the reduction of the ketone to its corresponding alcohol with a high concentration of (R) or (S)-1-(4-methylphenyl) ethanol (87-97%). With emphasis on FZFG5 fungus, whose excellent alcohol concentration was 97%. Three fungi were identified, from which the species *Curvularia clavata* Jain, *Aspergillus Niger* V. Tiegh and *Rhizopus oryzae* Went & Prinsen Geerligs were obtained through the microculture. It is concluded that, in general, the microorganisms tested and with enzymatic activity showed good ability to reduce the substrate 4-methylacetophenone in biotransformation experiments. Thus contributing to the knowledge of species of microorganisms with biocatalytic potential and new technologies. **Key words:** pharmacological activities, biotransformation, Caatinga, microorganisms, oxidoreductases.

1. INTRODUÇÃO

A enorme biodiversidade do Brasil explica o enorme potencial para a descoberta de medicamentos baseados em produtos naturais (COSTA-LOTUFO et al., 2010). Desta forma, as substâncias isoladas de micro-organismos, por exemplo, estão relacionados à produção de diversidade de micromoléculas ativas com grande potencial biológico, e responsáveis por 10% de todos os compostos bioativos conhecidos. Algumas classes químicas obtidas destes seres incluem: alcaloides, esteroides, terpenoides, isocumarinas, quinonas, ligninas, fenóis, lactonas, flavonoides, peptídeos, xantonas dentre outras (OLIVEIRA & OLIVEIRA, 2012; SANTOS; VARAVALLO, 2011).

Há muito tempo sabe-se do potencial dos micro-organismos como fonte de novos agentes terapêuticos (SOUZA et al., 2007) associado ao aspecto de já terem sido isolados diversos metabólitos secundários com importantes propriedades farmacológicas (BARREIRO; BOLZANI, 2009). Estes, quando comparados com animais e plantas, são considerados ótimas fontes renováveis e reprodutíveis (LAM KS, 2007). A partir destes organismos, ocorreu um grande avanço nas áreas dos antibióticos, imunossuppressores e medicamentos antineoplásicos (CHAPLA; BIASSETO; ARAÚJO., 2012). Com inúmeras pesquisas desenvolvidas sobre produtos naturais extraídos destes indivíduos no mundo foi possível compreender fenômenos complexos. Assim, os produtos naturais são relevantes, pois são usados como matéria-prima na síntese de moléculas complexas de interesse farmacológico (CALIXTO, 2003).

O interesse por substâncias enantiomericamente puras tem se intensificado no sentido de se estabelecer rotas enantiosseletivas devido à sua importância em indústrias farmoquímicas, de alimentos, na agricultura e inclusive na área de novos materiais, tais como polímeros e cristais líquidos quirais. Como tal, as enzimas, os receptores e outras moléculas ligantes têm capacidade de distinguir enantiômeros. O uso de enzimas como catalisadores de importantes reações químicas para a produção de pequenas moléculas quirais, através da biotransformação, por exemplo, é um assunto que vem chamando atenção da comunidade científica e industrial (BRAGA et al., 2013; MASSI; CERRUTTI; QUEIROZ, 2013; RIBEIRO et al., 2016).

A biotransformação ou biocatálise consiste no uso de catalisadores naturais, as enzimas, para realizar transformações químicas em compostos orgânicos. As enzimas têm ações catalisadoras bastantes eficientes quanto ao relacionado aumento de velocidade e a sua ligação do substrato à enzima (PRICE, 2001; LEHNINGER 2000). A princípio, todos os seres

vivos são fontes de biocatalisadores e as enzimas presentes podem ser utilizadas nos mais diversos tipos de reações orgânicas (BARROS, 2010; OMORI, PORTAS & OLIVEIRA, 2012). As vantagens de se utilizar organismos vivos como biocatalisadores são a sua fácil eliminação após o uso, pois são biodegradáveis com leves condições de reações, bem como a sua ampla disponibilidade a baixo custo (BOHMAN et al., 2009).

Na síntese de compostos, utiliza-se a técnica de biocatálise como sendo um dos campos mais promissores dentro das novas tecnologias. A grande versatilidade de reações catalisadas, condições brandas de reação, natureza regio, quimio e enantiosseletiva são algumas das vantagens da relevância do uso de enzimas em biocatálise (CARVALHO, 2005; FABER, 2011, DALLA,VECCHIA, 2004). De acordo com Bertini (2012) recentemente, plantas e micro-organismos foram utilizados diretamente como biocatalisadores em fontes de redutase atividade com sistemas de álcool desidrogenase, como *Daucus carota*, *Saccharum officinarum*, *Passiflora edulis*, *Cocos nucifera*, *Lentinus strigellus* e *Candida tropicalis*.

As modificações específicas da estrutura molecular de uma substância catalisada através da biocatálise envolvem meios biológicos, como células íntegras e/ou imobilizadas, enzimas ou seus extratos e micro-organismos (DIAS et.al., 2012). Dessa maneira, a grande diversidade e número de enzimas disponíveis na natureza é a base teórica da utilização de biocatálise em transformações orgânicas. Esta área é vasta e dispõe de uma variedade de conhecimentos envolvendo desde técnicas microbiológicas até análises cromatográficas e identificação espectrométrica dos produtos formados (OLIVEIRA & OLIVEIRA, 2012).

Nesse contexto sobre as pesquisas de novos biocatalisadores promissores e sabendo-se da carência de estudos sobre biomoléculas ativas presentes em espécies do meio ambiente desse bioma exclusivamente brasileiro, neste trabalho buscam-se estudar biotransformações enantiosseletivas a partir de micro-organismos isolados de amostras de solo da Caatinga piauiense direcionados para aplicações farmacológicas.

2. OBJETIVOS

Gerais

-Realizar estudo de biotransformação para busca de álcool desidrogenases de origem microbiana, isolados de amostras de solo, para aplicação em reações de biorredução enantiosseletiva bem como identificar os micro-organismos isolados do solo da Caatinga piauiense.

Específicos

- Produzir uma revisão de literatura sobre os micro-organismos e seus compostos bioativos.
- Realizar coletas de amostras de solo da Caatinga piauiense.
- Realizar o isolamento de micro-organismos com a atividade enzimática desejada, álcool desidrogenase.
- Analisar e avaliar o espectro de atividade enzimática dos micro-organismos isolados.
- Contribuir para o acesso à técnicas antioxidantes e fornecer pressupostos para outras atividades farmacológicas
- Verificar os melhores resultados da atividade enzimática.
- Identificar os micro-organismos isolados de amostras do solo da caatinga piauiense.

REFERÊNCIAS

- BARREIRO, E.J.; BOLZANI, V. S. Biodiversidade: fonte potencial para a descoberta de fármacos. **Química Nova**, Rio de Janeiro, v. 32, n. 3, p.679-688, jan. 2009.
- BARROS, M. R. A. Biocatálise em Solvente orgânico: ensino em biotecnologia. **Boletim da Sociedade portuguesa de Biotecnologia**. n.72. p.1-2, 2002.
- BERTINI, L. M.. Soybean (Glycine max) as a versatile biocatalyst for organic synthesis. **African Journal of Biotechnology**, Fortaleza, v. 11, n. 30, p.7766-7770, 12 abr. 2012.
- BOHMAN, B.; CAVONIUS, L. R.; UNELIUS, C. R.. Vegetables as biocatalysts in stereoselective hydrolysis of labile organic compounds. **Green Chemistry**, [s.l.], v. 11, n. 11, p.1900-1905, set. 2009.
- BRAGA, A. L. et al... Catálise assimétrica no Brasil: desenvolvimento e potencialidades para o avanço da indústria química brasileira. **Química Nova**, Florianópolis, v. 36, n. 10, p.1591-1599, 2013.
- CALIXTO, J. B.. Biodiversidade como fonte de medicamentos. **Ciência e Cultura**, São Paulo, p.37-39, set. 2003.
- CARVALHO, P. O. et al...Potencialde biocatáliseenantiosseletiva de lipases microbianas. **Química Nova**, São Paulo, Vol. 28, n. 4, p. 614-621, 2005.
- CHAPLA., V. M.; BIASSETO, C. R.; ARAÚJO., A. R.. Fungos Endofíticos: Uma Fonte Inexplorada e Sustentável de Novos e Bioativos Produtos Naturais. **Revista Virtual de Química**, Araraquara, v. 3, n. 5, p.421-437, nov. 2012.
- COSTA-LOTUFO, L. V. et al... The Contribution of Natural Products as Source of New Anticancer Drugs: Studies Carried Out at the National Experimental Oncology Laboratory from the Federal University of Ceará. **Revista Virtual de Química**, Fortaleza, v. 2, n. 1, p.47-58, 2010.
- DALLA -VECCHIA, R.; NASCIMENTO, M. G.; SOLDI, V. Aplicações sintéticas de lipases imobilizadas em polímeros.**Química Nova**, v. 27, n. 4, p.623-630, ago. 2004.
- DIAS, F. R. F; FERREIRA, V. F.; CUNHA, A. C.Uma Visão Geral dos Diferentes Tipos de Catálise em Síntese Orgânica. **Revista Virtual de Química**, Rio de janeiro, v.4, n.6, p.840-871, 2012.
- FABER, K. Biotransformations in Organic Chemistry: A Textbook. 6ed. Berlin: Springer-Verlag, 2011.
- LAM KS. New aspects of natural products in drug discovery. *Trends Microbiol* 2007;15:279-89.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. Principles of biochemistry. 3 ed. New York: Woth, 2000. 1152 p.

MASSI, L.; CERRUTTI, B. M.; QUEIROZ, S. L. Metodologia de ensino jigsaw em disciplina de química medicinal. **Química Nova**, São Carlos, v. 36, n. 6, p.897-904, 2013.

OLIVEIRA, K. B.; OLIVEIRA, B. H.. Obtenção de substâncias bioativas através da biotransformação de produtos naturais. **Revista Eletrônica de Farmácia**, [s.l.], v. 9, n. 1, p.89-99, 1 abr. 2012.

OMORI, A. T.; PORTAS, V. B.; OLIVEIRA, C. S.Redução enzimática do 4-(dimetilamino) benzaldeído com pedaços de cenoura (*Daucuscarota*): um experimento simples na compreensão da biocatálise. **Química Nova**, São Paulo, Vol. 35, No. 2, p.435-437, 2012.

PRICE, N. C.; DWEK, R. A.; RATCLIFFE, R. G.; WORMALD, M. R. Principles and Problems in Physical Chemistry for Biochemists, 3rd ed., Oxford University Press, 2001.

SANTOS, T. T.; VARAVALLO, M. A. Aplicação de micro-organismos endofíticos na agricultura e na produção de substâncias de interesse econômico. **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde**, Paraná, v. 32, n. 2, p.199-212, 12 dez. 2011.

SOUZA, M. V. N. et al... Produtos Naturais em Fase Avançada de Testes Clínicos no Tratamento contra o Câncer. **Estado da Arte**, Rio de Janeiro, v. 2, n. 3, p.25-42, jun. 2007.



**CAPÍTULO I – BIOTRANSFORMAÇÕES ENANTIOSSELETIVAS
ATRAVÉS DE OXIRREDUTASES PROVENIENTES DE MICRO-
ORGANISMOS DA CAATINGA PIAUIENSE**

**BIOTRANSFORMAÇÃO ENANTIOSSELETIVA ATRAVÉS DE
OXIRREDUTASES PROVENIENTES DE MICRO-ORGANISMOS
DA CAATINGA PIAUIENSE**

Espedito de S. Saraiva^a, Ana Paula^b, Lidiane S. Araújo^b, Chistiane M. Feitosa^b

^a Programa de Pós-Graduação em Química, Universidade Federal do Piauí, 64.049-550
Teresina – PI, Brasil

^b Departamento de Química, Universidade Federal do Piauí, 64.049-550 Teresina – PI, Brasil

RESUMO

Os micro-organismos são alvos de inúmeras pesquisas biotecnológicas, principalmente aqueles que são pouco estudados, sobre a diversidade microbiana, no sentido de isolar, caracterizar e produzir biomoléculas com elevado potencial biotecnológico. Os micro-organismos empregados como biocatalisadores surgem como uma opção ecologicamente correta para obtenção dos mesmos produtos, isto é, sem agredir o meio ambiente (sustentabilidade ambiental). Os micro-organismos foram obtidos pelo processo de isolamento de amostras do solo coletadas nas cidades de Teresina e Campo Maior localizadas no estado do Piauí. A partir das amostras coletadas foram coletas 10 amostras em Teresina e 10 amostras na Fazendinha, interior de Campo Maior. Dessas amostras foi isolado um total de 64 colônias de micro-organismos, sendo 47 bactérias e 17 fungos. Realizamos também a avaliação do espectro de atividade enzimática dos micro-organismos em reações de redução enantiosseletiva, e para isso empregamos um derivado *para* substituído do (*R,S*)-1-feniletanol. Das 47 bactérias testadas na biorredução da 4-metilacetofenona, 16 bactérias apresentaram oxirredutase que catalisaram a redução da cetona à seu correspondente (*R*) ou (*S*)-1-(4-metilfenil)etanol de moderada a elevadas concentrações (80 até >99%). Oito, dos 17 fungos testados na biorredução da 4-metilacetofenona, apresentaram oxirredutases que catalisaram a redução da cetona à seu correspondente álcool com moderada a elevada concentração do (*R*) ou (*S*) 1-(4-metilfenil)etanol (87-97%). Com destaque ao fungo FZFG5, cuja a excelente concentração do álcool foi 97%. Foram identificados 3 fungos, dos quais através do microcultivo foi possível chegar-se as espécies *Curvularia clavata* Jain, *Aspergillus Níger* V. Tiegh e *Rhizopus oryzae* Went & Prinsen Geerlig. As perspectivas para este trabalho demonstram que a utilização destes micro-organismos pode ser realizada em experimentos de biorredução e atividades farmacológicas com outros substratos, bem como para conhecimento de espécies biológicas com potencial biocatalisador sendo assim importantes para o conhecimento da biodiversidade dos micro-organismos em processos de bioprospecção.

Palavras-chave: álcool desidrogenases, biotransformação, Caatinga, micro-organismos, oxirredutases.

**BIOTRANSFORMAÇÃO ENANTIOSSELETIVA THROUGH
OXIRREDUTASES FROM MICROORGANISMS OF THE SOIL OF CAATINGA
PIAUIENSE**

Espedito de S. Saraiva^a, Ana Paula^b, Lidiane S. Araújo^b, Chistiane M. Feitosa^b

^aPrograma de Pós-Graduação em Química, Universidade Federal do Piauí, 64.049-550
Teresina – PI, Brasil

^bDepartamento de Química, Universidade Federal do Piauí, 64.049-550 Teresina – PI, Brasil

ABSTRACT

The microorganisms are the targets of numerous biotechnological researches, especially those that are little studied, on the microbial diversity, in the sense of isolating, characterizing and producing biomolecules with high biotechnological potential. The microorganisms used as biocatalysts appear as an ecologically correct option to obtain the same products, that is, without attacking the environment (environmental sustainability). The microorganisms were obtained by the process of isolation of soil samples collected in the cities of Teresina and Campo Maior located in the state of Piauí. From the collected samples were collected 10 samples in Teresina and 10 samples in Fazendinha, interior of Campo Maior. From these samples a total of 64 colonies of microorganisms were isolated, being 47 bacteria and 17 fungi. We also performed the evaluation of the spectrum of enzymatic activity of the microorganisms in enantioselective reduction reactions, using a substituted (R, S) -1-phenylethanol derivative. Of the 47 bacteria tested in the biorreduction of 4-methylacetophenone, 16 bacteria had oxirreductase that catalyzed the reduction of the ketone to its corresponding (R) or (S) -1- (4-Methylphenyl) ethanol from moderate to high concentrations (80 to > 99 %). Eight of the 17 fungi tested in the biorreduction of 4-methylacetophenone presented oxirreductases that catalyzed the reduction of ketone to its corresponding alcohol with moderate to high concentration of (R) or (S) 1- (4-methylphenyl) ethanol (91-97 %). With emphasis the fungus FZFG5, whose excellent alcohol concentration was 97%. Three fungi were identified, from which the species *Curvularia clavata* Jain, *Aspergillus Niger* V. Tiegh and *Rhizopus oryzae* Went & Prinsen Geerligs were obtained through the microculture. The prospects for this work demonstrate that the use of these microorganisms can be performed in bioreduction experiments and pharmacological activities with other substrates as well as for knowledge of biological species with biocatalytic potential and are thus important for the knowledge of the biodiversity of microorganisms in processes of bioprospecting.

Key words: alcohol dehydrogenases, biotransformation, Caatinga, microorganisms, oxidoreductases.

1.INTRODUÇÃO

Os micro-organismos são alvos de inúmeras pesquisas biotecnológicas, principalmente aqueles que são pouco estudados, sobre a diversidade microbiana, no sentido de isolar, caracterizar e produzir biomoléculas com elevado potencial biotecnológico, elevando assim os benefícios econômicos e estratégicos associados com a descoberta de novos micro-organismos potencialmente exploráveis nos diferentes processos biotecnológicos (STEVEN *et al.*, 2006; SANTOS *et al.*, 2009; NELSON; WEAR, 2014).

Os micro-organismos empregados como biocatalisadores surgem como uma opção ecologicamente correta para obtenção dos mesmos produtos, isto é, sem agredir o meio ambiente (sustentabilidade ambiental). Estes apresentam características bastante atrativas, como a capacidade de agir em muitas reações com eficiência, biodegradabilidade e condições brandas de ação, além de mostrar aspectos químicos importantes tais como regioseletividade, quimiosseletividade e enantioseletividade (FABER, 2011). O isolamento de micro-organismos de fontes naturais é um método útil para obtenção de biocatalisadores, seguido de testes de rastreio para identificar a capacidade enzimática desejada, e seleção das melhores performances (SCHÄFER *et al.*, 2007).

Os organismos microbianos, vegetais e animais possuem enzimas com capacidade de catalisar reações redox chamadas oxirredutases. Estas catalisam a troca de elétrons ou equivalentes redox entre moléculas doadoras e aceitadoras, em reações envolvendo transferência de elétrons, abstração de prótons, abstração de hidrogênio, transferência de hidreto, inserção de oxigênio ou outras etapas importantes (MUNRO; TAYLOR; WALKINSHAW, 2000). Suas aplicações práticas estão relacionadas à biossíntese de compostos quirais e polímeros, construção de biossensores e degradação de poluentes ambientais (LIU & WANG, 2007).

Atualmente, as novas oportunidades para a biotransformação através de micro-organismos oferecem muitas possibilidades para a produção de novos compostos quirais e para a aplicação de processos mais ecológicos e economicamente competitivos. Essas oportunidades surgiram a partir de novos desenvolvimentos científicos, desenvolvimento de processos e aumento da disponibilidade de enzimas úteis (JÄCKEL, HILVERT, 2010; REETZ, 2010; LUTZ, 2010). A descoberta de enzimas úteis proporcionou maior sucesso em áreas de biocatálise para enfrentar novos desafios sintéticos. Essas novas oportunidades ampliaram e aceleraram a aplicação da biocatálise e podem ser totalmente exploradas na

síntese de vários compostos quirais no futuro (ZHENG; XU, 2011).

Diante da grande diversidade biológica e da escassez de trabalhos relacionados ao estudo de micro-organismos do solo, busca-se neste trabalho estudar biotransformações enantiosseletivas promovidas pelas oxirredutases produzidas pelos micro-organismos isolados de amostras de solo da Caatinga piauiense.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Caatinga

O bioma Caatinga é uma floresta tropical seca de grande importância, não somente pela sua diversidade biológica, mas também porque as espécies deste ecossistema são adaptadas a uma precipitação irregular. É caracterizada como floresta de porte baixo, composta por árvores e arbustos que geralmente apresentam espinhos e microfilia, além de plantas suculentas (SILVA et al., 2013). Sua vegetação predominante é um complexo conjunto de várias fisionomias que, ocupa 734.478 km², sendo a maior parte do Nordeste Brasileiro com clima semiárido (RIBEIRO et al., 2017).

É necessário intensificar os estudos neste importante espaço geográfico, pois é um bioma exclusivamente brasileiro que recobre 54,53% da área da região, tendo características heterogêneas, com enorme biodiversidade e endemismos. Com relação à biodiversidade deste bioma ainda pouco se conhece. Os processos ocorridos de antropização prejudicam muitas plantas, animais e micro-organismos com propriedades medicinais ou com fontes potenciais de compostos bioativos. Dessa maneira, esses organismos correm o risco de desaparecer antes de serem estudados, não unicamente para se conhecer os indivíduos e respectivas funções, mas também os efeitos dos distúrbios ou estresses ambientais sobre tais comunidades (CAVALCANTI, et al., 2006; SANTANA et al., 2016; GONÇALVES et al., 2013; SILVA & SOUSA, 2016).

No trabalho desenvolvido por Moura et al... (2016) com plantas da Caatinga foi possível isolar e identificar fungos filamentosos e leveduriformes, endofíticos e epifíticos. Dentre os gêneros identificados, prevaleceram o *Aspergillus* sp., *Fusarium* sp. E *Paecilomyces* sp. Assim demonstrando que devem ser realizados novos estudos empregando-se as cepas isoladas para a produção de novos compostos bioativos de importância biotecnológica.

No trabalho realizado com antibióticos contra bactérias Gram positivas e/ou Gram negativas demonstrou que estas são produzidas por fungos da Caatinga sob condições favoráveis. A purificação dos metabólitos secundários via CLAE-FR resultou em moléculas isoladas com atividade antibacteriana, e a identificação por microcultivo mostrou que os fungos produtores de antibióticos que tiveram seus compostos purificados são do gênero *Aspergillus* (CLEMENTINO et. al., 2015).

2.2. Química Verde e Biocatálise

Nas últimas décadas, as pesquisas na área da química têm evoluído de forma indiscutível e contribuindo para avanços tecnológicos em diversos setores. Contudo, o grande aumento da demanda por substâncias químicas provocou um aumento simultâneo na geração de subprodutos tóxicos, os quais causam impactos negativos ao meio ambiente. Isso devido, a sociedade moderna não querer abrir mão das comodidades e benefícios que a indústria do petróleo oferece, por exemplo. Dessa maneira, os aspectos relacionados às questões ambientais têm recebido grande atenção, havendo a necessidade de uma mudança para remodelar empreendimentos tecnocientíficos, aplicando aos ecossistemas metodologias menos impactantes (ZANDONAI et al., 2013; MOTA; MONTEIRO, 2013).

A Química aplicada de forma inconsequente, geralmente é uma das causadoras da degradação ambiental, mas, ao mesmo tempo, quando utilizada de forma responsável, pode ser uma solução, ou seja, pode ser uma aliada à sustentabilidade ambiental (SILVA; LACERDA; JONES JUNIOR, 2005). Atualmente, de acordo com Lenardão et al. (2003) a química sustentável está baseada em doze princípios que precisam ser seguidos quando se pretende implementá-la em uma indústria ou instituição de ensino e/ou pesquisa na área de química. Esses princípios são:

1. Prevenção.
2. Economia de átomos.
3. Síntese de produtos menos perigosos.
4. Desenho de produtos seguros.
5. Solventes e auxiliares mais seguros.
6. Busca pela eficiência de energia.
7. Uso de fontes renováveis de matéria-prima.

8. Evitar a formação de derivados.
9. Catálise.
10. Desenho para a degradação.
11. Análise em tempo real para a prevenção da poluição.
12. Química intrinsecamente segura para a prevenção de acidentes

A Química verde ou química para o desenvolvimento sustentável é um campo emergente que tem como objetivo final desenvolver as ações científicas e/ou processos industriais ecologicamente corretos. Podendo a viabilizar processos e produtos de maneira a evitar ou minimizar o impacto negativo causado ao homem e ao meio-ambiente (Figura 1). Os avanços na área visam a aumentar a segurança dos processos e também resolver questões mundiais como a mudança climática, produção de energia, disponibilidade de recursos hídricos, produção de alimentos e a emissão de substâncias tóxicas ao meio-ambiente. O progresso na Química Verde tem sido alcançado em diversas linhas de pesquisa, como na catálise, formulação de solventes menos nocivos ao ambiente e desenvolvimento de processos que utilizam matérias-primas renováveis, bem como, também o aumento do rendimento e a redução de custos. (SOUSA-AGUIAR et al., 2014; ANASTAS; KIRCHHOFF, 2002; SHELDON, 2008; MOHANTY; MISRA; DRZAL, 2002)

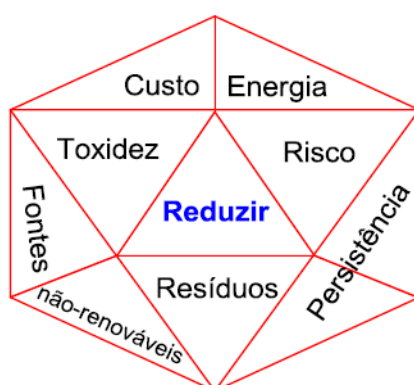


Figura 1: As faces do termo “reduzir” para a Química Verde. Fonte: (Ferreira, Da Rocha, Da Silva, 2014).

Vem ocorrendo o crescimento significativo na demanda por produtos químicos e produtos mais seguros, dos reguladores e do mercado nas últimas décadas. No entanto, essa demanda não encontrou crescimento semelhante em soluções e práticas de química verde. A Química Verde ainda não foi integrada no tecido da empresa química, sistemas educacionais ou programas governamentais (TICKNER; BECKER, 2016). Devido esses atributos sustentáveis é que a biocatálise possui relações afins com a Química verde.

A biocatálise ou biotransformação compreende os processos em que um catalisador biológico é utilizado para transformar um substrato numa quantidade limitada de etapas enzimáticas. O desenvolvimento e otimização integrados de um processo biotecnológico numa análise detalhada são fatores que condicionam eficácia deste (BARROS, 2010). Tal processo pode ser definido como modificações específicas da estrutura molecular de uma substância catalisada por meios biológicos, como células íntegras e/ou imobilizadas, enzimas ou seus extratos e micro-organismos (DIAS et al., 2012).

Conforme Giri et al. (2001) as biotransformações são reações químicas catalisadas por células, órgãos ou enzimas e que podem ser usadas para realizar conversões específicas de substratos complexos usando células vegetais, animais ou microbianas ou enzimas purificadas como catalisadores. As biotransformações têm grande potencial para originar novos produtos ou para produzir produtos conhecidos de forma mais eficiente. Portanto, são diferentes da biossíntese e das biodegradações.

As biotransformações estão sendo aceitas como um método para a geração de compostos opticamente puros e para o desenvolvimento de rotas eficientes para compostos alvo. As biotransformações fornecem uma alternativa à metodologia química sintética que às vezes é competitiva e, portanto, representa uma seção de ferramentas disponíveis para o químico sintético. Sendo que, a utilização de micro-organismos e/ou enzimas isoladas neste processo são cada vez mais explorada tanto na indústria como na síntese acadêmica em laboratórios. A consideração primária pela incorporação de uma biotransformação em uma sequência sintética é o controle regio e estereo se torna possível usando uma reação catalisada por enzimas (LOUGHLIN, 2000).

Após a matéria prima mais adequada ser identificada para substrato da biotransformação pretendida, deve selecionar-se o biocatalisador que apresente níveis adequados de atividade catalítica, seletividade e estabilidade para operar nas condições selecionadas de temperatura, força iônica, pH e natureza da solução tampão, concentração de substrato e produto e ainda na eventual presença de solventes orgânicos (BARROS, 2010).

2.3 Vantagens e Desvantagens da Biocatálise

Este processo é vantajoso, pois permite várias vezes a reutilização do biocatalisador, além de aumentar a estabilidade de enzimas e substratos. Além disso, diminui o risco de contaminação e de formação de subprodutos na reação. A utilização desses princípios em química verde permite a realização de diversas reações com seletividade, especificidade e eficiência elevada (DIAS et.al., 2012).

Outra questão relevante neste processo é que as enzimas, diferente dos catalisadores inorgânicos como ácidos, bases, óxidos de metais e metais pesados, possuem alta especificidade com o substrato ao qual converte sua estrutura. Elas ganharam um lugar de destaque para os químicos orgânicos por serem catalisadores seletivos (ROBERTS et al., 1995; HUDLICKY et al., 1999; DURAN et al., 2000; STEWART, 2000; ROBERTS, 2000).

