



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA  
INSTITUTO DE QUÍMICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

JOÃO CARLOS SILVA CONCEIÇÃO

**ESTUDOS *IN VITRO* E *IN SILICO* DAS BIOTRANSFORMAÇÕES DE  
SUBSTÂNCIAS FENÓLICAS EMPREGANDO *TRAMETES*  
*VERSICOLOR* E *ASPERGILLUS BRASILIENSIS***

Salvador  
2019

JOÃO CARLOS SILVA CONCEIÇÃO

**ESTUDOS *IN VITRO* E *IN SILICO* DAS BIOTRANSFORMAÇÕES DE  
SUBSTÂNCIAS FENÓLICAS EMPREGANDO *TRAMETES*  
*VERSICOLOR* E *ASPERGILLUS BRASILIENSIS***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal da Bahia, como requisito para obtenção do Título de Mestre em Química.

Área de Concentração: Química de Produtos Naturais

Orientadora: Profa. Dra. Eliane de Oliveira Silva

Salvador  
2019

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema Universitário de Bibliotecas (SIBI/UFBA),  
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Silva Conceição, João Carlos  
ESTUDOS IN VITRO E IN SILICO DAS BIOTRANSFORMAÇÕES  
DE SUBSTÂNCIAS FENÓLICAS EMPREGANDO TRAMETES  
VERSCOLOR E ASPERGILLUS BRASILIENSIS / João Carlos  
Silva Conceição. -- Salvador, 2019.  
149 f. : il

Orientadora: Eliane de Oliveira Silva.  
Dissertação (Mestrado - Química) -- Universidade  
Federal da Bahia, Mestrado-Programa de Pós-Graduação em  
Química, 2019.

1. Biotransformação. 2. Fungos filamentosos. 3.  
Substâncias fenólicas. 4. Acoplamento molecular. I. de  
Oliveira Silva, Eliane. II. Título.

JOÃO CARLOS SILVA CONCEIÇÃO

"ESTUDOS *IN VITRO* E *IN SILICO* DAS BIOTRANSFORMAÇÕES DE  
SUBSTÂNCIAS FENÓLICAS"

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Química,  
Universidade Federal da Bahia, pela seguinte banca examinadora:

Prof. Dr. Eliane de Oliveira Silva Eliane de Oliveira Silva  
Doutorado em Ciências, Universidade de São Paulo (USP)  
Universidade Federal da Bahia

Prof. Dr. Jorge Maurício David Jorge Maurício David  
Doutorado em Química, Universidade de São Paulo (USP)  
Universidade Federal da Bahia

Prof. Dr. Samuel Silva da Rocha Pita Samuel Silva da Rocha Pita  
Doutorado em Ciências Biológicas, Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ)  
Universidade Federal da Bahia

Salvador, 03 de maio de 2019.

Este trabalho é dedicado ao homem que ao cumprir sua missão na terra, nada me deixou faltar. As maiores lições que recebi como herança consistem em acreditar na minha capacidade de avançar e nunca desistir de alcançar meus objetivos.

In Memoriam

*Laurenço Manoel da Conceição*

## AGRADECIMENTOS

A Deus por está no controle de tudo, permitindo alcançar mais esse sucesso.

À Prof. Dra. Eliane de Oliveira Silva, pelo incentivo, orientação e oportunidade de desenvolver este trabalho;

Aos profs. Dr. Jorge Mauricio David e Dr. Samuel Silva da Rocha Pita, por terem aceitado fazer parte da banca deste trabalho;

Aos Profs. Dr. Wilson Araújo Lopes, Dr. Jorge Maurício David e Dr. Silvio do Desterro Cunha, pelo constante apoio para a concretização dos experimentos;

Ao Prof. Dr. André Alexandre Vieira e à Central de Análises do Departamento de Química da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), pela obtenção dos espectros de Ressonância Magnética Nuclear;

Aos profs. Dra. Valéria Belli Riatto e Dr. Mauricio Moraes Victor, por ter permitido desenvolver atividades no laboratório do CIENAN;

Ao prof. Dr. Antônio Eduardo Miller Crotti e a equipe do Grupo de Pesquisa em Síntese Química, do Departamento de Química da Faculdade de Filosofia, ciências e Letras da Universidade de São Paulo (FFCLRP-USP), por ter cedido gentilmente os substratos fenólicos;

Ao prof. Dr. Samuel Silva da Rocha Pita e a equipe do Laboratório de Bioinformática e Modelagem Molecular (LaBiMM) da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal da Bahia ( UFBA), pela realização dos ensaios de acoplamento molecular;

A equipe do Laboratório Integrado de Pesquisa Aplicada em Química (LIPAQ) do Centro Universitário SENAI CIMATEC, pela obtenção dos cromatogramas e espectros de massas;

Agradeço a minha mãe, irmãos, pelo incentivo como suporte fundamental para esse sucesso;

Aos meus amigos que conheci na graduação, e que sempre me apoiaram e me estimularam acreditar que seria possível alcançar este objetivo;

Aos meus colegas de laboratório Jainara, Henrique, Bruno, Monielly, Daniel, Rodrigo, Leticia e Amanda, pela convivência e apoio diário;

Aos colegas do Instituto de Química que conheci durante minha trajetória inicial da Pós-graduação Fabrícia, Leonardo, Elias, Eunice, pelo companheirismo;

A colega Iva Souza por ter contribuído em parte do meu trabalho, na obtenção dos espectros de Infravermelho;

À coordenação do Programa de Pós-graduação em Química da Universidade Federal da Bahia;

Ao Instituto de Química da Universidade Federal da Bahia, local de desenvolvimento deste trabalho;

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia (FAPESB), pela concessão de bolsas, que foram essenciais para continuidade do trabalho.

O Senhor é quem me guarda,  
É minha sombra a direita,  
Ele guarda a minha entrada,  
E a minha saída,  
Desde agora e para sempre.

Rose Marinho e Paulo Chagas

## RESUMO

Os processos de biotransformação ocupam papel importante na derivatização química, uma vez que as enzimas e seus cofatores são gerados *in situ*, atuando como catalisadores eficientes que modificam as estruturas químicas de diferentes substratos. Em geral, as reações de biotransformação apresentam elevada seletividade, além de obedecerem aos preceitos da Química Verde. Os compostos fenólicos apresentam inúmeras atividades biológicas e são úteis para diversos setores industriais para produção de derivados com alto valor agregado. Baseando-se nisso, no presente estudo, foram analisadas as biotransformações de três substâncias fenólicas, empregando duas linhagens de fungos filamentosos: *Trametes versicolor* ATCC 200801 e *Aspergillus brasiliensis* ATCC 16404. O fungo *T. versicolor* é fonte tradicional para obtenção da enzima lacase (uma oxidorreductase) em elevados rendimentos. Estudo utilizando *Aspergillus brasiliensis* foi realizado para verificar o comportamento das substâncias fenólicas frente a enzimas fúngicas distintas. Os perfis químicos das biotransformações foram avaliados utilizando Cromatografia em Camada Delgada (CCD), Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a detector de Arranjos de Diodos (CLAE-DAD) e Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas (CG-EM), o que permitiu a seleção dos processos mais promissores para a biotransformação dos substratos avaliados. Os derivados obtidos foram isolados por coluna cromatográfica utilizando sílica gel como fase estacionária e como fase móvel gradiente formado por acetato de etila, hexano e metanol. Técnicas espectroscópicas e espectrométricas foram empregadas na determinação das estruturas químicas dos derivados. Foi possível observar que o fungo *T. versicolor* biotransformou somente o *p*-cumarato de metila, resultando na formação de três derivados: ácido cumárico, com rendimento 12,18 %; cafeato de metila, com rendimento 3,56 %; e (*E*)-3-(4-metóxi-fenil) acrilato de metila (identificado em mistura). Já as biotransformações empregando *A. brasiliensis* resultaram na conversão do *p*-cumarato de metila em três derivados (detectados por CG-EM): acetofenona, 1-(4-hidróxi-fenil) propano-1,3-diol e 4-(3-hidróxi-propil) benzeno-1,3-diol; além da conversão do ferulato de metila em (*Z*)-3-(4-hidróxi-3-metoxi-fenil)-3-metoxiacrilato de metila, com rendimento de 10,31 %. Em seguida, as reações de biotransformação dos três substratos fenólicos por *T. versicolor* foram estudadas por ensaios *in silico*. Considerou-se que a enzima presente majoritariamente no meio reacional foi a lacase e utilizou-se a técnica de acoplamento molecular. Os programas AutoDock v.4.2 e Pymol possibilitaram uma previsão da orientação e da conformação preferencial que os substratos fenólicos assumiram no sítio ativo da lacase. Os resultados apontaram que os três substratos interagiram espontaneamente com o receptor biológico, porém com diferentes valores de energias livres ( $\Delta G$ ):  $\Delta G$  *p*-cumarato de metila = - 6,89 Kcal.mol<sup>-1</sup>,  $\Delta G$  ferulato de metila = -7,37 Kcal.mol<sup>-1</sup> e  $\Delta G$  cafeato de metila = - 7,55 Kcal.mol<sup>-1</sup>. O complexo ligante-proteína constituído por *p*-cumarato de metila-lacase mostrou ser o menos estável, sendo este sistema passível da ocorrência de biotransformação por *T. versicolor*. Assim, foi possível demonstrar que o *p*-cumarato de metila interagiu com o sítio da lacase, levando a formação de derivados que pudessem resultar em complexos mais estáveis, permitindo dessa forma, a ocorrência das reações de hidrólise, hidroxilação e metoxilação.

