



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
CAMPUS UNIVERSITÁRIO PROF. ANTÔNIO GARCIA FILHO
DEPARTAMENTO DE FARMÁCIA DE LAGARTO**

JÚLIA SANTANA LISBOA

**BIOTRANSFORMAÇÃO DE GINGERÓIS POR FUNGOS
ENDOFÍTICOS ISOLADOS DE *Humirianthera ampla***

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

LAGARTO, SERGIPE

Fevereiro, 2019

JÚLIA SANTANA LISBOA

**BIOTRANSFORMAÇÃO DE GINGERÓIS POR FUNGOS ENDOFÍTICOS
ISOLADOS DE *Humirianthera ampla***

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Departamento de Farmácia do Campus de Lagarto da Universidade Federal de Sergipe, como requisito para obtenção do diploma de Bacharel em Farmácia.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Natália Nogueira Saraiva

Co-orientador: Prof. Dr. James Almada da Silva

LAGARTO, SERGIPE

Fevereiro, 2019

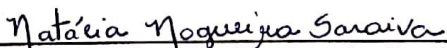
JÚLIA SANTANA LISBOA

BIOTRANSFORMAÇÃO DE GINGERÓIS POR FUNGOS ENDOFÍTICOS
ISOLADOS DE *Humirianthera ampla*

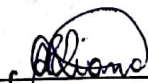
Trabalho de Conclusão de curso apresentado ao
Departamento de Farmácia da Universidade Federal de
Sergipe Campus de Lagarto, como requisito para
obtenção do diploma de bacharel em Farmácia.

Orientadora: Profª. Drª. Natália Nogueira Saraiva
Co-orientador: Prof. Dr. James Almada da Silva

Aprovado em: 19/02 2019



Profª. Dra. Natália Nogueira Saraiva
Universidade Federal de Sergipe
(ORIENTADORA)



Profª. Ma. Ana Carolina Viana Simões
Universidade Federal de Sergipe
(EXAMINADORA 1)



Profª. Dra. Luciana Pereira Lobato
Universidade Federal de Sergipe
(EXAMINADORA 2)

AGRADECIMENTOS

Ao Ser Divino, pelo dom da vida.

A minha mãe, Telma Santana por ter sido minha maior incentivadora, minha força diária, meu alicerce. Obrigada por nunca ter desistido de mim. Nunca terei como agradecer por tudo que faz por mim.

Ao meu pai Edson Barbosa, por ser meu herói, por ser meu espelho de batalha. Você é meu maior exemplo de luta e vitória.

A minha orientadora Profa. Dra. Natália Nogueira Saraiva, por ter sido meu exemplo desde o início, por ter me acolhido em seu grupo de pesquisa. Obrigada por toda paciência e aprendizado transmitido. Você foi essencial nessa jornada.

Aos meus avós Antônio, Edite, Valdice, por todo ensinamento e carinho ao longo da vida, e em especial a Zeinha (*in memoriam*), sinônimo de força, que sempre foi meu grande herói e hoje é meu anjo da guarda.

As minhas tias e tios por todo apoio e carinho, sempre torcendo por minhas conquistas. A toda minha família, por ser sinônimo de união.

Aos meus primos, que são meus irmãos de coração, me dão toda força e apoio, e foram sempre tão presentes e essenciais em toda minha trajetória.

Aos meus sobrinhos de coração, em especial a minha afilhada Sophia, por me fazer querer ser melhor a cada dia e por alegrarem meus dias com o amor mais puro de criança.

A toda equipe do GEPP e aos amigos lá obtidos, por todo aprendizado inicial e por sempre acreditarem no meu potencial.

Aos amigos feito no Amadeus, em especial a Bia e a Marília, que dividiram comigo os anos mais difíceis e decisivos da minha vida e nunca me abandonaram.

Aos mestres, pelos ensinamentos, em especial ao Prof. Dr. James Almada da Silva, Profa. Dra. Luciana Pereira Lobato e Profa. Ma. Ana Carolina Viana Simões pelas contribuições e auxílio em meu trabalho.

Aos meus amigos e companheiros de toda a vida dos grupos NFAIK, paralisa saideira, que trazem alegrias para os meus dias e dividirem comigo momentos únicos, sendo meu refúgio, na correria do dia a dia.

Aos meus melhores amigos Lucas, Lais, Jamille e Allefy que sempre me apoiaram e me aconselharam a ser melhor. Obrigada por todos momentos compartilhados.

Aos amigos do grupo de pesquisa da Profa. Dra. Natália Nogueira Saraiva, Lucas, Vitória, Reinan, Raissa e Diego, que compartilharam toda esta trajetória comigo, obrigada por toda ajuda.

Aos meus amigos feitos durante a graduação Mariana, Jaline, Bianca, Camila, Bruna, Kananda e Ary (que está comigo desde sempre), que compartilharam comigo todas as angústias e vitórias, que tornaram essa caminho mais leve.

A todos que contribuíram de forma direta e indireta para a realização deste trabalho, meu muito obrigada!

***“Não é apenas o resultado, mas a jornada e a
pessoa na qual se torna ao longo dela.”***

(Ipog)

RESUMO

BIOTRANSFORMAÇÃO DE GINGERÓIS POR FUNGOS ENDOFÍTICOS ISOALDOS DE *Humirianthera ampla*

Júlia Santana Lisboa, Lagarto, 2019.

Os fungos, por apresentarem uma enorme biodiversidade, dão origem a uma grande variedade de metabólitos, que possuem diversas funcionalidades. O seu estudo em processos de biotransformação tem sido muito útil na produção de novos compostos, devido ao aumento da produtividade das substâncias desejadas, superação dos problemas encontrados em análises químicas e a possibilidade da elucidação de vias biossintéticas. Assim, substâncias com amplo poder terapêutico, como as isoladas de *Zingiber officinale*, estão sendo bastante utilizados em estudos biocatalíticos. Baseado nisso, este trabalho avaliou o potencial de biotransformação de dois fungos endofíticos isolados da planta *Humirianthera ampla* frente à gingeróis isolados de *Zingiber officinale*. As duas cepas fúngicas foram submetidas a identificação molecular e cultivadas em placas de Petri em meio semissólido Batata Dextrose Ágar (BDA) durante 7 dias. Para os experimentos de biotransformação, pequenos pedaços (≈ 6 mm) de cada fungo foram colocados nos meios de cultura líquidos Batata dextrose (BD), Meio de Extrato de carne (MEP) e Saboraud (SBD) por 7 dias em crescimento. Após o crescimento fúngico, adicionou a fração enriquecida dos gingeróis (substrato orgânico), deixando sob agitação por mais 7 dias. Experimentos variando os dias de crescimento (7°, 8°, 9°, 10° e 14° dias) com a fração enriquecida também foram realizados. Ao final das biotransformações, os extratos foram obtidos por partição líquido-líquido com acetato de etila e analisados por métodos cromatográficos. Todos os procedimentos foram realizados em triplicata e com experimentos controles. Os fungos foram identificados em *Scytalidium lignicola* e *Scytalidium* sp. Para ambos os fungos, a biotransformação foi observada apenas no meio de crescimento MEP e a partir dos diferentes métodos cromatográficos observou-se o aparecimento de uma substância mais apolar em relação aos gingeróis testados em todos os dias estudados. Este trabalho possui caráter inédito já que não há trabalhos na literatura sobre o isolamento e identificação dos fungos endofíticos da *H. ampla*, nem a utilização deles em processos de biotransformação.

Palavras-chave: *Zingiber officinale*; Biocatálise; *Scytalidium lignicola*; *Scytalidium cuboideum*.

ABSTRACT

BIOTRANSFORMATION OF GINGERIALS BY ISOLATED ENDOFITIS FUNGI OF *Humirianthera ampla*

Júlia Santana Lisboa, Lagarto, 2019.

Fungi, because they present an enormous biodiversity, give rise to a great variety of these secondary metabolites, that have diverse functionalities. Its biotransformation study has been very useful in the production of new compounds, due to the increase of productivity of the desired substances, overcoming problems encountered in chemical analysis and the possibility of elucidation of the biosynthetic pathway. Thus, substances with broad therapeutic power, such as those isolated from *Zingiber officinale*, are being widely used in biocatalytic studies. Based on this, this work evaluated the biotransformation potential of two endophytic fungi isolated from the *Humirianthera ampla* plant against gingerols isolated from *Zingiber officinale*. The two fungal strains were submitted to molecular identification and cultured in Petri dishes in semisolid potato Agar Dextrose (BDA) for 7 days. For the biotransformation experiments, small pieces (≈ 6 mm) of each fungus were placed in the liquid culture media Dextrose Potato (BD), Meat Extract Medium (MEP) and Saboraud (SBD) for 7 days in growth. After the fungal growth, it was added the enriched fraction of gingerols (organic substrate), leaving under agitation for another 7 days. Experiments varying the growth days (7 °, 8 °, 9 °, 10 ° and 14 ° days) with the enriched fraction were also performed. At the end of the biotransformations, the extracts were obtained by liquid-liquid partition with ethyl acetate and analyzed by chromatographic methods. All procedures were performed in triplicate and with control experiments. The fungi were identified in *Scytalidium lignicola* and *Scytalidium* sp. For both fungi, the biotransformation was only observed in the medium of MEP growth and from the different chromatographic methods the appearance of a more apolar substance was observed in relation to the gingerols tested in all the studied days. This work has an unprecedented character since there are no papers in the literature on the isolation and identification of the endophytic fungi of the *H. ampla* nor the use of them in processes of biotransformation.

Keywords: *Zingiber officinale*; Biocatalysis; *Scytalidium lignicola*; *Scytalidium cuboideum*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Biotransformação da progesterona (A) em 11 α - hidroxiprogesterona (B)	21
Figura 2: 6-metoxibenzoxazolinona (MBOA) (C) e 2-benzoxazolinona (BOA) (D) e seus produtos biotransformados N-(2-hidroxifenil) (E) e N-(2-hidroxi-4-metoxifenil) (F).	22
Figura 3: Parte área da planta herbácea <i>Zingiber officinale</i> (A) e o seu rizoma (B).	23
Figura 4: Estruturas químicas de alguns constituintes encontrados no gengibre	24
Figura 5: Fluxograma das etapas da metodologia para o fungo UFCM 0550.....	27
Figura 6: Fluxograma das etapas da metodologia para o fungo UFCM 0536.....	28
Figura 7: Etapas da obtenção da fração enriquecida por gingeróis e do isolamento dos gingeróis. Fonte: próprio autor.	31
Figura 8: Ilustração das etapas do procedimento de biotransformação. Fonte: GONÇALVES, 2017.....	32
Figura 9: Representação do experimento de biotransformação para cada meio de cultivo e fungo. <i>Eppendorfs</i> para os controles (meio, meio + substrato e meio + fungo) e triplicatas da biotransformação BIO 1, BIO 2 e BIO 3 (meio + fungo + substrato).	32
Figura 10: Ilustração do experimento de biotransformação em dias diferentes para cada meio de cultivo e fungo. <i>Eppendorfs</i> para o controle (meio, meio + substrato e meio + fungo) e triplicatas da biotransformação BIO 1, BIO 2 e BIO 3 (meio + fungo + substrato).	33
Figura 11: Árvore filogenética de Agrupamento de Vizinhos para a região ITS do rDNA. Valores de bootstrap ($\geq 50\%$) para 1000 repetições são mostrados nos nós. UFCM - Coleção Micológica da Universidade Federal do Ceará	36
Figura 12: Placas cromatográficas das frações obtidas do extrato do tubérculo do gengibre após cromatografia líquida em coluna analítica, com destaque a figura 4, a qual corresponde a fração enriquecida de gingeróis. As placas 1, 2, 3 e 5 correspondem aos demais compostos do gengibre.....	37
Figura 13: Cromatograma da análise em CLAE da fração enriquecida por gingeróis. Condições: Coluna preparativa de fase reversa (ODS) C 18 com 25 cm de comprimento e 2,12 cm de diâmetro, bombas LC-6AD, desgaseificador DGU-20A3R, auto injetor SIL-20A, detector UV-Vis SPD-20A, vazão com fluxo isocrático 10 mL/min, eluente MeOH/H ₂ O (78:22).	37
Figura 14: Cultivo dos fungos em BDA por 7 dias. A: <i>Scytalidium lignicola</i> ; B: <i>Scytalidium</i> sp. Fonte: próprio autor.....	38
Figura 15: Placa cromatográfica do experimento de biotransformação do fungo <i>Scytalidium</i> sp. no meio MEP por 7 dias. Eluente: AcOEt/Hexano 4:6. M: controle do meio de cultura; MS: controle do meio de cultura mais o substrato; MF: controle do meio de cultura com o fungo; B1: triplicata do experimento de biotransformação 1, B2: triplicata do experimento de biotransformação 2; B3: triplicata do experimento de biotransformação 3. Revelação em solução de Vanilina.	39
Figura 16: Placa cromatográfica do experimento de biotransformação do fungo <i>Scytalidium lignicola</i> no meio MEP por 7 dias. Eluente: AcOEt/Hexano 4:6. M: controle do meio de cultura; MS: controle do meio de cultura mais o substrato; MF: controle do meio de cultura com o fungo; B1: triplicata da biotransformação 1, B2: triplicata do	

experimento de biotransformação 2; B3: triplicata do experimento de biotransformação 3. Revelação em solução de Vanilina..... 40

Figura 17: Placa cromatográfica do experimento de biotransformação em dias diferentes pelo fungo *Scytalidium lignicola* no meio MEP. Eluente: AcOEt/Hexano 4:6. M: controle do meio de cultura; MS: controle do meio de cultura mais o substrato; MF: controle do meio de cultura com o fungo; B1: triplicata do experimento de biotransformação 1; B2: triplicata do experimento de biotransformação 2; B3: triplicata do experimento de biotransformação 3. Revelação em solução de Vanilina..... 41

Figura 18: Comparação entre os cromatogramas em CLAE/EM obtidos das amostras do controle e do experimento de biotransformação do fungo *Scytalidium lignicola*. Condições: modo positivo, resolução 70.000, voltagem do spray 4 kV, gás de bainha 30, gás auxiliar 10, temperatura do capilar 320°C, temperatura de gás auxiliar 250 °C, *tube lens* 55 e faixa de massas m/z 100-500..... 43

Figura 19: Cromatograma em CLAE/EM obtido da amostra do experimento de biotransformação do fungo *Scytalidium lignicola*. Condições: coluna: Luna C-18 (110X4,6 mm) 5 µm; eluente: A: água com 0,1% de ácido fórmico, B: MeOH com 0,1% de ácido fórmico; fluxo: 0,5 mL/min, gradiente A (30):B(70) para A(70):B(50) em 20 min; volume de injeção: 5 µL; temperatura da coluna: 20°C. e faixa de massas m/z 100-500. 44