Células fúngicas marinhas foram utilizadas na redução quimiosseletiva de chalconas. O micélio inteiro do fungo marinho *Penicilium citrinum* CBMAI 1186, livre e imobilizado em algodão (*Gossypium sp.*), Fibroin (*Bombyx mori*) e um kapok local (*Ceiba speciosa*), catalisou a redução quimiosseletiva da ligação C=C de chalcona com bons rendimentos (98% de conversão). O fungo imobilizado e as células inteiras livres demonstraram comportamento na conversão de chalconas com diferentes substituintes. As enzimas envolvidas na redução são enoato redutases, que foram mais eficazes do que as desidrogenases de álcool na competição pelo substrato (FERREIRA et. al., 2014).

Faber (2011) enfatiza algumas vantagens e desvantagens das enzimas no processo de biocatálise comparadas com outros tipos de catalisadores como:

2.3.1 Vantagens

- ✓ **Catalisadores muito eficientes:** sendo adequados para acelerar as reações de 10^8 a 10^{10} vezes em relação à correspondente reação não catalisada. Assim a concentração do biocatalisador como consequência é muito menor que a de catalisadores químicos convencionais.
- ✓ **Ambientalmente aceitáveis:** não causam resíduos altamente tóxicos, como no caso dos metais pesados e são biodegradáveis.
- ✓ **Atuam sob condições leves:** demandam normalmente intervalos de pH de 5 a 8 e temperatura de 20 a 40 °C.

- ✓ **Tolerantes aos substratos:** interagem com uma grande variedade de substratos não naturais.
- ✓ **Atuam em meios não convencionais:** várias enzimas, e até mesmo células, tem demonstrado retenção do potencial catalítico em meios não convencionais, como solventes orgânicos.
- ✓ **Catalisam uma extensa faixa de reações químicas:** reações de redução, oxidação, transesterificação, hidrólise, entre outras, podendo ser catalisadas por enzimas.

2.3.2 Desvantagens

- ✓ **Na natureza são fornecidos em uma única forma enantiomérica:** é impossível para inverter a indução quiral de uma dada reação enzimática pela escolha do “outro enantiômero” do biocatalisador, deste modo é um método possível e catalisadores químicos quirais estão envolvidos.
- ✓ **Sensíveis a condições enérgicas:** necessitam sempre de condições brandas de operação quando em sua forma livre, constituindo um problema em situações operacionais que exijam altas temperaturas.
- ✓ **Atividade máxima em água:** a maioria dos substratos orgânicos é pouco solúvel em água.
- ✓ **Carecem de cofatores:** embora as enzimas sejam extremamente flexíveis para aceitar substratos não naturais, eles são quase que exclusivamente ligados aos seus cofatores naturais, onde estes são custosos e de difícil recuperação.
- ✓ **Podem causar alergias:** quando não manipuladas adequadamente podem causar reações alérgicas, em casos específicos.

As desvantagens deste processo vêm se reduzindo bastante devido o aperfeiçoamento e desenvolvimento de diversas técnicas para reações biocatalisadas e quando forem realizadas modificações no processo como, por exemplo, a mudança de solventes orgânicos se torna um problema quando este não for extremamente seletivo (SANTANIELLO et al., 1992).

As reações biocatalíticas podem ser realizadas por enzimas isoladas ou sistema de células inteiras, podendo ser provenientes de micro-organismos ou de células vegetais. Um método eficiente para se obter a enzima desejada é através da grande diversidade de micro-organismos que habitam no solo. Assim, essas reações catalisadas por enzimas têm se desenvolvido rapidamente nos últimos anos na síntese de álcoois quirais. As enzimas mais empregadas para este processo são as álcool desidrogenases, uma subclasse de oxirredutases

(ARAÚJO et al., (2011).

Os micro-organismos utilizados como biocatalisadores surgem como uma opção ecologicamente correta para obtenção dos mesmos produtos, isto é, sem agredir o meio ambiente (sustentabilidade ambiental). Estes apresentam características bastante atrativas, como a capacidade de agir em muitas reações com eficiência, biodegradabilidade e condições brandas de ação, além de mostrar aspectos químicos importantes tais como regiosseletividade, quimiosseletividade e enantiosseletividade (FABER, 2011).

Os álcoois quirais são um dos grupos mais úteis de compostos quirais gerados através das biotransformações. Eles são facilmente obtidos por hidrogenação de cetonas com Rh- e Ru-difosfina catalisadores em larga escala . Além disso, a biorredução é geralmente possível sob condições de reação leve (MARIA-SOLANO; ROMERO-RIVERA; OSUNA, 2017; ILLEOVÁ et. al. , 2015).

2.4 Enzimas

As enzimas são proteínas essenciais para a química da vida. A proteína possui sua ação enzimática sempre associada a um sítio ativo ou a um ponto para acoplar substratos através de forças intermoleculares, conferindo a esta proteína uma especificidade catalítica. As enzimas possuem atividades catalíticas surpreendentes, formadas por longas cadeias de aminoácidos. Devido essa atividade aceleram a velocidade das reações (da ordem de 10^{10} - 10^{23}) e reduzem a barreira energética entre os reagentes e os produtos conferindo a estes a formação de complexos intermediários entre enzima-substrato no estado de transição (Figura 2) (LEHNINGER 2000). Em seguida, o produto é formado e a enzima é liberada intacta no meio, sem que seja consumida ou modificada durante o processo de catálise (ILLANES 2008).

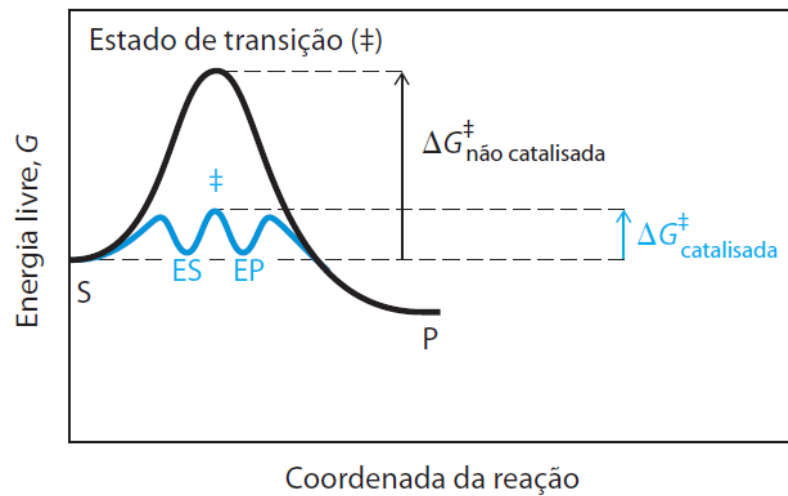


Figura 2: Diagrama da coordenada de uma reação catalisada por enzima com uma reação não catalisada. Fonte: Lehninger (2014).

Uma classificação das enzimas foi desenvolvida de acordo com a reação catalisada pela Comissão para Enzimas em 1961 (Enzyme Commission – EC) da União Internacional de Bioquímica (IUB) que dividiu em seis classes (CABRAL et.al, 2003). São elas:

- ✓ **Oxirredutases:** São enzimas que catalisam reações de transferência de elétrons, ou seja, reações de oxi-redução. As mais conhecidas são as Desidrogenases e as Oxidases.
- ✓ **Transferases:** São enzimas que intervêm em reações de transferência de diversos grupos funcionais, como aldeído, cetona, acila, amina, carboxila, etc.
- ✓ **Hidrolases:** São enzimas que catalisam reações de hidrólise. A extensão de grupos hidrolisáveis é muito grande, e incluem ésteres, amidas, peptídeos e outras funções que contêm grupos C-N, anidridos e muitos outros.
- ✓ **Liases:** Catalisam as reações de remoção ou fixação de grupos químicos, envolvendo ligações C=C, C=N e C=O de forma não hidrolítica. São bons exemplos as Desidratases e as Descarboxilases.
- ✓ **Isomerases:** Catalisam diversos tipos de isomerização, incluindo a racemização.
- ✓ **Ligases:** São enzimas que catalisam reações de formação de novas moléculas a partir de duas já existentes. Nesta classe são denominadas, frequentemente, sintetases.

As enzimas e os micro-organismos em decorrência da estocagem ou mesmo durante o uso estão propensos à inativação por fatores químicos, físicos ou biológicos. É necessário que

se estabilize estes biocatalisadores, como meio de evitar a inativação para uso em meio orgânico. Dessa maneira, para a manutenção da atividade catalítica e do potencial de estereosseletividade, é indispensável o desenvolvimento de métodos preventivos específicos (NASCIMENTO et al., 2002; MENDES et al., 2010).

A formação de produtos de maneira altamente estereo e regioseletiva esta ligada a natureza quiral das enzimas. A atuação destas a temperatura branda, condições neutras e aquosas, além do elevado número de ciclos catalíticos, chama a atenção para o uso de enzimas em síntese química. Muitas enzimas têm a capacidade de viabilizar a transformação de vários substratos em produtos dificilmente obtidos por rotas químicas ou ainda atuar em reações nas quais não existem alternativas químicas viáveis (OLIVEIRA; MANTOVANI, 2009).

2.5. Oxirredutases

Oxirredutases são catalisadores que possuem diversas aplicações atraentes e desafiadoras representando cerca de um quarto das enzimas conhecidas. Muitas vezes exigem cofatores como nicotinamida adenina dinucleótido (NAD) e nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADP) que possuem um valor elevado, como mostra na (Figura 3). Suas aplicações práticas estão relacionadas à biossíntese de compostos quirais e polímeros, construção de biossensores e degradação de poluentes ambientais (LIU; WANG, 2007).

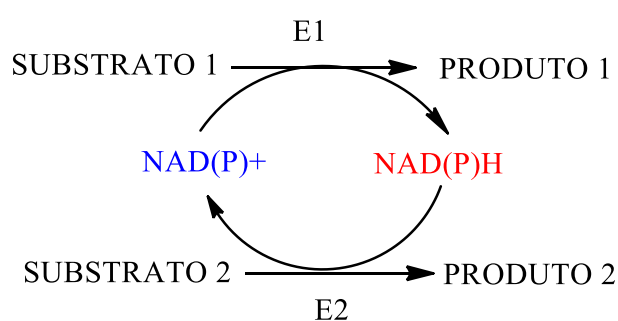


Figura 3: Regeneração enzimática de cofatores (para a regeneração acoplada ao substrato, as duas enzimas são as mesmas, E1 = E2, para a regeneração acoplada enzimática, E1 e E2 representam duas enzimas diferentes). Fonte: Adaptado de Liu & Wang (2007).

Oxirredutases são amplamente distribuídas entre organismos microbianos, vegetais e animais. Elas catalisam a troca de elétrons ou equivalentes redox entre moléculas doadoras e aceitadoras, em reações envolvendo transferência de elétrons, abstração de hidrogênios, abstração de hidrogênio, transferência de hidreto, inserção de oxigênio ou outras etapas

importantes (MUNRO; TAYLOR; WALKINSHAW, 2000).

As pesquisas biocatalíticas envolvem as enzimas oxirredutases. Nestes processos de biotransformações redox envolvem duas oxirredutases isoladas sendo uma para a biotransformação e outra para a regeneração do cofator. No entanto, a maioria das biotransformações redox envolvem metabolizar células com enzimas de todas as classes sendo ativas junto com as oxirredutases (STRAATHOF; PANKE; SCHMID, 2002).

A classe de enzimas, em questão, podem ser classificadas de acordo com a sua sequência ou estrutura tridimensional, que é muito informativa para o estudo de relação estrutura-função, evolução enzimática, funcional genômica e descoberta de novas enzimas *in silico* (XU, 2005). Outras classes incluem as oxirredutases (cloroperoxidase, colesterol oxidase, lacase, peroxidase, oxalato oxidase, glutamato desidrogenase e álcool desidrogenase), liases (aliinase) e isomerases (L-arabinose isomerase) (MENDES et al., 2011).

Muitas aplicações modernas eram esperadas para estas enzimas incluindo produtos farmacêuticos, síntese e modificação de polímeros, degradação oxidativa de poluentes e construção de biossensores para uma variedade de análises e aplicações clínicas (MAY, 1999).

Em escala industrial as biotransformações redox são bem sucedidas em diversos setores quando se envolvem oxirredutases (Figura 4) . Estes, às vezes, envolvem duas oxirredutases isoladas, uma para a biotransformação e outra para a regeneração do cofator. No entanto, a maioria das biotransformações redox envolvem metabolizar células com enzimas de todas as classes sendo ativas junto com as oxirredutases (STRAATHOF; PANKE; SCHMID, 2002).

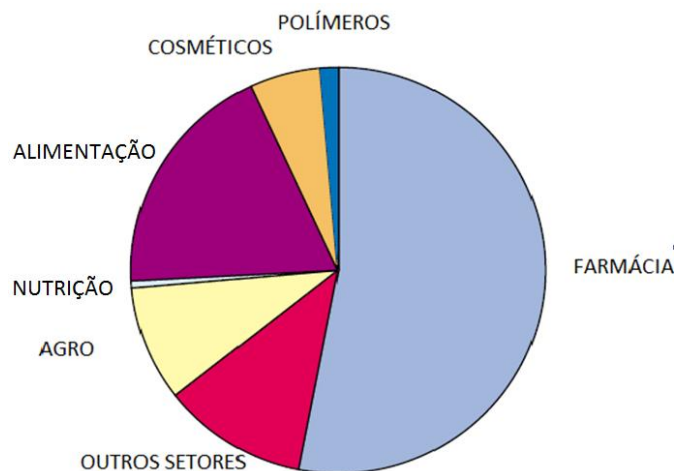


Figura 4: Setores industriais em que os produtos de biotransformações industriais são usados. Fonte: Adaptado de Straathof; Panke; Schmid (2002).

2.6. ADH E SUAS APLICAÇÕES

As álcool desidrogenases são oxirredutases de cadeia média classificadas como EC 1.1.1.1 contendo de 327-376 resíduos de aminoácidos por cadeia e geralmente necessitam de zinco (STROMMER, 2011) para catalisar a conversão reversível de etanol e acetaldeído. Sua ocorrência se manifesta em praticamente todos os organismos e catalisam a oxidação reversível de álcoois primários e secundários em aldeídos e cetonas, respectivamente (RAJ; RAMASWAMY; PLAPP, 2014). Essas enzimas promovem a redução a grupos carbonílicos, também referenciadas como carbonil-redutases ou cetorredutases (HOFF & SANDBY 2013). Estas enzimas também catalisam reações de oxidação de álcoois primários e secundários, como os substratos típicos (glicerol, lactato e etanol) em seus correspondentes compostos carbonilados (NAKAMURA et al... 2003) como mostra na Figura 5.

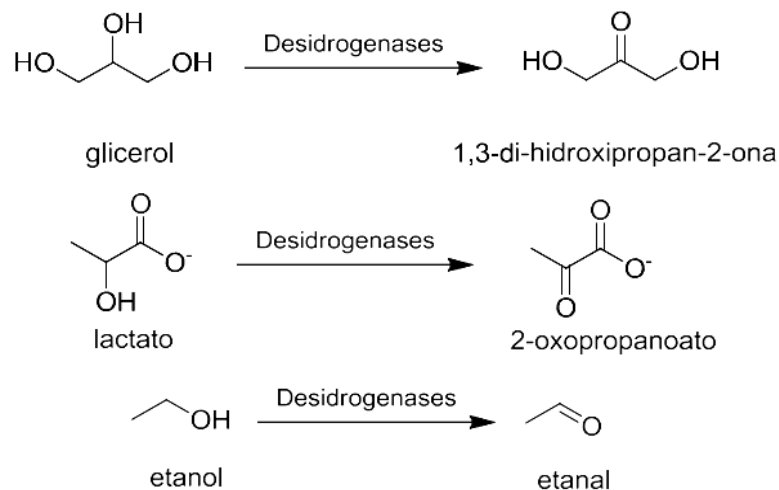


Figura 5: Oxidação de álcoois através de desidrogenases.

Fonte: Adaptado de Nakamura et al...(2003)

A álcool desidrogenase (ADH), uma isoenzima, desempenha um papel significativo no metabolismo de várias substâncias biologicamente importantes e promove a catálise das reações de oxidação ou redução de uma ampla especificidade de substratos. As isoenzimas são divididas em várias classes com base em diferenças na especificidade do substrato, bem como na sensibilidade a inibidores, localização e propriedades imunológicas (JELSKI, SZMITKOWSKI, 2008).

Outra papel importante das ADHs é que estão envolvidas na remoção de radicais livres, como a catalase (CAT), por serem enzimas respiratórias (KLUGE et. AL., 2017). Em muitos estudos mostraram que essas enzimas estão presentes nas células dos tecidos do cérebro humano. Essas enzimas são responsáveis pelo metabolismo de muitas substâncias biológicas, como etanol, retinol e serotonina. Em estudos preliminares descobriu-se que o

tecido do câncer expressa ADH atividades de isoenzimas. Além disso, o aumento da atividade total da álcool desidrogenase correlacionou-se com classe I da ADH e demonstra ser causada pela liberação desta isoenzima de células cancerígenas (JELSKI et. al., 2017).

As ADHs são utilizadas para a redução da cetona e requerem cofatores de nicotinamida (NADH ou NADPH) como fonte de hidreto (Figura 6). O alto custo dos cofatores torna a regeneração eficiente do cofator um pré-requisito para aplicações preparativas. Atualmente, existem várias perspectivas para contornar o desafio do cofator: usando células inteiras, ou através de abordagens enzimáticas, eletroquímicas, fotoquímicas e químicas (NI; XU, 2012; HOLLMANN et al., 2010). O cofator possui dois hidrogênios diastereotópicos com a mesma capacidade de serem transferidos. A estrutura da enzima implicada no processo e, portanto, sua ligação ao substrato, determina o hidrogênio a ser transferido a uma determinada face do substrato (LABES; WENDHAUSEN, 2008).

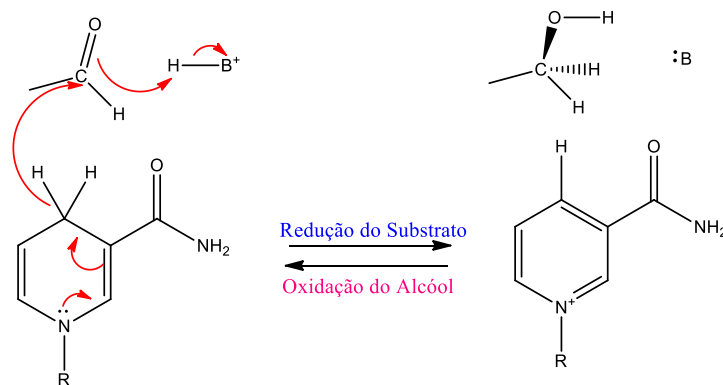


Figura 6: Mecanismo da redução promovida pelo NADH e NADPH.

Fonte: Bruice, 2006.

No trabalho realizado por Findrik e colaboradores (2005) se utilizou a ADH para catalisar uma reação de síntese orgânica. O composto acetofenona foi reduzido enantiosseletivamente em (*S*)-1-feniletanol pela enzima presente em *Thermoanaerobacter sp.*, como mostra na Figura 7. E a conversão poderia atingir 98% quando se empregou o 2-propanol como substrato secundário.

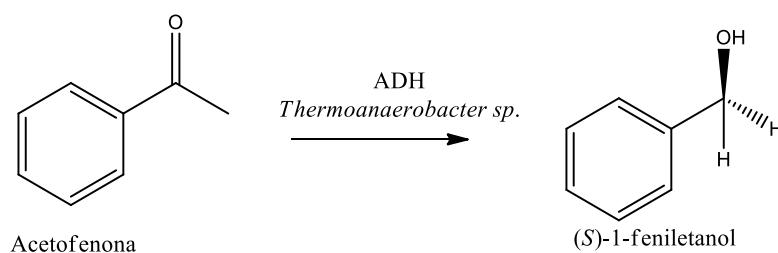


Figura 7: Reação de biorredução da Acetofenona.

Fonte: Adaptado de Findrik et. al. (2005)

No trabalho desenvolvido por Conceição et. al.(2003) o fungo *Pichia stipitis* foi utilizado na redução de cetonas com alta quimioseletividade e enantioselectividade. A preparação de (S)-2-etil-1-fenilprop-2-en-1-ol pela redução de 2-etil-1-fenilprop-2-en-1-ona adsorvido em Amberlite™ XAD-7(Figura 8).

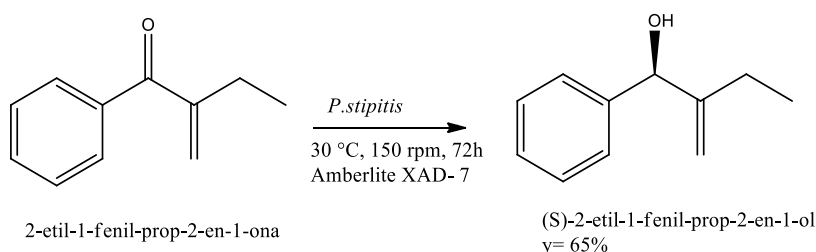


Figura 8: Redução de 2-etil-1-fenilprop-2-en-1-ona adsorvida em Amberlite™ XAD-7 por *P. Stipitis*.

Fonte: Conceição et. al.(2003)

3. PARTE EXPERIMENTAL

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Produtos Naturais e Neuroquímica Experimental (LPNNEX) na Universidade Federal do Piauí (UFPI).

3.1. EQUIPAMENTOS E MATERIAIS

O substrato, 4-metilacetofenona da marca Vetec foi adquirido comercialmente.

3.2. MICRO-ORGANISMOS

3.2.1. Isolamento de micro-organismos do solo da Caatinga piauiense

Esta parte foi dividida em três etapas: coleta, enriquecimento e o isolamento dos micro-organismos.

-Etapa 1: Coleta

Nesta etapa foram coletadas amostras de solos de diferentes ambientes naturais da cidade de Teresina e Campo Maior pertencentes à Caatinga piauiense.

O procedimento consistiu em coletar amostra de solo superficial, onde retirou-se a camada superficial de matéria orgânica (aproximadamente 2 cm) e transferiu-se o material para um frasco de vidro com auxílio de uma espátula. O material utilizado para coleta e armazenamento estava esterilizado.

-Para o preparo da solução tampão fosfato utilizada nas reações biocatalisadas

Para a obtenção da solução tampão fosfato (pH 7; 0,1 mol/L) inicialmente foram preparadas duas soluções:

Solução 1: pesou-se 11,867 g de Na_2HPO_4 e diluiu-se em 1 L de água destilada.

Solução 2: pesou-se 9,078 g de KH_2PO_4 e diluiu-se em 1 L de água destilada.

A solução final de tampão fosfato com pH 7 (0,1 mmol/L) foi obtida misturando-se 60 % da solução 1 e 40 % (v/v) da solução 2 (v/v), o que deu o pH desejado.

-Etapa 2: Enriquecimento

a) Pesou-se 2 g de solo em um béquer, acrescentou-se 20 mL de solução tampão (pH 7) e agitou-se vigorosamente, a amostra permaneceu parada por 2 minutos para sedimentação. Transferiu-se 100 μL do sobrenadante para placa de Petri contendo meio de cultura MCFE7, para ser realizado o isolamento microbiano (Etapa 3).

- Meios de Cultura

- Meio de cultura MCFE7: KH_2PO_4 (0,1 %; 1,0 g/L), Dextrose (0,025 %; 0,25 g/L) da marca Dinâmica, Peptona (0,025 %; 0,25 g/L) da marca Oxoid, ágar (2 %; 20,0 g/L; quando necessário) da marca Himedia.

- Meio de cultura MCBE7: KH_2PO_4 (0,1 %; 1,0 g/L), Extrato de Carne (0,025 %; 0,25 g/L) da marca Himedia, Peptona (0,025 %; 0,25 g/L), ágar (2 %; 20,0 g/L; quando necessário).

- Etapa 3: Isolamento de micro-organismos

Após a coleta de amostras de solo, partiu-se para o isolamento de micro-organismos que foi realizado em placa de Petri com meio de cultura apropriado (Figura 9).

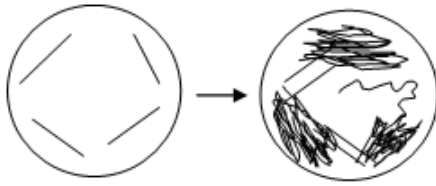


Figura 9: Repique de micro-organismos em placas de Petri com auxílio de uma alça de platina.

Fonte: Araújo, 2014.

-Etapa 4: Identificação taxonômica dos fungos

Após o isolamento dos fungos foram montados microcultivos em lâminas das colônias de modo a fornecer melhor crescimento das estruturas fúngicas onde estas foram analisadas através de microscópio óptico da marca Celestron através das objetivas 40x e 100x. A identificação à nível de espécie foi realizada seguindo as chaves de identificação descritas por De Hoog et al. (2000).

3.2.2. Avaliação do espectro de atividade enzimática enantiosseletiva de micro-organismos

Os micro-organismos isolados na etapa anterior inicialmente foram utilizados como biocatalisadores em reações de biorreduções catalisadas por oxirredutases. O composto selecionado para este estudo foi a 4-metilacetofenona.

Pré-inóculo: Para cada micro-organismo isolado, um pré-inóculo foi preparado para ser empregado na etapa de avaliação enzimática. O procedimento consistiu em inocular o micro-organismo em um Erlenmeyer de 125 mL contendo 20 mL de meio de cultura, tempo de crescimento e temperatura por volta de 25°C.

As reações foram realizadas em microplacas (24 poços, volume individual de 10 mL) Figura 10, e em cada poço foram adicionados 2 mL de meio de cultura MCFE1 e 200 µL de pré-inóculo. As microplacas foram mantidas em agitador rotativo por 4 dias e então foram adicionados os substratos (concentração de 5 mmol/L/etanol) para verificar o potencial de redução de cada micro-organismo. Após 72 h de reação as culturas foram transferidas para tubos de ensaios e extraídas com 2 mL de acetato de etila. Uma alíquota da fase orgânica de cada reação foi analisada por cromatografia líquida de alta eficiência.

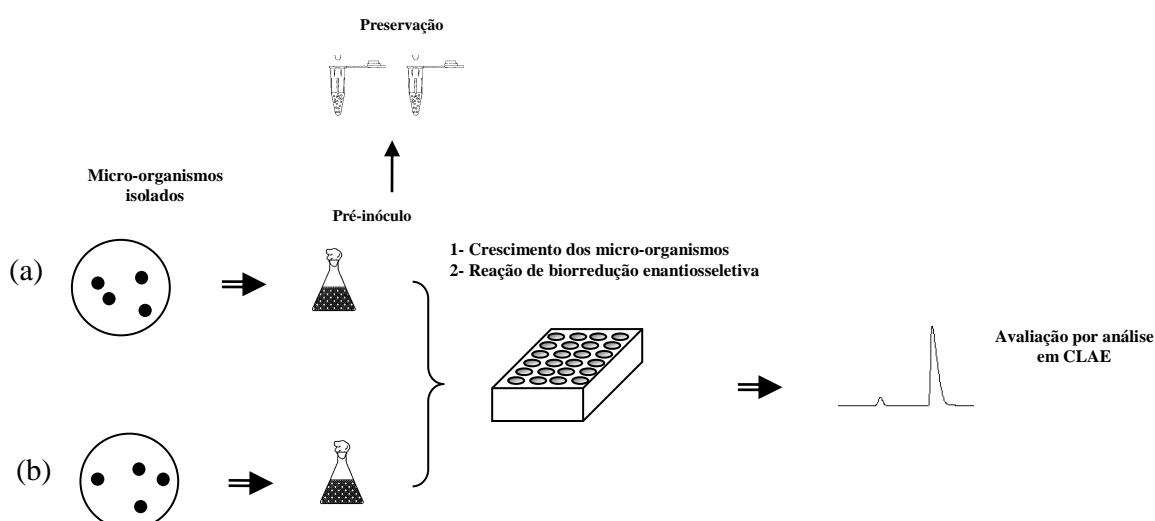


Figura 10: Resumo da etapa de avaliação do espectro de atividade enzimática enantiosseletiva dos micro-organismos. (a) Micro-organismo 1. (b) Micro-organismo 2. Fonte: Araújo, 2014.