**Palavras chave:** Biotransformação. Fungos filamentosos. Substâncias fenólicas. Acoplamento molecular.

## ABSTRACT

Biotransformation processes have an important role in chemical derivatization since the enzymes and their cofactors are generated in situ, and them as efficient catalysts that modify different substrates. In general, biotransformation reactions present high selectivity and are according to the Green Chemistry principles. Phenolic compounds have numerous biological activities and are useful for several industries to producing derivatives with high added value. Within this context, in the present study, the biotransformations of three phenolic substances were analyzed using two strains of filamentous fungi: *Trametes versicolor* ATCC 200801 and *Aspergillus brasiliensis* ATCC 16404. The fungus *T. versicolor* is a traditional source for the enzyme laccase (an oxidoreductase). A study using *Aspergillus brasiliensis* was performed to verify the behavior of phenolic substances against different fungal enzymes. The chemical profiles of the biotransformations were evaluated by using Thin Layer Chromatography (TLC), High-Efficiency Liquid Chromatography coupled to Diode Array Detector (HPLC-DAD) and Gas Chromatography coupled to Mass Spectrometry (GC-MS), and the most promising processes for the biotransformation of the evaluated substrates were selected. The obtained derivatives were isolated by chromatographic column using silica gel as the stationary phase and ethyl acetate, hexane and methanol as the mobile phase. Spectroscopic and spectrometric techniques were used to determine the chemical structures of the derivatives. It was possible to observe that *T. versicolor* biotransformed only methyl *p*-coumarate, resulting in the formation of three derivatives: cumaric acid, yield of 12.18 %; methyl caffeate, yield of 3.56%; and (E)-methyl-3-(4-methoxyphenyl) acrylate (identified in mixture). Biotransformations by *A. brasiliensis* resulted in the conversion of methyl *p*-coumarate into three derivatives (detected by GC-MS): acetophenone, 1-(4-hydroxyphenyl) propane-1,3-diol and 4-(3-hydroxypropyl) benzene-1,3-diol; methyl ferulate was biotransformed into (4)-methyl-3-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-3-methoxyacrylate (10.31 % yield). Additionally, the biotransformation of the three phenolic substrates by *T. versicolor* was studied by *in silico* assays. It was considered that the enzyme present in the reaction medium was laccase and the molecular docking was carried out. The AutoDock v.4.2 and Pymol softwares provided a prediction of the orientation and preferential conformation that the phenolic substrates took on the active site of laccase. The results indicated that the three substrates interacted spontaneously with the biological receptor, but with different free energy values ( $\Delta G$ ):  $\Delta G$  *p*-methyl coumarate = -6.89 Kcal.mol<sup>-1</sup>,  $\Delta G$  methyl ferulate = -7, 37 Kcal.mol<sup>-1</sup> and  $\Delta G$  methyl caffeate = -7.55 Kcal.mol<sup>-1</sup>. The ligand-protein complex consisting of methyl *p*-coumarate-laccase was the least stable one, being this system possible explaining the occurrence of biotransformation of this substrate by *T.versicolor*. Thus, it was possible to demonstrate that methyl *p*-coumarate interacted with the laccase site, leading to the formation of derivatives that could result in more stable complexes, thus allowing the occurrence of hydrolysis, hydroxylation and methoxylation reactions.

**Keywords:** Biotransformation. Filamentous fungi. Phenolic substances. Molecular coupling.

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Biossíntese do ácido chiquímico a partir de PEP (fosfoenolpiruvato) e <i>D</i> -eritrose 4-fosfato.....	30
Figura 2. Biossíntese da L-fenilalanina e L-tirosina a partir do ácido corísmico. ....	31
Figura 3. Formação dos ácidos cinâmico e <i>p</i> -cumárico a partir de aminoácidos aromáticos.....	32
Figura 4. Representação esquemática da morfologia de fungos filamentosos pertencentes ao filo Basidiomycota, cuja estrutura reprodutora constitui os cogumelos.....	34
Figura 5. Representação esquemática do ciclo catalítico da lacase .....	39
Figura 6. Estrutura tridimensional da lacase de <i>Trametes versicolor</i> , na qual são apresentados três domínios (T1, T2 e T3) em cores diferentes. Os átomos de cobre são as esferas violetas e a porção de hidrato de carbono são os modelos em bola-e-bastão. A parte cinzenta é o N-terminal e a verde o C-terminal. O sítio T1 é a esfera isolada.....	40
Figura 7. Representação esquemática da oxidação de grupos fenólicos de ligninas pela lacase .....	41
Figura 8. Obtenção de fenazina e fenoxazinona empregando biotransformação por <i>T. versicolor</i> .....	42
Figura 9. Biotransformação do ( <i>R</i> )- <i>Propranolol</i> por <i>P. crustosum</i> .....	45
Figura 10. Derivados obtidos a partir da biotransformação de ácido ferúlico por <i>C. acutatum</i> e <i>L. theobromae</i> .....	46
Figura 11. (a) Síntese química tradicional para obtenção da vanilina. (b) Biotransformação do ácido ferúlico por <i>Aspergillus niger</i> e <i>Phanerochaete cryosporium</i> gerando vanilina.....	47
Figura 12. Biotransformação do ácido cumárico por <i>Schizophyllum commune</i> . ....	48
Figura 13. Biotransformação do ácido ferúlico por <i>Aspergillus sp.</i> e <i>Fusarium sp.</i> .....	49
Figura 14. Biotransformação do ácido cafeico por <i>Fusarium graminearum</i> .....	50
Figura 15. Biotransformação do ácido ferúlico por <i>Aspergillus brasiliensis</i> ATCC 16404.....	50