Figura 20: CCDA dos experimentos de biotransformação pelo fungo *Scytalidium lignicola* variando os dias de incubação e utilizando o substrato 6-gingerol isolado. Revelador: Vanilina. Eluente: Hex:AcOEt (6:4). A: CCDA da biotransformação após 7 dias do fungo em contato com o substrato. B: CCDA da biotransformação após 14 dias do fungo em contato com o substrato..... 45

LISTA DE TABELA

Tabela 1: Isolados utilizados na filogenia.	35
Tabela 2: Comparação entre a identificação das substâncias nos cromatogramas obtidos na análise por CLAE/EM da amostra do experimento de biotransformação e da amostra do controle. A comparação foi realizada, levando em consideração as relações massa/carga $[M+Na]^+$ e os tempos de retenção de cada substância.	42

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AcOEt – Acetato de Etila

BD – Meio líquido Batata Dextrose

BDA – Meio semissólido Ágar Batata Dextrose

BIOAGRI - Laboratório de Biologia Molecular Aplicada a Agricultura

BLAST - *Basic Local Alignment Search Tool*

CCDA – Cromatografia em camada delgada analítica

CLAE – Cromatografia líquida de alta eficiência

CTAB - *Cationic Hexadecyl Trimethyl Ammonium Bromide*

EtOH - Etanol

HClO₄ – Ácido Perclórico

Hex - Hexano

ITS - *Internal Transcribed Spacer*

LABS - Laboratório de Biotecnologia e Síntese Orgânica

LPNBio – Laboratório de Produtos Naturais Bioativos

MeOH - Metanol

MEP – Meio líquido *Meat Extract and Peptone*

NCBI - *National Center for Biotechnology Information*

PCR - *Polymerase Chain Reaction*

SBA – Meio semissólido Ágar Sabourad

SBD – Meio líquido Sabouraud Dextrose

UV – Ultravioleta

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
2. REVISÃO DA LITERATURA	17
2.1 Biotransformação	17
2.2. Fungos Endofíticos	19
2.3. Fungos endofíticos na biotransformação	21
2.4. Gênero <i>Scytalidium</i> sp.	22
2.5 Gengibre e os gingeróis	23
3. OBJETIVOS	26
3.1. Geral	26
3.2. Específicos	26
4. METODOLOGIA	27
4.1 Obtenção e preservação dos fungos	28
4.2 Extração do DNA, amplificação, sequenciamento e análise filogenética de isolados endófitos de <i>Humirianthera ampla</i>	29
4.3 Preparo dos meios de cultivo	30
4.4 Obtenção do substrato orgânico	30
4.5 Biotransformação de substratos orgânicos	31
4.5.1 Biotransformação em meios de cultura diferentes	31
4.6 Métodos Cromatográficos	33
4.6.1 Cromatografia em camada delgada analítica (CCDA)	33
4.6.2 Cromatografia líquida em coluna	33
4.6.3 Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)	34
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	35
5.1 Identificação morfológica e molecular das cepas fúngicas	35
5.2 Obtenção dos substratos orgânicos	36
5.3 Experimentos de Biotransformação	37
5.3.1 Experimentos de Biotransformação a partir do fungo <i>Scytalidium</i> sp.	38
5.3.2 Biotransformação a partir do fungo <i>Scytalidium lignicola</i> .	40
5.3.2.1 Análise dos experimentos de biotransformação em dias diferentes obtidos a partir do fungo <i>Scytalidium lignicola</i> .	41
5.3.2.2 Análise em CLAE/EM dos experimentos de biotransformação do fungo <i>Scytalidium lignicola</i> .	42
5.3.2.3 Biotransformação do fungo <i>Scytalidium lignicola</i> utilizando o 6-gingerol como substrato.	44
6. CONCLUSÃO	46

1. INTRODUÇÃO

Mesmo na “era sintética”, a maioria dos produtos farmacêuticos são oriundos de fontes naturais. Dentre as fontes produtoras de compostos bioativos, merecem destaque os microrganismos, que têm se mostrado como uma fonte profícua de substâncias com estruturas diferentes (MORAIS *et al.*, 2014). Assim os fungos, por apresentarem uma grande biodiversidade, se tornam um grupo de grande enfoque para o descobrimento e criação de novos fármacos (SYNYTSYA *et al.*, 2016).

Dentre o grande grupo dos fungos, encontram-se os fungos endofíticos, que dão origem a uma ampla variedade de metabólitos secundários bioativos, como os: alcaloides, benzopirranonas, chinonas, flavonóides, ácidos fenólicos, quinonas, esteróides, terpenóides, tetralonas, xantonas, entre outros; os quais possuem funcionalidade como agroquímicos, antibióticos, imunossuppressores, antiparasitários, antioxidantes e agentes anticancerígenos. Por isso a importância do estudo desses microrganismos, com o intuito de buscar metabólitos capazes de serem utilizados na indústria farmacêutica (SILVA, 2014).

Os fungos endofíticos são microrganismos que crescem intra e/ou intercelularmente nos tecidos de plantas superiores, causando uma interação mútua, ou seja, sem causar prejuízos nas plantas em que vivem (BORGUES, 2008). Tendo em vista que, apenas uma pequena parte de endófitos tem sido estudada, recentemente, vários grupos de pesquisa têm sido motivados a avaliar e elucidar o potencial desses microrganismos, que são aplicados em processos biotecnológicos focados na produção de novos compostos bioativos. Segundo Faber (2011) a biotransformação é uma importante atividade da biotecnologia, pois é um processo natural que ocorre há milhares de anos nos diversos seres vivos.

A biotransformação ou biocatálise pode ser entendida como o uso de catálise enzimática para realizar modificações em substâncias orgânicas. Ou seja, é uma transformação biológica de um composto exógeno utilizando-se microrganismos para biocatalisar uma ou mais etapas específicas de uma síntese (FABER, 2011).

O processo de biotransformação proporciona várias vantagens sobre a síntese química, pois biocatalisadores são ambientalmente benignos, uma vez que são completamente degradáveis, aumentam a produtividade de um composto específico desejado devido o conhecimento da reação química, aumento da velocidade da reação em

até 10^{12} vezes, além de atuar em um intervalo de pH e temperatura variável. Com isso, é considerado um método útil para a produção de novos compostos (FABER, 2011).

As biotransformações podem ser realizadas com os mais variados substratos, sejam eles complexos ou simples. Assim, nesse estudo, serão utilizados os gingeróis, compostos fenólicos presente nos rizomas de *Zingiber officinale*, conhecido popularmente como gengibre (JOLAD *et al.*, 2004). Vários estudos comprovam o efeito farmacológico desses compostos, entre eles estão: atividades anti-inflamatória, hipoglicêmica, antioxidante, antiulcerosa, antiemética, anti-náusea, ansiolítica, antipirética e antitumoral pertencentes ao gengibre (RODRIGUES, 2013).

Dessa forma, o objetivo desse trabalho foi avaliar o potencial de biotransformação de dois fungos endofíticos (*Scytalidium lignicola* e *Scytalidium* sp.) isolados da planta *H. ampla* frente a gingeróis isolados do rizoma do *Zingiber officinale*, visto que, até o momento, não se tem estudos sobre o potencial biocatalítico de espécies fúngicas isoladas da planta *Humirianthera ampla*.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Biotransformação

Biotransformação ou biocatálise é um processo utilizado pela raça humana por milhares de anos, vindo desde antiguidade, com a conversão do etanol a ácido acético (vinagre) por povos da Babilônia (Mesopotâmia), Egito, México e no Sudão. Esse processo envolve reações químicas catalisadas por enzimas, células ou tecidos de origem vegetal, microbiana ou animal, que podem agir *in vivo* (processos biológicos dos sistemas vivos) ou *in vitro* (CORTEZ et al., 2017). Ou seja, são modificações na estrutura química de substâncias naturais ou sintéticas, realizada por catalisadores bioquímicos, e que pode ocorrer em ambiente aquoso ou orgânico (CASTRO, 2004).

O processo envolve enzimas purificadas ou células íntegras, que podem ser encontradas no seu estado estacionário (*resting cells*) ou mortas (não viáveis), mas com suas enzimas de interesse mantidas ativas (CORTEZ et al., 2017). Esta imobilização acontece por um fenômeno natural ou por meio de procedimentos artificiais; e é preferível em relação às células livres, uma vez que são mais oportunos de manusear e de separar do meio onde ocorreram as reações, além de serem mais estáveis, devido ao fato das enzimas estarem em seu ambiente natural e sua localização permanecer intacta (PERKINS et al., 2015). Ademais, as células íntegras (*whole cells*) não passam pelas etapas de extração, isolamento e purificação das enzimas de interesse, sendo assim, normalmente mais utilizadas (CORTEZ et al., 2017).

Os processos enzimáticos apresentam uma série de benefícios, dentre eles encontra-se o fato que estes processos são realizados sob condições operacionais mais brandas de temperatura, de pH e de pressão atmosférica, não causando problemas como isomerização, racemização, epimerização e rearranjo (PATEL, 2008). Além da alta eficiência catalítica que, segundo (FABER, 2011), as velocidades das reações na presença de enzimas são superiores de até 10^{10} , em relação aquelas não catalisadas. Porém, há autores que apontam um aumento de velocidade de aproximadamente 10^{10} a 10^{26} vezes superiores aos encontrados na ausência do catalisador (CORTEZ et al., 2017).

Adicionalmente, há outras vantagens da biotransformação, como sua alta estabilidade em solventes orgânicos; não utilizam co-fatores; possuem uma larga especificidade pelo substrato; reduz o número de etapas do processo; alto rendimento; e exibem uma alta enantiosseletividade (CASTRO, 2004). Essa enantiosseletividade

tornou-se cada vez mais importante na indústria farmacêutica, pois possibilita a produção de um único enantiômero de intermediários quirais, trazendo benefício para os medicamentos; visto que a maioria das substâncias quirais apresentam geometria e posições espaciais diferentes, o que permite a existência de dois enantiômeros; porém um fármaco que contenha os dois enantiômeros, um pode antagonizar a ação do outro, ou um dos enantiômeros pode apresentar um efeito terapêutico e o outro ser responsável por um efeito secundário ou efeito indesejável, dentre outras consequências não menos importantes (ORLANDO et al., 2007).

Outra vantagem também é que as enzimas são consideradas reagentes ambientalmente favoráveis, pois são completamente degradáveis e podem ser reutilizadas por muitos ciclos (PATEL, 2008). Desse modo, esta técnica se enquadra dentro da “química verde” ou “green chemistry”, a qual tem o intuito de desenvolver e aplicar processos e produtos químicos com a finalidade de reduzir ou eliminar o uso e/ou a geração de substâncias perigosas à saúde humana e ao meio ambiente (HAI-FENG et al., 2008). Além disso, tem-se o objetivo de aperfeiçoar a precisão e ampliar os processos de produção para que ocorra redução dos gastos de energia e de matérias-primas, bem como de resíduos tóxicos (LENARDÃO et al., 2003).

Entretanto, as etapas da biotransformação devem ser planejadas com cuidado, relevando alguns aspectos importantes como: escolha do microrganismo a ser usado, seleção da substância que irá sofrer as possíveis reações (oxidação, redução, etc.), verificação da atividade catalítica das enzimas isoladas. Além de, determinar as condições de reação (temperatura, tempo, pH, solvente e concentração do substrato), a escolha do método analítico apropriado, elucidação da configuração absoluta do produto, e se os resultados forem positivos, aumento da escala (industrial ou preparativa) (BORGES, 2008).

Em 1956 a União Internacional de Bioquímica criou uma Comissão Internacional de Enzimas, devido aos grandes avanços na área da enzimologia, com o intuito de se ter critérios para a nomenclatura e a classificação das enzimas, facilitando a vida dos pesquisadores, por evitar a nomenclatura aleatória de uma mesma enzima. Assim, dividiu-se as enzimas em várias classes, levando em consideração o tipo de reações que catalisam. Um exemplo destas classes são as: A) Oxirredutases: catalisam reações de oxidação-redução ou transferência de elétrons; B) Transferases: transferem grupos funcionais como amina, fosfato, acil, carboxil, entre outros grupos; C) Hidrolases:

catalisam reações de hidrólise de ligação covalente; D) Liases: quebram as ligações duplas (FERREIRA et al., 2009).

A biocatálise é um mercado crescente e promissor, e a sua maior produção de enzimas ainda é destinada às indústrias de detergente e amido (CASTRO, 2004). Por exemplo, na panificação, as enzimas α -amilase são utilizadas para decompor o amido, levando à formação de maltose, o que aumenta a maciez e a textura da massa e do miolo, mantendo o pão fresco por mais tempo. Assim como as amilases (α -amilases e glicoamilases), as proteases (quimosina, papaína, bromelina e pepsina) e as pectinases possuem também uma função importante dentre as hidrolases e a glicose-isomerase (FERREIRA et al., 2009).

Há inúmeros estudos sobre esse processo de biotransformação, utilizando os produtos tanto naturais quanto sintéticos, com o intuito de mensurar, avaliar e elucidar o potencial dos microrganismos aplicados nesses processos biotecnológicos. Dentre os diversos microrganismos existentes, dá-se uma atenção aos fungos, pois se observou que o isolamento destes do ambiente, e consequentemente suas enzimas, são responsáveis por essas inúmeras modificações nas moléculas. Além de se ter poucas espécies fúngicas realmente conhecidas, por isso há um interesse nessa área de pesquisa (BORGES et al., 2009).

2.2. Fungos Endofíticos

A pesquisa de novos produtos é um processo contínuo e benéfico para diversas áreas, inclusive para indústria farmacêutica, sendo importante no tratamento contra as mais diversas doenças. Borges (2008) afirma que existem muitos microrganismos que residem em nichos ecológicos pouco explorado, como por exemplos os fungos endofíticos, e sugerem que as buscas por novos metabólitos secundários, advindo da natureza, sejam feitas nessa área.

Há um grande potencial de isolamento de novas substâncias químicas dos fungos endofíticos, devido a estreita relação entre esses microrganismos e as plantas hospedeiras. Tendo em vista que, diversos metabólitos podem ser encontrados em uma única espécie de vegetal, pois estima que cerca de 1.300.000 endofíticos habitem as 270.000 plantas já conhecidas; sendo que até 2002, cerca de 49 % das substâncias bioativas isoladas dos fungos eram desconhecidas (BRADY; CLARDY, 2000).