3.2.3. Análise das reações de biocatálise por CLAE

A fase orgânica foi inicialmente filtrada e depois foi coletada de cada reação 1 μL onde foi analisada por cromatografia líquida de alta eficiência da marca Shimadzu equipado por coluna capilar aquiral Luna C8, 250x4,6 mm, marca Phenomenex utilizando no método acetonitrila/água Milli-Q (60/40%) para as análises das amostras do extrato orgânico acetato de etila/*p*-metilacetofenona. Os produtos das reações biocatalisadas foram comparados com misturas racêmicas de amostras previamente obtidas de reações químicas.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Coleta de solo

Selecionou-se o solo da Caatinga piauiense, como alvo de coleta, por ser o único bioma exclusivamente brasileiro, podendo guardar micro-organismos nunca estudados. Foram coletadas 10 amostras em Teresina (23M 743690 9437095) e 10 amostras na Fazendinha, interior de Campo Maior (23M 814048 9465719).

Dessas amostras foi isolado um total de 64 colônias de micro-organismos, sendo 47 bactérias e 17 fungos (Tabelas 1 e 2).

Tabela 1: Bactérias isoladas de amostras de solo

Amostras	Micro-organismos
Teresina	THB1

	THB2
	THB3
	THB4
	THB5
	THB6
	THB7
	THB8
	THB9
	THB10
	THB11
	THB12
	THB13
	THB14
	THB15
	THB16
	THB17
	THB18
	THB19
	THB20
	THB21
	THB22

	FZB1
	FZB2
	FZB3
	FZB4
	FZB6
	FZB7
Fazendinha (Campo Maior)	FZB8
	FZB9
	FZB10
	FZB11
	FZB12
	FZB13

FZB14
FZB15
FZB16
FZB17
FZB18
FZB19
FZB20
FZB21
FZB22
FZB23
FZB24
FZB25

Micro-organismos isolados no meio de cultura MCBE7

Tabela 2: Fungos isolados de amostras de solo

Amostras	Micro-organismos
Teresina	THFG1
	THFG2
	THFG3
	THFG4
	THFG5
	THFG6
	THFG7
Fazendinha (Campo Maior)	FZFG1
	FZFG2
	FZFG3
	FZFG4
	FZFG5
	FZFG6
	FZFG7
	FZFG8
	FZFG9
	FZFG10

 Micro-organismos isolados no meio de cultura MCFE7

De acordo com as tabelas 1 e 2, percebe-se que de maneira geral foram isolados mais bactérias do que fungos, sendo encontrados mais micro-organismos em amostras de solo da Fazendinha (Campo Maior).

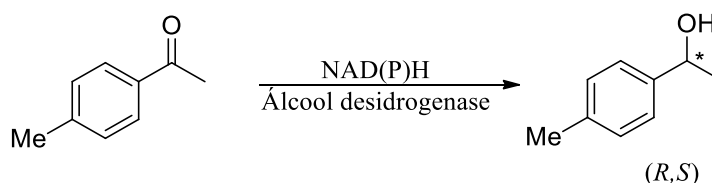
4.2. Avaliação da atividade enzimática dos micro-organismos

Como biocatalisadores para as reações de biorredução enantiosseletiva foram utilizados os 64 micro-organismos isolados de amostras de solo da Caatinga piauiense. Dentre os micro-organismos isolados têm-se bactérias e fungos.

4.2.1. Avaliação da atividade enzimática das bactérias da Caatinga piauiense em biorredução da 4-metilacetofenona

A fim de avaliar o potencial catalítico das diferentes bactérias isoladas do solo da Caatinga piauiense, como agente redutor, decidiu-se usar a redução da 4-metilacetofenona para produzir o (*R*) ou (*S*) 1-(4-metilfenil)etanol. Foram selecionados 47 bactérias para realizar esse estudo. Os resultados encontram-se na Tabela 3.

Tabela 3: Avaliação da atividade enzimática de bactérias na redução da 4-metilacetofenona.



Reação	Bactérias	Cetona/Álcool ^a
1	THB1	-
2	THB2	-
3	THB3	-
4	THB4	-
5	THB5	-
6	THB6	-
7	THB7	13/86
8	THB8	41/59
9	THB9	20/80
10	THB10	18/82

11	THB11	18/82
12	THB12	24/76
13	THB13	23/77
14	THB14	25/75
15	THB15	39/61
16	THB16	39/61
17	THB17	45/55
18	THB18	52/48
19	THB19	32/68
20	THB20	36/64
21	THB21	65/35
22	THB22	22/78
23	FZB1	27/73
24	FZB2	33/67
25	FZB3	21/79
26	FZB4	-
27	FZB5	-
28	FZB6	-
29	FZB7	-
30	FZB8	-
31	FZB9	13/87
32	FZB10	23/77
33	FZB11	29/71
34	FZB12	18/82
35	FZB13	3/97
36	FZB14	59/41
37	FZB15	45/55
38	FZB16	2/98
39	FZB17	2/98
40	FZB18	17/83
41	FZB19	4/96
42	FZB20	4/96
43	FZB21	3/97
44	FZB22	13/87
45	FZB23	3/97
46	FZB24	3/97
47	FZB25	>99

Condições reacionais: 5mmol/L de substrato 4-metilacetofenona em 2 mL de meio de cultura MCBE7 (pH 7) incubado a 32 °C em um agitador orbital (160 rpm) por 72 horas. ^aconversão determinada por HPLC usando a coluna Luna C8 25 mm x 0.25 mm);

Após a análise dos dados da Tabela 3 pôde-se observar que as maiores concentrações do (*R*) ou (*S*) 1-(4-metilfenil)etanol (80 até >99%) foram obtidos utilizando as bactérias THB7, THB8, THB9, THB10, THB11, FZB9, FZB12, FZB13, FZB16, FZB17, FZB18,

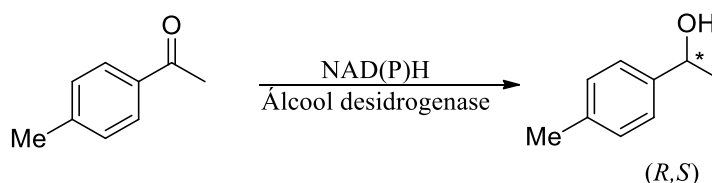
FZB19, FZB20, FZB23, FZB24 e FZB25 (Reações 7-11, 31, 34, 35, 38-42, 45-47). De maneira geral observou-se boas concentrações dos álcoois.

Algumas bactérias, THB1, THB2, THB3, THB4, THB5, THB6, FZB4, FZB5, FZB6, FZB7, FZB8, não apresentaram a oxirredutase de interesse, uma vez que a biorredução não ocorreu (Reações 1-6 e 26-30).

4.2.2. Avaliação da atividade enzimática dos fungos da Caatinga piauiense em biorredução da 4-metilacetofenona

Avaliou-se a atividade enzimática de 17 fungos isolados da Caatinga piauiense em biorredução da 4-metilacetofenona, Tabela 4.

Tabela 4: Avaliação da atividade enzimática dos fungos na redução da 4-metilacetofenona.



Reação	Fungos	Cetona/Álcool ^a (%)
1	THFG1	9/91
2	THFG2	6/92
3	THFG3	-
4	THFG4	-
5	THFG5	-
6	THFG6	22/78
7	THFG7	26/74
8	FZFG1	59/41
9	FZFG2	79/21
10	FZFG3	47/53
11	FZFG4	13/87
12	FZFG5	3/97
13	FZFG6	43/57
14	FZFG7	58/42
15	FZFG8	-
16	FZFG9	39/61
17	FZFG10	39/61

Condições reacionais: 5mmol/L de substrato 4-metilacetofenona em 2 mL de meio de cultura MCF7 (pH 5,6) incubado a 32 °C em um agitador orbital (160 rpm) por 72 horas.

^aconversão determinada por HPLC usando a coluna Luna C8 25 mm x 0.25 mm);

De acordo com os resultados da Tabela 4, observou-se a redução da 4-metilacetofenona pelas oxirredutases presentes nos fungos usados, sendo destacado os fungos THFG1, THFG2, THFG6, THFG7, FZFG4 e FZFG5 com moderada a excelente concentração do (*R*) ou (*S*)-1-(4-metilfenil)etanol (91, 92, 78, 74, 87 e 97%, respectivamente). Com destaque ao fungo FZFG5, cuja concentração do álcool foi >97%.

Após a avaliação do espectro de atividade enzimática dos micro-organismos isolados, partiu-se para a identificação daqueles micro-organismos que exibiram excelente atividade enzimática nas reações enantiosseletivas testadas. Para este propósito contamos com o apoio do grupo de pesquisa da Professora Dr^a. Mitra Mobin (Uninovafapi). A caracterização taxonômica dos micro-organismos foi realizada através de microscópio óptico. A identificação à nível de espécie foi realizada seguindo as chaves de identificação descritas por De Hoog et al.(2000).

Dentre os micro-organismos identificados têm-se os fungos espécies *Curvularia clavata* Jain, *Aspergillus Níger* V. Tiegh e *Rhizopus oryzae* Went & Prinsen Geerligts, inicialmente nomeados, como THFG2, THFG6 e FZFG4 (ANEXO I), respectivamente (Tabela 2).

5. CONCLUSÃO

As amostras de solo da Caatinga piauiense forneceram inicialmente 47 bactérias e 17 fungos após a metodologia de isolamento induzido com 4-metilacetofenona usado durante o crescimento dos micro-organismos. Foram identificados 3 fungos, dos quais através do microcultivo foi possível chegar-se as espécies *Curvularia clavata* Jain, *Aspergillus Níger* V. Tiegh e *Rhizopus oryzae* Went & Prinsen Geerligts.

Das 47 bactérias testadas na biorredução da 4-metilacetofenona, 16 bactérias apresentaram oxirredutase que catalisaram a redução da cetona a seu correspondente (*R*) ou (*S*) -1-(4-metilfenil)etanol de moderada a elevadas concentrações (80 até >99%).

Oito, dos 17 fungos testados na biorredução da 4-metilacetofenona, apresentaram oxirredutases que catalisaram a redução da cetona à seu correspondente álcool com moderada

a elevada concentração do (*R*) ou (*S*) 1-(4-metilfenil)etanol (87-97%). Com destaque ao fungo FZFG5, cuja concentração do álcool foi 97%. De forma geral, os micro-organismos testados e com atividade enzimática apresentaram boa capacidade de redução do substrato 4-metilacetofenona em experimentos de biotransformação.

As perspectivas para este trabalho demonstram que a utilização destes micro-organismos pode ser realizada em experimentos de biorredução com outros substratos, bem como para conhecimento de espécies biológicas com potencial biocatalisador, sendo assim importantes para o conhecimento da biodiversidade dos micro-organismos em processos de bioprospecção.

REFERÊNCIAS

ANASTAS, P. T.; KIRCHHOFF, M. M. O., Current Status, and Future Challenges of Green Chemistry†. **Accounts Of Chemical Research**, [s.l.], v. 35, n. 9, p.686-694, set. 2002.

ARAÚJO, L.S.. **Estudo de oxirredutase da *Arthrobacter* sp. isolada de sedimento marinho antártico**. 2014. 265 f. Tese (Doutorado) - Curso de Química, Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

ARAÚJO, L. S. et al... Screening of Microorganisms Producing Cold-Active Oxidoreductases to Be Applied in Enantioselective Alcohol Oxidation. An Antarctic Survey. **Marine Drugs**, São Paulo, v. 9, n. 12, p.889-905, 24 maio 2011.

BARROS, M. R. A. Biocatálise em Solvente orgânico: ensino em biotecnologia. **Boletim da Sociedade portuguesa de Biotecnologia**, n.72. p.1-2, 2002.

CABRAL, J. M. S.; AIRES-BARROS, M. R.; GAMA, M. **Engenharia Enzimática**. LIDEL Edições Técnicas, Lisboa PT, p.121-140, set. 2003.

CARVALHO, P. O. et al...Potencialde biocatáliseenantiosseletiva de lipases microbianas. **Química Nova**, São Paulo, Vol. 28, n. 4, p. 614-621, 2005.

CAVALCANTI, M. A. de Q. et al... Fungos filamentosos isolados do solo em municípios na região Xingó, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, Recife, v. 20, n. 4, p.831-837, dez. 2006.

CLEMENTINO, L. C. et al... Bioprospecção de antibióticos produzidos por fungos da Caatinga. **Evidência - Ciência e Biotecnologia**, São Carlos, v. 15, n. 1, p.37-56, 14 jul. 2015.

CONCEIÇÃO GJA, MORAN PJS, RODRIGUES JAR. Highly efficient extractive biocatalysis in the asymmetric reduction of an acyclic enone by the yeast *Pichia stipitis*. **Tetrahedron Asymmetry**; v.14,p.43–45, 2003.

- COSTA-LOTUFO, L. V. et al... The Contribution of Natural Products as source of New Anticancer Drugs: Studies Carried Out at the National Experimental Oncology Laboratory from the Federal University of Ceará. **Revista Virtual de Química**, Fortaleza, v. 2, n. 1, p.47-58, 2010.
- DIAS, F. R. F; FERREIRA, V. F.; CUNHA, A. C. Uma Visão Geral dos diferentes Tipos de Catálise em Síntese Orgânica. **Revista Virtual de Química**, Rio de Janeiro, v.4, n.6, p.840-871, 2012.
- DURAN, N.; CONTI, R.; RODRIGUES, J. A.r.. Biotransformations by microorganisms, organisms and enzymes: state of art. **Boletín de La Sociedad Chilena de Química**, [s.l.], v. 45, n. 1, p.109-121, mar. 2000.
- FABER, K. Biotransformations in Organic Chemistry: A Textbook. 6ed. Berlin: Springer-Verlag, 2011.
- FERREIRA, I. M. et al... Chemoselective reduction of chalcones by whole hyphae of marine fungus *Penicillium citrinum* CBMAI 1186, free and immobilized on biopolymers. **Biocatalysis And Agricultural Biotechnology**, São Carlos, v. 3, n. 4, p.358-364, out. 2014.
- FINDRIK, Z. et al. Kinetic Modeling of Acetophenone Reduction Catalyzed by Alcohol Dehydrogenase from *Thermoanaerobacter sp.* **Biotechnology Letters**, [s.l.], v. 27, n. 15, p.1087-1095, ago. 2005.
- GIRI, A. et al. Biotransformations using plant cells, organ cultures and enzyme systems: current trends and future prospects. **Biotechnology Advances**, Hyderabad, v. 19, n. 3, p.175-199, jun. 2001.
- GONÇALVES, F. J. T., FREIRE, F. D. C. O., LIMA, J. S. Fungos endofíticos e seu potencial como produtores de compostos bioativos. **Essential**, v.15, n.1, p.71-92, 2013.
- HOLLMANN, F.; ARENDS, I. w. c. e.; BUEHLER, Katja. Biocatalytic Redox Reactions for Organic Synthesis: Nonconventional Regeneration Methods. **Chemcatchem**, [s.l.], v. 2, n. 7, p.762-782, 23 jun. 2010.
- HOOG, G. S. de. **Atlas of Clinical Fungi, Second Edition**. 2. ed. Centraalbureau Voor Schimmelcultures, Baarn And Delft: Amer Society For Microbiology, 2000. 1126 p.
- HUDLICKY, T.; GONZALEZ, D.; GIBSON, D. T. Enzymatic dihydroxylation of aromatics in enantioselective synthesis: expanding asymmetric methodology. **Aldrichimica Acta**. v. 32, n. 2, p. 35-62, 1999.
- ILLEOVÁ, V. et al... Biotransformation of acetophenone to R-1-phenylethanol with immobilized *Pichia capsulata* in batch reactor. **Acta Chimica Slovaca**, Bratislava, v. 8, n. 2, p.107-114, 1 jan. 2015.
- JÄCKEL, C.; HILVERT, D.. Biocatalysts by evolution. **Current Opinion In Biotechnology**, [s.l.], v. 21, n. 6, p.753-759, dez. 2010.

JELSKI, W. et al... The diagnostic value of alcohol dehydrogenase (ADH) isoenzymes and aldehyde dehydrogenase (ALDH) measurement in the sera of patients with brain tumor. **Archives Of Medical Science**, Bialystok, v. 2, p.346-352, 2017.

JELSKI, W.; SZMITKOWSKI, M.. Alcohol dehydrogenase (ADH) and aldehyde dehydrogenase (ALDH) in the cancer diseases. **Clinica Chimica Acta**, Poland, v. 395, n. 1-2, p.1-5, set. 2008.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. Principles of biochemistry. 3 ed. New York: Woth, 2000. 1152 p.

LENARDÃO, E. J. et al... Os 12 princípios da química verde e sua inserção nas atividades de ensino e pesquisa. **Química Nova**, Pelotas, v. 26, n. 1, p.123-129, jan. 2003.

LIU, W.; WANG, P.. Cofactor regeneration for sustainable enzymatic biosynthesis. **Biotechnology Advances**, China, v. 25, n. 4, p.369-384, jul. 2007

LOUGHLIN, W. A.. ChemInform Abstract: Biotransformations in Organic Synthesis. **Cheminform**, Brisbane, v. 31, n. 40, p.49-62, 3 out. 2000.

MARIA-SOLANO, M. A.; ROMERO-RIVERA, A.; OSUNA, S.. Exploring the reversal of enantioselectivity on a zinc-dependent alcohol dehydrogenase. **Organic & Biomolecular Chemistry**, [s.l.], v. 15, n. 19, p.4122-4129, 2017.

MAY, S. W. Applications of oxidoreductases. **Current Opinion In Biotechnology**, Atlanta, Estados Unidos, v. 10, n. 4, p.370-375, ago. 1999.

MENDES, A. A. et al... Aplicação de quitosana como suporte para a imobilização de enzimas de interesse industrial. **Química Nova**, Sete Lagoas, v. 34, n. 5, p.831-840, 25 mar. 2011.

MENDES, A. A. et al... Multipoint covalent immobilization of lipase on chitosan hybrid hydrogels: influence of the polyelectrolyte complex type and chemical modification on the catalytic properties of the biocatalysts. **Journal Of Industrial Microbiology & Biotechnology**, Sete Lagoas, v. 38, n. 8, p.1055-1066, 5 out. 2010.

MOHANTY, A. K.; MISRA, M.; DRZAL, L. T.. Sustainable Bio-Composites from Renewable Resources: Opportunities and Challenges in the Green Materials World. **Journal Of Polymers And The Environment**, Michigan, v. 10, n. 1/2, p.19-26, 2002.

MOTA, C. J. A.; MONTEIRO, R. S.. Química e sustentabilidade: novas fronteiras em biocombustíveis. **Química Nova**, Rio de Janeiro, v. 36, n. 10, p.1483-1490, 2013.

MOURA, L. F. W. G. et al... Isolamento e identificação de fungos associados às plantas medicinais nativas da Caatinga da região dos Inhamuns, Tauá, Ceará, BRASIL. **Essentia**, Inhamuns, v. 17, n. 2, p.43-63, 2016.

MUNRO, A. W; TAYLOR, P.; WALKINSHAW, M. D. Structures of redox enzymes. **Current Opinion In Biotechnology**, Glasgow, v. 11, n. 4, p.369-376, ago. 2000.

NASCIMENTO, M. G. et al... Estudos de proteção da célula de *saccharomyces cerevisiae* para utilização em reações de redução em meio orgânico. **Química Nova**, Florianópolis, v. 25, n. 4, p.567-571, jul. 2002.

NELSON, C. E.; WEAR, E. K. Microbial diversity and the habitability of dissolved organic carbon. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 111, n. 20, p. 7166 - 7167, 2014.

NEUMANN, F. et al., Química Verde. **Química Nova**, v. 28, n. 1, p.103-110, 2005.

NI, Y.; XU, J.. Biocatalytic ketone reduction: A green and efficient access to enantiopure alcohols. **Biotechnology Advances**, Shanghai, v. 30, n. 6, p.1279-1288, nov. 2012.

OLIVEIRA, L G. de; MANTOVANI, S. M.. Transformações biológicas: contribuições e perspectivas. **Química Nova**, Campinas, v. 32, n. 3, p.742-756, 2009.

RAJ, S. B.; RAMASWAMY, S.; PLAPP, B. V.. Yeast Alcohol Dehydrogenase Structure and Catalysis. **Biochemistry**, Iowa, v. 53, n. 36, p.5791-5803, 16 set. 2014.

REETZ, M. T.. Laboratory Evolution of Stereoselective Enzymes: A Prolific Source of Catalysts for Asymmetric Reactions. **Angewandte Chemie International Edition**, [s.l.], v. 50, n. 1, p.138-174, 16 ago. 2010.

RIBEIRO, A. R. et al... Chiral pharmaceuticals in diverse environmental matrices: occurrence, removal and toxicity. **Química Nova**, Gandra, p.598-607, 2016.

RIBEIRO, T. O. et al... Diversidade do banco de sementes em diferentes áreas de Caatinga manejadas no semiárido da Paraíba, Brasil. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 27, n. 1, p.203-213, 31 mar. 2017

ROBERTS, S. M.. Using Microorganisms in Synthetic Organic Chemistry. **Journal Of Chemical Education**, [s.l.], v. 77, n. 3, p.363-368, mar. 2000.

ROBERTS, S. M.; TURNER, N. J.; WILLETTS, J.; TURNER, M. K. **Introduction to biocatalysis using enzymes and micro-organisms**. New York: Cambridge University Press, 1995.

SANTANA, J. A. S. et al... Estrutura e distribuição espacial da vegetação da Caatinga na Estação Ecológica do Seridó, RN. **Pesquisa Florestal Brasileira**, Macaíba, v. 36, n. 88, p.355-360, 11 jan. 2017.

SANTANIELLO, E. et al... The biocatalytic approach to the preparation of enantiomerically pure chiral building blocks. **Chemical Reviews**, Milão, v. 92, n. 5, p.1071-1140, jul. 1992.

SANTOS, T. M. C. *et al.*... Efeito da fertirrigação com vinhaça nos micro-organismos do solo. **Revista Caatinga**, v.22, n.1, p.155-160, 2009.

SCHÄFER, T. et al... Industrial Enzymes. **Advances In Biochemical Engineering/biotechnology**, [s.l.], p.59-131, 2007.

SHELDON, R. A.. E factors, green chemistry and catalysis: an odyssey. **Chemical Communications**, The Netherlands, n. 29, p.3352-3365, 2008

SILVA, A. G. C. da; SOUZA, T. D. Atividade antifúngica in vitro de metabólitos secundários produzidos por *Bacillus cereus*. **Revista da Universidade Vale do Rio Verde**, Feira de Santana, v. 14, n. 2, p.522-529, 2016.

SILVA, A. C. C. et al... Aspectos de ecologia de paisagem e ameaças à biodiversidade em uma unidade de conservação na Caatinga, em Sergipe. **Revista Árvore**, Sergipe, v. 37, n. 3, p.479-490, jun. 2013.

SILVA, F. M. da; LACERDA, P. S. B. de; JONES JUNIOR, J. Desenvolvimento sustentável e química verde. **Química Nova**, Rio de Janeiro, v. 28, n. 1, p.103-110, fev. 2005.

SOUSA-AGUIAR, E. F. et al... GREEN CHEMISTRY: THE EVOLUTION OF A CONCEPT. **Química Nova**, Rio de Janeiro, p.1257-1261, 2014.

STEVEN, B. *et al...* Microbial ecology and biodiversity in permafrost. **Extremophiles**, v.10, n.4, p. 259-267,2006.

STEWART, J. D. Organic transformations catalyzed by engineered yeast cells and related systems. **Curr. Opin. Biotech.** v. 11, n. 3, p. 344-348, 2000.

STRAATHOF, A. J.j; PANKE, S.; SCHMID, A.. The production of fine chemicals by biotransformations. **Current Opinion In Biotechnology**, The Netherlands, v. 13, n. 6, p.548-556, dez. 2002.

STROMMER, J.. The plant ADH gene family. **The Plant Journal**, Ontario, v. 66, n. 1, p.128-142, 28 mar. 2011.

TICKNER, J. A.; BECKER, M.. Mainstreaming green chemistry: The need for metrics. **Current Opinion In Green And Sustainable Chemistry**, Lowell, v. 1, p.1-4, ago. 2016.

XU, F.. Applications of oxidoreductases: Recent progress. **Industrial Biotechnology**, California, Estados Unidos, v. 1, n. 1, p.38-50, mar. 2005.

ZANDONAI, D. P.; SAQUETO, K, C.; ABREU, S. C. S. R.; LOPES, A. P.; ZUIN, V. G. Químicasverde e formação de profissionais do campo da química: relato de uma experiência didática para além do laboratório de ensino. **Revista Virtual de Química**, 2013.

ZHENG, G.; XU, J. New opportunities for biocatalysis: driving the synthesis of chiral chemicals. **Current Opinion In Biotechnology**, Shanghai, v. 22, n. 6, p.784-792, dez. 2011.



**CAPÍTULO II – METABÓLITOS ISOLADOS ATRAVÉS DE FUNGOS E SUAS
ATIVIDADES FARMACOLÓGICAS**
ARTIGO SUBMETIDO À REVISTA PHYTOTHERAPY RESEARCH

METABÓLITOS ISOLADOS ATRAVÉS DE FUNGOS E SUAS ATIVIDADES FARMACOLÓGICAS

Espedito de S. Saraiva^a, Laiana^a, Ana Paula^a, Felipe^a, Lidiane S. Araújo^a, Chistiane M. Feitosa^a, Ronaldo dos Santos S. Junior^a

^aDepartamento de Química, Universidade Federal do Piauí, 64.049-550 Teresina – PI, Brasil

e-mail: chistiane@ufpi.edu.br

RESUMO

Os produtos naturais isolados de micro-organismos, em especial os fungos, estão relacionados à produção de uma diversidade de micromoléculas bioativas em virtude da sua grande capacidade metabólica. Os fungos podem proporcionar potencialmente uma vasta variedade de metabólitos, tais como alcaloides, benzoquinonas, flavonoides, fenóis, esteroides, terpenoides, tetralonas e xantonas. Os mesmos são de grande interesse biotecnológico, principalmente em processos fermentativos que resultam na produção de metabólitos secundários. A metodologia utilizada para a realização deste trabalho foi de cunho bibliográfico, onde foi possível ter acesso a artigos científicos que explanavam sobre os compostos e o efeito biológico dos metabólitos secundários isolados por fungos. Com base na pesquisa realizada foram identificados os diferentes grupos de metabólicos e suas respectivas atividades farmacológicas. No presente estudo de revisão buscaram-se os principais metabólitos secundários relatados de fungos com atividades farmacológicas destes na literatura científica até agosto de 2017. Para futuras perspectivas, é necessário que se intensifique investigações sobre os compostos produzidos por estes organismos associado ao progresso e continuidade dos estudos químicos e farmacológicos dos compostos isolados de fungos consiste na facilidade de obtenção, com bons rendimentos e rotas biossintéticas viáveis.

Palavras-chave: atividades, fungos, metabólitos.

METABOLITES ISOLATED THROUGH FUNGI AND THEIR PHARMACOLOGICAL ACTIVITIES

Espedito de S. Saraiva^a, Laiana^b, Ana Paula^b, Felipe^b, Lidiane S. Araújo^b, Chistiane M. Feitosa^b, Ronaldo dos Santos S. Junior^b

^aDepartamento de Química, Universidade Federal do Piauí, 64.049-550 Teresina – PI, Brasil

^bDepartamento de Química, Universidade Federal do Piauí, 64.049-550 Teresina – PI, Brasil

ABSTRACT

Natural products isolated from microorganisms, especially fungi, are related to the production of a variety of bioactive micromolecules due to their great metabolic capacity. Fungi can potentially provide a wide variety of metabolites, such as alkaloids, benzoquinones, flavonoids, phenols, steroids, terpenoids, tetralones and xanthones. They are of great biotechnological interest, mainly in fermentative processes that result in the production of secondary metabolites. The methodology used to carry out this work was a bibliographical one, where it was possible to have access to scientific articles explaining about the compounds and the biological effect of the secondary metabolites isolated by fungi. Based on the research, the different metabolic groups and their respective pharmacological activities were identified. In the present review, the main secondary metabolites reported from fungi with pharmacological activities of these fungi were searched in the scientific literature until August 2017. For future prospects, it is necessary to intensify investigations on the compounds produced by these organisms associated to the progress and continuity of the studies chemical and pharmacological properties of the compounds isolated from fungi is easy to obtain, with good yields and viable biosynthetic routes.

Keywords: activities, fungi, metabolites.

1. INTRODUÇÃO

Os organismos vivos são fontes valiosas de substâncias biologicamente ativas, ou base promissora para a síntese química planejada, cujos metabólitos secundários surgem como matérias primas para a produção de inúmeros medicamentos contemporâneos (BARREIRO, BOLZANI, 2009).