Figura 16. Biotransformação do LASSBio-596 empregando <i>C. echinulata</i> e <i>B. bassiana</i> .....	56
Figura 17. LASSBio-596 no sitio ativo da CYP2C9. ....	57
Figura 18. Estruturas químicas dos substratos utilizados: <i>p</i> -cumarato de etila (1), ferulato de metila (2) e cafeato de metila (3).....	59
Figura 19. Cultura do (A) <i>Aspergillus brasiliensis</i> ATCC 16404 em meio malte e (B) <i>Trametes versicolor</i> ATCC 200801 em meio ágar .....	68
Figura 20. Meio de Cultura do (A.1) <i>Aspergillus brasiliensis</i> ATCC 16404 em meio Koch's K1 e (B.1) <i>Trametes versicolor</i> ATCC 200801 em meio com indutores de lacase .....	69
Figura 21. Cromatoplasmas das biotransformações dos substratos fenólicos selecionados. (I) em 24 horas, (II) em 48 horas e (III) em 72 horas. (1) Ferulato de metila, (2) cafeato de metila, (3) <i>p</i> -cumarato de metila, (4) controle, (5) extrato do ferulato de metila, (6) extrato do cafeato de metila e (7) extrato do <i>p</i> -cumarato de metila, reveladas a 254 nm.....	70
Figura 22. Cromatogramas obtidos em $\lambda$ 254 nm: (1) padrão <b>ACE</b> TR 20 min. Extratos da biotransformação do <b>ACE</b> por <i>T. versicolor</i> , (2) em 24 horas, (3) em 48 horas e (4) em 72 horas.....	72
Figura 23. Cromatogramas obtidos em $\lambda$ 254 nm: (1.1) padrão <b>ACFE</b> TR 17.6 min. Extratos da biotransformação do <b>ACE</b> por <i>T. versicolor</i> , (1.2) em 24 horas, (1.3) em 48 horas e (1.4) em 72 horas.....	73
Figura 24. Cromatogramas obtidos em $\lambda$ 254 nm: (2.1) padrão <b>AFE</b> TR 20 min. Extratos da biotransformação do <b>ACE</b> por <i>T. versicolor</i> , (2.2) em 24 horas, (2.3) em 48 horas e (2.4) em 72 horas.....	74
Figura 25. Cromatogramas dos controles obtidos a partir da biotransformação das substâncias, em $\lambda$ 254 nm. (3.1) em 24 horas, (3.2) em 48 horas, e (3.3) em 72 horas. ....	75
Figura 26. Cromatograma do <b>ACETR 15</b> isolado, obtido em $\lambda$ 254 nm.....	80
Figura 27. Cromatograma do <b>ACETR 17</b> isolado, obtido em $\lambda$ 254 nm.....	80
Figura 28. Cromatograma do <b>ACETR 19</b> isolado, obtido em $\lambda$ 254 nm.....	81

Figura 29. Estrutura química do <i>p</i> -cumararato de metila ( <b>ACE</b> ).....	82
Figura 30. Espectro de RMN de <sup>1</sup> H do <i>p</i> -cumarato de metila (400 MHz, CD <sub>3</sub> OD).....	83
Figura 31. Espectro de Infravermelho do ácido cumárico ( <b>ACETR 15</b> ), obtido em pastilha de KBr. ....	85
Figura 32. Espectro de RMN de <sup>1</sup> H do ácido cumárico padrão (400 MHz), CD <sub>3</sub> OD).....	86
Figura 33. Espectro de RMN de <sup>1</sup> H do ácido cumárico ( <b>ACETR 15</b> ) (400 MHz, CD <sub>3</sub> OD)..	87
Figura 34. Proposta estrutural para o derivado <b>ACETR 15</b> , obtido a partir da biotransformação do <b>ACE</b> por <i>T. versicolor</i> .....	89
Figura 35. Espectro de RMN de <sup>1</sup> H do <b>ACFE</b> padrão ( 400 MHz, CD <sub>3</sub> OD)...	90
Figura 36. Espectro de RMN de <sup>1</sup> H do cafeato de metila ( <b>ACETR 17</b> ) ( 400 MHz,CD <sub>3</sub> OD).....	91
Figura 37. Proposta estrutural para o derivado <b>ACETR 17</b> , obtido a partir da biotransformação do <b>ACE</b> por <i>T. versicolor</i> .....	92
Figura 38. Espectro de RMN de <sup>1</sup> H do ( <i>E</i> )-3-(4-metoxifenil) acrilato de metila ( <b>ACETR 19</b> ) em mistura com o <b>ACE</b> (400 MHz, CD <sub>3</sub> OD).....	94
Figura 39. Proposta estrutural para o derivado <b>ACETR 19</b> , obtido a partir da biotransformação do <b>ACE</b> por <i>T. versicolor</i> .....	95
Figura 40. sítio de ligação na TvLac com ferulato de metila (azul), cumarato de metila (amarelo) e cafeato de metila (rosa).....	97
Figura 41. Sítio de ligação do TvLac com o cafeato de metila( <b>ACFE</b> ), visualizado no Pymol.....	98
Figura 42. Sítio de ligação do TvLac com o ferulato de metila ( <b>AFE</b> ), visualizado no Pymol.....	99
Figura 43. Sítio de ligação do TvLac com o <i>p</i> -cumarato de metila ( <b>ACE</b> ), visualizado no Pymol.....	100
Figura 44. Reações Químicas resultantes da biotransformação do <b>ACE</b> por <i>T. versicolor</i> . ....	102
Figura 45. Oxidação do <i>p</i> -cumarato de metila ( <b>ACE</b> ) no sitio da lacase.....	103
Figura 46. Estruturas de ressonância do radical fenoxi.....	104
Figura 47. Proposta do mecanismo de reação radicalar de formação do <b>ACETR 17</b> .....	105

Figura 48. Proposta do mecanismo de reação radicalar de formação do <b>ACETR 15</b> .....	106
Figura 49. Proposta do mecanismo de reação radicalar de formação do <b>ACETR 19</b> .....	106
Figura 50. Cromatoplasmas das biotransformações dos substratos fenólicos selecionados. (1) Controle, (2) <i>p</i> -cumarato de metila, (3) cafeato de metila, (4) ferulato de metila, (5) extrato do <i>p</i> -cumarato de metila, (6) extrato do cafeato de metila e (7) extrato do ferulato de metila, (8) acetofenona, reveladas a 254 nm. .....	107
Figura 51. Cromatograma obtido no CG-EM. Derivados resultantes da biotransformação do <b>ACE</b> por <i>A. brasiliensis</i> .....	108
Figura 52. Espectro de Infravermelho do extrato obtido a partir da biotransformação do <b>ACE</b> por <i>A. brasiliensis</i> .....	110
Figura 53. Espectro de massas do derivado <b>ACETR 6</b> obtido a partir da biotransformação do <b>ACE</b> por <i>A. brasiliensis</i> .....	111
Figura 54. Proposta de fragmentos no espectro de massas da acetofenona( <b>ACTR 6</b> ).....	112
Figura 55. Espectro de massas do derivado <b>ACETR 16.3</b> obtido a partir da biotransformação do <b>ACE</b> por <i>A. brasiliensis</i> .....	113
Figura 56. Proposta de fragmentos no espectro de massas do 1-(4-hidróxifenil)propano-1,3-diol ( <b>ACTR 16.3</b> ).....	114
Figura 57. Espectro de massas do derivado <b>ACETR 16.7</b> obtido a partir da biotransformação do <b>ACE</b> por <i>A. brasiliensis</i> .....	115
Figura 58. Proposta de fragmentos no espectro de massas do 4-(3-hidroxipropil)benzeno-1,3-diol.....	116
Figura 59. Espectro de massas do <i>p</i> -cumarato de metila ( <b>ACE</b> ).....	117
Figura 60. Proposta de fragmentos no espectro de massas do <i>p</i> -cumarato de metila.....	117
Figura 61. Cromatograma do extrato obtido a partir da biotransformação do <b>AFE</b> por <i>A. brasiliensis</i> no período de 72 horas.....	118
Figura 62. Cromatogramas do (1) Controle e do (2) <b>AFTR 17.3</b> , obtidos em $\lambda$ 254 nm.....	120
Figura 63. Espectro de RMN de $^1\text{H}$ do <b>AFE</b> padrão (400 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ ).....	122
Figura 64. Espectro de RMN de $^1\text{H}$ do <b>AFTR 17.3</b> (400 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ ).....	123

. Figura 65. Proposta estrutural para o derivado <b>AFTR 17.3</b> , obtido a partir da biotransformação do <b>ACE</b> por <i>A. brasiliensis</i> .....	125
Figura 66. Proposta do mecanismo de reação de formação do <b>AFTR 17.3</b> .....	126

## ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Exemplos de produtos naturais bioativos isolados de plantas.....	24
Tabela 2. Exemplos de produtos naturais bioativos isolados de micro-organismos.....	26
Tabela 3. Fracionamento de extrato de ensaio preparativo da biotransformação do <i>p</i> -cumarato de metila por <i>T. versicolor</i> (1) .....	76
Tabela 4. Fracionamento de extrato de ensaio preparativo da biotransformação do <i>p</i> -cumarato de metila por <i>T. versicolor</i> (2).....	77
Tabela 5. Fracionamento de Frd.....	77
Tabela 6. Fracionamento de extrato de ensaio preparativo da biotransformação do <i>p</i> -cumarato de metila por <i>T. versicolor</i> .....	78
Tabela 7. Fracionamento de Frb.....	79
Tabela 8. Dados de RMN de <sup>1</sup> H ( 400 MHz, CD <sub>3</sub> OD) do <b>ACE</b> padrão.....	81
Tabela 9. Dados de RMN de <sup>1</sup> H (400 MHz, CD <sub>3</sub> OD) do derivado <b>ACETR 15</b> , e comparação com os dados da literatura (300MHz).....	88
Tabela 10. Dados de RMN de <sup>1</sup> H (400 MHz, CD <sub>3</sub> OD) do derivado <b>ACETR 17</b> , e comparação com os dados da literatura (500 MHz).....	89
Tabela 11. Dados de RMN de <sup>1</sup> H (400 MHz, CD <sub>3</sub> OD) do derivado <b>ACETR 19</b> .....	93
Tabela 12. Energias de ligação resultantes da ancoragem molecular entre as substancia fenólicas e a lacase .....	97
Tabela 13. Fracionamento de extrato de ensaio preparativo da biotransformação do ferulato de metila por <i>A. brasiliensis</i> .....	119
Tabela 14. Dados de RMN de <sup>1</sup> H (400 MHz, CD <sub>3</sub> OD) do derivado <b>AFTR 17.3</b> e <b>AFE</b> padrão.....	121

## LISTA DE ABREVIÇÕES

ATCC	American Type Culture Collection
PDB	Protein Data Bank
BDA	Batata dextrose ágar
CC	Cromatografia em Coluna Clássica
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
CG-EM	Cromatografia Gasos acoplada a espectrometria de massas
CLAE-DAD	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a detector de Arranjo de Diodos
ACE	<i>p</i> -cumarato de metila
CD <sub>3</sub> OD	Metanol Deuterado
DMSO	Dimetilsufóxido
ACFE	Cafeato de metila
AFE	Ferulato de metila
EM	Espectrometria de massas
HMBC	<i>Heteronuclear multiple bond coherence</i>
HSQC	<i>Heteronuclear multiple quantum coherence</i>
NAD <sup>+</sup>	Dinucleotideo de Nicotinamida e Adenina ( forma oxidada)
NADH	Dinucleotideo de Nicotinamida e Adenina (forma reduzida)
TvLAC	Lacase de <i>Trametes versicolor</i>
SAM	S-Adenosilmetionina sintetase (Metiltransferase)
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
IV	Infravermelho
TR	Tempo de retenção

## LISTA DE SÍMBOLOS

$\delta$	Deslocamento químico
$J$	Constante de acoplamento
$\lambda$	Comprimento de onda
$\Delta G$	Energia Livre de Gibbs
$\Delta H$	Entalpia
$\Delta S$	Entropia
$K_{eq}$	Constante de equilíbrio
pH	Potencial Hidrogeniônico
$s$	Simpleto
$d$	Dubleto
$dd$	Duplo dubleto
$m$	Multiplete
$m/z$	Razão massa carga
Hz	Hertz
rpm	Rotações por minuto

## Sumário

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	20
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	22
2.1 Objetivo Geral .....	22
2.2 Objetivos específicos .....	22
<b>3. REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	23
3.1 A química de produtos naturais .....	23
3.2 Biossíntese do ácido cumárico e derivados na via do chiquimato ..	28
3.3 Fungos filamentosos: sua importância e aplicações.....	33
3.4 A enzima lacase .....	38
3.5 Biotransformação .....	43
3.6 Acoplamento molecular. ....	51
<b>3.3 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	59
3.1 Obtenção dos substratos fenólicos.....	59
3.2 Preparação dos substratos fenólicos.....	59
3.3 Origem dos fungos filamentosos.....	60
3.4 Meios de cultura.....	60
3.5 Manutenção dos fungos filamentosos.....	60
3.6 Biotransformação dos substratos fenólicos.....	61
3.7 Obtenção dos extratos brutos.....	61
3.8 Avaliação dos perfis químicos dos extratos obtidos das culturas dos fungos filamentosos.....	62
3.9 Biotransformação em escala preparativa.....	64
3.10 Isolamento e identificação estrutural dos derivados da biotransformação.....	64

3.11 Ensaio computacional de acoplamento molecular.....	65
3.11.1 Acoplamento molecular dos substratos fenólicos com a lacase..	65
3.11.2 Preparação das estruturas da proteína e dos ligantes.....	66
3.11.3 Geração de rede.....	66
3.11.4 Acoplamento molecular utilizando o AutoDock v. 4.2.....	67
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>68</b>
4.1 Estudos preliminares das biotransformações dos compostos fenólicos selecionados.....	68
4.1.1 Avaliação dos perfis químicos dos ensaios da biotransformação empregando <i>T. versicolor</i> .....	69
4.2 Fracionamento dos extratos da biotransformação do <i>p</i> -cumarato de metila por <i>T. versicolor</i> .....	75
4.3 Identificações estruturais dos derivados obtidos da biotransformação do <b>ACE</b> por <i>T. versicolor</i> .....	81
4.3.1 Identificação estrutural do derivado <b>ACETR 15</b> .....	84
4.3.2 Identificação estrutural do derivado <b>ACETR 17</b> .....	89
4.3.3 Identificação estrutural do derivado <b>ACETR 19</b> .....	93
4.4 Estudos <i>in silico</i> das biotransformações dos compostos fenólicos selecionados.....	96
4.4.1 Propostas de mecanismos de reação para obtenção dos derivados da biotransformação do <b>ACE</b> por <i>T. versicolor</i> .....	102
4.5 Avaliação dos perfis químicos dos extratos da biotransformação das substâncias fenólicas por <i>A. brasiliensis</i> .....	107
4.5.1 Avaliação do perfil químico em CG-EM do extrato da biotransformação do <b>ACE</b> por <i>A. brasiliensis</i> .....	108
4.6 Identificações estruturais dos derivados da biotransformação do <b>ACE</b> por <i>A. brasiliensis</i> .....	109
4.7 Avaliação do perfil químico dos extratos da biotransformação do ferulato de metila por <i>A. brasiliensis</i> .....	118
4.8 Fracionamento do extrato obtido da biotransformação do <b>AFE</b> por <i>A.</i> <i>brasiliensis</i> .....	119
4.9 Identificação estrutural de <b>AFTR 17.3</b> obtido da biotransformação do <b>AFE</b> por <i>A. brasiliensis</i> .....	121
4.10 Proposta do mecanismo de reação de formação do <b>AFTR17.3</b> .	126

<b>5 CONCLUSÕES .....</b>	<b>127</b>
<b>6 REFERÊNCIAS .....</b>	<b>129</b>

## 1. INTRODUÇÃO

Historicamente o homem explora a natureza na busca por produtos naturais, que possuem diferentes aplicações. Nesta contextualização, pode ser citado o uso empírico e tradicional das plantas medicinais. Várias populações foram acumulando e transmitindo às gerações seguintes os conhecimentos relacionados ao uso das plantas medicinais, cujo o objetivo geral era curar ou amenizar enfermidades (ARAÚJO, 2015). Atualmente, os produtos naturais têm despertado o interesse de muitos setores industriais devido às inúmeras aplicações, ou seja, estes podem ser utilizados na produção de corantes, fibras, agentes aromatizantes, perfumes, fármacos, entre outros. Considerando que os produtos naturais possuem propriedades biológicas interessantes, muitas pesquisas estão sendo direcionadas para a descoberta de novos fármacos a partir de fontes naturais, principalmente daqueles que possam ser úteis no tratamento de doenças como o câncer e aquelas consideradas infecciosas.