No século XIX, os microrganismos endofíticos foram mencionados pela primeira vez, mas foi Bary (1866) quem deu a definição de ser qualquer microrganismo que vive nos tecidos de plantas. Entretanto a definição mais amplamente aceita e utilizada foi estabelecida por Bacon e Write que dizem: “endófitos são microrganismos que colonizam os tecidos internos das plantas sem causar prejuízos imediatos no hospedeiro” (CHAPLA et al, 2013). Eles protegem as plantas do ataque de insetos, de doenças e de mamíferos herbívoros por meio da produção de metabólitos funcionais e ajudam na adaptação nos diferentes ambientes (seco, frio, etc.), além de induzir a tolerância a fatores de estresse (baixo pH, salinidade, presença de metais pesados) (ZHANG et al., 2006).

Foi verificado que os fungos endofíticos apresentam interações simbióticas com o hospedeiro e também possuem a capacidade de produzir alterações fisiológicas e muitos outros efeitos nos vegetais que parasitam. Essas relações simbióticas fungo/hospedeiro trazem benefícios tanto para o fungo, que obtém seus nutrientes e compostos necessários para sua sobrevivência, como também para a planta, pois os compostos produzidos pelos microrganismos servem de resistência e auxiliam no seu crescimento, devido à produção de fitormônios (KAUL et al, 2012).

Cada planta pode hospedar mais de um fungo endofítico, com isso, têm-se quase 300 mil espécies de plantas conhecidas no mundo, possibilitando uma grande oportunidade de descobrir novos microrganismos endofíticos de plantas de diferentes ecossistemas (CHAPLA et al, 2013). Entretanto existem diversos fatores que influenciam nas interações microrganismo/planta como: modo de transmissão, o padrão de infecção, idade da planta, condições ambientais e os antecedentes genéticos (SILVA, 2014).

A entrada dos fungos nas plantas ocorre por causas naturais ou feridas, no ambiente favorecido por climas úmidos. Seu isolamento pode servir para explicar a origem de alguns metabólitos secundários em plantas, devido a presença de enzimas específicas que possuem habilidade de catalisar reações (BORGES et al., 2009). Dentre os microrganismos endofíticos, encontram-se tanto fungos como bactérias. Porém os fungos são mais frequentemente isolados, por produzirem maiores quantidades de metabólitos secundários em comparação as bactérias (SILVA, 2014).

Diante de tanta importância desempenhada pelos fungos endofíticos, devido ao seu papel fisiológico, tem-se intensificado os estudos nesta área para aplicações na agricultura, indústria farmacêutica e alimentícia (ZHAO et al, 2010). Levando em consideração que, os fungos endófitos representam uma fonte inexplorada de produtos naturais novos e bioativos, pois há mais de 20.000 substâncias documentadas, dentre

delas 51% apresentam estruturas inéditas e 80% atividade biológica (CHAPLA et al, 2013).

2.3. Fungos endofíticos na biotransformação

A primeira aplicação de biotransformação foi feito por Pasteur, usando o fungo *Penicillium glaucum*, em 1858, onde se utilizou o D-tartarato de amônio e obtendo L-tartarato de amônio. Entretanto, somente no século XX, surgiu o desenvolvimento de hidroxilações microbianas em esteroides bioativos e em produtos intermediários, utilizados na síntese de corticosteroides, como por exemplo, a α -hidroxilação da progesterona usando *Rhizoma arrhizus* (figura 1), a qual levou a síntese de hormônios adrenocorticoides (corticosterona, cortisona e hidro cortisona) e abriu caminho para a preparação de uma série de derivados bioativos (prednisona, prednisolona e triancinolona) (BORGES, 2008).

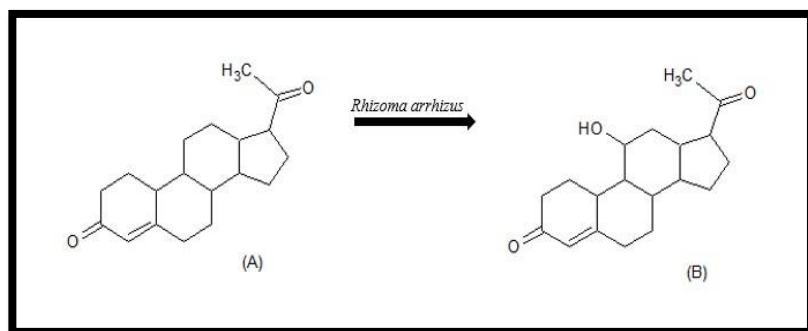


Figura 1: Biotransformação da progesterona (A) em 11 α - hidroxiprogesterona (B).

Há inúmeros relatos de estudos de biotransformação utilizando os fungos endofíticos, como por exemplo, o fungo *Fusarium moniliforme*, que está associado à *Zea mays L*, que metabolizou o substrato 6-metoxibenzoxazolinona (MBOA) e 2-benzoxazolinona (BOA) em N-(2-hidroxi-4-metoxifenil) e N-(2-hidroxifenil), respectivamente, como mostra na figura 2 (ZIKMUNDOVA et al., 2002).

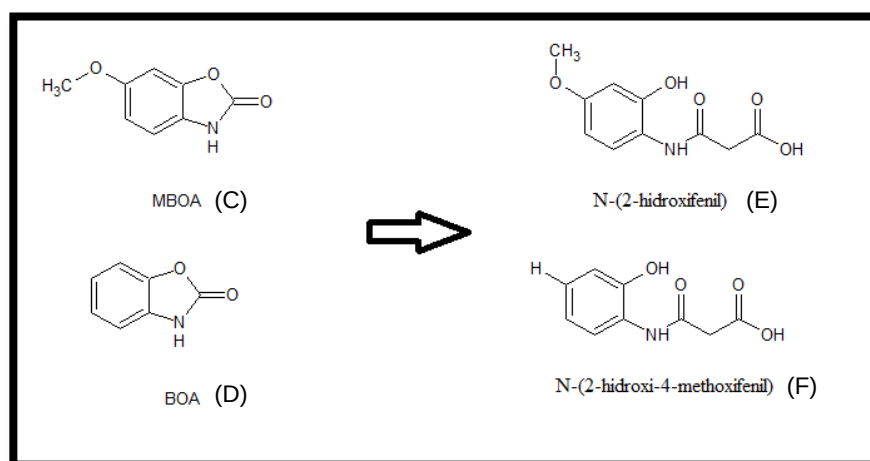


Figura 2: 6-metoxibenzoxazolinona (MBOA) (C) e 2-benzoxazolinona (BOA) (D) e seus produtos biotransformados N-(2-hidroxifenil) (E) e N-(2-hidroxi-4-metoxifenil) (F).

Há também estudos de biotransformação utilizando fármacos, como por exemplo: os derivados fenotiazínicos, tal como tioridazina, que sob a reação de S-oxidação, geram derivados sulfoxidados: tioridazina-2-sulfóxido (o qual tem sua ação antipsicótica aumentada), tioridazina-2-sulfona e tioridazina-5-sulfóxico (ação cardiotoxica), os quais são metabólitos ativos (BORGUES, 2008). Outros agentes oriundos da biotransformação realizadas por fungos são os antimicrobianos: ácido fusídico e a griseofulvina; e também os antifúngicos semissintéticos, como a anidulafungina, caspofungina e o retapamulina, que são derivados de metabólitos secundários de fungos (KJER et al, 2010).

2.4. Gênero *Scytalidium* sp.

Scytalidium sp. é um gênero de fungos na ordem de Helotiales. Este gênero de fungo anamórfico tem ampla distribuição e são um microrganismos saprofíticos e fitopatogênicos, encontrados no solo e/ou vegetação de clima tropical e subtropical. São filamentosos e se subdividem em inúmeras espécies, como: *S. lignicola*, *S. cuboideum*, *S. dimidiatum*, *S. hyalinum*, entre outros (KIR, 2008).

Eles se encontram dentre os principais agentes filamentosos não dermatófitos causadores da doença, juntamente com os gêneros *Scopulariopsis*, *Fusarium*, *Aspergillus* e *Onychocola*. Espécies de *Scytalidium* sp. estão sendo associadas à patogenia primária de unha, o qual a prevalência das infecções vem aumentando nas últimas décadas, embora ainda pouco seja relatado. Há relatos de infecções profundas e superficiais pelo gênero *Scytalidium* em pacientes imunocomprometidos e imunocompetentes, incluindo abscesso

no sistema nervoso central, endoftalmites, sinusites, osteomielites, fungemias, infecções subcutâneas, eumicetoma, linfangite, linfadenite, tinea pedis, onicomicoses, entre outras (TONANI, et al. 2018).

O *Scytalidium lignicola* é um fungo descoberto recentemente e tem sido descrito como um importante patógeno na cultura da mandioca causando a podridão negra em raízes e caule. Ao colonizar ambientes de madeira, solo ou composto, *S. lignicola* é reconhecido como um oportunista saprotrófico cujo estilo de vida pode mudar para a patogenicidade humana, causando infecções. De fato, há pouca informação disponível sobre o papel desse patógeno facultativo (BÜTTNER, et al. 2018).

2.5 Gengibre e os gingeróis

Entre as diversas plantas existentes e utilizadas como terapia está o *Zingiber officinale* (Figura 3), conhecido como gengibre, pertencente à família das “Zingiberáceas”. É uma planta herbácea (Figura 3 - A), que pode vir atingir até 1,20 m de altura, nativa da Índia (Ásia), e não apresenta raízes, mas sim, numerosos rizomas (Figura 3 - B), onde são extraídos elementos resinosos, que são muito aromáticos. Possui um gosto picante, motivo pelo qual é empregado na preparação de condimentos, temperos, etc (RODRIGUES, 2013). Incluindo-o então no grupo de “especiarias”, representando atualmente o terceiro lugar das plantas medicinais, aromáticas e condimentares mais produzidas no Paraná (NEGRELLE, 2005).



Figura 3: Parte aérea da planta herbácea *Zingiber officinale* (A) e o seu rizoma (B).

O quantitativo de seus componentes químicos varia de acordo com a origem geográfica da planta, secagem, época de colheita, tipo de adubação, entretanto os principais constituintes responsáveis, parecem permanecer constantes como os sesquiterpenos que contêm 1 a 3%, gingerol e shogaol 2,5 a 5% e 60% de amido. Os

gingeróis e shogaóis são os responsáveis pela maior parte das atividades terapêuticas do gengibre (GRÉGIO, 2006).

O shogaol (figura 4-C) é um produto da quebra de uma hidroxila (reação de eliminação) do 6-gingerol, produzido durante a secagem, e é duas vezes mais pungente que os gingeróis. Já os gingeróis, além de ter caráter pungente, possui substâncias homólogas que se diferenciam entre si devido ao comprimento de sua cadeia alquílica, como por exemplo os [6] -, [8] - e [10] -gingerol que contém 10, 12 e 14 carbonos em suas cadeias alquílicas não ramificadas, respectivamente (figura 4); todavia o [6]-gingerol é encontrado como o maior constituinte dos rizomas de gengibre frescos. Ambos os compostos possuem ação terapêutica, porém os gingeróis apresentam vários efeitos farmacológicos comprovados como: analgésico, antipirético, atividade anti-hepatotóxica, antinauseante, anti-inflamatória, antiemética, antimutagênica, antiúlcera, hipoglicêmica, antibacteriana, entre outras (NEGRELLE, 2005).

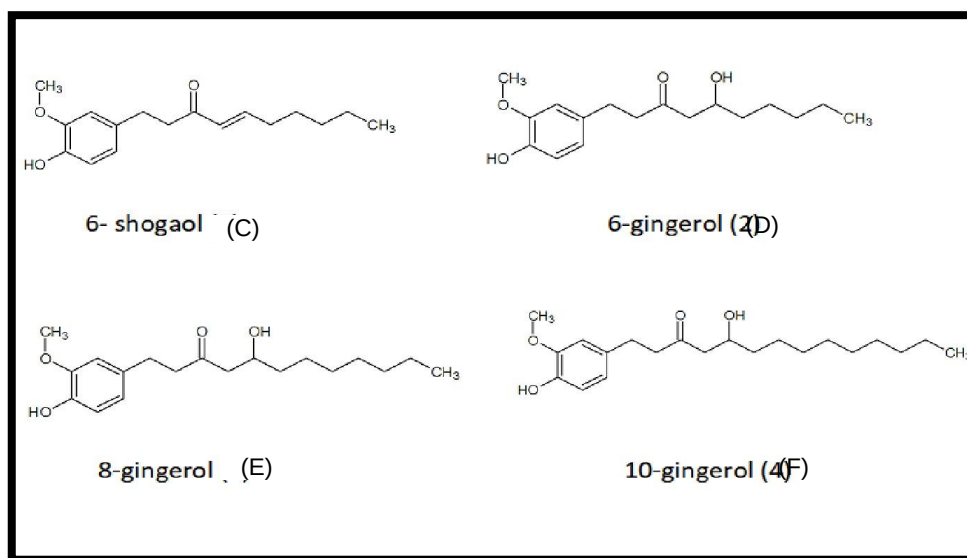


Figura 4: Estruturas químicas de alguns constituintes encontrados no gengibre.

Pesquisas mostram que óleos e extratos de *Zingiber officinale* apresentam ação inibitória em bactérias gram positivas e gram negativas. Segundo Grécio (2006), que comparou a atividade dos gingeróis e shogaóis na inibição da enzima ciclooxigenase do tipo 2 (responsável pelo processo inflamatório), os gingeróis e os shogaóis foram capazes de inibir a ciclooxigenase-2 em modelos experimentais *in vitro*.

O rizoma de gengibre é largamente comercializado por causa de suas diversas aplicações, como na medicina popular (excitante, estomacal e carminativo), na alimentação, na indústria e especialmente como matéria-prima para fabricação de

bebidas, perfumes e produtos de confeitaria como pães, bolos, biscoitos e geleias (NEGRELLE, 2005).

Popularmente, o gengibre pode ser comercializado na forma de soluções e sprays, na cavidade oral, devido a sua ação cicatrizante, antiinflamatória e antimicrobiana. Porém ainda há poucos indícios que relacionam o gengibre aos microrganismos prevalentes na cavidade bucal, pois esta apresenta uma flora bastante variada. Há também outras formas de se comercializar as substâncias do gengibre, como em comprimidos e cápsulas, para o tratamento de dores de cabeça, náusea e outras desordens estomacais, de resfriados e algumas outras infecções virais como a hepatite C, de osteoartrite, além de apresentar efeitos anticancerígenos (GRÉGIO, 2006).