No Brasil, os produtos naturais são uma tendência devido a sua vasta área territorial, sendo detentor da maior floresta equatorial e tropical úmida do planeta, e uma vasta flora e fauna. Desta forma, os produtos naturais isolados de micro-organismos, em especial os fungos, estão relacionados à produção de diversidade de micromoléculas bioativas em virtude da sua grande capacidade metabólica, e no que se refere a medicamentos (exemplo antibióticos), mas, sobretudo como agroquímicos que causem menos danos ao ser humano (PINTO et. al., 2002).

Os fungos são notavelmente um grupo diversificado, incluindo cerca de 1,5 milhões de espécies, que podem proporcionar potencialmente uma vasta variedade de metabólitos, tais como alcaloides, benzoquinonas, flavonoides, fenois, esteroides, terpenoides, tetralonas e xantonas (JOEL & BHIMBA, 2013). Vários constituintes isolados de seu metabolismo apresentam atividades farmacológicas bem elucidadas e com uso clínico difundido, como exemplo podemos citar os antibióticos penicilinas, o antifúngico griseofulvina ambos obtidos de fungos do gênero *Penicillium*, além das estatinas obtidas de diferentes fungos, que representam uma classe de fármacos que atuam como inibidor da enzima HMGCo-ARedutase, que está envolvida no metabolismo do colesterol, representadas pela lovastatina cuja otimização levou à síntese da sinvastatina (VIEGAS JR et al., 2006).

Devido ao interesse crescente por metabólitos secundários obtidos por síntese ou naturais advindas de fungos, e com possível potencial terapêutico, buscou-se apresentar nessa obra os mais recentes estudos e pesquisas envolvidas nesse fim. Nesta revisão descrevemos brevemente as publicações encontradas até agosto de 2017.

2. METODOLOGIA

A revisão científica foi desenvolvida de forma sistemática sobre os metabólitos secundários isolados pelos fungos e suas atividades farmacológicas.

Nesta revisão descrevemos brevemente as publicações encontradas até agosto de 2017. Para tanto, pesquisamos no ScienceDirect, PubMed, Web of Science, Scopus, e nas bases de dados diversas, com os termos relevantes “‘fungi’, ‘fungus’, ‘secondary metabolites’, ‘pharmacological activities of fungus’, ‘chemopreventive fungus’”. Não foram impostas restrições linguísticas.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Principais metabólitos encontrados em fungos

A princípio nas culturas de fungos podem ser usados os esporos, micélios e tecidos a partir de corpos de frutificação ou substratos. Os métodos são simples e normalmente não necessitam de equipamentos complexos ou protocolo (ARORA et al., 1992).

Os metabólitos secundários geralmente apresentam uma estrutura complexa, baixo peso molecular e apresentam-se em baixas concentrações. Sabe-se que muitas dessas substâncias estão diretamente envolvidas nos mecanismos que permitem a adequação do produtor a seu meio. Assim, despertam grande interesse, não só pelas atividades biológicas e farmacológicas, mas também pelas áreas alimentar, agrônoma, perfumaria e outras (SIMÕES et al., 2007; PEREIRA E CARDOSO, 2012).

Existem três grandes grupos de metabólitos secundários: compostos fenólicos, terpenos e alcaloides utilizados na defesa contra estresses bióticos e abióticos (TAIZ; ZEIGER, 2009). Os compostos fenólicos são derivados do ácido chiquímico e ácido mevalônico. Os terpenos são produzidos a partir do ácido mevalônico (no citoplasma) ou do piruvato e 3-fosfoglicerato (no cloroplasto). Os alcaloides são provenientes de aminoácidos aromáticos (triptofano, tirosina), os quais são derivados do ácido chiquímico e de aminoácidos alifáticos (ornitina, lisina). Flavonoides, taninos e ligninas fazem parte dos compostos fenólicos; óleos essenciais, saponinas, carotenoides e a maioria dos fitorreguladores são terpenos; nicotina, cafeína e vincristina são exemplos de alcaloides (ALVES, 2001; PERES, 2004). Alguns metabólitos como alcaloides, esteroides, terpenos entre outros estão descritos a seguir.

3.2. Alcalóides

Os alcalóides representam uma grande parte dos metabólitos secundários contendo nitrogênio. Esses compostos foram descobertos em plantas e fungos que exibem excelentes propriedades biológicas. Os alcalóides possuem uma variedade de estruturas químicas nitrogenadas, muitas vezes ricas em alguma atividade biológica importante, podendo ser utilizados como anticancerígenos, antipalúdicos e anti-arrítmicos (DEMBITSKY, 2014; O'CONNOR; MARESH, 2006).

Outra aplicabilidade dos alcalóides está relacionada à capacidade inibidora da acetilcolinesterase (AChE), onde estudos apontam, por exemplo, duas acridonas: quinolactacina A1 (1) e quinolactacina A2 (2) isoladas a partir do fungo *Penicillium citrinum* (Trichocomaceae) possuem efeito inibitório da AChE (LARSEN, 1991). Estruturas dos alcalóides isolados do fungo *Penicillium citrinum* na Fig. 1.

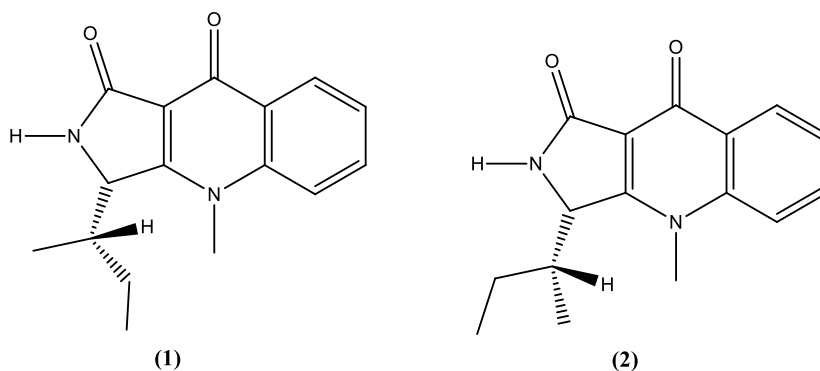


Figura 1: Estruturas dos alcalóides isolados do fungo *Penicillium citrinum*.

Pesquisas relatam que centenas de novos constituintes são produzidos por organismos das seguintes famílias, Hypocreaceae, Nectriaceae, Pleosporaceae, Trichocomaceae (WILLIAMS, 2004). Fungos endófiticos, por exemplo, são uma nova fonte de metabólitos secundários com o potencial para usos médicos, agrícolas e exploração industrial (GUARNIERI, 2007). Essas atividades farmacológicas tem possibilitado sua busca através de diversas espécies (DEMBITSKY, 2014) como relatado por Zhu et al. (2016) que isolou alcalóides de piridona a partir de fungos endofíticos obtido da planta do mangue *S. caseolaris* e Ma et al. (2015) que teve resultados a partir de um fungo derivado de esponja *Aspergillus flavus*.

Wang et al. (2015) estudou a espécie *Hericium erinaceus*, um cogumelo medicinal utilizado há bastante tempo como alimento funcional no norte Asiático. Segundo algumas descrições esta espécie possui efeitos farmacológicos que incluem bioatividades hipoglicêmicas, anticancer e anti-inflamatórias. Com seus estudos ele isolou oito novos

alcaloides estabelecendo suas estruturas por métodos espectroscópicos de RMN e cálculos ECD. Dois dos alcaloides apresentaram citotoxicidade em testes *in vitro* contra células, sendo eles Erinacerin P (3) e Erinacerin M (4) enquanto Erinacerin Q (5) e Erinacerin T (6) apresentaram atividades inibitórias contra as proteínas tirosina fosfatase-1- β e α -glucosidase. Estruturas dos alcalóides isolados do fungo *Hericium erinaceus* na Fig. 2.

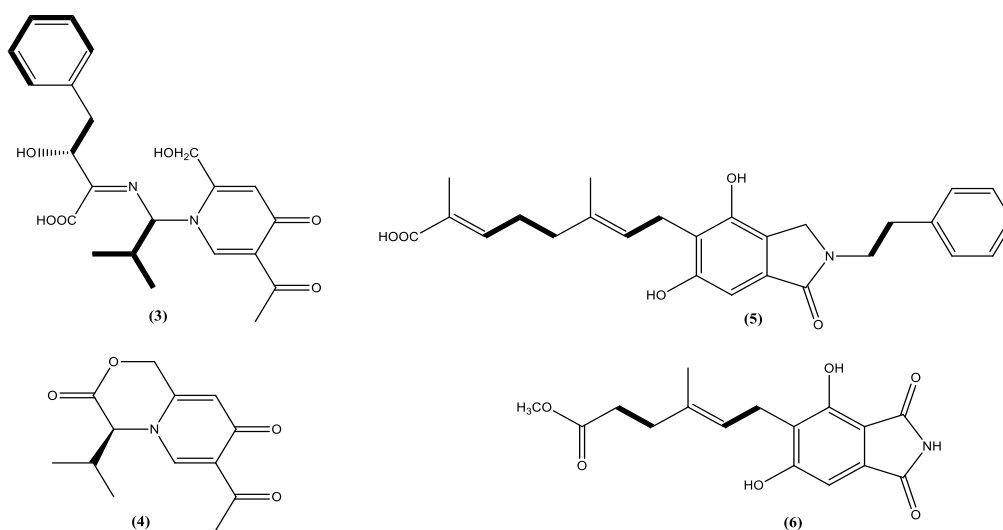


Figura 2: Estruturas dos alcalóides isolados do fungo *Hericium erinaceus*.

Testes de citotoxicidade também foram realizados em dois novos alcalóides, indolprenilados, isolados por Zhang et al. (2015) que estudou o fungo endofítico marinho *Paecilomyces variotii* obtido da *Grateloupia turuturu*, uma alga vermelha. Os alcaloides foram nomeados como dihidrocarneamida A (7) e iso-notoamida B (8). As estruturas foram analisadas através de técnicas de análise em HPLC e análise espectral abrangente. Estes são alcaloides raros, pois diferentes de alguns tipos indolprenilados, esses possuem prenilação C-5 e formam o anel dimetildi-hidropirano fundido em C-5 e C-6 no anel índol que é incomum nesse tipo de alcalóide. Os testes biológicos realizados mostraram que 7 e 8 possuem baixa citotoxicidade contra células tumorais. Estruturas dos alcalóides isolados do fungo *Paecilomyces variotii* na Fig. 3.

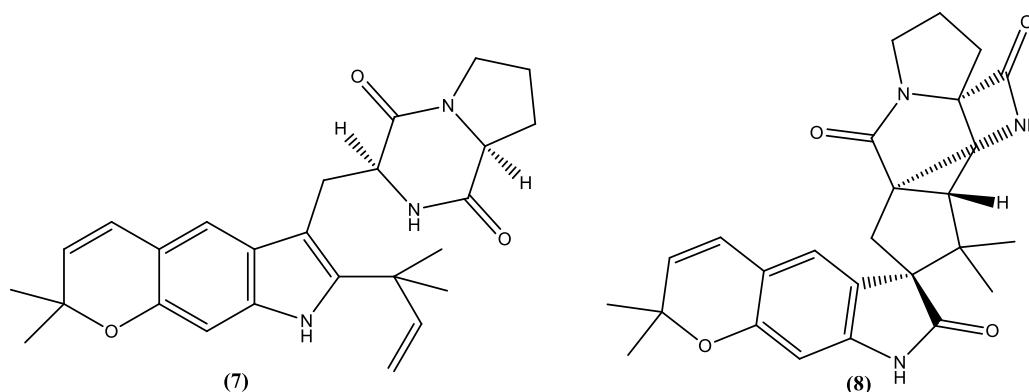


Figura 3: Estruturas dos alcalóides isolados do fungo *Paecilomyces variotii*.

No estudo desenvolvido por Xu et al. (2015) isolaram nove compostos de oxindol do fungo *Penicillium commune* em que suas estruturas foram identificadas a partir de dados espectroscópicos, onde um dos compostos apresentou uma porção rara de 2H-pirrol [2,1-b] piridina e outros dois apresentaram-se como alcalóides policíclicos e polihidroxiílicos complexos. Alguns dos metabólitos também foram testados quanto a atividade citotóxica em carcinoma humano porém, não apresentaram bons resultados.

Outro fungo endofítico foi isolado por Na et al. (2016) em suas pesquisas, onde a partir dos caules e raízes da espécie *Nerium indicum* onze micro-organismos foram determinados e identificados morfológicamente como *Geomyces*, *Trichoderma*, *Penicillium*, *Aspergillus* e *Nigrospora*. O trabalho desenvolvido mostrou também que o isolamento da cepa CH1 (*Geomyces*) pode produzir compostos bioativos como alcalóides indólicos, a vincamina (9), e outros análogos deste composto partir da análise por TLC, HPLC e análise LC-MS. Estrutura de um alcalóide indólico de micro-organismos das raízes de *Nerium indicum* na Fig. 4.

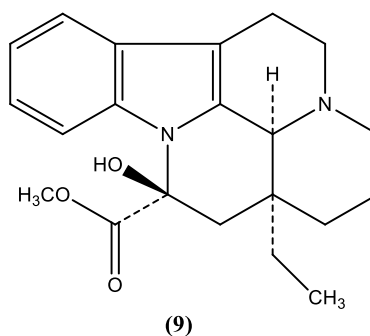


Figura 4: Estrutura de um alcalóide indólico de micro-organismos das raízes de *Nerium indicum*.

Zhang et al. (2014) isolou e identificou dois novos alcalóides, a partir de plantas, incluindo um novo composto derivado da piperidina do fungo *Penicillium oxalicum*, penioxamida A (10) e um novo análogo de decaurina, 18-hidroxydecaurina B (11). O fungo endofítico foi obtido a partir do tecido interno das folhas frescas da planta da espécie *Rhizophora stylosano* do mangue. Suas estruturas e configurações absolutas foram elucidadas com base nos dados espectrais e análise do dicroísmo circular. Estruturas do alcalóides isolados do fungo *Penicillium oxalicum* na Fig.5.

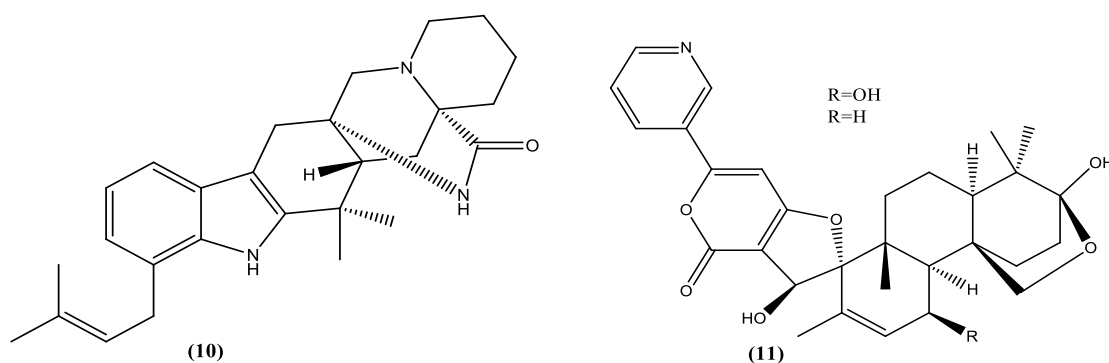
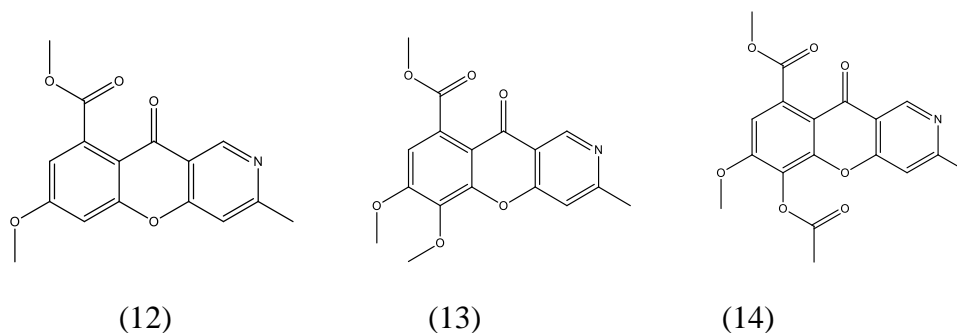


Figura 5: Estruturas dos alcalóides isolados do fungo *Penicillium oxalicum*.

Cui et al. (2017) também isolou seis novos alcaloides a partir de um fungo endofítico (*Diaporthe phaseolorum* SKS019) obtido de um ramo fresco da planta *Acanthusilicifoliuse* e incluíam quatro cromeno [3,2-c] piridinas (diaporfasinas AD) mostradas nas estruturas 12-15 e duas isoindolinonas (meyeroguilinas C e D) mostradas nas estruturas 16-17. Os demais alcaloides descobertos já eram conhecidos, são eles meyeroguilina A, 5-desoxilostrihidina e fusaristatina A (compostos 18, 19 e 20 respectivamente). Suas estruturas foram definidas por análise de RMN 1D e 2D e espectroscopia de massa. Estruturas de compostos isolados de *Diaporthe phaseolorum* SKS019 na Fig. 6.



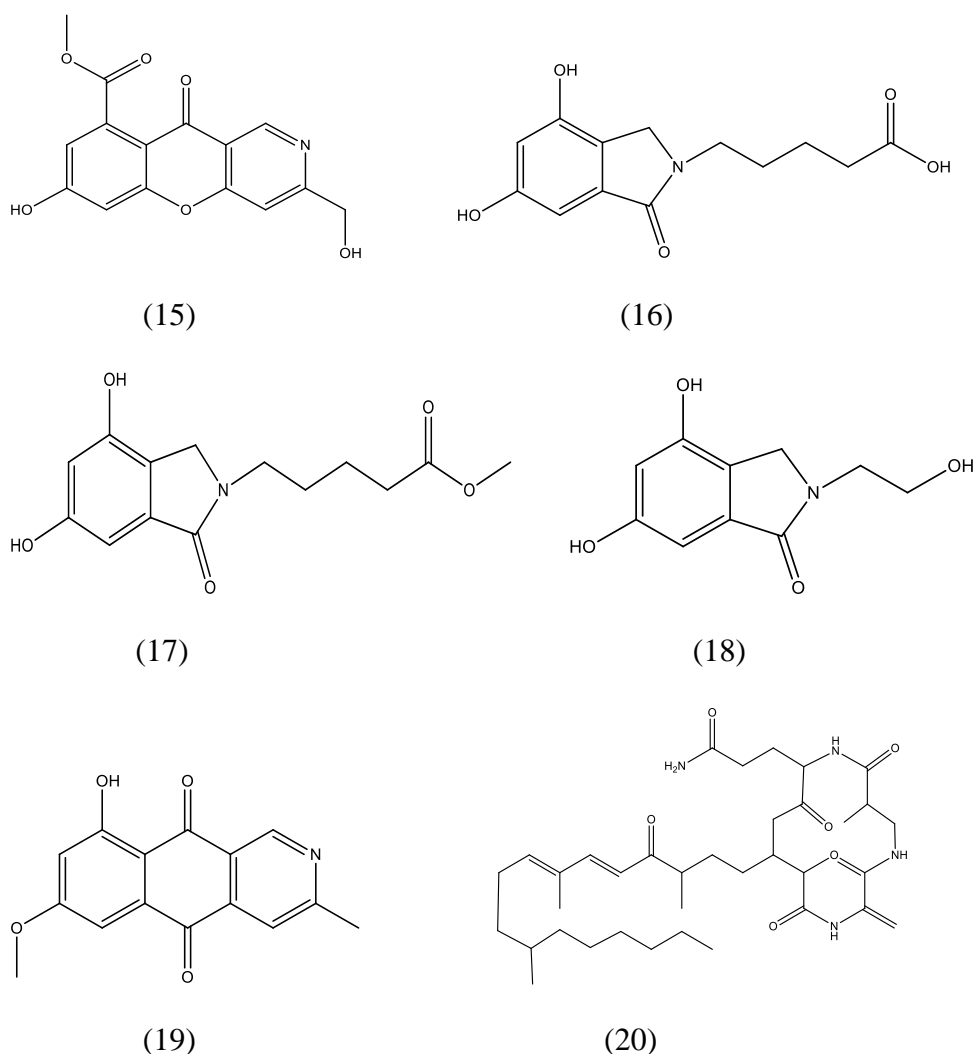


Figura 6: Estruturas de compostos isolados de *Diaporthe phaseolorum* SKS019.

Outros estudos relacionados foram de Wang et al. (2017) que isolaram três pares de alcaloides conhecidos e sete novos que foram obtidos a partir de corpos frutíferos de *G. conclear* e elucidados utilizando técnica de RMN 1D e 2D. Alguns dos novos compostos foram isolados como uma mistura racêmica e suas separações foram realizadas por análise em HPLC, suas configurações absolutas foram determinadas por cálculos de ECD e os novos alcaloides foram nomeados de ganocochlearine. Todos os oito alcaloides apresentaram uma característica comum, o grupo 1,4-di-hidróxido que é um intermediário do ácido chiquímico o que nos leva a especular se esses alcaloides e meroterpenóides nesse fungo podem partilhar uma via biogenética comum.

Isaka et al. (2013) isolou e elucidou a estrutura de um novo alcalóide, cordilactama (21) a partir de um fungo patogênico (*Cordyceps* sp.) de uma aranha (*Araneae*) na fig. 7. A elucidação da estrutura foi através da base de dados espectroscópicas de RMN e

espectrometria de massas, o qual foi confirmada por análise espectroscópica de um derivado semi-sintético. A presença de um metabólito secundário foi sugerida pela exibição de um perfil único de espectroscopia RMN ^1H . Estrutura do composto isolado de *Cordyceps sp* na Fig. 7.

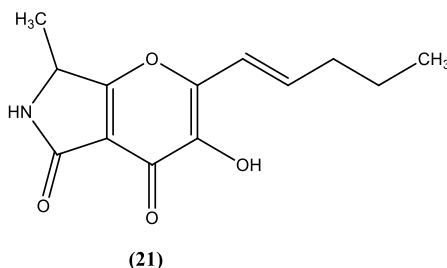


Figura 7: Estrutura do composto isolado de *Cordyceps sp*.

3.3. Esteróides

Esteroides são lipídeos que formam o conjunto de compostos encontrados na fração insaponificável de óleos e gorduras graxas e estão presentes em quantidades na ordem de ppm, em óleos e gorduras, junto com os pigmentos e tocoferóis. Entretanto, os animais, que contêm principalmente colesterol, as plantas sintetizam uma mistura complexa de diferentes tipos de esteroides, onde o principal é o β -sitosterol. Embora os esteroides estejam amplamente distribuídos na natureza, muitos deles são constantemente sintetizados em laboratório, para aplicações químicas e farmacêuticas (BEZERRA; ANTONIOSI; FILHO, 2015).

Zhang e colaboradores (2007) isolaram e identificaram quatro esteróides conhecidos incluindo (22E, 24R)-ergosta-5,7,22-trien-3 β -ol, (22E, 24R)-ergosta-4,6,8 (14), 22- tetraen-3-ona, (22E, 24R) -5 α , 8 α -epidioxi-ergona-6,22-dien-3 β -ol e (22E, 24R) -ergosta- 7,22- dien-3 β , 5 α , 6 β -triol e um aduto natural de Diels-Alder chamado ergostimida do fungo endofítico *Aspergillus niger* EN-13 de um alga marinha marrom, *Colpomenia sinuosa*. Em outro trabalho 5 α , 8 α -epidioxi- (22E, 24R) -ergosta-6,22-dien-3 β -ol foi isolada do fungo patogênico do inseto, *Aschersonia luteola* BCC 31749 e apresentou atividade antibacteriana contra *Bacillus cereus*, bem como mostrou citotoxicidade em relação às células NCI-H187 e vero. (KORNSAKULKARN et al., 2016).

A partir do extrato da cultura do fungo *Penicillium chrysogenum* QEN-24S, um fungo endofítico presente numa espécie de algas vermelhas do gênero *Laurencia* foram obtidos dois novos esteróides polioxigenados, a saber, os penicisteróides A(22) e B(23). Além disso, sete esteróides conhecidos também foram isolados e identificados. As estruturas destes

compostos foram estabelecidas com base numa extensa análise espectroscópica. O Penicisteroide A, que é um esteróide estruturalmente único possuindo grupos tetra-hidróxi e C-16-acetóxi, exibiu uma potente atividade antifúngica e citotóxica nos bioensaios realizados (GAO et al., 2011). Estruturas dos esteróides isolados do fungo *Penicillium chrysogenum* QEN-24S na Fig. 8.

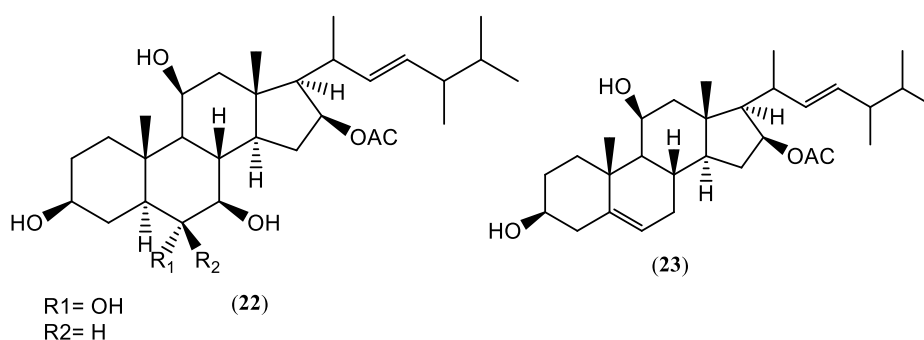


Figura 8: Estruturas dos esteróides isolados do fungo *Penicillium chrysogenum* QEN-24S.

Andersson e colaboradores (2013) isolaram furanosteróides do fungo *Hymenoscyphus pseudoalbidus* causador da doença “ash dieback”, juntamente com os compostos conhecidos viridiol (24) e demetoxiviridiol (25). Os compostos foram caracterizados por espectroscopia de RMN 1D e 2D, LC-HRMS e polarimetria. Estruturas dos esteróides isolados do fungo *Hymenoscyphus pseudoalbidus* na Fig. 9.

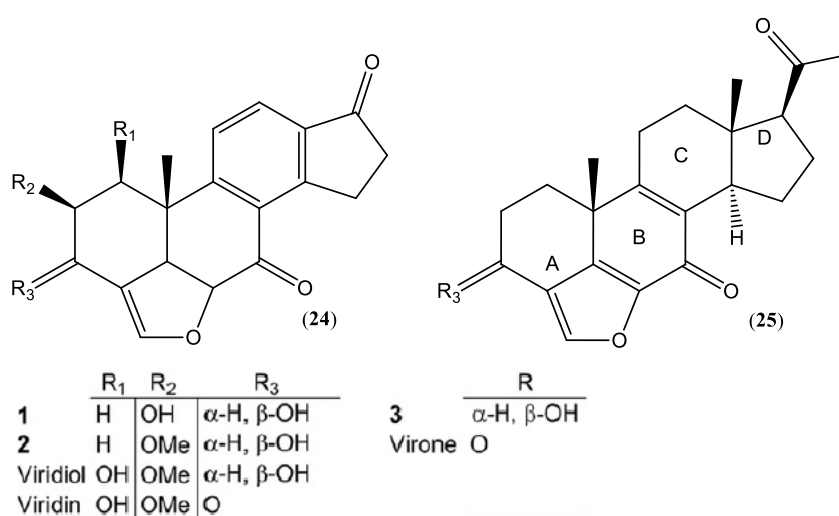


Figura 9: Estruturas dos esteróides isolados do fungo *Hymenoscyphus pseudoalbidus*.

Um novo esteroide C₂₉ poli-hidroxiado, 25ξ -metil-22-homo-5α -colest-7,22-dieno-3β, 6β, 9α -triol designado globosterol, juntamente com um ergosterol tetra-hidroxiado conhecido (22E, 24R) -ergosta-7,22-dieno-3β, 5α, 6β, 9α-tetraol (2) foi isolado a partir das culturas de um fungo endofítico, *Chaetomium globosum* ZY-22 originado da planta *Ginkgo biloba*. As estruturas e configurações relativas destes compostos foram estabelecidos com base em extensas análises espectroscópicas incluindo experiências de RMN 1D e 2D (¹H-¹H COSY, HSQC, HMBC e NOESY) e comparação com a literatura(QIN et al., 2009).