Os produtos naturais, também denominados como metabólitos secundários, são biossintetizados por vias específicas e são classificados de acordo com o padrão estrutural presente em suas estruturas químicas. Os metabólitos secundários fenólicos constituem um grupo que desenvolvem importantes funções nas plantas, e são biossintetizados em parte como resposta a fatores ecológicos e fisiológicos. No reino vegetal, eles têm a finalidade de atrair polinizadores por conferirem cores às plantas, possuem também ação protetora contra radiação, possuem ação alelopática, têm o potencial de proteger as plantas contra o ataque de patógenos e insetos (KHODDAMI; WILKES; ROBERTS, 2013). Os compostos fenólicos podem desempenhar inúmeras atividades biológicas interessantes, como antioxidante, anti-alérgica, antiviral, ação vasodilatadora, anti-inflamatória, antimicrobiana, anticâncer e antidiabética (CIANCIOSI et al., 2018). A via do chiquimato é a principal responsável pela biossíntese de diversos compostos fenólicos em muitos organismos, incluindo plantas, bactérias, fungos e alguns protozoários (STARCEVIC, 2008). Essa via biossintética possui alguns intermediários-

chave, como os ácidos cumárico, cafeico e ferúlico, os quais apresentam elevado potencial biológico.

Estudos de biotransformação correspondem a uma das alternativas empregadas para obtenção de derivados dos produtos naturais com as maiores taxas de sucesso. As reações de biotransformação podem ser catalisadas por micro-organismos não patogênicos, que por sua vez apresentam diversas vantagens, pois conduzem a processos sustentáveis de derivatização química, e, em muitos casos podem substituir os processos químicos tradicionais. As reações de biotransformação podem ocorrer a temperatura ambiente e sob condições normais de pressão, além de evitar a formação de subprodutos (GONÇALVES; MARSAIOLI, 2013). Os interesses no estudo e desenvolvimento da biotransformação, explicam-se pela possibilidade da bioconversão de diferentes substratos em produtos desejados com alta eficiência. Outra vantagem é que o processo da biotransformação obedece aos princípios da Química Verde, uma vez que utiliza reagentes de partida que minimizam os impactos ambientais (AGUIAR et al., 2014).

O presente estudo propôs a investigação da biotransformação de alguns compostos fenólicos (substratos), os quais são intermediários-chave da via biossintética do chiquimato. As reações de biotransformação foram catalisadas por diferentes fungos filamentosos. Os estudos sobre a biotransformação dos intermediários biossintéticos da via do chiquimato (compostos fenólicos), tornam-se importantes no sentido que a derivatização biológica pode resultar no fornecimento de análogos estruturais dos metabólitos secundários fenólicos provenientes dessa via, que posteriormente poderão ser utilizados no desenvolvimento de novos protótipos para fármacos. Adicionalmente, foram realizados ensaios computacionais de acoplamento molecular para a predição das interações entre os substratos fenólicos e as enzimas fúngicas.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Obter derivados naturais de ésteres metílicos de três derivados de ácidos cinâmicos, os quais são intermediários da via biossintética do chiquimato, a partir dos processos de biotransformação empregando fungos filamentosos.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Realizar a biotransformação dos substratos fenólicos selecionados por diferentes períodos de tempo e por dois fungos filamentosos;
- b) Avaliar os perfis químicos dos derivados obtidos, por meio de CCD, CLAE-DAD e CG-EM;
- c) Selecionar os processos mais promissores para a derivatização de cada substrato, mediante avaliação dos perfis químicos, para o desenvolvimento das biotransformações em escala preparativa;
- d) Realizar a biotransformação dos substratos em escala preparativa, utilizando-se dos processos selecionados;
- e) Isolar os derivados empregando técnicas cromatográficas;
- f) Identificar as estruturas químicas dos derivados, utilizando técnicas espectroscópicas e espectrométricas;
- g) Realizar ensaios computacional de acoplamento molecular que permitam a investigação sobre as interações enzima-substrato ocorridas no sítio ativo.

### 3. REFERENCIAL TEÓRICO

#### 3.1 A química de produtos naturais

O uso da medicina tradicional no tratamento de muitas doenças, impulsionou a investigação e a descoberta de novos fármacos a partir dos recursos disponíveis na natureza (VIEIRA et al., 2017). Historicamente, os produtos naturais sempre foram essenciais para a produção de medicamentos e, as razões estão associadas à capacidade dos organismos vivos produzir metabólitos estruturalmente complexos, diversificados e com atividade biológica promissora (HEINRICH et al., 2012).

Os produtos naturais têm ganhado cada vez mais espaço na academia científica, uma vez que os mesmos são atrativos principalmente para a indústria farmacêutica, indústria química, alimentícia e de cosméticos. Pinto e colaboradores (2002) apontam a Química de Produtos Naturais como sendo a área mais antiga dentro da Química brasileira, e que talvez possua o maior número de pesquisadores. Outra vantagem apontada nas investigações com os produtos naturais, está na obtenção de substâncias enantiomericamente puras, importantes para o desenvolvimento farmacêutico (PINTO et al., 2002). Em relação às pesquisas acadêmicas realizadas na área da Química de Produtos Naturais, Pupo e colaboradores (2007) afirmam que a maioria dos trabalhos estão voltados para o isolamento e identificação de substâncias, muitos desses associados aos ensaios biológicos ou estudos quimiotaxonômicos.

Araújo (2015) define os produtos naturais como sendo produtos principalmente de origem vegetal, usados para o tratamento de múltiplas afecções. Chintoju e colaboradores (2015), descrevem um produto natural como sendo um composto orgânico, produzido por meio das vias do metabolismo secundário presentes nos organismos vivos. O metabolismo, por sua vez, é definido como o conjunto total das transformações químicas que ocorrem nas células vivas. Essas reações possuem certas orientações devido à presença de enzimas específicas, estabelecendo, assim, as vias

biossintéticas (PEREIRA; CARDOSO, 2012). O metabolismo primário é comum a todos os organismos vivos e atua nas funções vitais, relacionadas ao crescimento, desenvolvimento e reprodução, sendo este responsável pela síntese de celulose, lignina, açúcares, proteínas, lipídeos, ácidos nucleicos, entre outros. Por outro lado, o metabolismo secundário tem distribuição restrita, ou seja, é limitado a alguns organismos como plantas, micro-organismos e alguns animais, e, geralmente atua no mecanismo de defesa, sendo este responsável pela produção dos compostos fenólicos, alcaloides, terpenoides e policetídeos (CUNHA et al., 2016). Muitos autores referem-se aos metabólitos secundários como produtos naturais ou micromoléculas. Os produtos naturais possuem vasta diversidade química, não só em termos de diversidade estrutural, mas também devido às várias atividades biológicas apresentadas (Tabela 1). Dessa forma, a quimiodiversidade aliada ao elevado potencial biológico vistos nos produtos naturais impulsionam diversos estudos que geralmente visam a obtenção de protótipos para o desenvolvimento de novos fármacos (GU et al., 2013).