3. OBJETIVOS

3.1. Geral

- Avaliar o potencial de biotransformação de dois fungos endofíticos isolados da planta *H. ampla* frente à gingeróis isolados de *Zingiber officinale*.

3.2. Específicos

- Identificar os fungos endofíticos UFCM 0550 e UFCM 0536 isolados de *H. ampla*;
- Obter os gingeróis a partir do rizoma de *Zingiber officinale*;
- Avaliar o efeito da mudança do meio de cultivo e dias de experimento na obtenção de novos produtos a partir da biotransformação dos fungos UFCM 0550 e UFCM 0536;
- Analisar os experimentos de biotransformação por métodos cromatográficos e espectrométricos;

4. METODOLOGIA

O estudo foi dividido em algumas etapas, como a identificação molecular das cepas fúngicas, isolamento dos substratos orgânicos, experimentos de biotransformação e análises cromatográficas. Abaixo, segue os fluxogramas (Figura 5 e 6) para a demonstração dessas etapas.

Para o fungo UFCM 0550 o experimento de biotransformação foi realizado em meios de cultura diferentes (MEP, BD e SBD) por 7 dias, utilizando como substrato a fração enriquecida por gingeróis e os extratos analisados em cromatografia em camada delgada analítica (CCDA).

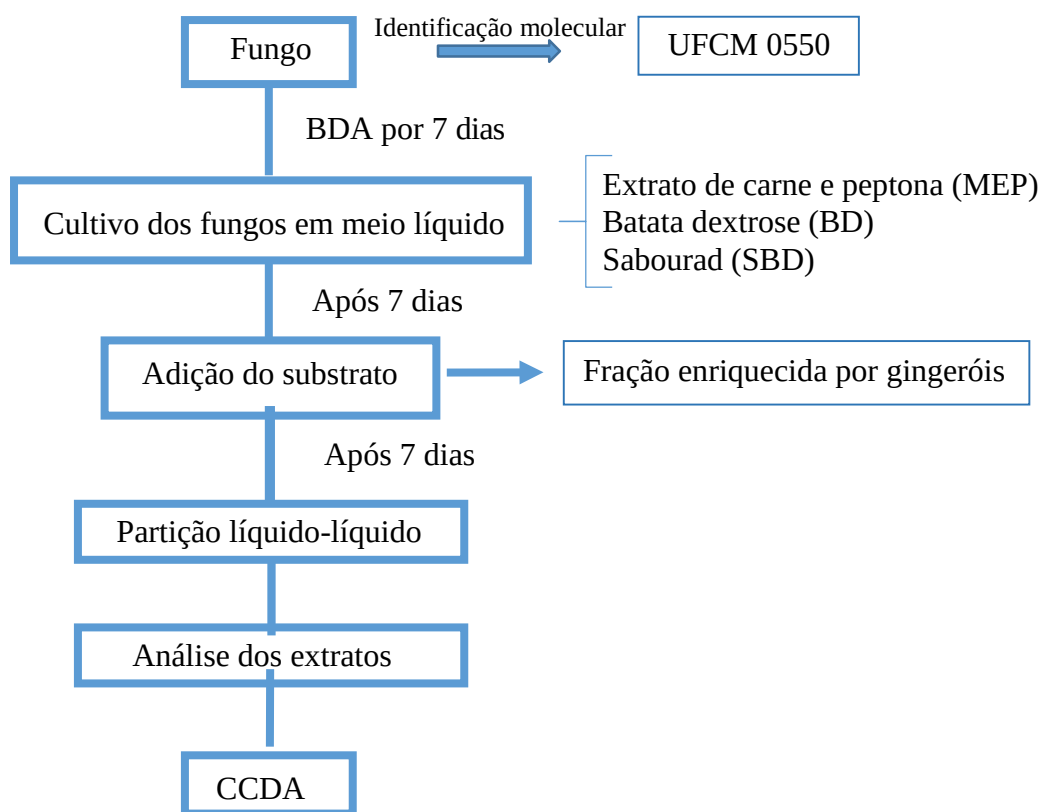


Figura 5: Fluxograma das etapas da metodologia para o fungo UFCM 0550.

Para a cepa UFCM 0536, o experimento foi realizado em meios de cultura diferentes e utilizando a fração enriquecida por gingeróis como substrato inicialmente por 7 dias. Depois o experimento foi repetido, avaliando os dias diferentes de biotransformação. Os extratos obtidos foram analisados por CCDA e cromatografia

líquida de alta eficiência acoplado a espectrômetro de massas (CLAE/EM). Além disso, também foi realizado um experimento utilizando o 6-gingerol como substrato por 7 dias.

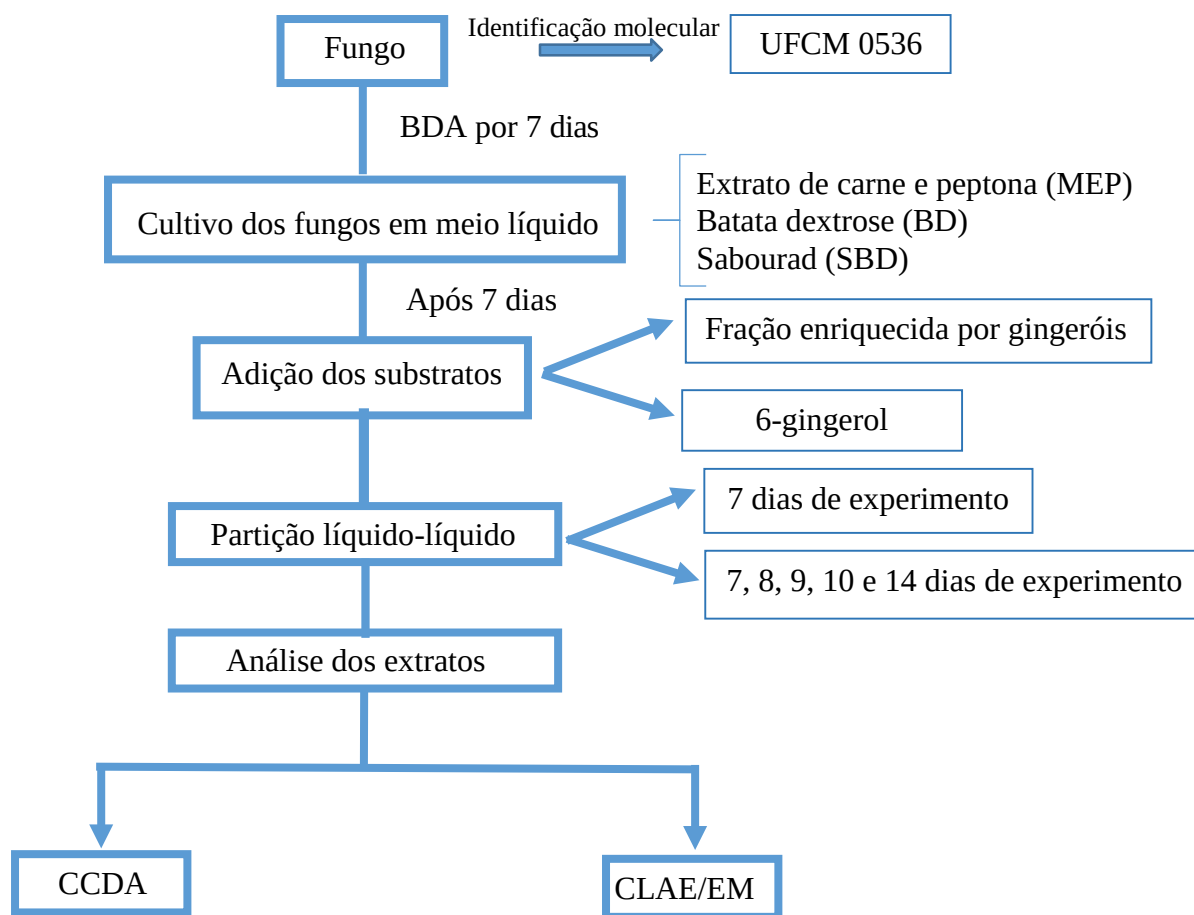


Figura 6: Fluxograma das etapas da metodologia para o fungo UFCM 0536.

4.1 Obtenção e preservação dos fungos

As cepas fúngicas desse trabalho foram obtidas a partir de uma parceria com a Universidade Federal do Ceará - UFC, no Laboratório de Biotecnologia e Síntese Orgânica (LABS), responsável pela etapa de isolamento dos microrganismos da planta *Humirianthera ampla*.

Os fungos foram incubados no meio de cultivo semissólido Batata Dextrose Ágar (BDA) durante 7 dias a temperatura ambiente e em seguida, preservou-os em óleo mineral. As culturas fúngicas, assim preservadas, serviram de matrizes para todos os estudos realizados nesse trabalho.

4.2 Extração do DNA, amplificação, sequenciamento e análise filogenética de isolados endófitos de *Humirianthera ampla*

Esses procedimentos foram realizados no Laboratório de Micologia e no Laboratório de Biologia Molecular Aplicada a Agricultura (BIOAGRI), do Departamento de Fitotecnia, da Universidade Federal do Ceará, Fortaleza.

Os isolados monospóricos e os isolados obtidos a partir das hifas foram cultivados em meio líquido Batata Dextrose (BD) até que a biomassa produzida fosse suficiente para a extração do DNA, pelo método CTAB (*Cationic hexadecyl trimethyl ammonium bromide*) (MURRAY; THOMPSON, 1980).

A amplificação dos fragmentos do DNA da região ITS (*Internal Transcribed Spacer*) do rDNA foi realizado de acordo com White et al. (1990) e Kuninaga et al. (1997), com modificações. A concentração final do DNA obtido foi ajustada para 10 a 20 ng.µL⁻¹ em reações de PCR (*Polymerase Chain Reaction*), que também continham: tampão 1X; iniciadores ITS4 e ITS5 (WHITE et al., 1990) a 0,5 µM cada; MgCl₂ a 1,5 mM; dNTPs a 0,2 mM cada; Taq DNA polimerase a 0,05 U. µL⁻¹; e água ultra pura, resultando em um volume final de 50 µL.

Os produtos da PCR foram sequenciados utilizando-se os iniciadores ITS4 e ITS5 na empresa Macrogen (Seul, Coréia do Sul). Os eletroferogramas gerados foram analisados no programa BioEdit e as sequências foram comparadas na base de dados do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI), por meio do programa BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*). Sequências com identidade superior a 90% foram obtidas do *GenBank* e utilizadas para a geração de alinhamentos múltiplos. A análise filogenética dos alinhamentos foi realizada pelo método de agrupamento de vizinhos, seguido de análise de *bootstrap* com 1.000 repetições.

4.3 Preparo dos meios de cultivo

Preparou-se 20 mL dos meios MEP e SBD, conforme as indicações do fabricante KASVI®. Para o meio sintético MEP foram pesados 0,56 gramas e diluídos em 20 mL de água destilada em frascos de Erlenmeyer. No meio sintético SBD pesou-se 0,6 gramas do meio e diluiu em 20 mL de água destilada em frascos de Erlenmeyer. Depois cada meio foi distribuído em *eppendorfs* e esterilizados em autoclave por 15 minutos a 121 °C.

O meio BD foi preparado com a batata fresca, onde foi cozido 4 g de batata inglesa em 20 mL de água, em seguida, filtrou-se o caldo e adicionou 0,4 grama de dextrose. Os 20 ml de meio preparado foram distribuídos em *eppendorfs* e esterilizados em autoclave por 15 minutos a 121 °C.

4.4 Obtenção do substrato orgânico

Primeiramente, pesou-se 1.184 gramas do rizoma do gengibre e colocou-o em um processo de limpeza, em uma solução com 2 litros de água e 50 mL de hipoclorito de sódio (água sanitária) com a concentração de 2,5% de cloro ativo. Em seguida, foi levado para estufa à 40°C por 7 dias e, posteriormente, triturado, utilizando um liquidificador, obtendo, ao final, 232 gramas.

O método de extração utilizado foi o de maceração. Assim, adicionou-se 1000 mL de etanol 99,5% sobre o material vegetal triturado, que foram trocados de 2 em 2 dias o solvente, durante sete dias. Cada solvente retirado foi filtrado, e em seguida, levado ao rota-evaporador para obtenção do extrato bruto.

O extrato bruto foi dissolvido em uma mistura binária de etanol/água na proporção de 1:1 e depois particionado em funil de separação com clorofórmio na proporção de 1:3.

A fração orgânica obtida, foi fracionada em cromatografia líquida de coluna de vidro (20 x 8 cm) preenchida com sílica gel 60 (70-230 mesh), utilizando solventes com polaridades diferentes. Primeiramente foi empregado o hexano (1 litro), seguido por uma mistura de hexano/acetato de etila (1:1) (2,5 litros). As frações foram recolhidas, de acordo com sua coloração, e analisadas por cromatografia em camada delgada analítica (CCDA) para obtenção da fração enriquecida de gingeróis. Para o isolamento dos gingeróis, utilizou-se a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), o qual é equipado com duas bombas LC-6AD, desgaseificador DGU-20A3R, auto-injetor SIL-20A,

detector UV-Vis SPD-20A e controladora CBM-20A e seguiu as seguintes condições: injeção de 1 mL da fração enriquecida de gingerol, coluna analítica C18, eluente MeOH/H₂O 78:22, fluxo isocrático de 10 mL/min. Todo esse procedimento está descrito na figura 7, e foi baseado na metodologia desenvolvida por SILVA, 2012.

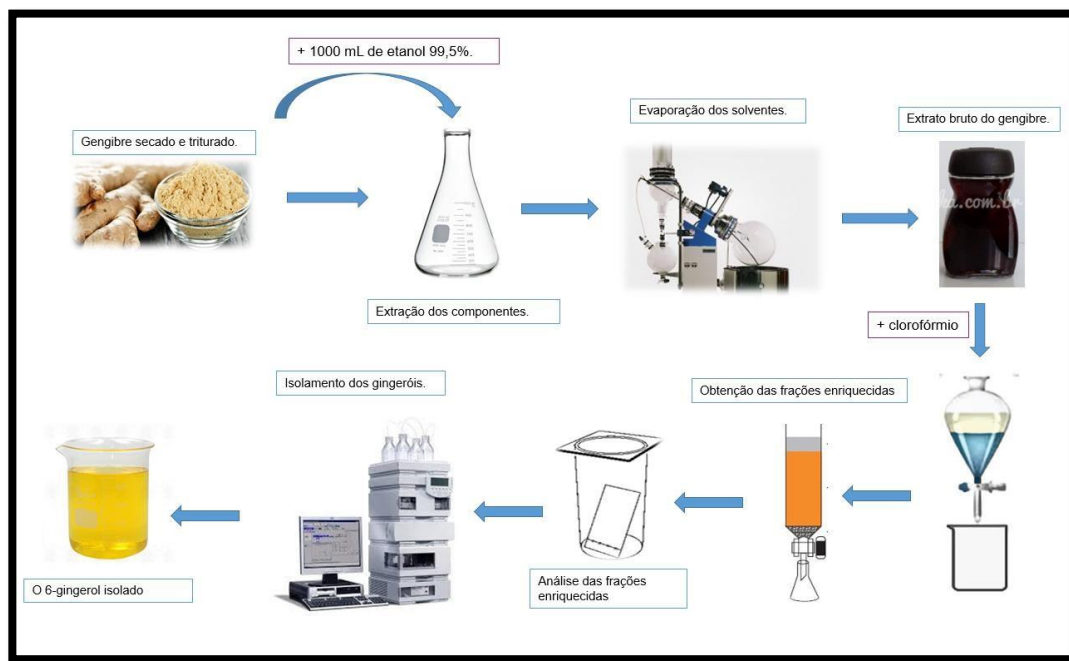


Figura 7: Etapas da obtenção da fração enriquecida por gingeróis e do isolamento dos gingeróis. Fonte: próprio autor.