Chen e colaboradores (2014) isolaram de culturas de *Antrodia albocinnamomea* três novos esteróides degradados, denominados albocisteróis A-C. Suas estruturas foram definidas por análise espectroscópica abrangente e cristalografia de raios X de cristal único. A mistura de dois desses compostos exibiu atividades inibidoras significativas contra a proteína tirosina fosfatase 1B (PTP1B).

Em uma investigação química realizada foram isolados três esteróides C₂₅ incomuns, neociclocitrinóis EG e 3β-hidroxi-5,9-epoxi- (22E, 24R) -ergosta-7,22-dien-6-ona juntamente com três esteróides conhecidos a partir de produtos de fermentação sólidos do fungo endofítico, *Chaetomium* sp. M453 da espécie *Huperzia serrata* (Thunb. Ex Murray) Trev. e submetidos a análises espectroscópicas, incluindo RMN 1D, 2D e HR-ESI-MS. O composto 3β-hidroxi-5,9-epoxi- (22E, 24R) -ergosta-7,22-dien-6-ona mostrou uma fraca atividade inibidora de acetilcolinesterase (YU et al., 2017).

Isolaram-se três novos esteróides, denominados cattienóides A-C, juntamente com a esquisanlactona A (4), a partir de corpos frutíferos de *Tomophagus cattienensis* (Ganodermataceae), um cogumelo recém-coletado no Parque Nacional Cattien, no Vietnã. Suas estruturas foram determinadas por métodos espectroscópicos. Adicionalmente, alguns desses compostos mostraram citotoxicidade contra células KB (um carcinoma epidérmico humano). Estes compostos não têm atividade antimicrobiana nem inibição da tirosinase (HIEN et al., 2013).

Tu e colaboradores (2015) relataram quatro novos derivados de esteróides polioxigenados, onde foram isolados a partir da gorgonia *Menella woodin*, recolhida das águas vietnamitas. Suas estruturas foram elucidadas pelas análises espectroscópicas de RMN e por espectrometria de massa, bem como comparação com as relatadas na literatura. Alguns desses compostos diminuem a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) pelos macrófagos murinos da linha RAW 264.7 na indução por lipopolissacárido endotóxico (LPS) de *Escherichia coli*.

Isolou-se a partir do fungo *Phoma sp.* um esteróide C₂₅ estruturalmente único (phomarol) proveniente da medusa gigante *Nemopilema nomurai*. Sua estrutura planar e configuração relativa foram estabelecidas através da análise de dados de RMN 1D e 2D e sua configuração absoluta foi determinada usando o método de Mosher modificado e o cálculo do ECD (LAKIM et al., 2016) [33]. Realizou-se ensaios em outro trabalho com extrato de EtOAc da cultura da mesma espécie porém isolado de *Fucus serratus (F. serratus)* que demonstraram boa atividade antifúngica e boas atividades antibacterianas e antialgal (HUSSAIN et al., 2014).

Dois compostos novos, (22E)-25-carboxi-8 β , 14 β -epoxi-4 α , 5 α -dihidroxi-gergona-2,22-dien-7-ona e fusidiona, juntamente com dois compostos conhecidos 5 α , 8 α -epidioxi ergosta-6,22-dieno-3 β -ol e microperfuranona, foram isolados a partir dos produtos de fermentação do fungo de origem marinha *Acremonium fusidioides* RZ01. As estruturas de dois desses compostos foram elucidadas por métodos espectroscópicos extensivos, especialmente por RMN 2D, e as suas configurações absolutas foram sugeridas com base na análise espectral do dicroísmo circular e nos dados NOESY. Ambos os novos compostos mostraram atividade inibitória contra as células HL-60 (AN et al., 2016).

Dois novos antraquinona-esteróides foram isolados do fungo endofítico *Emericella varicolor*, o evantrasterol A (26) e B(27), e um novo meroterpenóide, ácido emericélico(28), juntamente com seis compostos conhecidos: ácido estelático (29), ergosterol (30), 14-metoxitajixantona-25-acetato (31), 8-hidroxi-1,3-dimetoxi-6-metilantraquinona (32), 2,8-dihidroxi-1,3-dimetoxi-6-etilantraquinona (33) e hidrato de tajixantona (34) a partir do extrato bruto de acetato de etila do micélio e do caldo de cultura em MaltCzapek-Doxde *E. varicolor* (CELIS et al., 2014). Estruturas dos compostos isolados do fungo *Emericella varicolor* na Fig. 10.

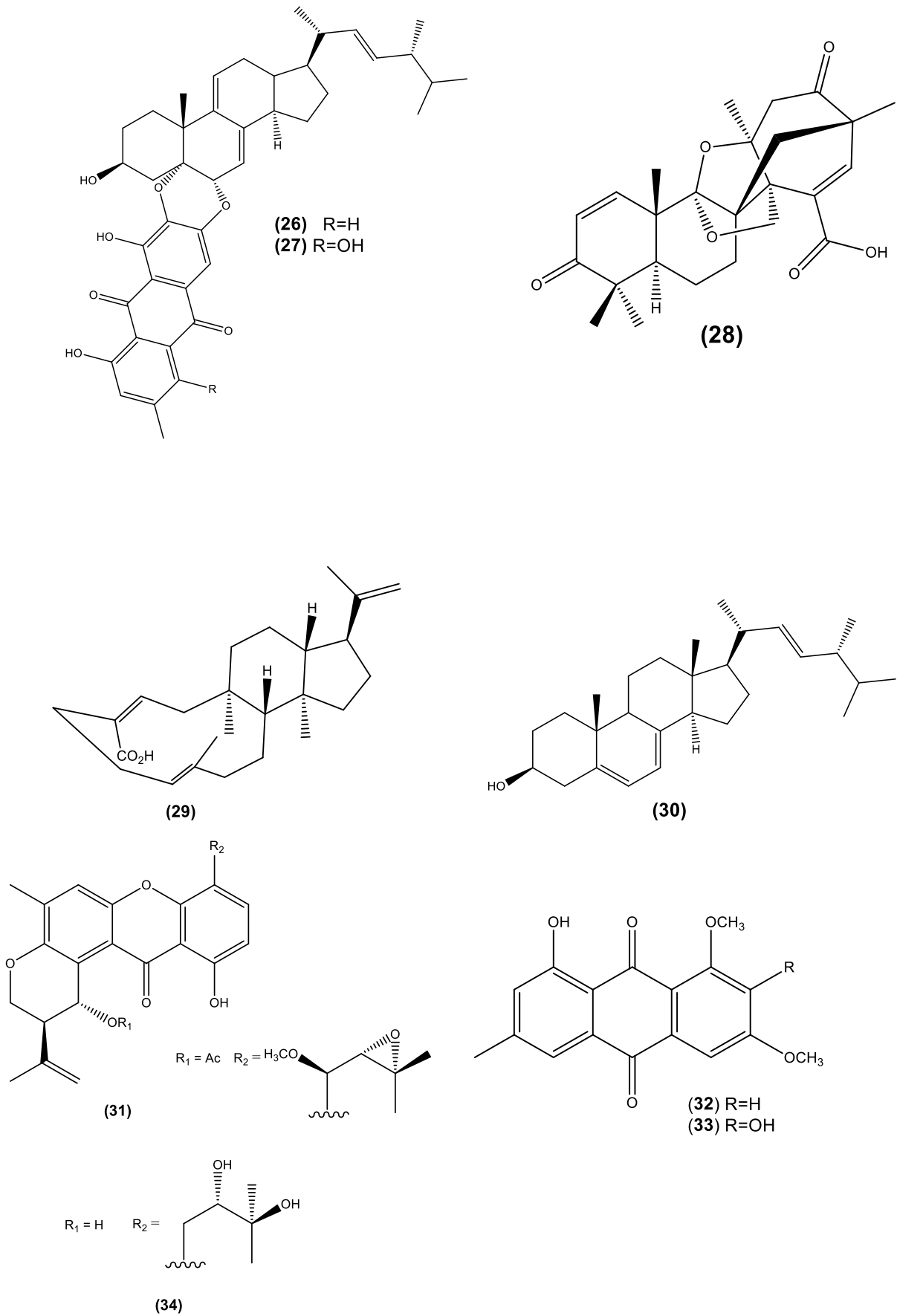


Figura 10: Estruturas dos compostos isolados do fungo *Emericella varicolor*.

Paterson (2016) destaca o gênero *Ganoderma* com um grande potencial terapêutico bem como a capacidade de induzir apoptose e inibir a proliferação celular. A caracterização dos compostos destes organismos permitiu a identificação de seus principais constituintes farmacologicamente ativos como: triterpenoides e esteroides, polissacárideos, proteínas, peptídeos e aminoácidos.

A abordagem utilizada por Yeh e colaboradores (2016) para obtenção de biomassa micelial e metabólitos para produção de compostos farmacêuticos de fungos tem se utilizado o processo de fermentação submersa do corpo de frutificação onde se desenvolveu a produção da biomassa micelial e triterpenóides na cultura submersa da trufa do fungo endofítico *Hypocreale ssp.* provindo da espécie *Tuber magnatum*. As principais composições de esteróis do corpo de frutificação de *Tuber magnatum* e micélio de *Hypocreales sp.* Os seus compostos foram identificados por cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massas (CG/MS). Um total de 12 esteróis foram identificados e 11 esteróis foram pela primeira vez relatados, indicando que ambos eram boas fontes de alimentos ricos em esteróis. Além disso, quatro fitoesteróis benéficos para a saúde (isto é, brassicasterol, campesterol, estigmasterol e β -sitosterol) foram encontrados no micélio do fungo.

3.4. Terpenos

Os terpenos são derivados das unidades básicas de cinco carbonos, no qual sua origem biossintética provém de unidades do isopreno (WAWRZYN; BLOCH; SCHMIDT-DANNERT, 2012). Podem ser encontrados em bactérias, fungos, algas, plantas (abundante em óleos essenciais, ceras de resina e latex) e alguns animais (principalmente insetos e organismos marinhos). Foram descritas duas vias diferentes para biossíntese dos terpenos: a via do mevalonato e o fosfato de desoxixilose / metileritritol (DOXP / MEP) (GONZALEZ-BURGOS; GOMEZ-SERRANILLOS, 2012).

Apesar dos terpenos serem estudados principalmente em produtos naturais das plantas, também é constituinte dos fungos. As espécies do gênero *Fusarium*, causadoras da patologia do grão Fusarium, sintetizam micotoxinas sesquiterpenóides, denominadas tricotecenos, no qual representam uma ameaça aos seres humanos e animais por meio do contato das culturas infectadas com as fontes de alimento (KIMURA et al., 2007; WAWRZYN; BLOCH; SCHMIDT-DANNERT, 2012).

Há diversas utilizações dos terpenos na medicina terapêutica e popular, principalmente de terpenos derivados de plantas. Esses têm sido utilizados como

tranquilizantes sedativos e anticonvulsivantes. Alguns óleos essenciais de terpenos apresentam atividades farmacológicas, tais como antinociceptiva, anticonvulsivante e ansiolítica. Diversos derivados monoterpênicos têm evidenciado atividade analgésica e antidepressiva (LEITE et al., 2008; PASSOS et al., 2009; SOUSA; NÓBREGA; ALMEIDA, 2007; PERAZZO et al., 2007; SOUSA et al., 2007).

No estudo realizado por Cohen et al... (2011) descrevem os fungos como produtores prolíficos de diversos tipos de produtos naturais incluindo metabólitos de mistura policetídeo e biossínteses de terpenos tais como os meroterpenóides. Três novos meroterpenóides, os insuetolides A-C (35-37) e quatro sesquiterpenos drimano, foram isolados a partir do extrato de acetato de etila do meio de cultura do fungo *Aspergillus insuetus* que foi isolado a partir da esponja marinha *Psammocinia sp.* do Mediterrâneo. As estruturas dos compostos foram determinadas por métodos espectroscópicos. Estruturas dos terpenos isolados do fungo *Aspergillus insuetus* na Fig. 11.

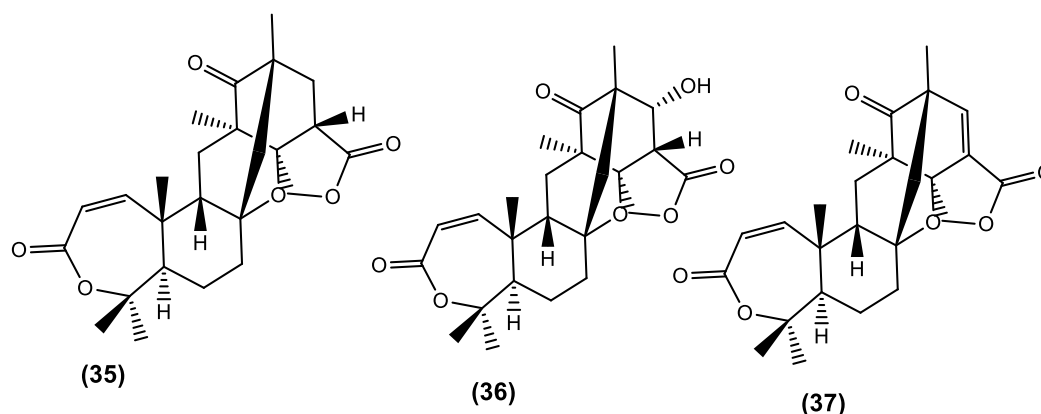


Figura 11: Estruturas dos terpenos isolados do fungo *Aspergillus insuetus*

Em outro trabalho desenvolvido por Kuhnert et al... (2015) obtiveram dez metabólitos secundários de origem terpênic, os quais foram isolados a partir de culturas submersas de fungo da espécie *Hypoxylon rickii* através de HPLC no modo preparativo. Suas estruturas foram elucidadas utilizando técnicas espectrais, incluindo RMN 2D complementado por HRESIMS. Três compostos foram elucidados como novos botrianos (38–40) juntamente com três outros conhecidos, (3aS)-3a,5,5,8-tetrametil-3,3a,4,5-tetrahydro-1H-ciclopenta[de]isocromen-1-ona (41) (3aS,8R)-3a,5,5,8-tetrametil-3,3a,4,5,7,8-hexahidro-1H-ciclopenta[de]isocromen-1-ona (42) e botrienanol (43). Outros três novos sesquiterpenoides

apresentaram um esqueleto tipo 14-noreudesmano e foi chamado hipoxilan A–C (**44–46**); o diterpenoide rickitina A (**47**) contendo um esqueleto tipo abietano. Alguns compostos apresentaram efeitos citotóxicos contra a linha de células de fibroblastos de rato L929 e a do carcinoma colo do útero, KB3.1. Estruturas dos compostos isolados do fungo *Hypoxylon rickii* na Fig. 12.

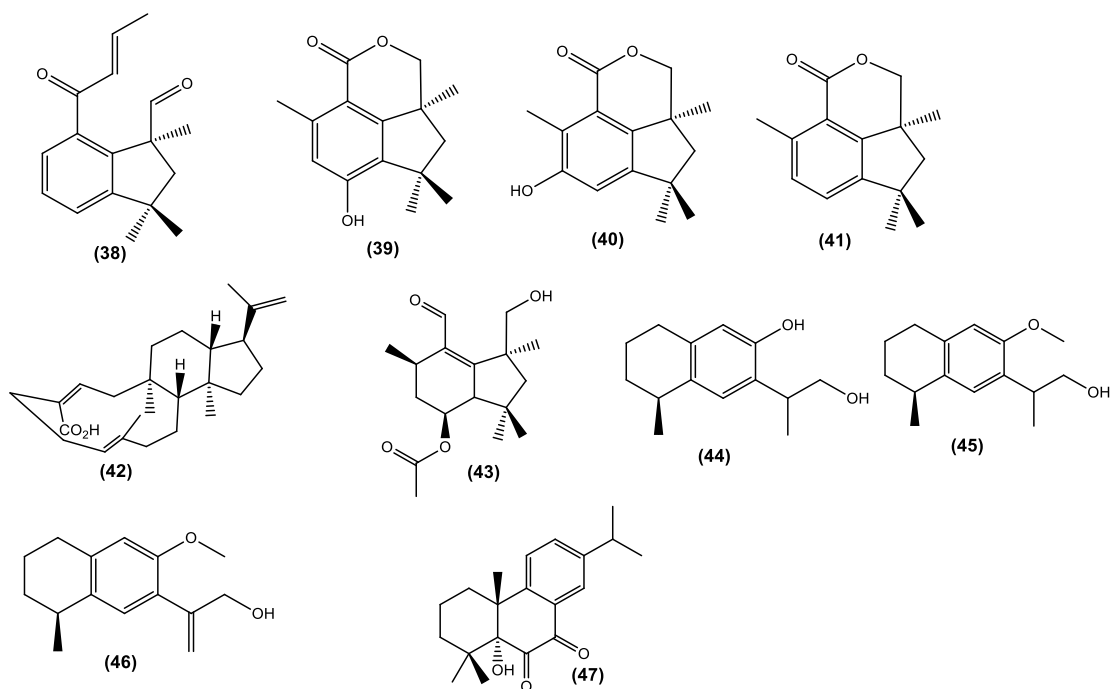


Figura 12: Estruturas dos compostos isolados do fungo *Hypoxylon rickii*.

Já na pesquisa desenvolvida por Whang et al... (2013) isolaram-se três terpenóides inéditos mistos, os tricicloalternarenos (TCAs) e o F-H (**48-50**), utilizando cultura de Czapek de um fungo endófito *Ulocladium sp.* Outros dez tricicloalternarenos já conhecidos foram isolados, são eles, TCA 1a (**51**), TCA 1b (**52**), TCA2a (**53**), TCA2b (**54**), TCA6a (**55**), TCA6b (**56**), TCA9b (**57**), tricicloalternarenal (**58**), ACTG-toxinH(**59**), e TCAD (**60**). As estruturas dos compostos foram elucidadas por técnicas espectroscópicas (RMN e MS) e por comparação com os dados da literatura. TCAs mostrou fraca atividade contra a cepa de Bacilo de *Calmette-Guerin* com o MIC de 125 µg/mL. TCAs exibiram forte atividade citotóxica contra a linha de células tumorais humanas, Hela, utilizando método MTT. Estruturas dos compostos isolados do fungo *Ulocladium sp.* na Fig. 13.

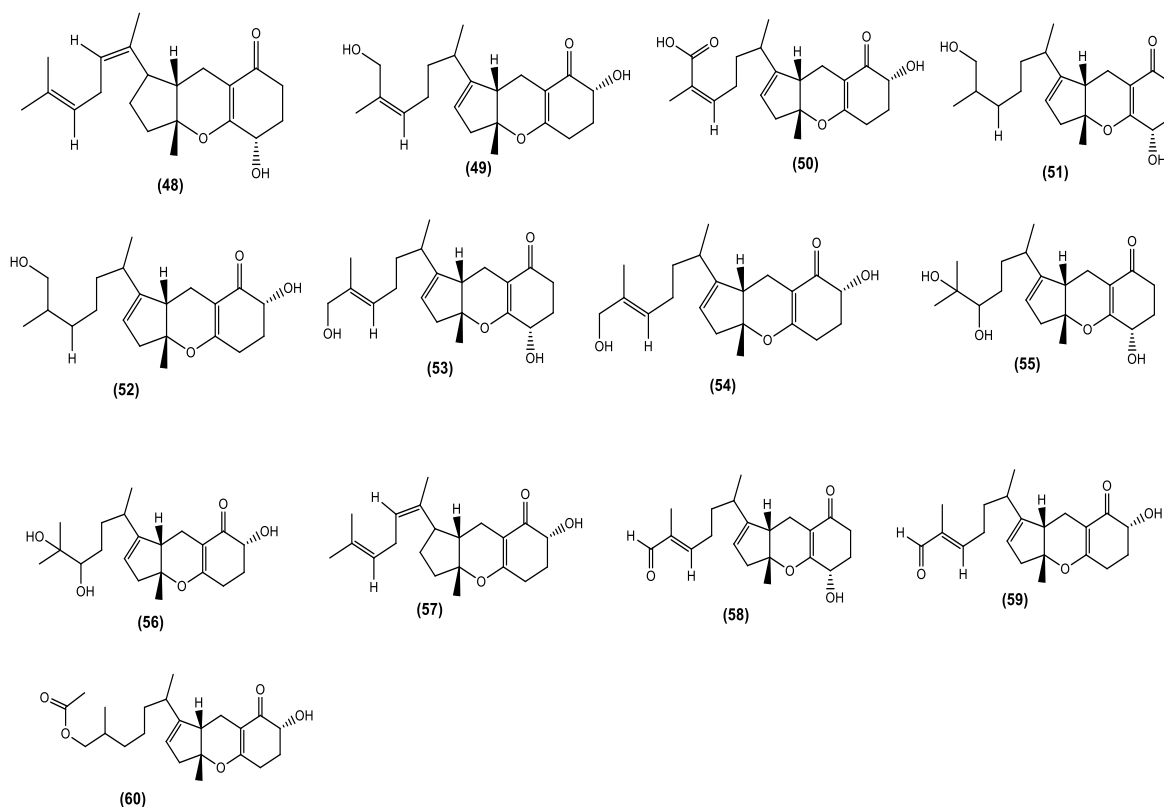


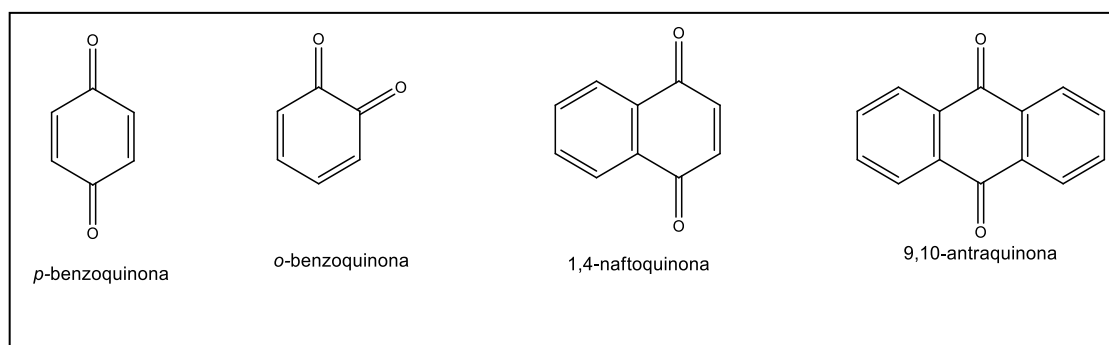
Figura 13: Estruturas dos compostos isolados do fungo *Ulocladium sp.*

3.5 Quinonas

Conforme Da Silva et al. (2003) as quinonas é uma família de metabólitos de distribuição natural, envolvidas em etapas cruciais do metabolismo de seres vivos, principalmente nos níveis da cadeia respiratória, da fotossíntese e coagulação sanguínea, como por exemplo as ubiquinonas, plastoquinonas, vitaminas do tipo K, respectivamente. Com base na sua estrutura molecular, as quinonas são divididas em diferentes grupos, utilizando-se como critério o tipo de sistema aromático que sustenta o anel quinonoídica: benzoquinonas - um anel benzênico; naftoquinonas - um anel naftalênico; antraquinonas - um anel antracênico linear ou angular (Simões, 2007). Principais esqueletos das quinonas na Fig. 14.

Em estudos farmacológicos as quinonas apresentaram propriedades antifúngicas (ÍBIS et al. 2011), tripanossomicidas (SILVA JÚNIOR et al., 2009), viruscidas (STAGLIANO et al., 2006), antitumorais (Zakharova et al., 2011). Outra atividade marcante destas substâncias, descoberta um tanto recentemente, é a inibição do complexo das

topoisomerasas, ação que provoca o desencadeamento do apoptose celular (suicídio celular) (DA SILVA et al., 2003).



Esquema 1: Principais esqueletos das quinonas

Figura 14: Principais esqueletos das quinonas.

Conforme revisão elaborada por Da Silva e colaboradores (2003) dentre os fármacos com agrupamento quinona utilizados na clínica e proveniente de culturas de fungos do gênero *Streptomyces* temos os antibióticos mitociclina, tendo como maior representante a mitomicina C utilizada na quimioterapia de tumores sólidos, e as antraciclina cujos os representantes mais conhecidos desta classe são a daunorubicina (61) e a adriamicina (62) isoladas de *S. peuceoticus* e *S. coeruleorubidus*, respectivamente. A daunorubicina (63) também possui efeito terapêutico contra a leucemia humana. Estruturas das quinonas isoladas do fungo do gênero *Streptomyces*. na Fig. 15.

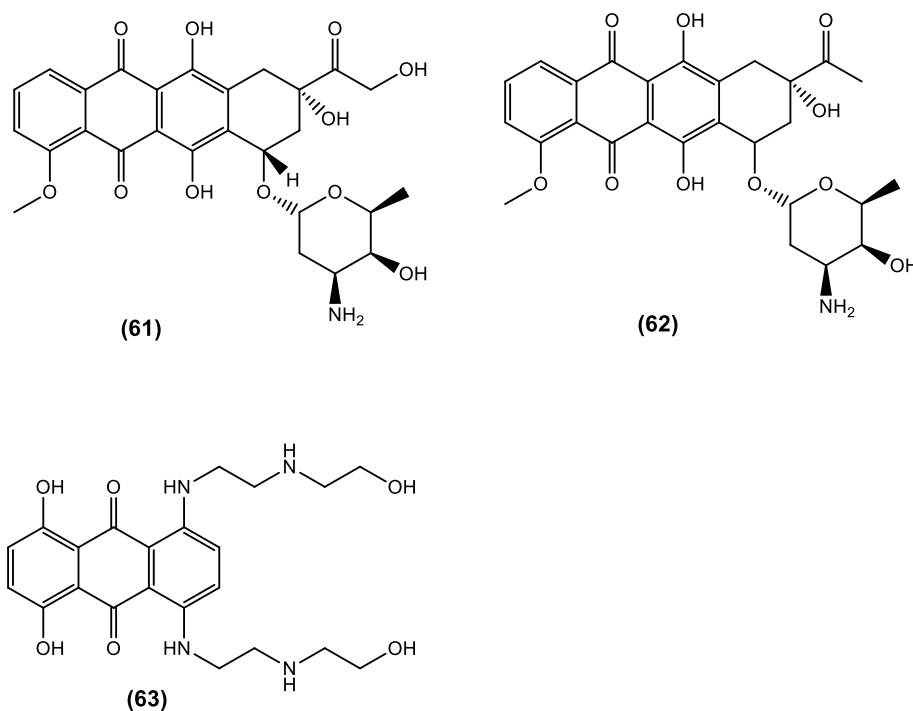


Figura 15: Estruturas das quinonas isoladas do fungo do gênero *Streptomyces*.

Essa notável citotoxicidade está relacionada ao caráter fortemente eletrofílico das quinonas que sofrem redução transformando-se na forma reativa de semiquinona, esta por sua vez *in vivo* passa por um ciclo redox reagindo com o oxigênio molecular gerando espécies reativas de oxigênio as quais podem causar danos em membranas, proteínas e no DNA, podendo induzir a apoptose das células (SOUSA, LOPES E ANDRADE, 2016).

Uma investigação química realizada recentemente por Wang e colaboradores (2015) da cultura líquida extraída com acetato de etila do fungo *Bipolaris sorokiniana* isolado a partir da planta medicinal *Pogostemon cablin* resultou no isolamento de quatro novos compostos citotóxicos. O extrato foi submetido a vários protocolos de cromatografia em coluna para dar compostos 60- 68. As estruturas dos novos compostos isocochlioquinona D (64), isocochlioquinona E (65), cochlioquinona G (66), cochlioquinona H (67) e enquanto que os compostos conhecidos foram atribuídos isocochlioquinona C (68), cochlioquinona C (69), cochlioquinona D (70), cochlioquinona E (71) e cochlioquinona B (72) foram elucidadas por análise espectroscópica e pelas propriedades físico-químicas, bem como, por comparação dos seus dados espectroscópicos com aqueles encontrados na literatura. Estruturas das quinonas isoladas do fungo do *Bipolaris sorokiniana* na Fig. 16.