**Tabela 1:** Exemplos de produtos naturais bioativos isolados de plantas (Fonte: ARAÚJO, 2015).

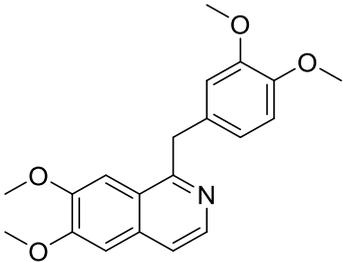
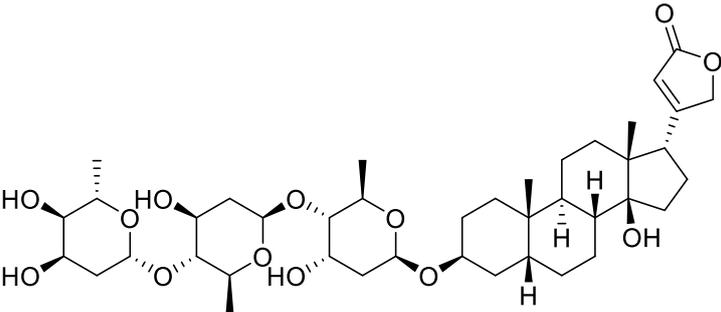
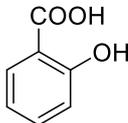
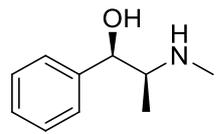
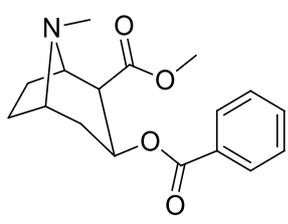
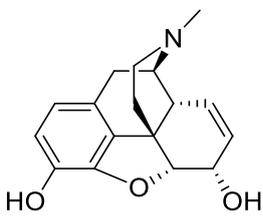
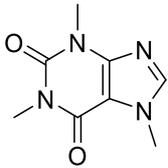
Produto natural	Atividade Biológica	Fonte para isolamento
<p data-bbox="448 1256 612 1290">Papaverina</p>  <p>The chemical structure of Papaverina is a benzomorphan alkaloid. It consists of a benzene ring fused to a morphine-like ring system. The benzene ring has two methoxy groups (-OCH<sub>3</sub>) at the 6 and 7 positions. The morphine ring system has a nitrogen atom at the 4 position and a methoxy group at the 3 position.</p>	<p data-bbox="1007 1330 1190 1364">Espamolítico</p>	<p data-bbox="1267 1290 1426 1352"><i>Papaver somniferum</i></p>
<p data-bbox="448 1621 576 1655">Digoxina</p>  <p>The chemical structure of Digoxina is a complex steroid glycoside. It features a steroid nucleus with a lactone ring at the C-17 position. The molecule is highly substituted with hydroxyl groups (-OH) and methyl groups (-CH<sub>3</sub>) at various positions. It is linked to a sugar moiety via a glycosidic bond.</p>	<p data-bbox="1007 1765 1190 1798">Cardiotônico</p>	<p data-bbox="1286 1765 1406 1798"><i>Digitalis</i></p>

Tabela 1. Continuação

Produto Natural	Atividade Biológica	Fonte para isolamento
<p>Ácido Salicílico</p> 	Antipirético e anti-inflamatório	<i>Salix alba</i>
<p>Efedrina</p> 	Antialérgico	<i>Ephedra sinica</i>
<p>Cocaína</p> 	Estimulante; Anestésico; Supressor de apetite.	<i>Erythroxylum coca</i>
<p>Morfina</p> 	Analgésico	<i>Papaver somniferum</i>
<p>Cafeína</p> 	Estimulante do sistema nervoso central	<i>Camellia sinensis</i>

É importante destacar que existem na natureza outras fontes para obtenção de produtos naturais, por exemplo, os micro-organismos. As pesquisas com micro-organismos, principalmente fungos filamentosos, começaram a ganhar espaço nas pesquisas a partir de 1928, quando Alexandre Fleming descobriu de forma acidental a penicilina. A descoberta de novos produtos naturais isolados de micro-organismos, continua sendo de

grande interesse para a produção de fármacos (Tabela 2). A cultura de diferentes células microbianas está desempenhando um papel cada vez mais significativo na descoberta de novos fármacos (KAMALI; HASHIM, 2018). Micro-organismos exercem um papel fundamental na natureza, pois contribuem para a estabilidade de diferentes ecossistemas, além de representarem importante fonte de recursos genéticos com grande potencial biotecnológico, o que contribui para a produção de antibióticos, enzimas e substâncias biologicamente ativas (SILVA et al., 2017).

**Tabela 2:** Exemplos de produtos naturais bioativos isolados de micro-organismos (Fonte: SILVA et al., 2015).

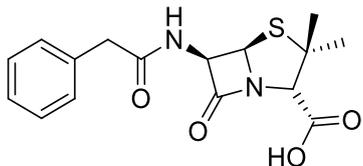
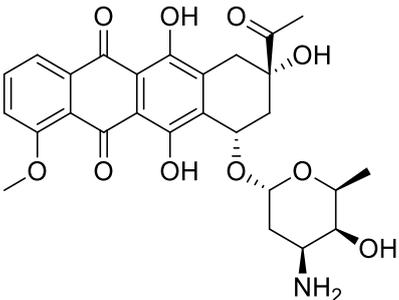
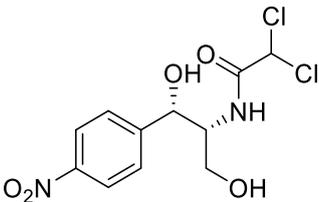
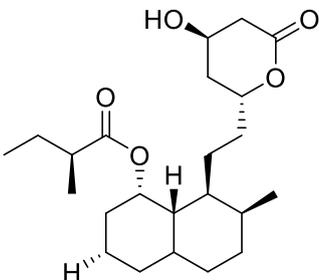
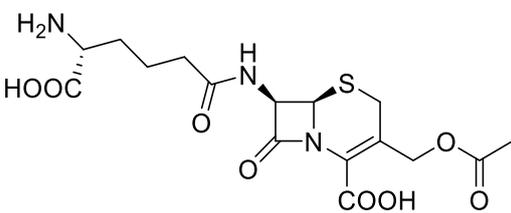
Produto natural	Atividade biológica	Micro-organismo
<p>Penicilina G</p> 	Antibiótico	<i>Penicillium notatum</i>
<p>Daunorubicina</p> 	Antineoplásico	<i>Streptomyces peucetius</i>
<p>Cloranfenicol</p> 	Antibiótico	<i>Streptomyces venezuelae</i>

Tabela 2. Continuação

Produto Natural	Atividade biológica	Micro-organismo
Mevastatina 	Hipocolesterolêmico	<i>Penicillium brevicompactum</i>
Cefalosporina C 	Antibiótico	<i>Cephalosporium acremonium</i>

Em muitos casos, a obtenção de grandes quantidades de um produto de origem natural inviabiliza o seu uso para a produção de fármaco, quer seja pelo custo ou pela escassez de fontes renováveis (OLIVEIRA<sup>1</sup> et al., 2012). Isso pode ser explicado levando em consideração que durante o processo de isolamento, as quantidades obtidas do produto natural de interesse na forma pura, são insuficientes para determinação estrutural e avaliação da atividade biológica. Além disso, tais compostos são produzidos em misturas complexas e os métodos analíticos atualmente disponíveis apresentam limitações na separação e detecção dos mesmos.

Diante do que foi discutido acima, uma alternativa para obtenção de produtos naturais é a semissíntese. Nessa abordagem, os produtos naturais são utilizados como materiais de partida para reações sintéticas. Podem ser obtidos análogos estruturais, e, em muitos casos os efeitos farmacológicos tornam-se mais potentes (KENNEDY, 2007).

Atualmente, os derivados semissintéticos vêm sendo produzidos com êxito, substituindo aqueles de origem natural por serem de mais fácil aquisição

(MACIEL et al., 2007). Entre as desvantagens da utilização da semissíntese na obtenção de produtos naturais estão por exemplo, as limitações em sintetizar derivados mantendo a estereoquímica, ou realizar certas modificações regioespecíficas sem a necessidade de agentes enzimáticos durante o processo (GARY et al., 2018).