4.5 Biotransformação de substratos orgânicos

4.5.1 Biotransformação em meios de cultura diferentes

Foram adicionados em *ependorfs* de 5,0 mL, 1,4 mL de cada meio de cultura (MEP, SBD e BD). Após autoclavados, adicionou discos de aproximadamente 6 mm dos fungos aos *ependorfs* contendo cada meio de cultivo. Os fungos permaneceram por 7 dias em agitação (120 rpm) à 32°C para o crescimento. Após esse período, colocou-se na cultura fúngica 25 µL da fração enriquecida com gingeróis, dissolvido no co-solvente dimetilsulfóxido (DMSO) ficando com concentração 4% (4 mg/100 microlitros), permanecendo em agitação por mais 7 dias (figura 8, p. 32). Entretanto apenas para a cepa UFCM 0536 repetiu-se o mesmo experimento utilizando o 6-gingerol isolado, visto que as cepas fungicas do UFCM 0550 tinham morrido, não possibilitando a continuidade do experimento.

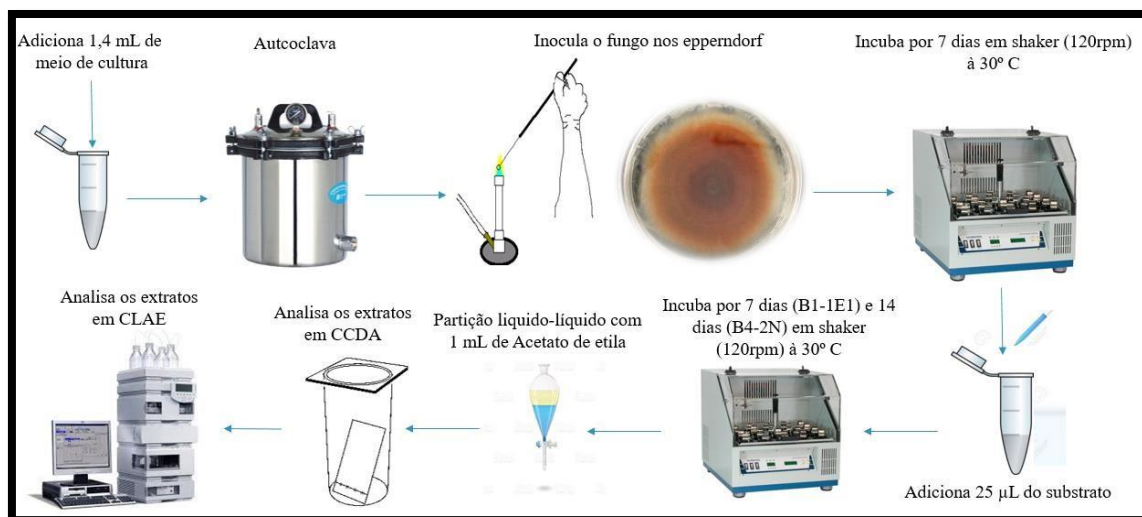


Figura 8: Ilustração das etapas do procedimento de biotransformação. Fonte: GONÇALVES, 2017.

Todos os ensaios foram realizados em triplicata e para cada procedimento foram feitos experimentos controles: controle do meio líquido (Controle 1); controle do meio de cultura com crescimento fúngico (Controle 2) e um controle do meio de cultura apenas com o substrato (Controle 3). Após os setes dias de agitação finalizou os experimentos através de uma partição líquido-líquido utilizando 1 mL de acetato de etila (figura 9, p. 32).



Figura 9: Representação do experimento de biotransformação para cada meio de cultivo e fungo. Eppendorfs para os controles (meio, meio + substrato e meio + fungo) e triplicatas da biotransformação BIO 1, BIO 2 e BIO 3 (meio + fungo + substrato).

Experimentos em dias diferentes foram realizados repetindo-se todo o procedimento anterior com o fungo *Scytalidium lignicola* utilizando a fração enriquecida de gingeróis como substrato. Assim, após o 7º, 8º, 9º, 10º e 14º dias de agitação os experimentos foram finalizados e os extratos analisados em CCD, através de uma partição líquido-líquido utilizando 1 mL de acetato de etila (figura 10, p.33). Todo método foi realizado em triplicata e com os controles.

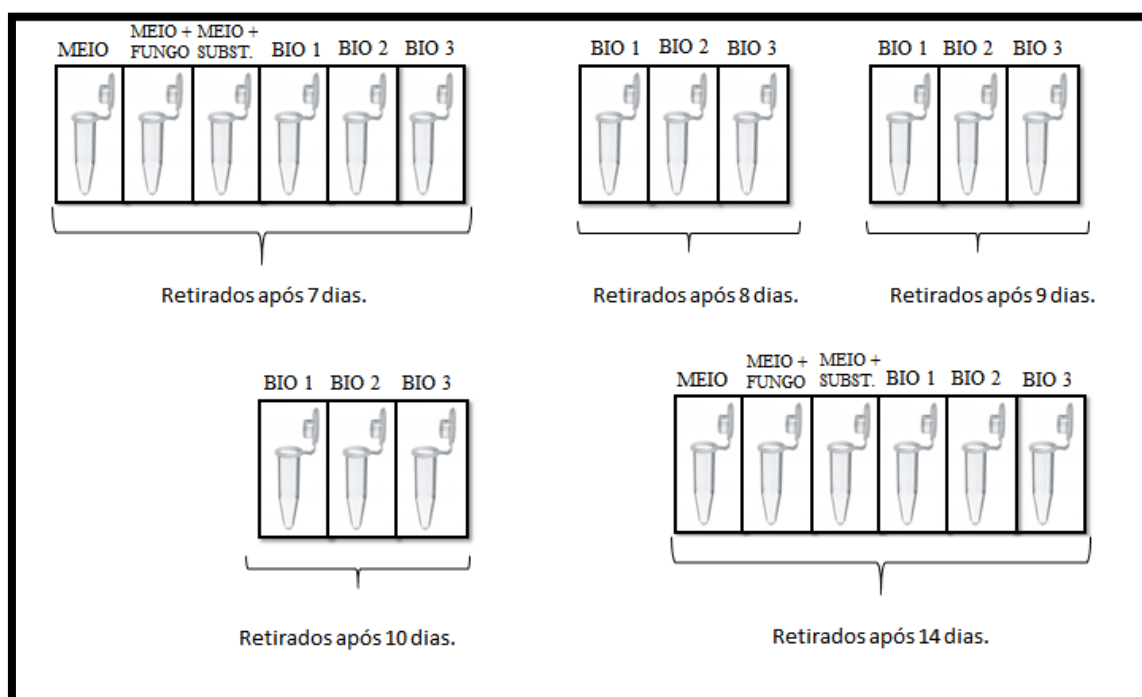


Figura 10: Ilustração do experimento de biotransformação em dias diferentes para cada meio de cultivo e fungo. *Eppendorfs* para o controle (meio, meio + substrato e meio + fungo) e triplicatas da biotransformação BIO 1, BIO 2 e BIO 3 (meio + fungo + substrato).

4.6 Métodos Cromatográficos

4.6.1 Cromatografia em camada delgada analítica (CCDA)

Os substratos orgânicos obtidos por cromatografia líquida em coluna (Item 4.4) e os extratos obtidos dos experimentos da biotransformação foram analisados por CCDA, feitas sobre cromatofolhas de alumínio cobertas com gel de sílica 60 F254 – Merck (espessura de 0,2 mm).

A revelação das substâncias nas placas analíticas foi realizada através da exposição a uma lâmpada ultravioleta UVSL – 25 da Mineral Light, em dois comprimentos de onda (254 e 365 nm) e imersas com solução de vanilina em ácido perclórico/etanol ($\text{HClO}_4/\text{EtOH}$).

4.6.2 Cromatografia líquida em coluna

A fração orgânica obtida do gengibre, foi fracionada em cromatografia líquida de coluna de vidro (20 x 8 cm), preenchida totalmente com sílica gel 60 (70-230 mesh). Em seguida, injetou-se a 5,9913 do extrato, dissolvido em acetato de etila e hexano 1:1, na parte superior da coluna, e posteriormente, adicionou a fase móvel (acetato de etila + hexano na proporção 1:1) para arrastar a amostra até o final da coluna e fraciona-las.

4.6.3 Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

- **Obtenção dos gingeróis isolados**

O isolamento dos gingeróis foi realizado em CLAE e foi realizado na Universidade Federal de Sergipe – São Cristóvão, em um aparelho de sistema Shimadzu UFLC equipado com um detector UV-Vis com arranjo de diodos modelo SPD-M20A. Usou-se uma coluna preparativa de fase reversa (ODS), com 25 cm de comprimento e 2,12 cm de diâmetro. O aparelho possui bombas LC-6AD, desgaseificador DGU-20A3R, auto injetor SIL-20A, detector UV-Vis SPD-20A e controladora CBM-20A. O volume de injeção foi de 1 mL, com vazão de 10 mL/min. A eluição foi modo isocrático usando 78 mL de metanol + 22 mL de água.

- **Análise dos experimentos de biotransformação**

Os extratos dos experimentos de biotransformação da cepa UFCM 0536 foram enviados para a Universidade Federal do Ceará e analisados em sistema CLAE/EM composto por Cromatógrafo líquido Ultimate 3000, Thermo Scientific, acoplado ao espectrômetro de massas Q-Exactive, Thermo Scientific, com fonte H-ESI, operando em modo positivo, resolução 70.000, utilizando-se voltagem do spray 4 kV, gás de bainha 30, gás auxiliar 10, temperatura do capilar 320°C, temperatura de gás auxiliar 250°C, *tube lens* 55 e faixa de massas m/z 100-500.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Identificação morfológica e molecular das cepas fúngicas

Nas buscas no *GenBank*, NCBI, a sequência de ITS (tabela 1) do isolado UFCM 0536 mostrou 99% de identidade com *Scytalidium lignicola*. Por outro lado, a sequência de ITS do isolado UFCM 0550 mostrou 93% de identidade com *Scytalidium* sp.

Os isolados foram submetidos a análise filogenética para determinação da relação com espécies de cada gênero observado nas buscas no *GenBank*, NCBI (figura 11). A cepa UFCM 0536 formou um grupo com o representante de *Scytalidium lignicola* e possivelmente pertence a essa espécie. Entretanto, a cepa UFCM 0550 agrupou próximo a *Scytalidium cuboideum*, mas não se pode afirmar que se trata dessa espécie devido ao baixo percentual de identidade nas buscas no *GenBank* formando um grupo exclusivo que possivelmente deve se tratar de uma espécie nova.

Tabela 1: Isolados utilizados na filogenia.

Espécie	Isolado	ITS	Referência
<i>Arthrographis chlamydospora</i>	UTHSC 06-1053*	HG004554	Giraldo et al. 2014
<i>Arthrospis hispanica</i>	CBS 351.92*	HE965758	Giraldo et al. 2013
<i>Scytalidium cuboideum</i>	CBS 241.62*	GQ272628	Giraldo et al. 2013
<i>Neoscytalidium dimidiatum</i>	CBS 145.78*	KF531816	Huang et al. 2016
<i>Cophinforma atrovirens</i>	MFLUCC 11- 0425*	JX646800	Huang et al. 2016
<i>Neoscytalidium novaehollandiae</i>	CBS122071	KF766207	Huang et al. 2016
<i>Scytalidium sphaerosporum</i>	ATCC34392	GQ272624	Goh et al. 2015
<i>Scytalidium ganodermophthorum</i>	TPML97003	GQ272622	Goh et al. 2015
<i>Scytalidium lignicola</i>	KACC41228	GQ272634	Goh et al. 2015
<i>Scytalidium cuboideum</i>	KACC41224	GQ272630	Goh et al. 2015
<i>Scytalidium cuboideum</i>	KACC41290	GQ272629	Goh et al. 2015
<i>Scytalidium cuboideum</i>	UAMH676	GQ272627	Goh et al. 2015
<i>Scytalidium sphaerosporum</i>	KACC41220	GQ272623	Goh et al. 2015

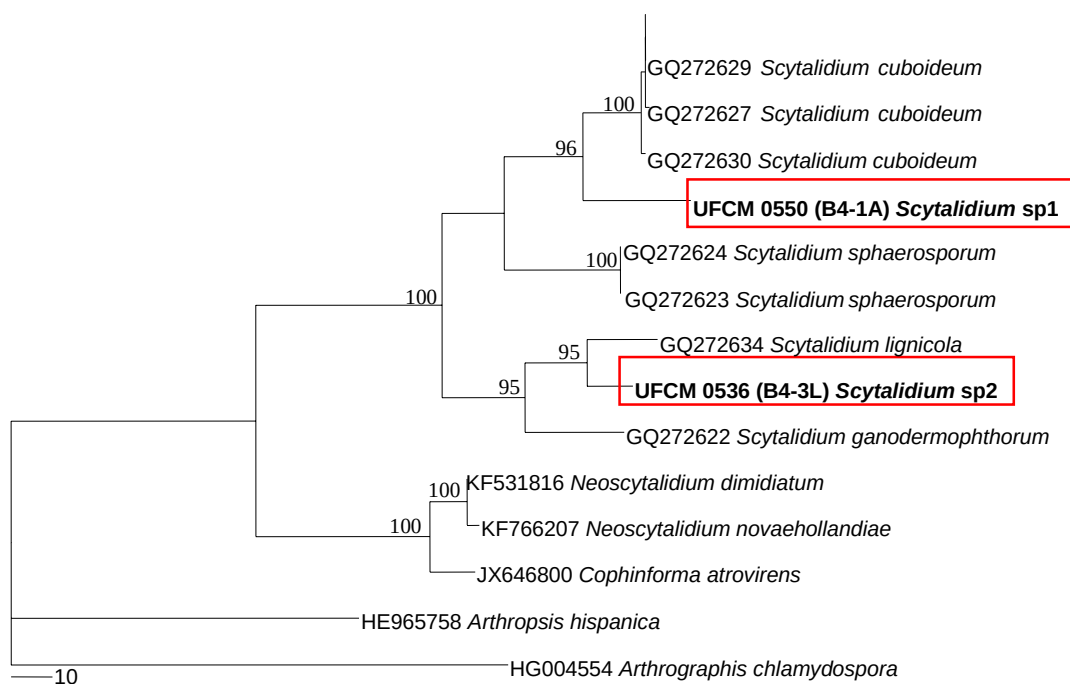


Figura 11: Árvore filogenética de Agrupamento de Vizinhos para a região ITS do rDNA. Valores de bootstrap ($\geq 50\%$) para 1000 repetições são mostrados nos nós. UFCM - Coleção Micológica da Universidade Federal do Ceará.