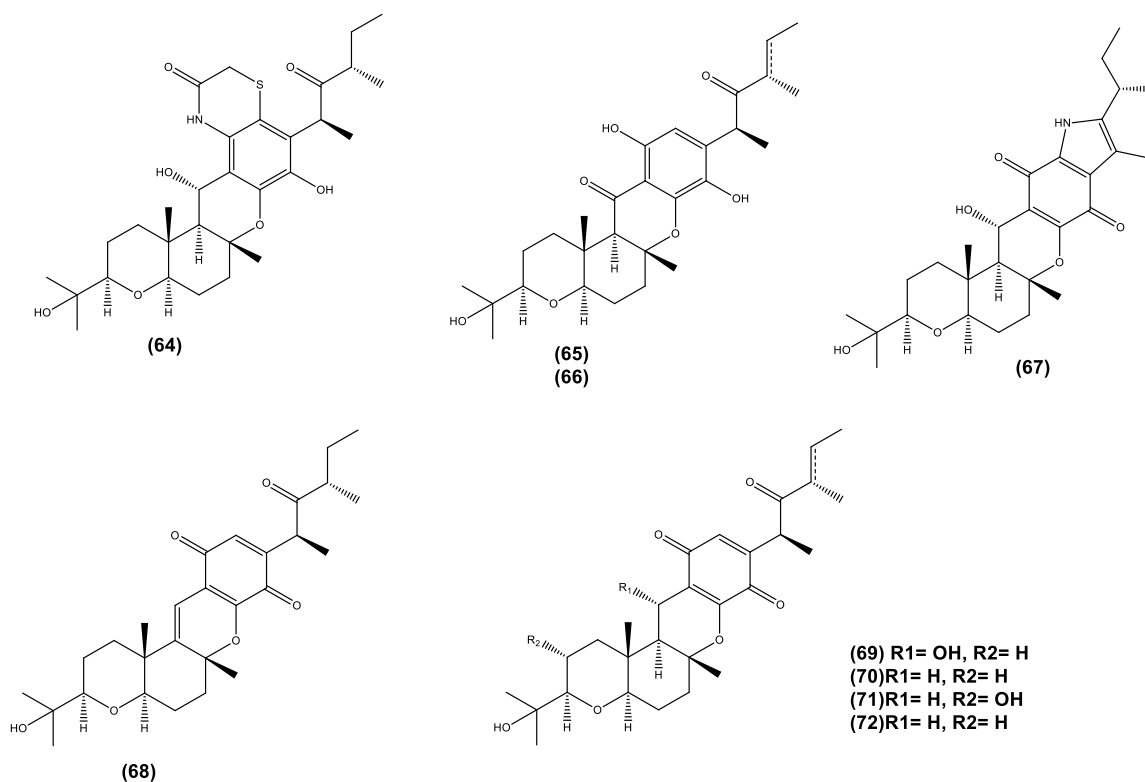


Figura 16: Estruturas das quinonas isolados do fungo do *Bipolaris sorokiniana*.

Chagas e colaboradores (2016) destacam que perilenequinonas são de metabólitos

secundários encontrados em fungos, plantas, insetos e animais (crinóides). Estes metabólitos foram obtidos a partir de culturas do fungo *Alternaria tenuissima*. A investigação comprovou a aquisição de três novos produtos naturais, 1,4,6b, 7,10-penta-1,2,6b, 7,8,12b-hexahidroperileno-3,9-diona (**73**), 1,4,9,12a-tetra-hidroxi-12-metoxi-1,2,11,12,12a, 12b-hexahidroperileno-3,10-diona (**74**) e 1,4,9-trihidroxi-1,2-dihidroperileno-3,10-diona (**75**). As estruturas químicas foram determinadas por análises combinadas de RMN 1D e 2D, UV e ESIHRMS. O Composto (**73**) é apontando como um provável intermediário na via de biossíntese de alguns perilenequinonas produzidas por este fungo. Estruturas das quinonas isoladas do fungo do *Alternaria tenuissima* em Fig. 17.

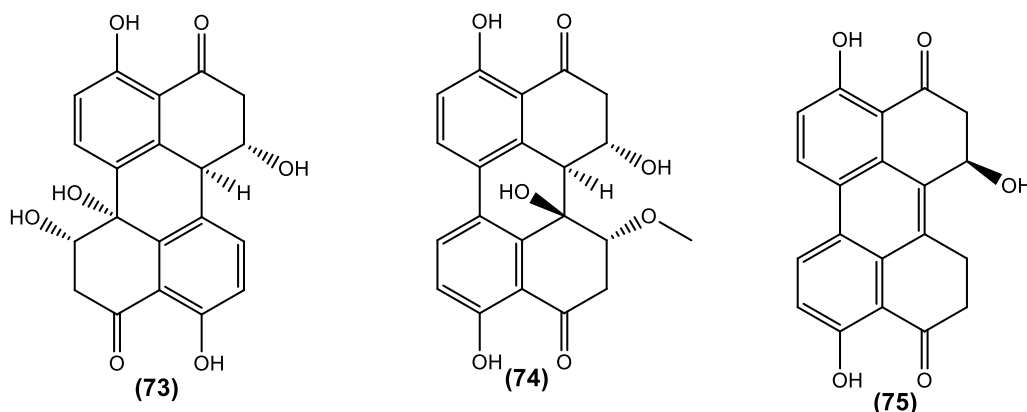


Figura 17: Estruturas das quinonas isolados do fungo do *Alternaria tenuissima*.

Chokpaiboon e colaboradores (2016) relataram os novos compostos, astronipirona (**76**), astroniquinona (**77**) e astroniurea (**78**), juntamente com três compostos conhecidos, xestodecalactona A (**79**), ent-coryoctalactona B (**80**) que isolaram a partir do fungo marinho *Astrosphaeriella nypae*. Suas estruturas foram elucidadas com base nos dados de espectroscopia de RMN e espectrometria de massas. Astronipirona possui um derivado de 2-pirona fundido com uma porção de tetra-hidrofurano através de uma unidade de di-hidropirano, enquanto que o anel 2-pirona é substituído por um esqueleto naftoquinona em astroniquinona. Estruturas das quinonas isoladas do fungo do *Astrosphaeriella nypae* na Fig. 18.

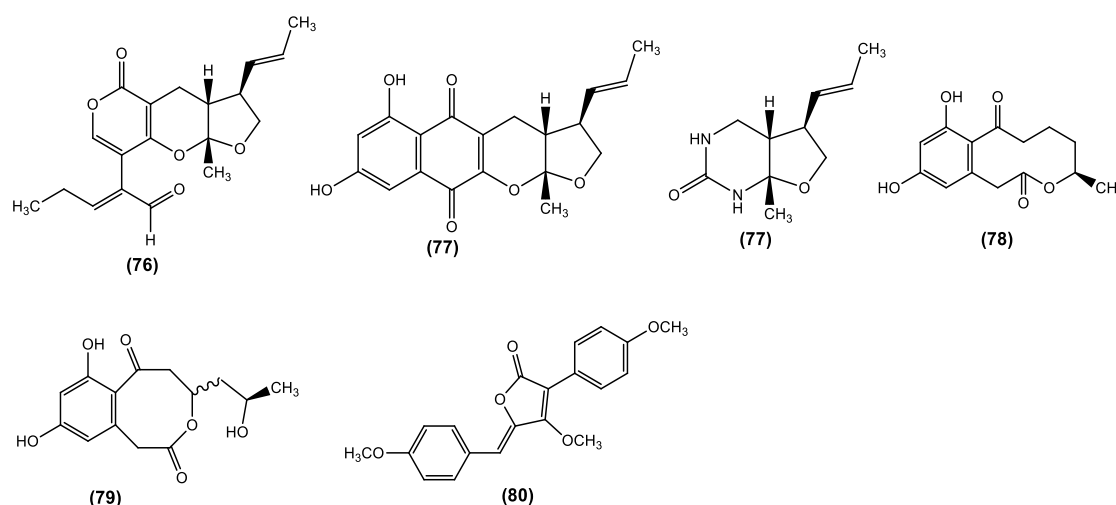


Figura 18: Estruturas das quinonas isolados do fungo do *Astrosphaeriella nypae*.

3.6. Flavonoides

Os flavonoides são metabólitos secundários derivados do fenilpropanóide, sendo caracterizados principalmente em plantas. Os principais subgrupos de flavonóides encontrados na maioria das plantas superiores incluem chalconas, flavonas, flavonóis, antocianinas, proantocianidinas (taninos condensados) e auronas (WILLIAMS, 2004; REDDY, 2007).

Uma de suas propriedades mais divulgadas é a capacidade de captar espécies reativas de oxigênio (ROS). Embora isso seja conhecido há algum tempo, os flavonóides estão ganhando mais notoriedade devido ao impacto que os ROS causam aos humanos (POTAPOVICH, 2003) e no metabolismo e fisiologia de plantas (WINKEL-SHIRLEY, 2001). ROS implicam na função e permeabilidade da membrana, degradação oxidativa de proteínas e DNA, oxidação de pigmentos, redução da atividade fotossintética, respiração e na morte celular (LARSEN, 1999; WILLIAMS, 2004).

Recentemente flavonóides do fungo *Flammulina velutipes* foram isolados e a composição química deste foi identificada por cromatografia líquida de alta eficiência/espectrometria de massa (HPLC / MS). Os flavonóides foram identificados como arbutina, epicatequina, filirina, apigenina, campferol e formononetina. Os flavonóides têm sido apontados recentemente como uma abordagem promissora para retardar o envelhecimento e exercem uma poderosa proteção contra a lesão neuronal envolvida na doença de Parkinson (DP) e doença de Alzheimer (AD) (HU et al., 2016).

Wang e colaboradores (2017) descrevem que diferenças antioxidantes entre dois extratos de flavonóides do corpo de frutificação e caldo de fermentação do fungo *Phellinus igniarius* foram determinadas, e os efeitos da adição de flavonóides sobre as características sensoriais de caviar de esturjão foram investigados. Dessa forma, concluíram que os extratos de flavonóides do corpo de frutificação seco e da cultura submersa de *P. Igniarius* poderiam ser bons antioxidantes para armazenamento de caviar de esturjão. Os resultados indicaram que extratos de flavonóides de produtos fermentados de *P. Igniarius* podem ser uma fonte promissora de aditivos alimentares antioxidantes.

3.7. Atividades farmacológicas apresentadas por fungos.

Nogueira e colaboradores desenvolveram extratos de acetato de etila dos fungos fitopatogênicos *Diplodia maydise*, *Sclerotium rolfii* que apresentaram atividade bactericida contra bactérias multirresistentes isoladas de pacientes de um Hospital Universitário para testar a atividade antibacteriana. Este estudo demonstrou que os extratos de acetato de etila *D. maydis* e *S. rolfii* têm um espectro mais amplo de inibir a ação de crescimento de todas as bactérias testadas como: *Acinetobacter baumannii*, *Enterococcus cloacae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis* e *Staphylococcus aureus* mostrando que os fungos produzem metabólitos secundários que podem ser utilizados como agentes antibióticos ou como protótipos das mesmas.

No ensaio realizado, *in vitro* e *in vivo*, a levedura *Candida guilliermondii* foi usada para determinar sua eficácia no controle biológico de *Rhizopus stolonifer* em tomates (*Lycopersicon esculentum*). Testou-se o efeito antagonista utilizando uma suspensão biomassa de levedura e cromatografia em fase gasosa com um detector seletivo de massa que foram utilizados para identificar seus metabólitos. Os dados apresentaram máxima atividade antifúngica no ensaio *in vivo* utilizando biomassa de levedura (88% de proteção) e a fase orgânica contendo metabólitos (80% de proteção) (CELIS et al., 2014).

Chow e colaboradores (2014) buscaram por endófitos que produzissem a enzima L-asparaginase para aproveitar o seu potencial anticancerígeno para a produção em massa. Foram isolados fungos de plantas *Cymbopogon citratus*, *Murraya koenigii*, *Oldenlandia diffusa* e *Pereskia bleo* que produzem esta enzima e foram identificadas como espécies dos prováveis gêneros *Colletotrichum*, *Fusarium*, *Phoma* e *Penicillium*. Nesta investigação os endófitos mostraram ser boas fontes alternativas para a produção de L-asparaginase e eles podem ser provenientes de plantas anticancerígenas, principalmente o *P. bleo*.

O extrato do fungo *Meyerozyma guilliermondii* mostrou um excelente efeito citotóxico indicando seu possível potencial de desenvolvimento como uma droga antineoplásica que merece uma investigação mais aprofundada. Os extratos de acetato de etila deste fungo apresentaram uma ótima atividade citotóxica contra linhas celulares de Hep2 e adenocarcinoma de mama humano (MCF-7) com valores de IC₅₀ de 1,25 e 0,625 µg/mL, respectivamente (JOEL & BHIMBA, 2013).

A atividade antioxidante foi demonstrada por Li e colaboradores (2016) a partir dos metabólitos do fungo *Aspergillus iizuka*, que residem nas vísceras de espécies grilos de *Gryllus testaceus*. As atividades antioxidantes foram avaliadas através de ensaios de eliminação de radicais ABTS e DPPH. Três compostos exibiram atividades significativas com valores de IC₅₀ de 29,46, 9,59 e 12,36 mM, respectivamente, em comparação com o controle positivo Trolox (IC₅₀ 13.11mM). Pelo método DPPH, fungos endofíticos *Chaetomium sp.*, *Aspergillus sp.*, *Aspergillus peyronelii* e *A. niger* isolados de *Eugenia jambolana* se mostraram eficientes com 98% de atividade antioxidante (Hu, et al...). Além da atividade antioxidante para o extrato metanólico do cogumelo comestível *Cantharellus cibarius* Fr. ter apresentado 50% para *in vitro* também se relata as atividades citotóxica, anti-hipertensiva e antibacterianas para este fungo (KOZARSKI, 2015).

3. CONSIDERAÇÕES E PERSPECTIVAS

São notáveis que as diversificadas classes de constituintes presentes nos fungos lhes conferem inúmeras atividades que subsidiarão o desenvolvimento de novas drogas. Diante dessa diversidade de ações e investigações sobre esses metabólitos devem-se avançar as pesquisas a fim de elucidar novas moléculas bioativas ou mesmo servir como modelo para biossíntese de novos compostos. Esta evidência somada à grande demanda atual no uso de produtos naturais com propósitos medicinais somados às pequenas quantidades normalmente existentes nos fungos, leva o interesse pela utilização das tecnologias de alimentos, da farmácia e industriais. Devido a isso, um maior número de pesquisas deveria ser feito sobre as substâncias biologicamente ativas contidas nesses organismos as quais são necessárias para determinar seus efeitos benéficos e/ou maléficis com mais exatidão, podendo oferecer eficácia nos seus usos sem riscos de toxicidade.

REFERÊNCIAS

- AN, X. et al... Isolation and identification of two new compounds from marine-derived fungus *Acremonium fusidioides* RZ01. **Chinese Journal Of Natural Medicines**, China, v. 14, n. 12, p.934-938, dez. 2016.
- ANDERSSON, P. F. et al... Viridin-like steroids from *Hymenoscyphus pseudoalbidus*. **Phytochemistry**, Sweden, v. 86, p.195-200, fev. 2013.
- ARORA, D. K.; ELANDER, R. P. & MUKERJI, K. G.. **Handbook of applied mycology. Volume 4: Fungal biotechnology**. New York, Marcel Dekker, 1992.
- ARORA, D. K.; ELANDER, R. P. & MUKERJI, K. G.. **Handbook of applied mycology. Volume 4: Fungal biotechnology**. New York, Marcel Dekker, 1992.
- BARREIRO, E. J.; BOLZANI, Vanderlan da Silva. Biodiversidade: fonte potencial para a descoberta de fármacos. **Química Nova**, [s.l.], v. 32, n. 3, p.679-688, 2009.
- CELIS, C.Z. et. al. Determining the effectiveness of *Candida guilliermondii* in the biological control of *Rhizopus stolonifer* in postharvest tomatoes. **Universitas Scientiarum**, v.19, p.51-62, nov.2014.
- CHAGAS, F.O. et. al. New perylenequinone derivatives from the endophytic fungus *Alternaria tenuissima* SS77. **Tetrahedron Letters**, v. 57, p. 3185–3189, 2016.
- CHEN, Z. et al... Three novel degraded steroids from cultures of the Basidiomycete *Antrodiella albocinnamomea*. **Steroids**, China, v. 87, p.21-25, set. 2014.
- CHOKPAIBOON, S. et al... A pyrone, naphthoquinone, and cyclic urea from the marine-derived fungus *Astrosphaeriella nypae* BCC 5335. **Tetrahedron Letters**, v. 57, p. 1171–1173, 2016.
- COHEN, E. et al... Novel terpenoids of the fungus *Aspergillus insuetus* isolated from the Mediterranean sponge *Psammocinia* sp. collected along the coast of Israel. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, [s.l.], v. 19, n. 22, p.6587-6593, nov. 2011.
- CUI, H. et al... Alkaloids from the mangrove endophytic fungus *Diaporthe phaseolorum* SKS019. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, [s.l.], v. 27, n. 4, p.803-807, fev. 2017.
- DA SILVA JUNIOR, E.N. et al... Cytotoxic, Trypanocidal Activities and Physicochemical Parameters of nor-B-Lapachone-based 1,2,3-Triazoles. **Journal of the Brazilian Chemical Society**. v. 20, n. 4, p. 635-643, 2009.
- DA SILVA, M.N., FERREIRA, V.F.; DE SOUSA, M.C.B.V. Um panorama atual da Química e da Farmacologia de Naftoquinonas com ênfase na b-lapachona e seus derivados. **Quim.**

Nova, v. 26, n. 3, p.407-416, 2003.

DEMBITSKY, V. M.. Naturally occurring bioactive Cyclobutane-containing (CBC) alkaloids in fungi, fungal endophytes, and plants. **Phytomedicine**, [s.l.], v. 21, n. 12, p.1559-1581, out. 2014.

GAO, S. et al... Penicisteroids A and B, antifungal and cytotoxic polyoxygenated steroids from the marine alga-derived endophytic fungus *Penicillium chrysogenum* QEN-24S. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, China, v. 21, n. 10, p.2894-2897, maio 2011.

GONZALEZ-BURGOS, E.; GOMEZ-SERRANILLOS, M.. Terpene Compounds in Nature: A Review of Their Potential Antioxidant Activity. **Current Medicinal Chemistry**, [s.l.], v. 19, n. 31, p.5319-5341, 1 nov. 2012.

GUARNIERI, S., RISO, P., PORRINI, M., Orange juice vs vitamin C: Effect on hydrogen peroxide-induced DNA damage in mononuclear blood cells. *Br. J. Nutr.* 2007, 97, 639–643.

HIEN, B. T. T. et al... Cattienoids A–C, three novel steroids from the mushroom *Tomophagus cattienensis*. **Fitoterapia**, Viet Nam, v. 91, p.125-127, dez. 2013.

HOUGHTON P.J., REN Y.H., HOWES M.J. Acetylcholinesterase inhibitors from plants and fungi. **Natural Product Reports**.; v.23, p.181 – 199, 2006.

HU, Q. et al... Identification of flavonoids from *Flammulina velutipes* and its neuroprotective effect on pheochromocytoma-12 cells. **Food Chemistry**, [s.l.], v. 204, p.274-282, ago. 2016.

HUSSAIN, H. et al... Antimicrobial chemical constituents from endophytic fungus *Phoma sp.* **Asian Pacific Journal Of Tropical Medicine**, Alemanha, v. 7, n. 9, p.699-702, set. 2014.

ÍBIS, C. et al... Synthesis and Biological evaluation of novel nitrogen-and sulfur-containing hetero-1,4-naphthoquinones as potent antifungal and antibacterial agents. **Europaen journal of Medicinal Chemistry**, v.46, p. 5861-5867, 2011.

ISAKA, M. et. al. Cordylactam, a new alkaloid from the spider pathogenic fungus *Cordyceps sp.* BCC 12671. **Phytochemistry Letters**, Tailândia, v. 6, p.162–164, 2013.

JOEL, E.L., BHIMBA, B.V. Evaluation of secondary metabolites from mangrove associated fungi *Meyerozyma guilliermondii*. **Alexandria Journal of Medicine**, v.49, p.189-194, 2013.

KIMURA, M. et al... Molecular and genetic studies of Fusariumtrichothecene biosynthesis: pathways, genes, and evolution. **Bioscience, Biotechnology, And Biochemistry**, Tóquio, v. 71, n. 9, p.2105-2123, jan. 2007.

KORNSAKULKARN, J. et al... Chaetone G, a new dibenzo[b,e]oxepinone from the insect pathogenic fungus *Aschersonia luteola* BCC 31749. **Tetrahedron Letters**, Tailândia, v. 57, n. 3, p.305-307, jan. 2016.

KUHNERT, E. et al... Rickenyls A–E, antioxidative terphenyls from the fungus *Hypoxyylon rickii* (Xylariaceae, Ascomycota). **Phytochemistry**, [s.l.], v. 118, p.68-73, out. 2015.

LAKIM, E. et al... An unusual 1(10→19)abeo steroid from a jellyfish-derived fungus. **Tetrahedron Letters**, Republica da Corea, v. 57, n. 25, p.2803-2806, jun. 2016.

LEITE, M. P. et al... Behavioral effects of essential oil of *Citrus aurantium* L. inhalation in rats. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, [s.l.], v. 18, p.661-666, dez. 2008.

LI, L.L. et. al. Antioxidant aromatic butenolides from an insect-associated *Aspergillus iizukae*. **Phytochemistry Letters**, China, v.16, p.134–140, 2016.

MA, X. et al... Speradines B-D, oxygenated cyclopiazonic acid alkaloids from the sponge-derived fungus *Aspergillus flavus* MXH-X104. **Tetrahedron**, [s.l.], v. 71, n. 21, p.3522-3527, maio 2015.

NA, R. et al... Identification of vincamineindole alkaloids producing endophytic fungi isolated from *Nerium indicum*, Apocynaceae. **Microbiological Research**, [s.l.], v. 192, p.114-121, nov. 2016.

O'CONNOR, S. E.; MARESH, Justin J.. Chemistry and biology of monoterpeneindole alkaloid biosynthesis. **Natural Product Reports**, Massachusetts, v. 23, n. 4, p.532-547, maio 2006.

PASSOS, C. S. et al... Terpenóides com atividade sobre o Sistema Nervoso Central (SNC). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Porto Alegre, v. 19, n. 1, p.140-149, mar. 2009.

PATERSON, R.R.M., *Ganoderma* – a therapeutic fungal biofactory. **Phytochemistry** 67, p.1985–2001, 2006.

PERAZZO, F. F. et al... 2007. Comparative anti-inflammatory and antinociceptive effects of terpenoids and an aqueous extract obtained from *Croton cajucara* Benth. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, [s.l.], v.17, n. 1, p.521-528, 2007.

PEREIRA, R. J. CARDOSO, M. G. Vegetable secondary metabolites and antioxidants benefits. **J. Biotec. Biodivers.** v. 3, n.4. p. 146-152, nov. 2012.

PINTO, A.C. et al... Produtos naturais: atualidade, desafios e perspectivas. **Química Nova.**, v.25, p.45-61, 2002.

POTAPOVICH, A. I. Comparative Study of Antioxidant Properties and Cytoprotective Activity of Flavonoids. **Biochemistry (moscow)**, [s.l.], v. 68, n. 5, p.514-519, 2003.

QIN, J. et al... Polyhydroxylated steroids from an endophytic fungus, *Chaetomium globosum* ZY-22 isolated from *Ginkgo biloba*. **Steroids**, China, v. 74, n. 9, p.786-790, set. 2009.

REDDY, A. M. et al... Novel transgenic rice overexpressing anthocyanidin synthase accumulates a mixture of flavonoids leading to an increased antioxidant potential. **Metabolic**

Engineering, [s.l.], v. 9, n. 1, p.95-111, jan. 2007.

SAMAGA, P. V.; RAI, V. R.. Free radical scavenging activity and active metabolite profiling of endophytic fungi from *Nothapodytes foetida* and *Hypericum mysorense*. **International Journal Of Chemical And Analytical Science**, [s.l.], v. 4, n. 2, p.96-101, jun. 2013.

SIMÕES, C. M. O.;SCHENKEL, E. P.; GOSMAN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. Farmacognosia: da planta a medicamento. Florianópolis: **Editora da UFSC**, 1102 p. 2007.

SOUSA, D. P. et al... Pharmacological effects of the monoterpene α,β -epoxy-carvone in mice. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, [s.l.], v. 17, n. 2, p.170-175, jun. 2007.

SOUSA, D. P.; NÓBREGA, F. F. de F.; ALMEIDA, R. N.. Influence of the chirality of (R)-(-)- and (S)-(+)-carvone in the central nervous system: A comparative study. **Chirality**, [s.l.], v. 19, n. 4, p.264-268, 2007.

SOUSA, E.T.; LOPES, W.A.; ANDRADE, J.B.; Fontes, formação, reatividade e determinação de quinonas na atmosfera. **Química Nova**, v. 39, n. 4, p. 486-495, 2016.

STAGLIANO, K.W. et al... Regiocontrolled synthesis and HIV inhibitory activity of unsymmetrical binaphthoquinone and trimeric naphthoquinone derivatives of conocurvone. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**. v.14, p. 5651-5665, 2006.

TU, Vu A. et al... Polyoxygenated steroids from the gorgonian *Menella woodin* with capabilities to modulate ROS levels in macrophages at response to LPS. **Steroids**, Viet Nam, v. 104, p.246-251, dez. 2015.

VIEGAS JR.; C. BOLZANI, V.S.; BARREIRO, E.J. Os produtos naturais e a química medicinal moderna. **Química nova**, v.29, n 2, p. 326-337, 2006.

WANG, K. et al... Eight new alkaloids with PTP1B and α -glucosidase inhibitory activities from the medicinal mushroom *Hericium erinaceus*. **Tetrahedron**, [s.l.], v. 71, n. 51, p.9557-9563, dez. 2015.

WANG, X. et al... Racemic alkaloids from the fungus *Ganoderma cochlear*. **Fitoterapia**, [s.l.], v. 116, p.93-98, jan. 2017.

WAWRZYN, G. T.; BLOCH, Sarah E.; SCHMIDT-DANNERT, Claudia. Discovery and Characterization of Terpenoid Biosynthetic Pathways of Fungi. **Natural Product Biosynthesis By Microorganisms And Plants, Part A**, [s.l.], p.83-105, 2012.

WHANG, Q-X. et. al. Tricycloalternarenes F–H: Three new mixed terpenoids produced by an endolichenic fungus *Ulocladium sp.* using OSMAC method. **Fitoterapia**, v.85 p.8–13, 2013.

WILLIAMS CA, GRAYER RJ. Anthocyanins and other flavonoids. Natural Product Report. 2004.

WILLIAMS, R. J; SPENCER, Jeremy P.e; RICE-EVANS, Catherine. Flavonoids:

antioxidants or signalling molecules?. **Free Radical Biology And Medicine**, [s.l.], v. 36, n. 7, p.838-849, abr. 2004.

WINKEL-SHIRLEY, B.. Flavonoid Biosynthesis. A Colorful Model for Genetics, Biochemistry, Cell Biology, and Biotechnology. **Plant Physiology**, [s.l.], v. 126, n. 2, p.485-493, 1 jun. 2001.

XU, X. et al... Oxindole alkaloids from the fungus *Penicillium commune* DFFSCS026 isolated from deep-sea-derived sediments. **Tetrahedron**, [s.l.], v. 71, n. 4, p.610-615, jan. 2015.

YEH, C. et al... Polyhydroxylated steroids and triterpenoids from an entophytic fungus, *Hypocreales* sp. NCHU01 isolated from *Tuber magnatum*. **Journal Of The Taiwan Institute Of Chemical Engineers**, [s.l.], v. 64, p.22-30, jul. 2016.

YU, F. et al... Four new steroids from the endophytic fungus *Chaetomium* sp. M453 derived of Chinese herbal medicine *Huperzia serrata*. **Fitoterapia**, China, v. 117, p.41-46, mar. 2017.

ZAKHAROVA, O.D. et al... Cytotoxicity of new polyfluorinated 1,4-naphthoquinones with diverse substituents in the quinone moiety. **Bioorganic& medicinal Chemistry**. v.19, p. 256-260, jan. 2011.

ZHANG, P. et al... Prenylated indole alkaloids from the marine-derived fungus *Paecilomyces variotii*. **Chinese Chemical Letters**, [s.l.], v. 26, n. 3, p.313-316, mar. 2015.

ZHANG, P. et al... Prenylatedindole alkaloids from the marine-derived fungus *Paecilomycesvariottii*. **Chinese Chemical Letters**, [s.l.], v. 26, n. 3, p.313-316, mar. 2015.