### **3.2 Biossíntese do ácido cumárico e derivados na via do chiquimato**

Muitas pesquisas na área de Química de Produtos Naturais estão voltadas para obtenção de compostos fenólicos devido à ampla variedade de atividades biológicas que estes apresentam. As investigações acerca da obtenção desses compostos incluem estudos sobre a via biossintética que é responsável pela produção dos mesmos (DZIALO et al., 2016). No entanto, existem métodos de estudos biossintéticos descritos na literatura que consistem na marcação dos precursores e na utilização de mutantes. Estes métodos podem contribuir de forma significativa para o reconhecimento dos precursores que deram origem ao metabólito de interesse (ROMEK et al., 2015), ou no caso de mutantes, bloquear vias biossintéticas que impossibilitem a formação de metabólitos indesejáveis, contribuindo para o acúmulo do metabólito de interesse (CZECHOWSKI et al., 2016).

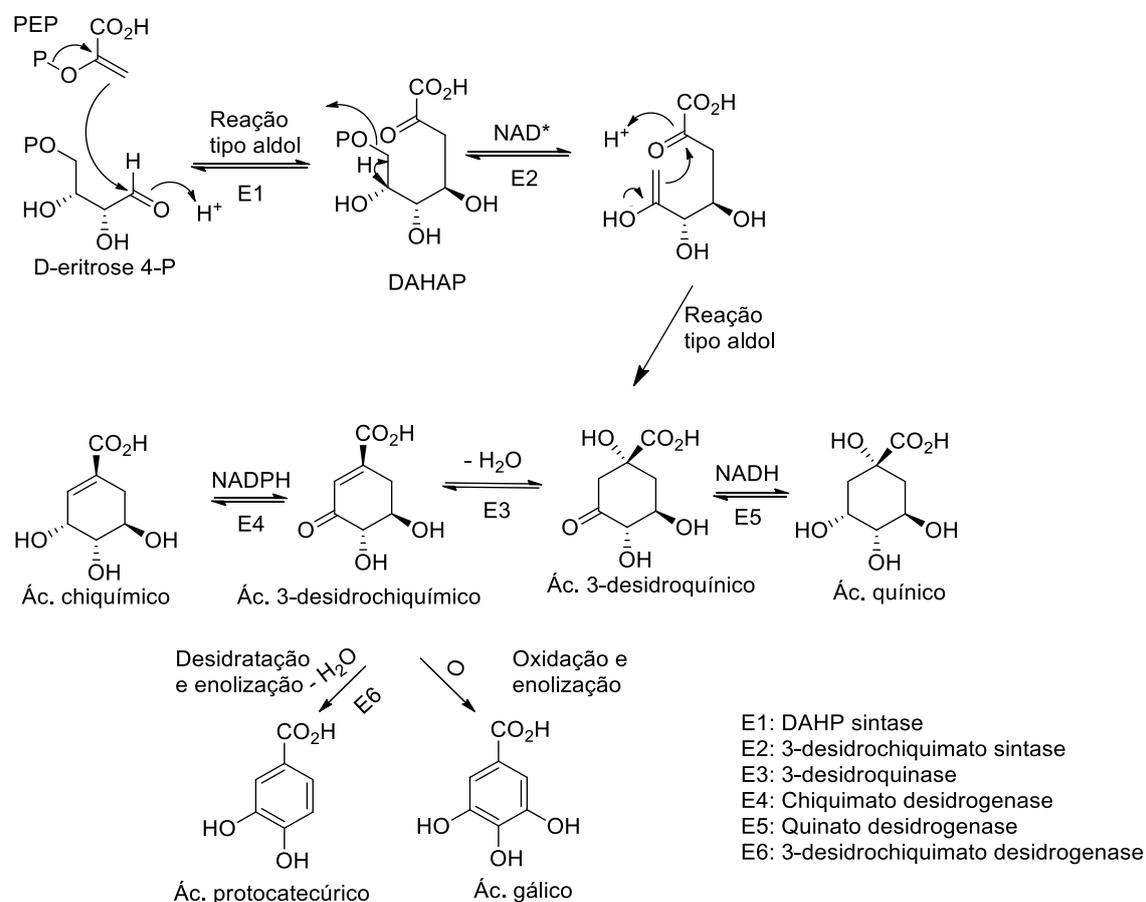
O ácido chiquimico, presente na via do chiquimato, é um precursor simples e essencial para a formação de muitos produtos naturais, como os aminoácidos aromáticos fenilalanina, tirosina, triptofano, ácidos aromáticos simples (por exemplo, ácidos benzóico e gálico) e aldeídos aromáticos. (HEINRICH et al., 2012). A via do chiquimato é a via biossintética presente exclusivamente em plantas e micro-organismos (AVERESCH; KROMER, 2018). Esta via é responsável pela biossíntese de inúmeros metabólitos secundários fenólicos, como alcaloides, flavonoides, ligninas, lignanas, cumarinas e alguns taninos. Muitos destes compostos são bioativos, e vêm desempenhando papéis importantes na defesa de plantas contra estresses bióticos e abióticos, além de promoverem interações ambientais (TOHGE et al., 2013). O ácido cumárico e seus derivados por exemplo, exercem essa função

de defesa, e são biossintetizados por meio desta via, cujos precursores são compostos aromáticos como L-tirosina e o ácido cinâmico.

A via do chiquimato inicia-se a partir da condensação aldólica entre o fosfoenolpiruvato (PEP) e o D-eritrose-4-fosfato (E4P). Após a ocorrência de sete reações biossintéticas gera o ácido corismico (TZIN; GALILI, 2010).

Na primeira etapa, a enzima *ácido 3-desoxi-D-arabino-heptulosônico-7-fosfato sintase* (DAHPS) catalisa a condensação aldólica entre o PEP e o E4P levando a formação do ácido 3-desóxi-D-arabino-heptusônico-7-fosfato (DAHP). Na segunda etapa, ocorre a eliminação do grupo fosfato, e na sequência a enzima *ácido 3-desidrochiquímico sintase* catalisa uma reação aldólica intramolecular, levando à formação do ácido 3-desidroquínico. Na terceira etapa, há possibilidade de ocorrência de duas reações: (I) a enzima *quinato desidrogenase* catalisa uma reação de redução do ácido 3-desidroquínico na presença do NADH levando a formação do ácido quínico, ou (II) a enzima *3-desidroquinase* catalisa a reação de desidratação do ácido 3-desidroquínico levando a formação do ácido 3-desidrochiquímico. A ocorrência da reação (II) explica a formação do ácido chiquímico, que corresponde ao intermediário chave desta via. Na quinta etapa, a enzima *chiquimato desidrogenase* catalisa reação de redução do ácido 3-desidrochiquímico na presença do NADPH formando o ácido chiquímico. O ácido 3-desidrochiquímico é um precursor essencial para a biossíntese de outros compostos como o ácido protocatecúrico e ácido gálico. Na sexta etapa, a enzima *chiquimato quinase* catalisa a fosforilação do ácido chiquímico levando a formação do ácido chiquímico-3-fosfato (S3P). Posteriormente, um segundo PEP é condensado com o S3P produzindo o 5-enolpiruvilchiquimato-3-fosfato (EPSP). Na sétima etapa, a *corismato sintase* catalisa a reação de eliminação do grupo fosfato do EPSP (Figura 1) (TOHGE et al., 2013 e DEWICK, 2009).