5.2 Obtenção dos substratos orgânicos

O método de extração utilizado para obter o extrato do gengibre foi o de maceração, desestabilizando e rompendo suas membranas celulares, liberando os compostos para o solvente. Ou seja, a droga vegetal é colocada, em um recipiente fechado em temperatura ambiente, em contato com o líquido extrator por um período prolongado, podendo está sob agitação ou não. No caso do experimento, a planta ficou sob temperatura ambiente, entretanto sem agitação. Tal extrato obtido foi fracionado em cromatografia e eluido com a fase móvel hexano/acetato de etila (1:1), obtendo 5,9913 gramas da fração rica em gingeróis e shogaois.

As análises em CCDA das frações obtidas a partir do fracionamento seguem abaixo (figura 12, p. 37). Na placa cromatográfica de número 4 foi identificada a fração enriquecida de gingeróis, pois o perfil cromatográfico está de acordo com o do procedimento já conhecido e utilizado por Silva (2012).

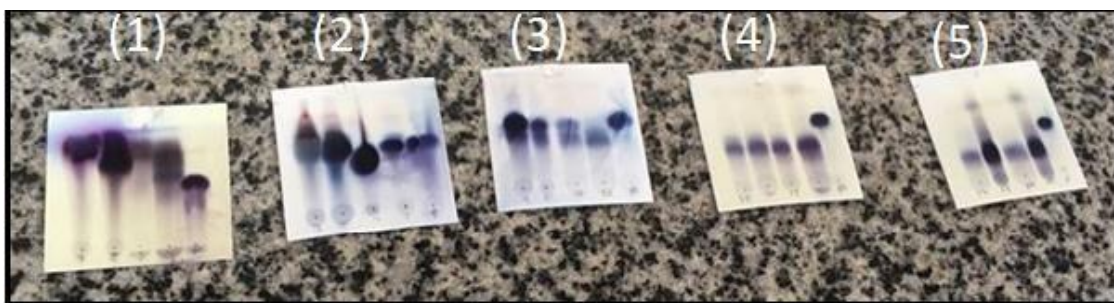


Figura 12: Placas cromatográficas das frações obtidas do extrato do tubérculo do gengibre após cromatografia líquida em coluna analítica, com destaque a figura 4, a qual corresponde a fração enriquecida de gingeróis. As placas 1, 2, 3 e 5 correspondem aos demais compostos do gengibre.

Posteriormente, a fração enriquecida foi cromatografada em CLAE, onde foi obtido o cromatograma da Figura 13. Quatro picos foram vistos corroborando com a metodologia seguida (SILVA, 2012). O primeiro pico corresponde ao 6- gingerol, o segundo ao 8-gingerol e o terceiro ao 10-gingerol. O pico entre o 8-gingerol e o 10-gingerol não se conhece, sendo assim uma alternativa de estudos para isolamento e identificação. Os gingeróis foram isolados obtendo-se as seguintes massas: 6-gingerol 0,7515 gramas (0,063%), 8-gingerol 0,5466 gramas (0,046%) e 10-gingerol 0,5405 gramas (0,045%).

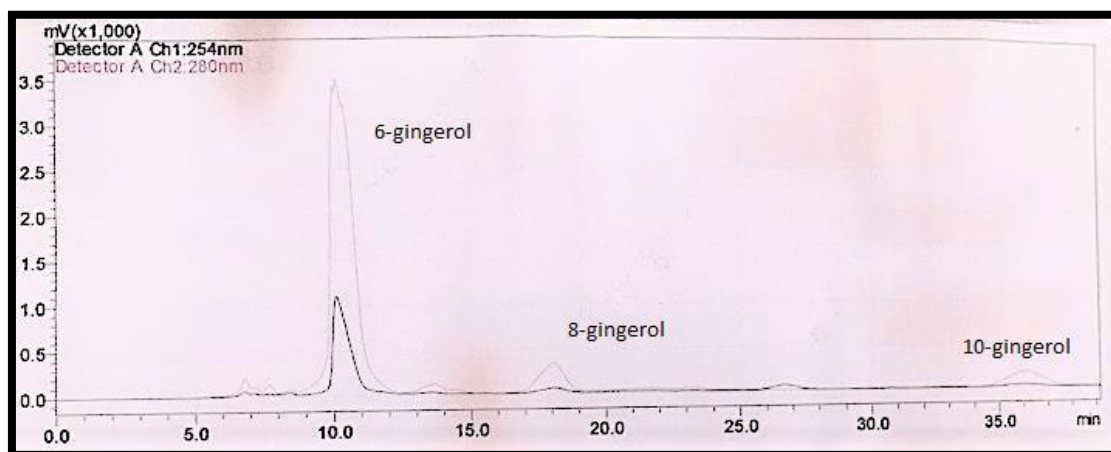


Figura 13: Cromatograma da análise em CLAE da fração enriquecida por gingeróis. Condições: Coluna preparativa de fase reversa (ODS) C 18 com 25 cm de comprimento e 2,12 cm de diâmetro, bombas LC-6AD, desgaseificador DGU-20A3R, auto injetor SIL-20A, detector UV-Vis SPD-20A, vazão com fluxo isocrático 10 mL/min, eluente MeOH/H₂O (78:22).

5.3 Experimentos de Biotransformação

Cultivou-se os fungos em meio BDA durante 7 dias (Figura 14, p. 38) para que ocorresse seu crescimento e a ativação de suas enzimas biológicas para iniciar o experimento. Para o fungo *Scytalidium lignicola* foi realizado o experimento utilizando

tanto a fração enriquecida do gengibre como o 6-gingerol, além de ter sido realizado o procedimento inicial por 7 dias e depois em dias diferentes, onde o experimento foi avaliado até o 14º dia. Já a cepa do fungo *Scytalidium* sp. foi feita apenas a primeira etapa do experimento, onde se utilizou a fração enriquecida de gingeróis por 7 dias, pois ao decorrer do experimento a cepa fúngica foi perdida, não crescendo mais em nenhum meio.

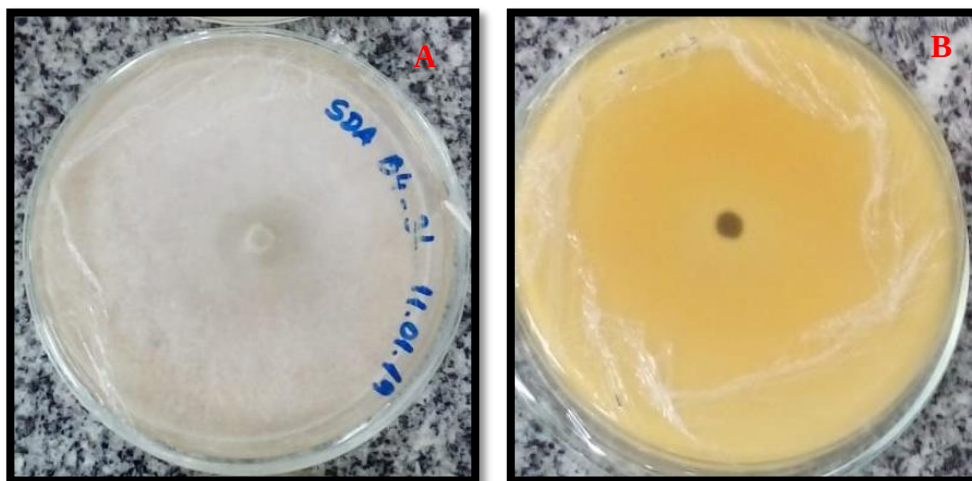


Figura 14: Cultivo dos fungos em BDA por 7 dias. **A:** *Scytalidium lignicola*; **B:** *Scytalidium* sp. Fonte: próprio autor.

5.3.1 Experimentos de Biotransformação a partir do fungo *Scytalidium* sp.

A biotransformação pelo fungo foi testada em três meios diferentes (MEP, SBD e BDA), utilizando a fração enriquecida de gingeróis, pois além do menor custo de se utilizá-la, há a possibilidade de se avaliar a biotransformação de todos os gingeróis contidos na fração.

Sabe-se que os meios BD e SBD são próprios para o cultivo de fungos (JAPANESE, 2007), embora existam diferenças em suas composições. O meio SBD é um meio de peptona suplementado com dextrose para suporte do crescimento de fungos, ou seja, rico em carboidratos e proteínas, enquanto o meio BDA é composto de batata desidratada e dextrose, sendo rico apenas em carboidrato. Já o MEP é composto por extrato desidratado de tecido bovino, que fornece nitrogênio, aminoácidos, vitaminas e carbono, sendo um meio mais “pobre” em carboidrato e rico em proteínas. Esse meio não é próprio para o cultivo de fungos, mas foi escolhido na intenção de se criar um ambiente hostil para as cepas, possibilitando os seus potenciais biocatalíticos. Mesmo com diferentes composições, a cepa cresceu nos três meios.

Tendo em vista, que a pretensão era analisar qualitativamente o perfil cromatográfico por meio da comparação do perfil de eluição das substâncias contidas nos extratos dos experimentos de biotransformação em relação aos experimentos controles,

os extratos obtidos foram analisados inicialmente por CCDA, pois além de ser uma técnica de baixo custo, é eficiente em análises qualitativas.

O eluente utilizado foi uma mistura Acetato de etila/Hexano (AcOEt/Hexano) na proporção 4:6, e essa determinação se deu a partir de experimentos iniciais com eluentes de polaridades diferentes, até chegarmos ao ponto onde pudéssemos observar, no centro da placa, substâncias apolares e polares geradas a partir de uma possível biotransformação.

Após os sete dias de experimento, apenas no meio de cultura MEP foi constatado uma mudança cromatográfica nos extratos obtidos em comparação aos extratos obtidos dos controles (figura 15, p. 39). Deduz-se que este evento ocorreu devido ao estresse que o fungo passou por ser cultivado em um meio pobre em carboidratos para o seu crescimento. Abaixo segue a fotografia do cromatograma dos extratos obtidos a partir da biotransformação do isolado fúngico *Scytalidium* sp. no meio de cultura MEP.

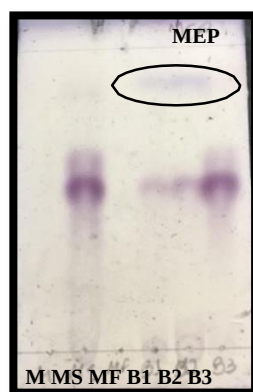


Figura 15: Placa cromatográfica do experimento de biotransformação do fungo *Scytalidium* sp. no meio MEP por 7 dias. Eluente: AcOEt/Hexano 4:6. M: controle do meio de cultura; MS: controle do meio de cultura mais o substrato; MF: controle do meio de cultura com o fungo; B1: triplicata do experimento de biotransformação 1, B2: triplicata do experimento de biotransformação 2; B3: triplicata do experimento de biotransformação 3. Revelação em solução de Vanilina.

É possível observar uma mancha na parte superior da placa nos *spots* das triplicatas dos experimentos do meio MEP (B1, B2 e B3) em relação aos dos extratos dos controles, sendo o resultado de uma provável biotransformação, resultando em uma substância mais apolar que os gingeróis. Entretanto o quantitativo de substrato spotado não foi semelhante nas triplacas, resultando então em quantitativo de substância obtida e assim, uma coloração diferente.

A partir da análise qualitativa em CCDA, foi possível selecionar o meio MEP como meio de cultivo mais profícuo para a cepa do *Scytalidium* sp. e consequentemente para futuramente se realizar um estudo de biotransformação mais minucioso,

modificando o quantitativo de dias de exposição ao substrato e também analisá-lo em métodos mais eficientes como o CLAE.

5.3.2 Biotransformação a partir do fungo *Scytalidium lignicola*.

As cepas do *Scytalidium lignicola*, nos experimentos de biotransformação, foram testados nos três meios de cultivo (BD, SBD e MEP) e analisados em CCDA. A partir da fração enriquecida de gingeróis, foi observado apenas nos extratos do meio de cultivo MEP uma mudança no perfil cromatográfico deles em relação aos seus controles. O crescimento fúngico também foi observado nos outros meios (BD e SBD), não sendo esse o motivo pelo qual a biotransformação não ocorreu. Dessa forma, confirmou a importância da mudança do meio de cultivo nos experimentos de biotransformação por microrganismos.

Abaixo segue a fotografia da análise em CCDA do perfil cromatográfico da biotransformação do meio de cultivo MEP (figura 16, p. 40). O eluente utilizado foi o mesmo para todas as análises em CCDA, AcOEt/Hexano na proporção 4:6, e essa determinação se deu a partir de experimentos iniciais com eluentes de polaridades diferentes, até chegarmos ao ponto onde as substâncias fossem melhores para serem observadas.

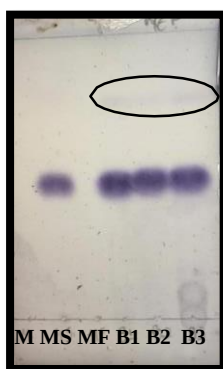


Figura 16: Placa cromatográfica do experimento de biotransformação do fungo *Scytalidium lignicola* no meio MEP por 7 dias. Eluente: AcOEt/Hexano 4:6. M: controle do meio de cultura; MS: controle do meio de cultura mais o substrato; MF: controle do meio de cultura com o fungo; B1: triplicata da biotransformação 1, B2: triplicata do experimento de biotransformação 2; B3: triplicata do experimento de biotransformação 3. Revelação em solução de Vanilina.