ZHANG, Y. et al... Ergosterimide, a new natural Diels–Alder adduct of a steroid and maleimide in the fungus *Aspergillus niger*. **Steroids**, China, v. 72, n. 9-10, p.723-727, set. 2007.

ZHU, M. et al... Campyridones A–D, pyridone alkaloids from a mangrove endophytic fungus *Campylocarpon* sp. HDN13-307. **Tetrahedron**, [s.l.], v. 72, n. 37, p.5679-5683, set. 2016.



CAPÍTULO III – TÉCNICAS *IN VITRO* E *IN VIVO* PARA MEDIR O POTENCIAL ANTIOXIDANTE DOS COMPOSTOS

PUBLICADO IN: ANTIOXIDANTES: ASPECTOS QUÍMICOS, FARMACOLÓGICOS E TERAPÊUTICOS. EDITORA ÁTOMO,

TÉCNICAS *IN VITRO* E *IN VIVO* PARA MEDIR O POTENCIAL ANTIOXIDANTE DOS COMPOSTOS

Chistiane Mendes Feitosa, Espedito de Sousa Saraiva, Layana Karine Farias Lima, Lidiane da Silva Araújo e Soane Kaline Morais Chaves

RESUMO

Antioxidantes podem ser definidos como quaisquer substâncias que, quando presente em baixas concentrações comparadas àquela do substrato oxidável, retarda ou previne, significativamente, a oxidação daquele substrato. Em condições normais, os antioxidantes convertem espécies reativas de oxigênio em água para prevenir a superprodução destes compostos. Embora quando há um desequilíbrio no organismo podem ocorrer vários efeitos fisiológicos associado à superprodução destes compostos comumente denominados de radicais livres. Esses danos estão sendo cada vez mais relacionados ao desenvolvimento e/ou progressão de diversas alterações patológicas como câncer, depressão, Parkinson e Doença de Alzheimer. Estudos acerca dos radicais livres e o desenvolvimento de métodos para avaliação de atividade antioxidante (AA) têm aumentado consideravelmente nos últimos anos. Neste capítulo foram abordadas as principais técnicas *in vitro* e *in vivo* para medir o potencial antioxidante dos compostos. A avaliação da atividade antioxidante *in vitro* é realizada utilizando reações químicas para determinar a capacidade da amostra de reagir com estruturas reativas, sendo elas radicais livres presentes ou não no organismo. Diversos modelos de atividade antioxidante *in vitro* estão disponíveis, e eles podem ser classificados de diversas formas. As principais técnicas descritas foram: ensaio radical DPPH, ensaio radical ABTS^{•+}, níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), atividade de superóxido dismutase (SOD), atividade da catalase (CAT), atividade da glutatona, determinação da concentração de glutatona reduzida (GSH), glutatina peroxidase (GSHPx) e radical nitrito. Com relação às técnicas *in vivo* não foram abordadas estudos que avaliassem a atividade antioxidante *in vivo*. Conclui-se que, através da diversidade de testes para avaliar a atividade antioxidante pode-se prever o mecanismo de ação da substância-teste.

Palavras-chave: Antioxidantes, radicais livres, técnicas *in vitro*, técnicas *in vivo*.

TECHNIQUES AND *IN VITRO* AND *IN VIVO* TO MEASURE THE ANTIOXIDANT POTENTIAL OF COMPOUNDS

Chistiane Mendes Feitosa, Espedito de Sousa Saraiva, Layana karine Farias Lima, Lidiane da Silva Araújo e Soane Kaline Morais Chaves

ABSTRACT

Antioxidants can be defined as any substances which, when present in low concentrations compared to that of the oxidizable substrate, significantly slow or prevents oxidation of that substrate. Under normal conditions, antioxidants convert reactive oxygen species into water to prevent overproduction of these compounds. Although when there is an imbalance in the body can occur several physiological effects associated with overproduction of these compounds commonly called free radicals. These damages are increasingly being linked to the development and / or progression of various pathological changes such as cancer, depression, Parkinson's and Alzheimer's disease. Studies on free radicals and the development of methods for evaluating antioxidant activity (AA) have increased considerably in recent years. In this chapter the main *in vitro* and *in vivo* techniques for measuring the antioxidant potential of the compounds were discussed. The evaluation of antioxidant activity *in vitro* is performed using chemical reactions to determine the ability of the sample to react with reactive structures, whether they are free radicals present or not in the body. Several models of *in vitro* antioxidant activity are available, and they can be classified in a number of ways. The main techniques described were: (TBARS), superoxide dismutase activity (SOD), catalase activity (CAT), glutathione activity, determination of reduced glutathione (GSH) concentration, glutathione Peroxidase (GSHPx) and nitrite radical. In relation to *in vivo* techniques were not found, however, studies that evaluated antioxidant activity *in vivo*. It was then concluded that *in vitro* methods have advantages over *in vivo* such as being able to limit the number of experimental variables, obtaining meaningful data more easily beyond the test period being in many cases shorter.

Keywords: Antioxidants, free radicals, *in vitro* techniques, *in vivo* techniques.

1.Introdução

Os produtos advindos do metabolismo oxidativo, tais como as espécies reativas de oxigênio, em excesso no organismo, causam vários tipos de danos celulares que podem comprometer a manutenção da saúde. Esses danos estão sendo cada vez mais relacionados ao desenvolvimento e/ou progressão de diversas alterações patológicas como câncer, depressão, Parkinson e Doença de Alzheimer. Estudos acerca dos radicais livres e o desenvolvimento de métodos para avaliação de atividade antioxidante (AA) têm aumentado consideravelmente nos últimos anos. A relação do estresse oxidativo com os danos ao organismo tem proporcionado a busca por substâncias com capacidade antioxidante que pode impedir e/ou minimizar as alterações causadas por radicais livres (BETTIO et al., 2014; AMUNUGAMA et al, 2016; ALVES et al., 2010).

2.ENSAIOS *IN VITRO*

Ensaio antioxidantes *in vitro* são testes que, além de permitir avaliar, inicialmente, a capacidade das substâncias de sequestrar radicais livres, ainda permitem excluir um possível antioxidante, pois se o composto não exibiu atividade na metodologia *in vitro* dificilmente irá apresentar capacidade *in vivo*.

2.1.Ensaio radical DPPH

O DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil), um pó de cor escura, solúvel em metanol ou etanol, é um radical livre estável que apresenta coloração violeta intensa, ocasionada pela deslocalização do elétron desemparelhado (Figura 1). A reação do DPPH com outros radicais, elétrons ou átomos de hidrogênio leva à perda da coloração, que é mensurada em cerca de 515 nm. Essa perda de coloração ocorre devido a transformação do DPPH em difenil-picril-hidrazina (Figura 2), que apresenta uma coloração amarela. A mudança de coloração e consequentemente de absorção são utilizadas para avaliar o potencial antioxidante das substâncias. O ensaio de DPPH foi primeiramente desenvolvido por Blois em 1958, sendo um dos mais antigos e mais frequentemente utilizados para a determinação da ação antioxidante de extratos, frações, compostos isolados, sintéticos e até mesmo alimentos. A avaliação da capacidade antioxidante pode ser realizada pela medição do valor de absorção antes da adição (absorção inicial – A_i) de uma substância teste e após a adição da mesma respeitando o tempo de reação (absorção final – A_f), em espectrofotômetro, utilizando o comprimento de onda adequado. Ao final do método pode-se utilizar como parâmetro de avaliação a diferença entre os valores de A_f e A_i para o cálculo do CE_{50} (concentração efetiva capaz de inibir em 50% o

DPPH), para avaliar a porcentagem de radical perdido ou remanescente, bem como a eficiência antirradical do composto e o potencial sequestrante de DPPH pelas equações.

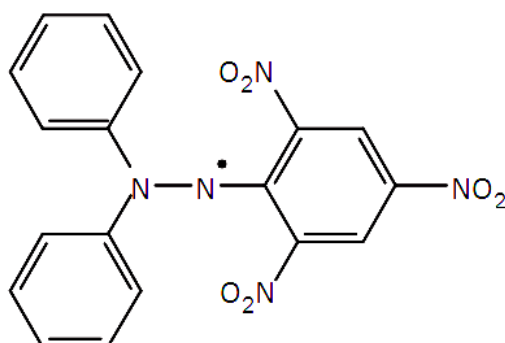


Figura 1. Estrutura química do radical DPPH.

Fonte: Adaptado de Alves et al. (2010).

Inúmeros estudos que avaliam a capacidade antioxidante de substâncias utilizam o ensaio DDPH, por ser um método rápido e de fácil execução. Como controles positivos são usados vários compostos sabidamente antioxidantes como trolox, ácido ascórbico, BHT, entre outros (FADDA et al., 2014; ZHANG et al., 2015a; ZHANG et al., 2015b).

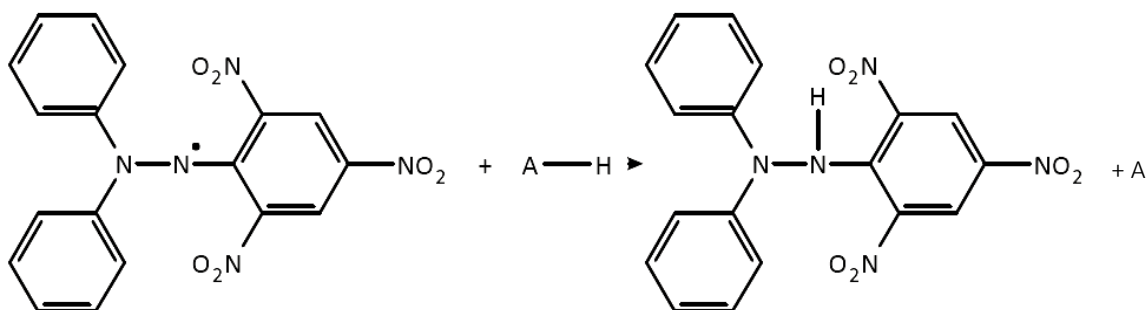


Figura 2. Esquema da reação do ensaio com radical DPPH.

Fonte: Adaptado de Alves et al. (2010).

2.2. Ensaio radical ABTS^{•+}

Outro método, extensamente utilizado, para avaliar a capacidade antioxidante de alimentos, extratos, frações, substâncias isoladas, de natureza hidrofílica ou lipofílica, dentre outros, é pela captura do radical 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolína-6-ácido sulfônico) – ABTS^{•+} (Figura 3), que pode ser produzido por meio de uma reação química, eletroquímica ou enzimática. Esse teste apresenta baixo custo e com protocolos de fácil execução, pode ser realizado em meio aquoso ou orgânico e sob uma ampla faixa de pH. A abordagem mais popular do teste utiliza uma solução radical colorida, relativamente estável, semelhante ao teste do radical DPPH associada ao espectrofotômetro, mas em alguns estudos há a utilização

do mesmo princípio associado ao HPLC. O potencial antioxidante da amostra pode ser mensurado pela diminuição da coloração de ABTS⁺, por interceptação da oxidação inicial e prevenção da produção do radical ou pela reação direta com ABTS⁺.

O radical pode ser gerado por meio da utilização da metilmioglobina-H₂O₂ que gera os radicais hidroxil (OH•) que, por sua vez, oxidam o ABTS para sua forma de radical livre de coloração esverdeada. Esta versão está disponível em *kits* comerciais. No entanto, para essa metodologia o mecanismo antioxidante não pode ser determinado, visto que, o composto em teste pode reagir tanto com os radicais OH•, quanto com a metilmioglobina e/ou com o ABTS⁺, podendo causar uma superestimação da capacidade antioxidante. Outra forma de obter o radical, que soluciona o entrave das várias reações da metodologia anteriormente citada, consiste na geração direta do radical com alto rendimento por meio da mistura de ABTS e solução aquosa de persulfato de potássio (K₂S₂O₈), um cromógeno azul, que promove à oxidação de ABTS e conseqüentemente a formação do radical. A mistura deve ser incubada à temperatura ambiente na ausência de luz por cerca de 12 a 16 horas. Os antioxidantes reagem somente com o ABTS⁺, o que leva à descoloração esverdeada, cuja extensão pode ser determinada em um ponto de tempo fixo (BORGES et al., 2011; MAGALHÃES et al., 2014; TABASSUM et al., 2014; WERF et al., 2014; SCHAICH; TIAN; XIE, 2015; VALENT et al., 2016; ZHENG et al., 2016).

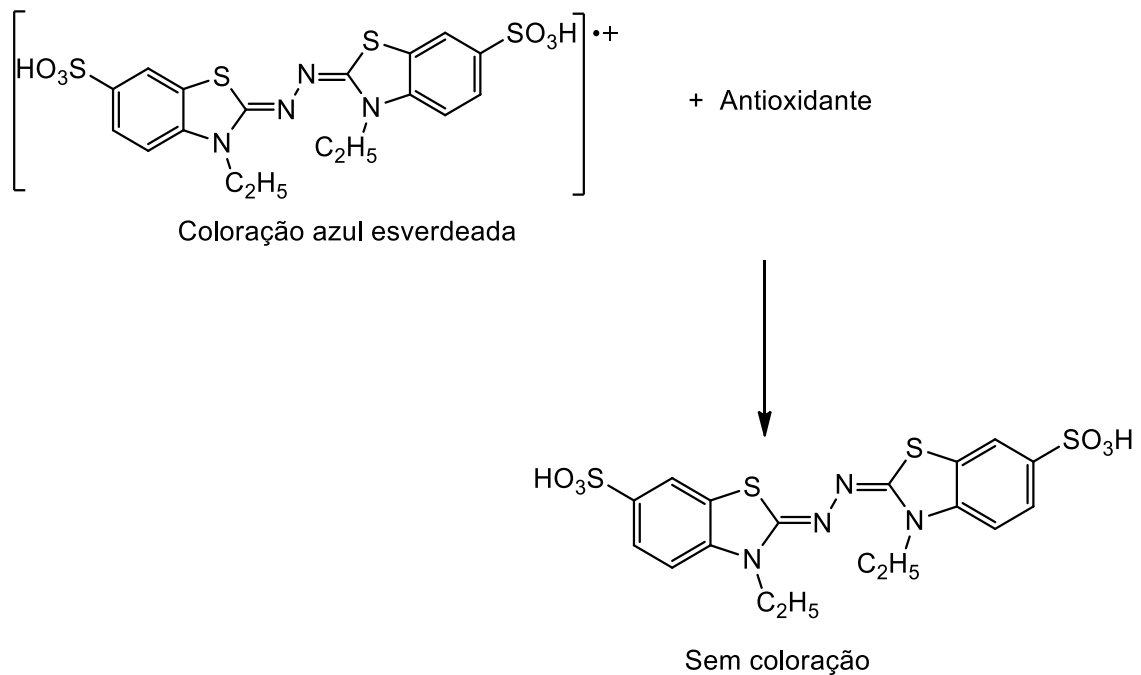


Figura 3. Exemplo de esquema utilizando a reação com radical $\text{ABTS}^{\bullet+}$.

Fonte: Adaptado de Schaich, Tian e Xie (2015).

2.3. Níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)

A peroxidação de ácidos graxos insaturados nas membranas lipídicas é um dos índices mais comumente relatados de estresse oxidativo, e tem sido implicada como um fator que contribui para uma variedade de doenças degenerativas, incluindo Doença de Alzheimer e distúrbios psiquiátricos (MOSELHY et al., 2013; DAWN-LINSLEY et al., 2005). Este processo promove grave alteração da membrana celular, causando perda da fluidez, alteração da função secretora e dos gradientes iônicos transmembrana. Além disso, tem sido observada perda da seletividade na troca iônica, com liberação do conteúdo de organelas, levando à formação de produtos citotóxicos até a morte celular (BEZERRA et al., 2004; FERREIRA; MATSUBATRA, 1997).

Os peróxidos lipídicos, derivados de ácidos graxos poliinsaturados, são instáveis e se decompõem para formar uma série de compostos complexos que incluem compostos carbonílicos reativos, como o malondialdeído (MDA) (NASSER et al., 2010). O malondialdeído é um aldeído reativo (baixa estabilidade) de cadeia curta, amplamente utilizado como biomarcador na avaliação do estresse oxidativo (PILZ et al., 2000) que pode

ser quantificado colorimetricamente.

Nessa reação uma molécula de MDA reage com 2 moléculas de ácido 2-tiobarbitúrico por condensação tipo Knoevenagel para se obter um cromóforo (Figura 4) em meio ácido (pH 1-2) e a alta temperatura (100 °C), no sentido de aumentar a sua velocidade e sensibilidade, para produzir um pigmento de cor rosa a vermelho, com um máximo de absorção a 532 nm, que é um indicador confiável da peroxidação lipídica e tem sido utilizado para avaliar a extensão do dano oxidativo (OXFORD, 2012; BORGES et al., 2011).

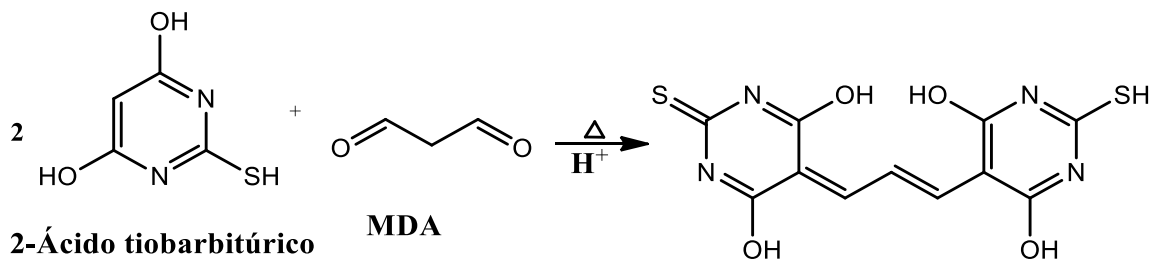


Figura 4. Reação entre o ácido 2-tiobarbitúrico e MDA em condições ácidas.

Fonte: Adaptado de Oxford (2012).

Apesar de sua simplicidade e facilidade de execução, o teste do TBA não é específico para o malondialdeído, reagindo com uma ampla variedade de compostos como açúcares, aminoácidos, proteína, aminas e bilirrubina. Por este motivo é também denominado teste das substâncias que reagem com o ácido tiobarbitúrico (Thiobarbituric Acid-Reactive Substances – TBARS) (BARBOSA et al., 2008). Outra metodologia proposta e descrita por Okhawa (1979) parte de 0,2 mL de tecido homogeneizado em 0,1 M de tampão de pH 7,4), 0,2 mL de 8,1% de dodecil sulfato de sódio (DSS), 1,5 mL de ácido acético a 20% e 1,5 mL de 8% de TBA são adicionados a água destilada até volume final de 5 mL, em seguida os tubos são incubados em banho-maria a 95 °C por 60 minutos. Após resfriamento 5,0 mL de butanol:piridina (15:1) é adicionada à mistura e os conteúdos são agitados exaustivamente durante 2 minutos. Após centrifugação a 3000 rpm, durante 10 min, o sobrenadante é levado ao espectro sendo que sua absorbância é lida a 532 nm contra um branco apropriado, sem a amostra. Os níveis de peróxidos de lipídios podem ser expressos como moles de substâncias ácidas reativas de tiobarbitúrico (TBARS)/mg de proteína usando um coeficiente de extinção de $1,56 \cdot 10^5 \text{ mL} \cdot \text{cm}^{-1}$ (ALAM; BRISTI; RAFIQUZZAMAN, 2013).

2.4. Atividade de superóxido dismutase (SOD)

As espécies reativas de oxigênio responsáveis pela deterioração oxidativa de ácidos graxos insaturados das membranas incluem principalmente o oxigênio 'singleto' ou molecular (O_2), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), radical superóxido (O_2^-) e o radical hidroxila (OH) (FLORES et al., 2014). Estes radicais têm sido implicados em condições inflamatórias agudas e crônicas e desordens do SNC como doença de Parkinson, epilepsia e demência (Alzheimer) (FREITAS et al., 2008).

O organismo dispõe de mecanismos chamados de sistemas antioxidantes, que são capazes de prevenir os danos das espécies reativas de oxigênio, dentre eles as enzimas superóxidos dismutase (SOD) e a catalase (CAT) (VASCONCELOS et al., 2007). Ambas podem ser encontradas nas diferentes áreas cerebrais desempenhando importante papel neuroprotetor.

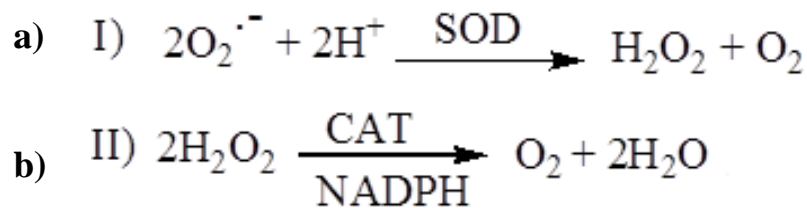


Figura 5. Atividade enzimática da SOD e CAT.

Fonte: Adaptada de Vasconcelos et al... (2007).

A SOD catalisa a dismutação do superóxido a peróxido de hidrogênio (Figura 5a), mantendo assim, baixos os níveis de O_2^- que não induzem o aparecimento de patologias em humanos (LIU et al., 2002). A CAT, também endógena, catalisa a redução de peróxido de hidrogênio em água e oxigênio (Figura 5b) (VASCONCELOS et al., 2007). Estas moléculas altamente reativas fazem parte de subprodutos do metabolismo normal e desempenham papel importante nos processos de sinalização celular. Entretanto, em situações de estresse celular, as espécies reativas de oxigênio podem aumentar significativamente levando a danos celulares como alteração do DNA, peroxidação de lipídios e oxidação de aminoácidos nas proteínas (JONSSON et al., 2007).

Basicamente a atividade de inibição da SOD pode ser determinada por um método colorimétrico (Figura 6). Nesse ensaio proposto por Ukeda et al. (1997) utiliza-se um sistema

de xantina oxidase/xantina (XOD) para gerar ânions superóxido. Estas espécies reativas de oxigênio, na presença de um cromóforo como o sal de tetrazólio reduzem este composto para formar um derivado formazano que absorve luz no comprimento de onda de 470 nm. Entretanto esta redução é inibida na presença de SOD pelo fato de requerer O_2 para formar peróxido de hidrogênio na presença de cátions H^+ (JONSSON et al., 2007). Quando a enzima SOD está presente, a concentração do radical superóxido é reduzida, decrescendo assim a formação do cromóforo, conforme esquema demonstrado na Figura 6.

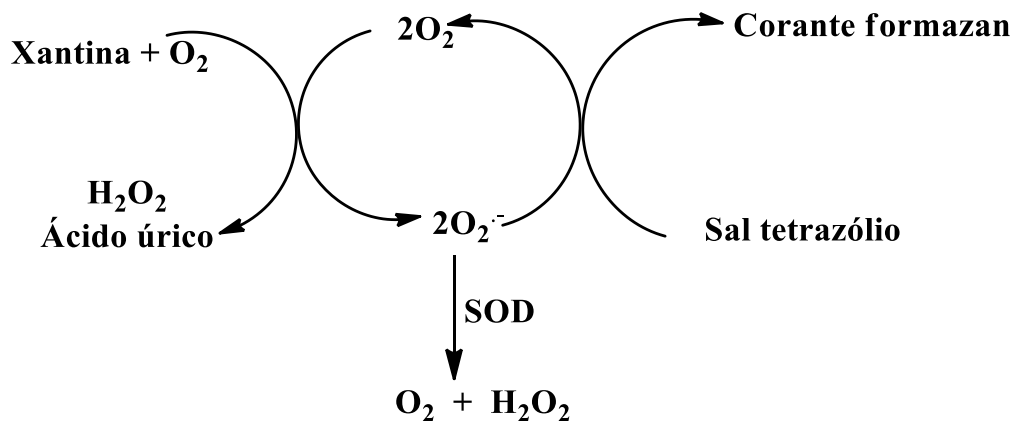


Figura 6. Reação de inibição da SOD com a produção de radicais pela xantina.

Xantina oxidase (XO) é a enzima responsável pela transformação da xantina em ácido úrico, tendo como consequência a produção de peróxido de hidrogênio e radical superóxido. Assim, é possível que a inibição deste processo enzimático por compostos que exibem propriedades antioxidantes ou inibitórias da xantina oxidase possa ter uso terapêutico (ALVES et al., 2010).

A atividade de eliminação de ânion superóxido pode ser medida *in vitro* como descrita por Alam, Bristi e Rafiquzzaman (2013). Nessa metodologia os ânions superóxido são gerados em 3,0 mL de tampão Tris-HCl (16 mM, pH 8,0), contendo 0,5 mL de azul de nitrotetrazólio (NBT) (0,3 mM); 0,5 mL de NADH solução (0,936 mM); 1,0 mL de extrato e 0,5 mL de tampão Tris-HCl (16 mM, pH 8,0). A reação é iniciada por adição de 0,5 mL de metossulfato de fenazina (PMS) solução (0,12 mM) à mistura, incubando-se a 25 °C durante 5 min e, em seguida, a absorvância é medida a 560 nm contra uma amostra em branco.

2.5. Atividade da catalase (CAT)

A enzima catalase está presente na maioria das células aeróbicas principalmente nos

eritrócitos, onde evita o acúmulo de metaemoglobina e decompõe o peróxido de hidrogênio em água e oxigênio. Além de seu papel como espécie reativa de oxigênio, e, portanto, causador de estresse oxidativo, o H_2O_2 em excesso causa oxidação da hemoglobina e, conseqüentemente, diminuição das concentrações de oxigênio, o que pode acarretar infecções, formação de úlceras e até necrose (FERREIRA; MATSUBARA, 1997).

A medida do decaimento na concentração de H_2O_2 e da geração do oxigênio são os parâmetros mais utilizados na determinação da atividade da catalase. Os valores de CAT também são expressos em unidades por g de hemoglobina (U/g Hb). Uma unidade de CAT corresponde à atividade da enzima necessária para o consumo de 1 μ mol de H_2O_2 em 1 min (VASCONCELOS et al., 2007).

A atividade da catalase pode ser determinada usando o método de Aebi (1984) e descrita por Antunes Neto (2008). A preparação da amostra inicia-se com a adição de 900 μ L de tampão fosfato, pH 7.4, a 100 μ L do hemolisado (1:1), obtendo-se, assim, uma diluição 1:20 da amostra inicial. Deste hemolisado, 1 μ L é adicionado ao meio básico de reação, que continha tampão fosfato 50 mM, pH 7,0, e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) 10 mM. A medida da atividade da CAT ocorre pela velocidade com que o H_2O_2 é reduzido pela ação da enzima, provocando diminuição no valor da absorbância em 240 nm. A diferença na leitura das absorbâncias a 240 nm, em determinado intervalo de tempo (15 segundos), permite estabelecer a velocidade de redução do H_2O_2 , que é proporcional à velocidade da reação enzimática catalisada pela CAT.

2.6. Atividade da glutathiona

A glutathiona é um tripeptídeo (g-L-glutamil-L-cisteinil-glicina) que existe no organismo em suas formas reduzidas (GSH) e oxidadas (GSSG), possui papel central na biotransformação e eliminação de xenobióticos e na defesa das células contra o estresse oxidativo (ROVER JÚNIOR et al., 2001; HUBER; ALMEIDA; FÁTIMA, 2008). A presença do selênio na enzima (selenocisteína) explica a importância desse metal e sua atuação como antioxidante nos organismos vivos. A GSH reduz o H_2O_2 a H_2O em presença de GPx, formando uma ponte dissulfeto e, em seguida, a GSH é regenerada. A glutathiona opera em ciclos entre sua forma oxidada e sua forma reduzida (BARREIROS et al., 2006). Em particular, problemas na síntese e metabolismo da glutathiona estão associados a algumas doenças, nas quais os níveis de glutathiona e das enzimas que atuam no seu metabolismo podem ser bastante significativos no diagnóstico de alguns tipos de câncer, bem como em outras doenças relacionadas ao estresse

oxidativo (ROVER JÚNIOR et al., 2001). A seguir serão abordados os principais métodos de análise deste tripeptídeo e derivados.