Notou-se, a partir do perfil cromatográfico que uma mancha na parte superior da placa surgiu em relação aos controles, sendo uma provável biotransformação em uma substância mais apolar que os gingeróis.

Com esse estudo, foi possível selecionar o meio MEP como meio de cultivo mais propício para a cepa do *Scytalidium lignicola* para a realização de um estudo de

biotransformação em diferentes dias e também analisá-lo em métodos cromatográficos e espectrométricos mais eficientes.

Como na literatura não existe ainda nenhum estudo de biotransformação com fungos do gênero *Scytalidium* não se pôde corroborar os resultados obtidos nesta pesquisa.

5.3.2.1 Análise dos experimentos de biotransformação em dias diferentes obtidos a partir do fungo *Scytalidium lignicola*.

Após ter observado uma mudança no perfil cromatográfico nos experimentos de biotransformação no meio de cultivo MEP para a cepa, foi realizado um estudo onde se variaram os dias de experimento com o intuito de estabelecer um dia onde houvesse o consumo total do substrato adicionado ao meio (comparando com controle da fração enriquecida de gingeróis) e/ou o aparecimento maior da mancha mais apolar, que foi verificada em sete dias de experimento.

Após os dias de experimentos (7°, 8°, 9°, 10° e 14° dias) foi observada a mesma mancha mais apolar nos cromatogramas dos diferentes dias de experimento, não verificando o desaparecimento total de nenhuma das manchas dos gingeróis, mas sim uma diminuição. Como dito anteriormente, a análise em CCDA foi apenas qualitativa e não se pôde confirmar um aumento na produção da substância mais apolar, podendo se constatar apenas que seu aparecimento continuou ao decorrer dos dias.

Abaixo seguem os cromatogramas dos experimentos de cada dia de biotransformação (figura 17, p.41). O eluente utilizado foi o mesmo das outras análises, AcOEt/Hexano 4:6.

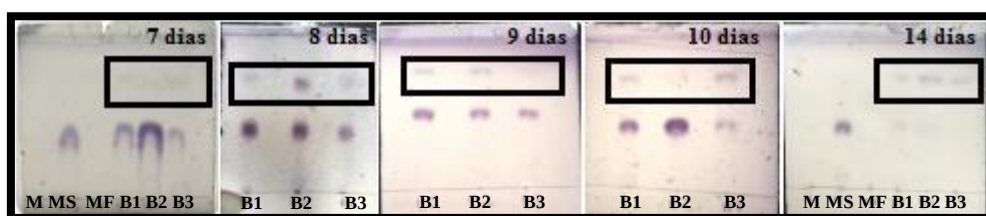


Figura 17: Placa cromatográfica do experimento de biotransformação em dias diferentes pelo fungo *Scytalidium lignicola* no meio MEP. Eluente: AcOEt/Hexano 4:6. M: controle do meio de cultura; MS: controle do meio de cultura mais o substrato; MF: controle do meio de cultura com o fungo; B1: triplicata do experimento de biotransformação 1; B2: triplicata do experimento de biotransformação 2; B3: triplicata do experimento de biotransformação 3. Revelação em solução de Vanilina.

No intuito de se garantir o resultado positivo na biotransformação dos gingeróis pela cepa do *Scytalidium lignicola*, duas amostras foram submetidas a análise por CLAE/EM. Como a análise foi paga e não foi verificado mudanças nos perfis cromatográficos dos dias diferentes, foi enviado apenas uma amostra do controle do meio mais a fração enriquecida e uma triplicata do experimento da biotransformação em sete dias.

5.3.2.2 Análise em CLAE/EM dos experimentos de biotransformação do fungo *Scytalidium lignicola*.

As amostras foram analisadas sob duas condições cromatográficas, a primeira comparou-se a amostra do controle (Controle) e a amostra do experimento de biotransformação em sete dias (Bio-MEP). Já a segunda condição foi apenas a amostra do experimento para melhor identificação da molécula biotransformada.

A análise em CLAE/EM desse experimento teve caráter apenas qualitativo, pois o intuito era confirmar a biotransformação de algum gingerol e, possivelmente, a partir da análise do espectro de massas, saber qual substância foi formada.

i) Primeira análise:

Após a análise dos cromatogramas (figura 18, p. 43) das duas amostras, foi observado um pico diferente, entre o 8-gingerol e o 10-gingerol, o qual não foi observado no controle, apresentando fórmula molecular $C_{17}H_{26}O_3$, relação massa/carga igual a 301, 17743 $[M + Na]^+$ e tempo de retenção (R_f) de 2,30 min. Foram observados picos em comum e identificados devido a comparação dos espectros de massas obtidos com os da literatura (Jolad et al, 2005), sendo eles o do 6-gingerol ($C_{17}H_{26}O_4$ - 294 g/mol) com relação m/z $[M+Na]^+ = 317,17239$ e $R_f = 0,89$; 8-gingerol ($C_{19}H_{30}O_4$ - 322 g/mol) com relação m/z $[M+Na]^+ = 345,20358$ e $R_f = 2,07$, 10-gingerol ($C_{21}H_{34}O_4$ - 350 g/mol) com relação m/z $[M+Na]^+ = 373,23492$ e $R_f = 3,85$ e o 6-shogaol ($C_{17}H_{24}O_3$ - 276 g/mol) com relação m/z $[M+Na]^+ = 299,27405$ e $R_f = 1,69$ (Tabela 2).

Tabela 2: Comparação entre a identificação das substâncias nos cromatogramas obtidos na análise por CLAE/EM da amostra do experimento de biotransformação e da amostra do controle. A comparação foi realizada, levando em consideração as relações massa/carga $[M+Na]^+$ e os tempos de retenção de cada substância.

Substâncias/[M+Na] ⁺	Tempo de retenção	BIO-MEP	CONTROLE
6-shogaol 299,27405 (C ₁₇ H ₂₄ O ₃)	1,69	✓	✓
10-gingerol 373,23492 (C ₂₁ H ₃₄ O ₄)	3,85	✓	✓
6-gingerol 317,17239 (C ₁₇ H ₂₆ O ₄)	0,89	✓	✓
8-gingerol 345 20358 (C ₁₉ H ₃₀ O ₄)	2,07	✓	✓
301,17743 (C ₁₇ H ₂₆ O ₃)	2,30	✓	-

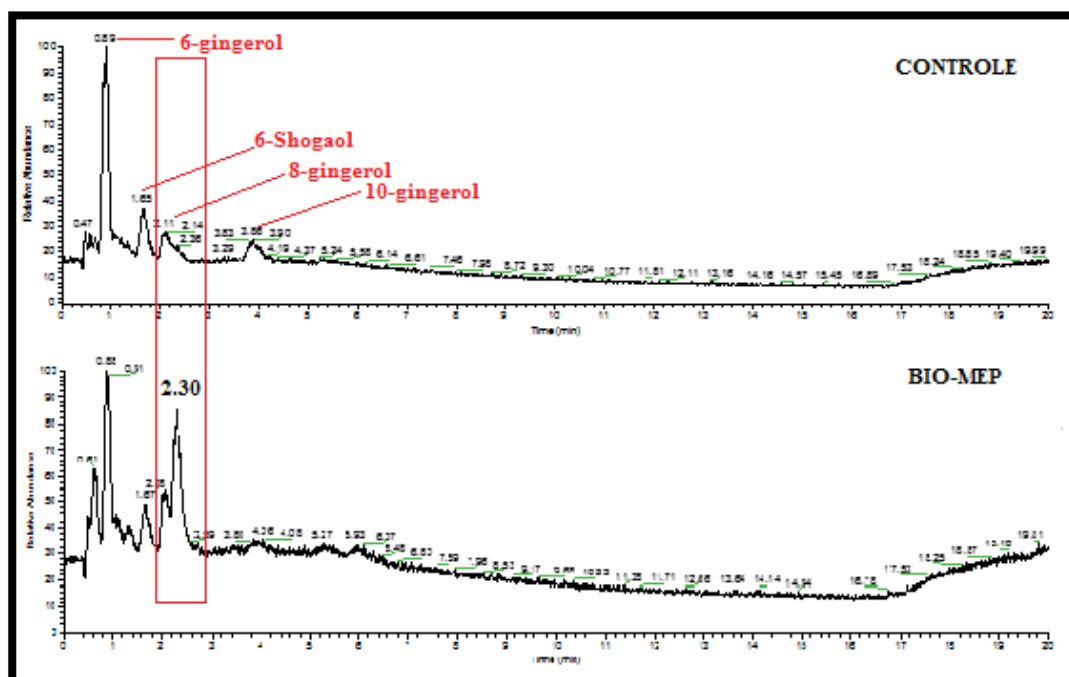


Figura 18: Comparação entre os cromatogramas em CLAE/EM obtidos das amostras do controle e do experimento de biotransformação do fungo *Scytalidium lignicola*. Condições: modo positivo, resolução 70.000, voltagem do spray 4 kV, gás de bainha 30, gás auxiliar 10, temperatura do capilar 320°C, temperatura de gás auxiliar 250 °C, tube lens 55 e faixa de massas m/z 100-500.

ii) Segunda análise

Na segunda condição, a fração BIO-MEP passou por uma nova separação para melhor resolução dos tempos de retenção das substâncias do extrato biotransformado (figura 19, p. 44). A partir da melhor resolução do perfil cromatográfico, confirmou-se o surgimento de uma nova substância a partir dos gingeróis da fração enriquecida, a qual se observa no cromatograma com o tempo de retenção de 3,44 min. Não se sabe ainda qual substância se trata, pois estudos mais aprofundados sobre o espectro de massas estão sendo realizado. Além disso, será feito outro experimento na tentativa de se obter mais quantidade de massa do produto para o seu isolamento e posterior identificação a partir de técnicas espectroscópicas.

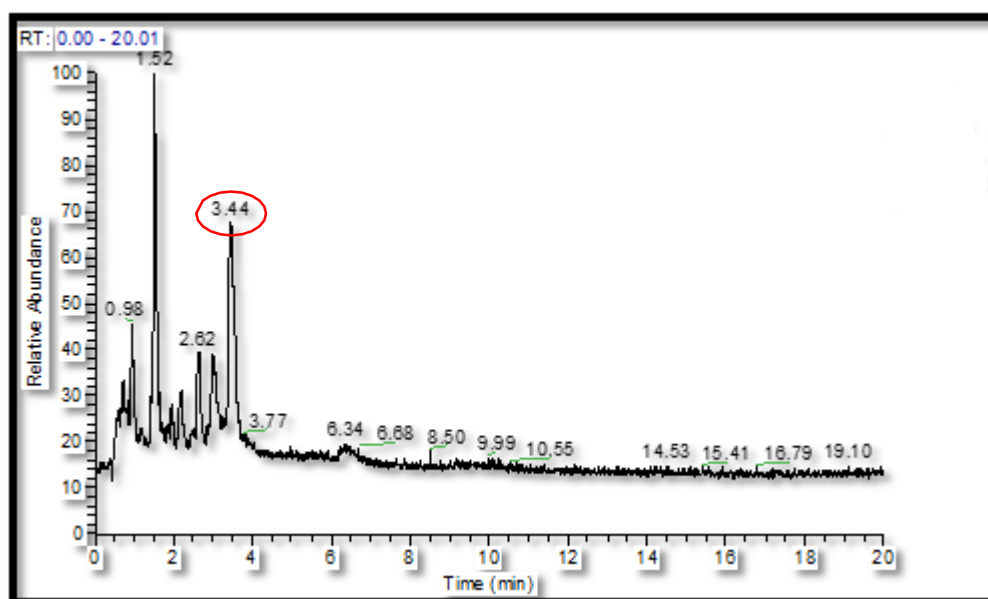


Figura 19: Cromatograma em CLAE/EM obtido da amostra do experimento de biotransformação do fungo *Scytalidium lignicola*. Condições: coluna: Luna C-18 (110X4,6 mm) 5 µm; eluente: A: água com 0,1% de ácido fórmico, B: MeOH com 0,1% de ácido fórmico; fluxo: 0,5 mL/min, gradiente A (30):B(70) para A(70):B(30) em 20 min; volume de injeção: 5 µL; temperatura da coluna: 20°C. e faixa de massas m/z 100-500.

5.3.2.3 Biotransformação do fungo *Scytalidium lignicola* utilizando o 6-gingerol como substrato.

Ao se confirmar o surgimento de uma nova substância advinda da biotransformação do fungo, procurou-se investigar qual gingerol o fungo utilizou e, conseqüentemente, modificou. O espectro de massas da nova substância está sendo analisado e em paralelo, foi realizado o experimento de biotransformação do 6-gingerol, levando em consideração que ele é o composto fenólico majoritário da fração enriquecida e já havíamos isolado em laboratório em quantidade suficiente para a realização do procedimento.

O experimento de biotransformação pelo fungo foi realizado em diferentes dias no meio de cultura MEP, com o intuito de observar se haveria o consumo desse composto e sucessivamente o surgimento da substância biotransformada, ratificando a ideia de que o 6-gingerol seria a substância convertida, entretanto não foi o que ocorreu.

A partir da análise em CCDA (figura 20, p.45) notou-se que não houve surgimento de novas manchas nas placas cromatográficas. O perfil cromatográfico do controle MS (meio de cultura mais substrato) foi semelhante ao perfil cromatográfico dos extratos dos experimentos de biotransformação (B1, B2 e B3), nos diferentes dias.

Desse modo, acredita-se que a substância biotransformada não foi advinda do 6-gingerol, dispondo da possibilidade da utilização dos outros compostos contidos na fração enriquecida do extrato, como o 8-gingerol, 10-gingerol ou 2-shogaol.

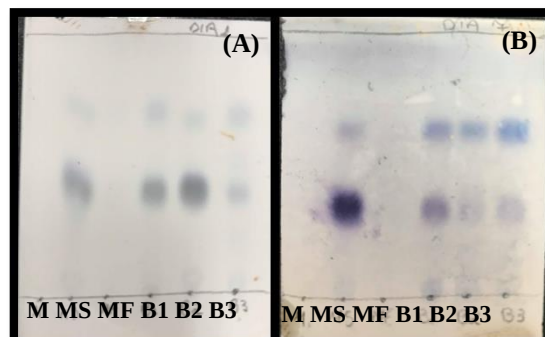


Figura 20: CCDA dos experimentos de biotransformação pelo fungo *Scytalidium lignicola* variando os dias de incubação e utilizando o substrato 6-gingerol isolado. Revelador: Vanilina. Eluente: Hex:AcOEt (6:4). A: CCDA da biotransformação após 7 dias do fungo em contato com o substrato. B: CCDA da biotransformação após 14 dias do fungo em contato com o substrato.

6. CONCLUSÃO

Neste trabalho, os fungos codificados como UFCM 0536 e UFCM 0550 foram identificados por biologia molecular como *Scytalidium lignicola* e *Scytalidium* sp. respectivamente. Ambos os fungos cresceram bem nos meios de cultura sólidos MEP, SBA e BDA.

A fração enriquecida e os isolados do gengibre, utilizada como substrato nos experimentos de biotransformação, foi colhida por meio de maceração. Obtida a partir do fracionamento por coluna cromatográfica, seguida de CCDA e CLAE.

Nestes experimentos, os dois microrganismos mostraram-se promissores na biotransformação frente a gingeróis no meio MEP, transformando-os em produtos mais apolares. Com o fungo *Scytalidium lignicola* os experimentos continuaram, onde realizou-se os estudos da biotransformação em diferentes dias de crescimento com a fração enriquecida de gingeróis e para ratificar, analisou os extratos em CLAE/EM onde foi possível observar o surgimento de um pico que corresponde a substância biotransformada. Utilizou-se também, o isolado 6-gingerol como substrato e constatou que houve a biotransformação.

Tendo em vista a química verde, é importante que as investigações futuras desse trabalho sejam voltadas para o isolamento e identificação dos produtos biotransformados, bem como uma melhor análise destes possíveis produtos com técnicas cromatográficas mais eficientes para se obter informações sobre quais as reações químicas ocorrem, o quanto do substrato foi consumido pelo fungo durante os experimentos, bem como a identificação dos novos compostos, devido a necessidade do surgimento de produtos inovadores que, preferencialmente, apresentem atividades biológicas benéficas.

Desde já garante-se que esse estudo de biotransformação da fração enriquecida do gengibre pelas duas linhagens de fungos utilizadas apresenta caráter inédito por tratarem-se de fungos em que não foram utilizados em biotransformação.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AZEVEDO, J. L. **Botânica: uma ciência básica ou aplicada?** Rev. brasil. Bot., São Paulo, V.22, n.2(suplemento), p.225-229, out. 1999.

BARREIRO, E. J.; FRAGA, C. A. M. **Química medicinal: As Bases Moleculares da Ação dos Fármacos.** ed. 1. Porto Alegre. Ed.: Artmed, p. 243, 2001.

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

BORGES, W. S. **Estudo de fungos endofíticos associados a planta da família Asteraceae como fontes de metabólitos secundários e em processos de biotransformação.** Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, f. 350, 2008.

BRACY, S.F.; CLARDY, J. **A new pentaketide antifungal agente isolated from na endophytic fungus.** Journal of Natural Products, 63. P. 1447-1448, 2000.

BÜTTNER, E.; GEBAUER, A. M.; HOFRICHTER M.; LIERS, C.; KELLNER H. **Draft Genome Sequence of *Scytalidium lignicola* DSM 105466, a Ubiquitous Saprotrophic Fungus.** Oct 11, 2018.

CANUTO, M. K.; RODRIGUES, T. H. S.; OLIVEIRA, F. S. A.; GOLÇALVES, F. J. T. **Fungos endofíticos: Perspectiva de descoberta e aplicação de compostos bioativos na agricultura.** Embrapa Agroindústria Tropical: Fortaleza, 2012.

CASTRO, H. F.; MENDES, A. A.; SANTOS, J. C.; AGUIAR, C. L. **Modificação de Óleos e Gorduras por Biotransformação.** Quim. Nova, Vol. 27, No. 1, p. 146-156, 2004.

CHAPLA, V. M.; BIASETTO, C. R.; ARAUJO, A. R. **Fungos Endofíticos: Uma Fonte Inexplorada e Sustentável de Novos e Bioativos Produtos Naturais.** Rev. Virtual Quim. Vol. 5 (3), p. 421-437, 2013.

CORTEZ, D. V.; CASTRO, H. F.; ANDRADE, G. S. S. **Potential catalytic of mycelium-bound lipase of filamentous fungi in biotransformation processes.** Quím. Nova, Vol. 40, No.1, 2017.

FABER, K. **Biotransformation in Organic Chemistry.** ed. 6, Springer-Verlag: Heidelberg, 2011.

FERREIRA, P. A.; VARGAS, P.; COSTA, M. P.; MACHADO, I. L.; COSTA, F. C.; BORGES, J. D. S. **Revista Processos Químicos / SENAI.** Departamento Regional de Goiás. Goiânia: SENAI/DR. Gerência de Educação Profissional / Faculdade de Tecnologia SENAI Roberto Mange, Vol.3, n.5, 2009.

FILHO, A. Z.; MURTA A. L. **Extração do óleo e resinas de gengibre encontrado no litoral paranaense (*zingiber officinale roscoe*).** B.CEPPA, Curitiba, Vol. 17, n. 2, p. 211-228, 1999.

GONÇALVES, V. S. S. **Análise do potencial de biotransformação dos fungos endofíticos de *Humirianthera ampla*.** Relatório Técnico científico. Lagarto: Universidade Federal de Sergipe, p. 25, 2017.

GRAEBNER, I. B.; MOREL, A F.; BURROW, R. A.; MOSTARDEIRO, M. A.; ETHUR, E. M.; DESSOY, E. C. M.; SCHER, A. **Diterpenos isolados de *Humirianthera ampla*. Miers.** Revista Brasileira de Farmacognosia, Vol. 12, supl. 1, 2002.

GRÉGIO, A. M. T.; FORTES, E. S. M.; ROSA, E. A. R.; SIMEONI R. B.; ROSA, R. T. **Antimicrobial activity from *Zingiber officinale* on oral cavity pathogens.** Estud. Biol., Vol. 28, n. 62, p. 61-66, 2006.

HAI-FENG, Z.; GUO-QING, H.; JING, L.; HUI, R.; QI-HE, C.; QIANG, Z.; JIN-LING, W. E HONG-BO, Z.; **Production of gastrodim through biotransformation of p-2-**

hydroxybenzyl alcohol by cultured cells of *Armillaria luteo-virens* Sacc. Enzyme and Microbial Technology. Vol. 43, p. 25-30, 2008.

JAPANESE. **PHARMACOPOEIA.** Society of Japanese Pharmacopoeia. Amended Chapters 35.1, 35.2, 7. The Minister of Health, Labor, and Welfare. 2007.

JOLAD, S. D.; LANTZ, R. C.; CHEN, G. J.; BATES, R. B.; TIMMERMAN, B. N. **Commercially processed dry ginger (*Zingiber officinale*): Composition and effects on LPS-stimulated PGE2 production.** Phytochemistry. Vol. 66, p 1614–1635, 2005.

JÚNIOR, M. R. M.; PASTORE G. M. **Biotransformação de limoneno: uma revisão das principais rotas metabólicas.** Revista: Quím. Nova vol.30 n.2, 2007.

KAUL, S.; GUPTA, S.; AHMED, M.; DHAR, M. K. **Endophytic fungi from medicinal plants: a treasure hunt for bioactive metabolites.** Phytochemistry Reviews, Vol. 11, n. 4, p. 487–505, 2012.

KIR K. P. M.; CANHÃO P. F.; MINTER D. W. **Stalpers já. Dicionário dos Fungos** (10^a ed.). Wallingford: CABI. p. 627, 2008.

KJER, J.; DEBBAB, A.; ALY, A. H.; PROKSCH, P. **Methods for isolation of marine-derived endophytic fungi and their bioactive secondary products.** Nature Protocols, Vol. 5, n 3, 2010.

LACAZ, C.S.; PORTO, E.; MARTINS, J.C.E. **Tratado de Micologia Médica.** Ed 9. São Paulo: Sarvier. 2002.

LENARDÃO, E. J.; FREITAG, R. A.; DABDOUB, M. J.; BATISTA, A. C. F.; SILVEIRA, C. C.; **“Green chemistry” - Os 12 princípios da química verde e sua inserção nas atividades de ensino e pesquisa.** Quim. Nova, Vol. 26, N. 1, p. 123-129, 2003.

LIMA, S.F. **Bioprospecção da atividade antimicrobiana de extratos brutos de fungos endofíticos isolados da espécie *Oryctanthus alveolatus* (Kunth) Kuijt**. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia para Recursos Amazônicos) - Universidade Federal do Amazonas, Itacoatiara, p. 60, 2015.

LIMA, V. L. E. **Os fármacos e a quiralidade: uma breve abordagem**. Quím. Nova [online], Vol.20, n.6, p.657-663, 1997.

MARQUES, R. A. **Estudo Fitoquímico e Biológico de *Humirianthera ampla* Miers (Icacinaceae)**. Dissertação (Mestrado em Química) - Centro de Ciências, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, p. 132, 2007.

MARQUES, R. A. **Estudo Químico e Avaliação Quimiopreventiva de *Humirianthera ampla* Miers, *Simarouba versicolor* e cinco espécies do gênero *Lippia***. Tese (Doutorado em Química) - Centro de Ciências, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2011.

MORAIS, J. F.; YOSHIMOTO, M.; RHONDEN, S. A.; PAMPHILE, J. A.;
Bioprospecção de Microrganismos Produtores de Compostos Bioativos com Atividade Antitumoral. UNINGÁ Review. Vol. 17, n.1, p.27-34, 2014.

NEGRELLE, R. R. B.; ELPO, E. R. S.; RÜCKER, N. G. A. **Análise prospectiva do agronegócio gengibre no estado do Paraná**. Horticultura Brasileira, Brasília, Vol.23, n.4, p.1022-1028, 2005.

ORLANDO, R. M.; NORMANDIS, C. F.; GIL, E. S.; STRINGHETTA, J. P. S.
Princípios da físico-química. Revista Eletrônica de Farmácia Vol. 4, p. 08-14, 2007.

PAIVA, J. R. P. **Estudo Do Potencial Biocatalítico Do Fungo *Rhizopus Stolonifer* Na Biotransformação De Produtos Naturais**. 2014. Dissertação de Mestrado (Química Orgânica) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2014.

PATEL, R.N.; **Synthesis of chiral pharmaceutical intermediates by biocatalysis**. Coordination Chemistry Reviews, 252, p. 659-701, 2008;

PERKINS, C.; SIDDIQUI, S.; PURI, M.; DEMAINE, A. L.; **Biotechnological applications of microbial bioconversions**. *Crit Rev. Biotechnol*, Vol. 36, 2015.

RAVEN, P. H. **Biologia vegetal**. São Paulo: Guanabara, p. 297, 2001.

RODRIGUES, M. L.; LIRA, R. K. **Perfil fitoquímico e biológico do extrato hidroalcoólico dos rizomas do gengibre (*Zingiber officinale roscoe*)**. *SaBios: Rev. Saúde e Biol.*, Vol.8, n.1, p.44-52, 2013.

SILVA, I. P. **Fungos Endofíticos: Fonte alternativa a metabólitos secundários de plantas**. ENCICLOPÉDIA BIOSFERA, Centro Científico Conhecer - Goiânia, Vol.10, n.18; p. 2014.

SILVA, J.A.; BECCENERI, A. B.; MUTTI, H. S.; MARTINC, A. C. B. M.; SILVAA, M. F. G. F.; FERNANDES, J. B.; VIEIRAA, P. C.; COMINETTI, M. R. **Purification and differential biological effects of ginger-derived substances on normal and tumor cell lines**. *J. Chromatogr. B*, Vol. 903, p. 157–162, 2012.

SILVA, R. R.; COELHO, G. D. **Fungos Principais grupos e aplicações biotecnológicas**. Monografia (Especialização) - Curso de Curso de Capacitação de Monitores e Educadores Programa de Pós Graduação em Biodiversidade Vegetal e Meio Ambiente, Instituto de Botânica, São Paulo, f. 20. 2006.

STRAUCH, M. A. et al. **Antiophidic activity of the extract of the Amazon plant *Humirianthera ampla* and constituents**. *Journal of Ethnopharmacology*. Vol. 145, ed. 1, p. 50-58, 2012.

STROBEL, G.; DAISY, B. **Bioprospecting for Microbial Endophytes and Their Natural Products**. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, Washington, Vol. 67, n. 4, p. 491–502, 2003.

SY-CORDERO, A. A.; FIGUEROA M.; RAJA, H. A.; AVIÑA, M. E. M.; CROATT, M. P.; ADCOCK A. F.; KROLL D. J.; WANI, M. C.; PEARCE, C. J.; OBERLIES, N. H. **Spiroscytalin, a new tetramic acid and other metabolites of mixed biogenesis from *Scytalidium cuboideum*** Nov 25, 2015.

SYNYTSYA, A. et al. **Antimicrobial activity of crude extracts prepared from fungal mycelia.** Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine. Vol. 7, ed. 3, p. 257–261, 2016.

TAN, R. X.; ZOU, W. X. **Endophytes: a Rich Source of Functional Metabolites.** *Nat. Prod. Rep.* Vol. 18, p. 448–459, 2001.

TONANI, L.; MOROSINI, N. S.; MENEZES, H. D.; NADALETTO B. S.; MARIA E.; WAINWRIGHT, M.; LEITE B.; GILBERTO U.; VON Z. K.; MARCIA R. **In vitro susceptibilities of *Neoscytalidium* spp. sequence types to antifungal agents and antimicrobial photodynamic treatment with phenothiazinium photosensitizers.** Fungal biology, v. 122, n. 6, SI, p. 436-448, JUN 2018.

VULFSON, E. N. **Em *Lipases* - their structure, biochemistry and application;** Woolley, P.; Petersen, S. B., eds.; Cambridge University Press: Cambridge, cap. 13, 1994.

ZHANG, H. W.; SONG, Y. C.; TAN, R. X. **Biology and chemistry of endophytes.** Natural Product Report, New York, Vol. 23, n. 5, p. 753-771, 2006.

ZHAO, J.; ZHOU, L.; WANG, J.; SHAN, T.; ZHONG, L.; LIU, X.; GAO, X. **Endophytic fungi for producing bioactive compounds originally from their host plants.** In: MENDEZ-VILAS, A. (Ed.). Current research, technology and education topics in applied microbiology and microbial biotechnology. Badajoz: Formatex Research Center. Vol. 1. (Microbiological bo series, 2), p. 567-576, 2010.

ZIKMUNDOVA, M.; DRANDAROV, K.; BIGLER, L.; HESSE, M.; WERNER, C. **Biotransformation of 2-benzoxazolinone and 2-hidroxi-1,4-benzoxazin-3-one by fungi isolated from *Aphelandra tetragona*.** Applied and Envirommental Microbiology, 68, p. 4863-4870, 2002.