Para que a atividade protetora da glutathiona expressa pela redução de espécies oxidantes, e consequente oxidação da GSH a glutathionadissulfeto (GSSG) seja mantida, a GSH precisa ser regenerada pelo ciclo catalítico, representado na Figura 7. Nele podemos identificar a atividade de três grupos de enzimas: a glutathiona oxidase (GO), a glutathionaperoxidase (GSH-Px) e a glutathionaredutase (GR). As duas primeiras enzimas, GO e GSH-Px, catalisam a oxidação de GSH a GSSG e a última, GR, é responsável pela regeneração de GSH, a partir de GSSG, na presença de NADPH (HUBER; ALMEIDA; FATIMA, 2008). Após exposição da GSH ao agente oxidante, ocorre sua oxidação a GSSG. A recuperação da GSH é feita pela enzima GR, uma etapa essencial para manter íntegro o sistema de proteção celular, entretanto, sob condições de excesso de agentes oxidantes e/ou deficiência do sistema protetor, haverá desequilíbrio entre o consumo de GSH e a produção de GSSG, o que caracteriza o estresse oxidativo (VAZATA et al., 2009).

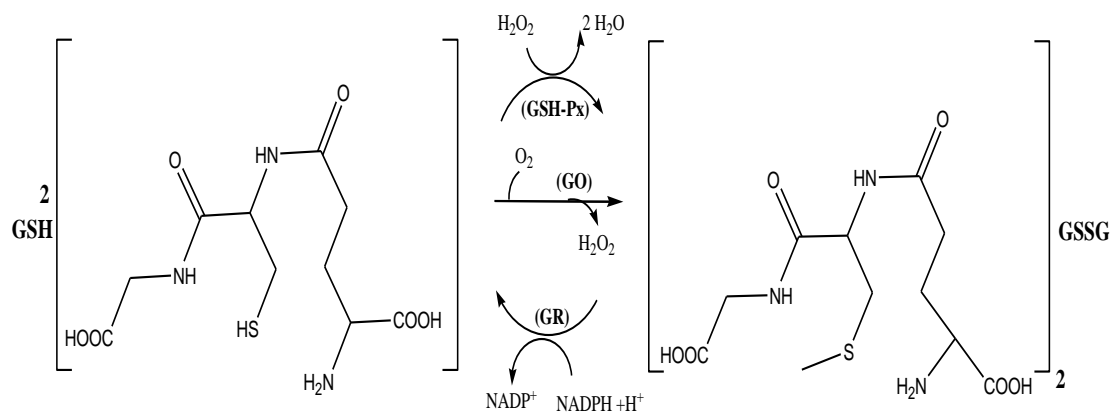


Figura 7. Interconversão da glutathiona nas formas reduzida (GSH) e oxidada (GSSG) pela ação da enzima glutathiona peroxidase (GSH-Px), glutathiona oxidase (GO) e glutathiona redutase (GR).

Fonte: Adaptada de Rover Júnior et al... (2001).

2.7. Determinação da concentração de glutathiona reduzida (GSH)

O método ilustrado por Ellman (1959) e descrito por Alam, Bristi e Rafiquzzaman (2013) pode ser utilizado para a determinação da atividade antioxidante. O homogeneizado de tecido (em tampão fosfato 0,1 M pH 7,4) é tomado e a ele adicionado igual volume de ácido tricloroacético a 20% (TCA) contendo EDTA 1 mM para precipitar as proteínas do tecido. A mistura é deixada repousar durante 5 min antes da centrifugação durante 10 min a 2000 rpm.

O sobrenadante (200 μ L) foi transferido para tubos de ensaio e adicionou-se 1,8 mL de reagente de Ellman (5,5'-dithiobis-2-nitrobenzóico a 0,1 mM preparado em tampão de fosfato 0,3 M com 1% de solução de citrato de sódio). Então, todos os tubos de ensaio são completados até o volume de 2 mL. Depois de completada toda a reação, as absorbâncias são medidas a 412 nm contra o branco. Os valores de absorbância foram comparados com uma curva padrão gerada conhecida de GSH. A quantidade de hidroperóxidos é medida indiretamente pela diminuição da quantidade de GSH, avaliada pela diminuição da absorbância a 412 nm, resultante da reação de glutatona com DTNB que gera o ácido 2-nitro-5-mercapto-benzóico (TNB) de coloração amarela, como mostra a Figura 8 (ROVER JÚNIOR et al., 2001).

O mesmo procedimento pode ser utilizado para a determinação de GSSG, com acompanhamento da mudança de absorbância em NADPH a 340 nm. Entretanto, para evitar a interferência de GSH, essa deve ser derivatizada com vinilpiridina (não interfere com o GR) ou com *N*-etilmaleimidina (NEM). Quando NEM é utilizada, o derivado formado deve ser eliminado antes da análise, pois o mesmo inibe a GR (VASCONCELOS et al., 2007).

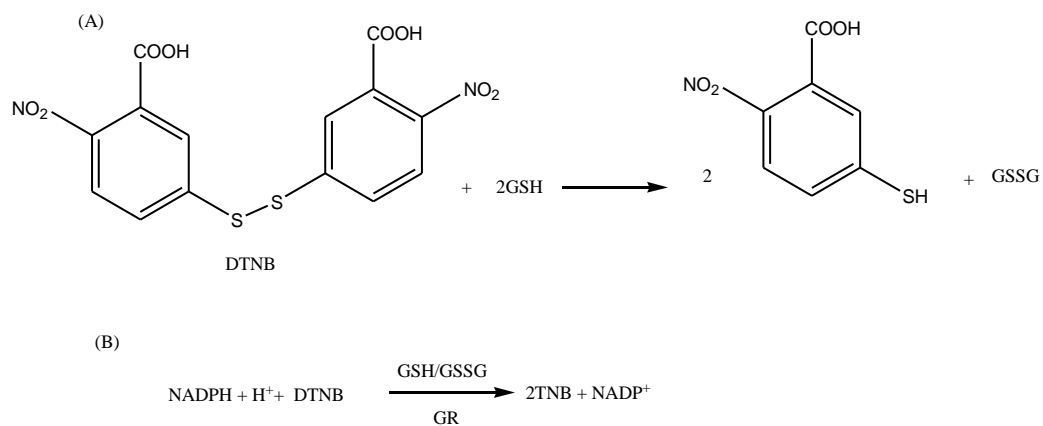


Figura 8. Reação enzimática do DTNB e do produto da sua redução, TNB (Ácido 5-tio-2-nitrobenzóico), sob ação da GSH a 412 nm (a). Em (b) reação não enzimática para detecção de NADP a 330 nm.

Fonte: Adaptada de Vasconcelos et al... (2007).

2.8. Glutamina Peroxidase (GSHPx)

A GPx é uma seleno-enzima presente no citosol de todas as células ou no plasma, e catalisa a redução do H₂O₂ e outros peróxidos a água ou álcool (VASCONCELOS et al., 2007).

Sua baixa atividade enzimática é uma das primeiras consequências de uma perturbação do equilíbrio pró-oxidante/antioxidante.

Um método muito utilizado para avaliar a atividade de GPx em eritrócitos consiste em

adicionar ao lisado de hemácias uma mistura contendo NADPH, GSH, GR, EDTA e tampão fosfato, mantido em banho-maria a 37 °C durante 1 min, adicionando-se, em seguida, H₂O₂ ou hidroperóxido orgânico, para iniciar a reação, que é acompanhada em espectrofotômetro a 340 nm quando o NADPH é convertido a NADP. O consumo de GSH é medido, mantendo em concentrações constantes a GR e o NADPH que converte imediatamente a GSSG produzida em GSH (VASCONCELOS et al., 2007).

2.9. Radical nitrito

O óxido nítrico é classificado como um radical livre, sua interação com o oxigênio gera as espécies reativas de nitrogênio (RNS), pode ser produzido no organismo pela ação da enzima óxido nítrico sintase a partir de arginina, oxigênio e NADPH (BARREIROS et al., 2006); exibe reatividade importante com certos tipos de proteínas e de outros radicais livres, tais como superóxido formando o ânion peroxinitrito altamente reativo (ONOO) aumentando o estado de estresse oxidativo, induzindo peroxidação lipídica, desestabilidade nas membranas, oxidação e nitração de proteínas e danos ao DNA (AWALA; OYETAYO, 2016; MAIA et al., 2010). O óxido nítrico desempenha diversos papéis incluindo mensageiro neuronal, vasodilatador e as atividades antimicrobianas e antitumorais. No entanto a sua exposição crônica está associada a vários carcinomas e estados inflamatórios (AWALA; OYETAYO, 2016). Assim, substâncias que sequestram o radical óxido nítrico podem desempenhar um importante papel citoprotetor, agindo nos processos de toxicidade induzida por RNS, modulando os processos inflamatórios, diminuindo o estado de estresse oxidativo e podendo apresentar-se como alternativa terapêutica para algumas dessas desordens (MAIA et al., 2010).

O óxido nítrico é gerado a partir da decomposição espontânea do nitroprussiato de sódio (NPS) em tampão fosfato 20 mM (pH 7,4). Uma vez gerado, o óxido nítrico interage com o oxigênio para produzir íons nitrito, que serão medidos pela reação de Griess (BASU; HAZRA, 2006). A mistura de reação (1 mL) contendo NPS em tampão fosfato 10 mM e a amostra em diferentes concentrações são incubadas a 37 °C durante 1 h. Uma alíquota de 0,5 mL é retirada e misturada com 0,5 mL de reagente de Griess. A absorbância do cromóforo será medida em 540 nm. Substâncias com ação sequestradora de óxido nítrico, competem com o oxigênio, produzindo uma ação oxidante que pode ser caracterizada pela supressão do óxido nítrico devido à neutralização do mesmo por uma reação química ou inibição de sua formação (NOGUEIRA NETO; SOUSA; FREITAS, 2013). Como antioxidantes doam prótons para o radical nitrito, a absorbância é diminuída, usada para medir o grau de eliminação de radical nitrito (AWALA; OYETAYO, 2016). A percentagem de inibição foi calculada utilizando a

fórmula:

$$\text{Inibição do óxido nítrico}(\%) = \frac{A_{cont} - A_{test}}{A_{cont}} \cdot 100$$

Na reação de Griess o nitrito reage com a sulfanilamida em meio ácido, formando um diazo que reage com o cloridrato de *N*-(1-naftil)etilenodiamina (NED), gerando um composto de coloração vermelha intensa, reação mostrada na Figura 9 (RAMOS et al., 2006).

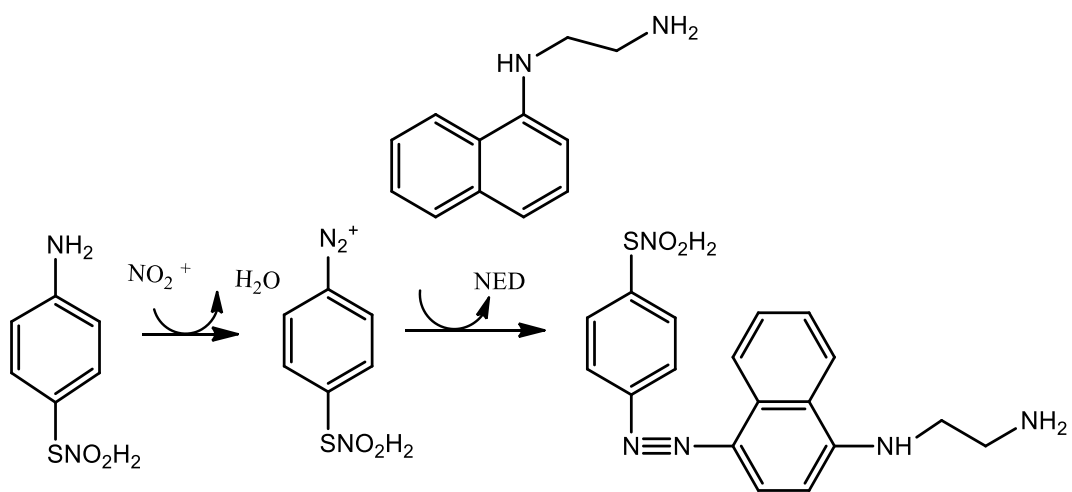


Figura 9. Reação colorimétrica de Griess formando um diazo a 540 nm.

Fonte: Adaptada de Ramos et al. (2006).

REFERENCIAS

- AEBI, Hugo. Catalase in vitro. **Methods In Enzymology**, [s.l.], p.121-126, 1984.
- ALAM, N.; BRISTI, N.J.; RAFIQUZZAMAN, Review on in vivo and in vitro methods evaluation of antioxidant activity .**Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 21, p.143–152, 2013.
- ALVES, C.Q.; DAVID, J.M.; DAVID, J.P.; BAHIA, M.V.; AGUIAR, R.M. Métodos para determinação de atividade antioxidante *in vitro* em substratos orgânicos: **Química Nova**, v.33 n.10, 2010.
- AWALA S.I.; OYETAYO, V.O. Assessment of Free Radical Scavenging Potentials of Extracts of *Trametes lactinea* Collected from Akure. **Research Journal of Phytochemistry**, v.10,p.10-20,2016.
- BARBOSA, K. B. F.; COSTA, N. M. B.; ALFENAS, R. C. G.; PAULA, S. O.; MININ, V. P. R.; BRESSAN, J. Oxidative stress: assessment of biomarkers. **Nutrire: rev. Soc. Bras. Alim. Nutr.J. Brazilian Soc. Food Nutr.**,v. 33, n. 2, p. 111-128,ago. 2008.
- BARREIROS, A.L.B.S.; DAVID, J.M.; DAVID, J.P. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesas do organismo. **Química Nova**, v.29, n.1, 2006.
- BASU S, HAZRA B. Evaluation of nitric oxide scavenging activity, in vitro and ex vivo, of selected medicinal plants traditionally used in inflammatory diseases. **Phytotherapy Research**, v.20, n.10, p.896-900, 2006
- BEZERRA, F.J.L.; REZENDE, A.A.; RODRIGUES, S.J.; ALMEIDA, M.G. Determinação das Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico como Indicador da Peroxidação Lipídica em Ratos Tratados com Sevoflurano. **Revista Brasileira de Anestesiologia**. v. 54, n.5, 2004.
- BORGES, L.L.; LUCIO, T.C.; GIL, E.S.; FERNANDES, E. Uma abordagem sobre métodos analíticos para determinação da atividade antioxidante em produtos naturais. **Enciclopédia Biosfera, Centro Científico Conhecer**, v.7, n.12, 2011.
- DAWN-LINSLEY, M.; EKINCI, F.J.; ORTIZ, D.; ROGERS, E.; SHEA, T.B. Monitoring thiobarbituric acid-reactive substances (TBARS) as an assay for oxidative damage in neuronal cultures and central nervous system. **Journal of neuroscience methods**.v.141, n.2, p.219–222, 2005.
- ELLMAN, G. L. Tissue sulfhydryl groups. *Archives of biochemistry and biophysics*, v.82, n.1, p.70-77, 1959
- FADDA, A. et al... Journal of Food Composition and Analysis Reaction time and DPPH concentration influence antioxidant activity and kinetic parameters of bioactive molecules and plant extracts in the reaction with the DPPH radical. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 35, n. 2, p. 112–119, 2014.

FEREIRA, A.L.A. MATSUBARA, L.S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v.43, n.1, p. 61-8, 1997.

FLORES, A.V.;BORGES, E.E.L.;GUIMARÃES, V.M.;GONÇALVES, F.C.; ATAÍDE, G.M.; BARROS, D.P. Atividade enzimática durante a germinação de sementes de *Melanoxylon brauna schott* sob diferentes temperaturas.**CERNE** [online], v.20, n.3, pp.401-408, 2014.

FREITAS, R. M. alterações comportamentais e neuroquímicas durante a fase aguda do processo convulsivo induzido por pilocarpina. **Revista Eletrônica de Farmácia**. v. 5, p.60 - 70, 2008.

HUBER, P.C.; ALMEIDA, W.P.; FÁTIMA, A. Glutathione e enzimas relacionadas: papel biológico e importância em processos patológicos. **Química Nova**, v. 31, n. 5, p.1170-1179, 2008.

JONSSON, C.M.; CASTRO, V.L.S.; TESSARI, C.M.; GRANERO, G. Metodologias de análise da atividade de duas enzimas com potencial uso em biossensores .3º Workshop de Rede de nanotecnologia Aplicada ao Agronegócio-EMBRAPA Meio Ambiente, 2007.

LIU, K.J.; LIU, S.; MORROW, D.; PETERSON, S.L. Hydroethidine detection of superoxide production during the lithium-pilocarpine model of status epilepticus. **Epilepsy Research**. v. 49, p.226-238, 2002.

MAGALHÃES, L. M., BARREIROS, L., REIS, S., & SEGUNDO, M. A. Kinetic matching approach applied to ABTS assay for high-throughput determination of total antioxidant capacity of food products. **Journal of Food Composition and Analysis**, v.33, n.2, p.187-194, 2014.

MAIA, R.M.; MOURA, C.W.N.; BISPO, V.S.; SANTOS, J.L.A.; SANTANA, R.S.; MATOS, H.R. Avaliação do sequestro do óxido nítrico (NO) pelo extrato metanólico da alga *Bryothamnion triquetrum* (Gmelin) Howe. **Revista brasileira de farmacognosia**. v.20, n.4 , 2010.

MOSELHY, H. F. et al... A specific, accurate, and sensitive measure of total plasma malondialdehyde by HPLC. **Journal Of Lipid Research**, [s.l.], v. 54, n. 3, p.852-858, 20 dez. 2012.

NASSER, A.L.M.; DOURADO, G.K.; MANJATE, D.A.; CARLOS, I.Z.; CESAR, T.B Avaliação do estresse oxidativo no sangue de consumidores habituais de suco de laranja. **Revista Ciência Farmácia Básica Aplicada**,v.32, n.2,p.275-279, 2011.

NETO, A., FERREIRA, J. M., RIVERA, R. J. B., CALVI, R. G., RAFFA, M. F., DONADON, C. C., MELO, P. D. S. Níveis comparativos de estresse oxidativo em camundongos em duas situações do limite orgânico: overreaching induzido por treinamento de natação e câncer. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, v.14, n.6, p.548-552, 2008.

NOGUEIRA NETO, J.D.; de SOUSA, D.P.; FREITAS, R.M. Avaliação do potencial antioxidante in vitro do nerolidol. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica**

Aplicada, v.34, n.1, p.125-130, 2013.

OHKAWA, H.; OHISHI, N.; YAGI, K.. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. **Analytical Biochemistry**, [s.l.], v. 95, n. 2, p.351-358, jun. 1979.

PILZ, J.; MEINEKE, I.; GLEITER, C.H. Measurement of free and bound malondialdehyde in plasma by high-performance liquid chromatography as the 2,4-dinitrophenylhydrazine derivative. **Journal of Chromatography B**, v.742, p.315–325, 2000.

RAMOS, L.A.; CAVALHEIRO, C.C.S.; Cavalheiro, E.T.G. Determinação de nitrito em águas utilizando extrato de flores. **Química Nova**, v.29, n.5, 2006.

REIS, S.; SEGUNDO, M. A. Kinetic matching approach applied to ABTS assay for high-throughput determination of total antioxidant capacity of food products. **Journal Of Food Composition And Analysis**, [s.l.], v. 33, n. 2, p.187-194, mar. 2014

ROVER JÚNIOR, L.; HOEHR, N.F.; VELLASCO, A.P.; KUBOTA, L.T.; Sistema antioxidante envolvendo o ciclo metabólico da glutatona associado a métodos eletroanalíticos na avaliação do estresse oxidativo. **Química Nova**, v. 24, n. 1, p.112-119, 2001.

SCHAICH, K. M.; TIAN, X.; XIE, J. Reprint of “ Hurdles and pitfalls in measuring antioxidant efficacy : A critical evaluation of ABTS , DPPH , and ORAC assays ”. **Journal of Functional Foods**, v. 18, p. 782–796, 2015.

SILVA, F. A. M.; BORGES, M. Fernanda M.; FERREIRA, Margarida A.. Métodos para avaliação do grau de oxidação lipídica e da capacidade antioxidante. **Química Nova**, [s.l.], v. 22, n. 1, p.94-103, fev. 1999.

TABASSUM, S. et al... Synthesis , crystal structure , ABTS radical-scavenging activity , antimicrobial and docking studies of some novel quinoline derivatives. **Journal of Molecular Structure**, v. 1070, p. 10–20, 2014.

UKEDA, H.; MAEDA, S.; ISHII, T.; SAWAMURA, M. Spectrophotometric assay for superoxide dismutase based on tetrazolium salt 3'-(1-(phenylamino)-3,4-tetrazolium)-bis(4-nitrophenyl)benzenesulfonic acid hydrate reduction by xanthine-xanthine oxidase. **Anal. Biochem.**, v. 251, p.206-209, 1997.

VALENT, I. et al... Kinetics of ABTS derived radical cation scavenging by buccillamine, cysteine, and glutathione. Catalytic effect of Cu²⁺ ions. **Biophysical Chemistry**, [s.l.], v. 212, p.9-16, maio 2016.

VASCONCELOS, S. M. L. et al... Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. **Química Nova**, [s.l.], v. 30, n. 5, p.1323-1338, out. 2007.

VAZATTA, R. et al... Exercício Físico e Mecanismo Antioxidante de Defesa. **Saúde em Revista**, [s.l.], v. 11, n. 28-29, p.7-15, 31 dez. 2009.

WERF, R. VAN DER et al... LWT - Food Science and Technology ABTS radical scavenging capacity in green and roasted coffee extracts. **LWT - Food Science and Technology**, v. 58,

n. 1, p. 77–85, 2014.

ZHANG, P. et al... *Phytochemistry Letters* New butenolide derivatives from the marine-derived fungus *Paecilomyces variotii* with DPPH radical scavenging activity.

Phytochemistry Letters, v. 11, p. 85–88, 2015a.

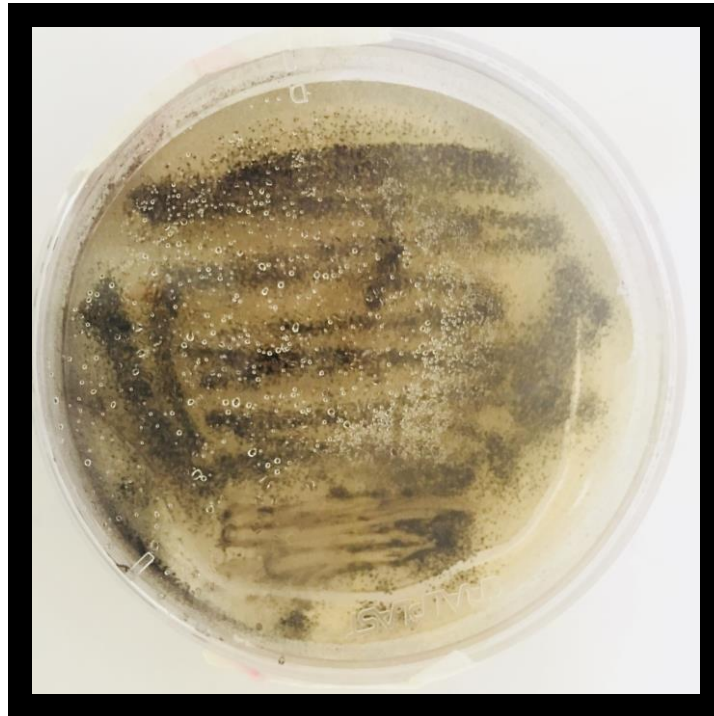
HANG, Y. et al... *LWT - Food Science and Technology* Assessment of the correlations between reducing power, scavenging DPPH activity and anti-lipid-oxidation capability of phenolic antioxidants. **LWT - Food Science and Technology**, v. 63, n. 1, p. 569–574, 2015b.

ZHENG, L. et al... Practical problems when using ABTS assay to assess the radical-scavenging activity of peptides: Importance of controlling reaction pH and time. **Food Chemistry**, v. 192, p. 288–294, 2016.

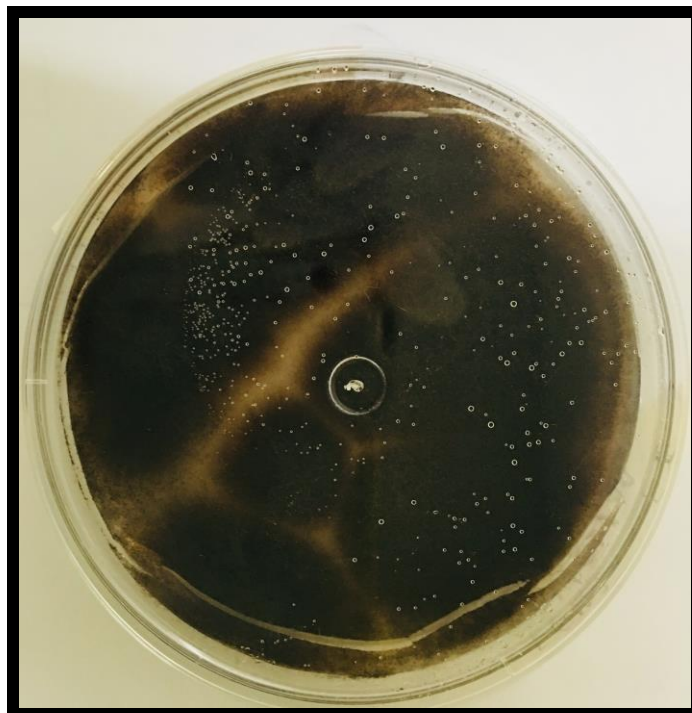
ANEXOS



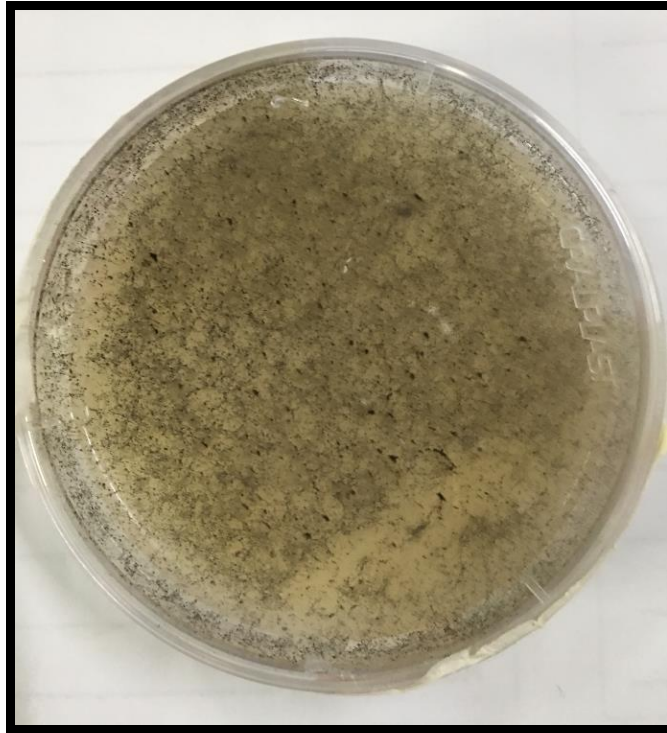
ANEXO I: FOTOS DOS FUNGOS ISOLADOS E IDENTIFICADOS DO SOLO DA CAATINGA PIAUIENSE



Fungo isolado THFG2 (*Curvularia clavata*
Jain) (Tabela 2)



Fungo isolado THFG6 (*Aspergillus Níger* V.
Tiegh) (Tabela 2)



Fungo isolado FZFG4 (*Rhizopus oryzae* Went & Prinsen Geerligs) (Tabela 2)

ANEXO II: ARTIGO SUBMETIDO À REVISTA PHYTOTHERAPY RESEARCH

The screenshot shows a web browser window with the URL <https://mc.manuscriptcentral.com/ptr>. The page header includes the ScholarOne Manuscripts logo, the journal name "Phytotherapy Research", and navigation links for Home, Author, and Review. The user is identified as "Christiane Feitosa". The main content area displays "Submission Confirmation" with a "Print" button and the message "Thank you for your submission". Below this, it states "Submitted to Phytotherapy Research". The Windows taskbar at the bottom shows the time as 11:19.

The screenshot shows the same web browser window displaying the submission details for Manuscript ID PTR-18-0556. The title is "SECONDARY METABOLITES AND PHARMACOLOGICAL ACTIVITIES OF FUNGI: A REVIEW". The authors listed are Feitosa, Christiane; Saraiva, Espedito; Santos, Felipe; Lima, Layana F. de Lima; Sousa, Ana Paula; Junior, Ronaldo; and Rai, Mahendra. The date submitted is 18-Apr-2018. An "Author Dashboard" button is visible at the bottom right. The footer of the page features the SCHOLARONE™ logo and the Clarivate logo. The Windows taskbar at the bottom shows the time as 11:19.