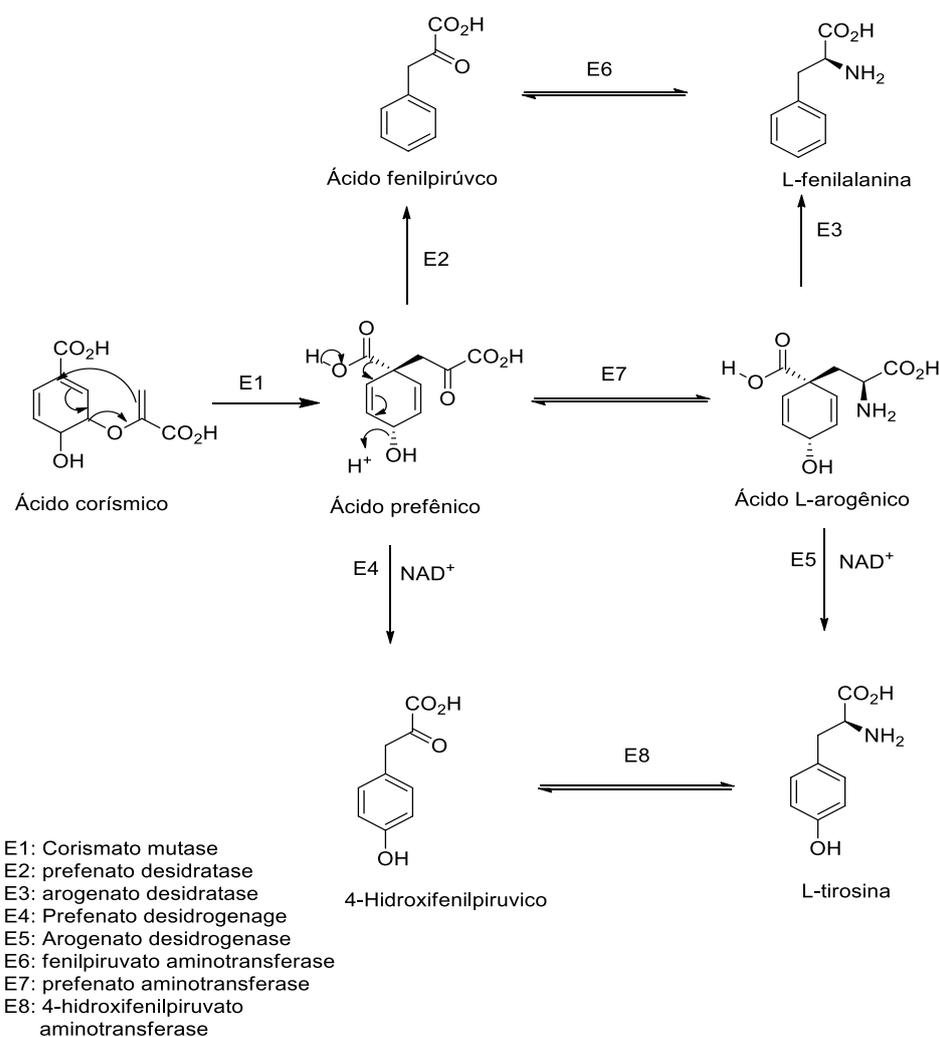
**Figura 1.** Biossíntese do ácido chiquímico a partir de PEP (fosfoenolpiruvato) e *D*-eritrose 4-fosfato (Fonte: Dewick, 2009).



A corismato mutase catalisa a primeira etapa da biossíntese da *L*-fenilalanina (precursor do ácido cinâmico) e *L*-tirosina (precursor do ácido cumárico), onde inicialmente converte o ácido corísmico à ácido prefênico, por meio de um rearranjo de Claisen. Na segunda etapa, três reações poderão ocorrer: (III) a enzima prefenato desidratase catalisa as reações de descarboxilação e desidratação levando a formação do ácido fenilpirúvico, (IV) a enzima prefenato aminotransferase catalisa a reação levando a formação do ácido *L*-aragônico, (V) a enzima prefenato desidrogenase catalisa a reação de descarboxilação produzindo o 4-hidroxifenilpirúvico. Na terceira etapa, a *L*-fenilalanina é produzida a partir do ácido fenilpirúvico mediada por fenilpiruvato aminotransferase ou a partir do ácido *L*-aragônico mediada pela enzima aragogenato desidratase. Já a *L*-tirosina é biossintetizada a partir do 4-

hidroxipirúvico mediada por 4-hidroxifenipiruvato aminotransferase ou a partir do ácido L-arogênico mediada por arogenato desidrogenase (Figura 2).

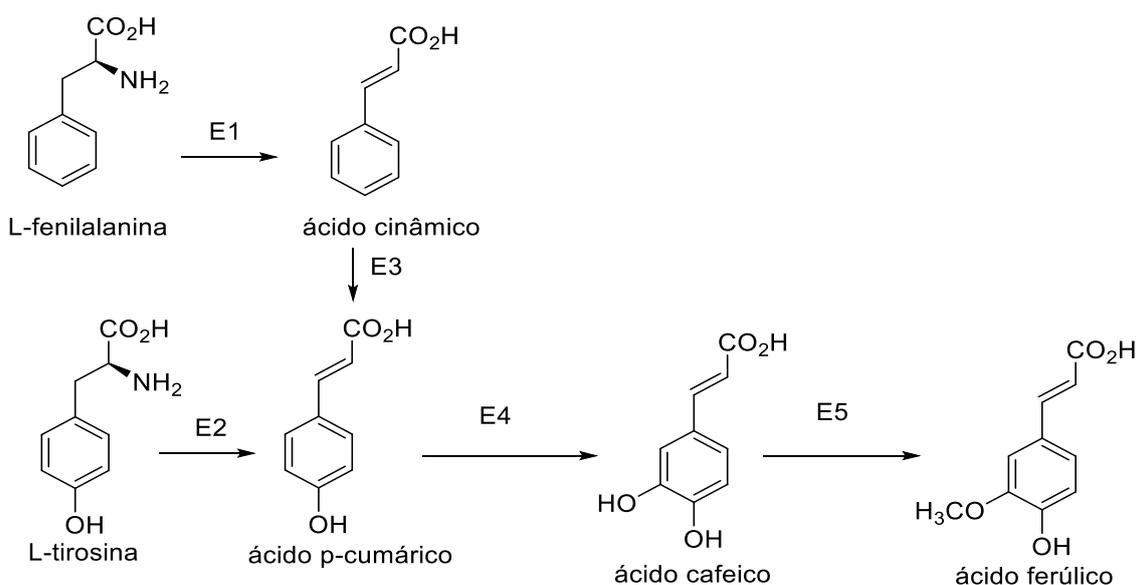
**Figura 2.** Biossíntese da L-fenilalanina e L-tirosina a partir do ácido corísmico (Fonte: Dewick, 2009).



A L-fenilalanina e L-tirosina, como blocos de construção C6C3, são precursores de uma gama ampla de produtos naturais, inclusive o ácido cumárico e derivados. O primeiro passo, partindo da L-fenilalanina, é a eliminação de amônia mediada por fenilalanina aminoníase (PAL) para gerar o ácido cinâmico. Posteriormente, a enzima cinamato 4-hidroxilase catalisa a reação de conversão do ácido cinâmico para o ácido *p*-cumárico. No entanto, algumas plantas conseguem converter a L-tirosina diretamente ao ácido *p*-

cumárico, sem a intermediação de ácido trans-cinâmico, por meio da ação da enzima tirosina amonialiase (TAL) (Figura 3). Uma vez o ácido *p*-cumárico sendo formado, este pode ser convertido ao ácido cafeico mediado por *p*-cumarato 3-hidroxilase. A enzima ácido cafeico *O*-metiltransferase catalisa a reação de metilação formando o ácido ferúlico (TZIN; GALILI, 2010). Outros compostos obtidos a partir do ácido cinâmico são obtidos por outras reações de hidroxilação e metilação, sequencialmente, construindo padrões de substituição típicos de metabólitos da via do chiquimato. A metilação é catalisada por uma enzima metiltransferase de especificidade ampla (DEWICK, 2009).

**Figura 3.** Formação dos ácidos cinâmico e *p*-cumárico a partir de aminoácidos aromáticos (Fonte: Dewick, 2009).



- E1: Fenilalanina aminoliase (PAL)  
 E2: Tirosina aminoliase (TAL)  
 E3: Cinamato 4-hidroxilase  
 E4: *p*-cumarato 3-hidroxilase  
 E5: ácido cafeico *O*-metiltransferase

### 3.3 Fungos filamentosos: sua importância e aplicações

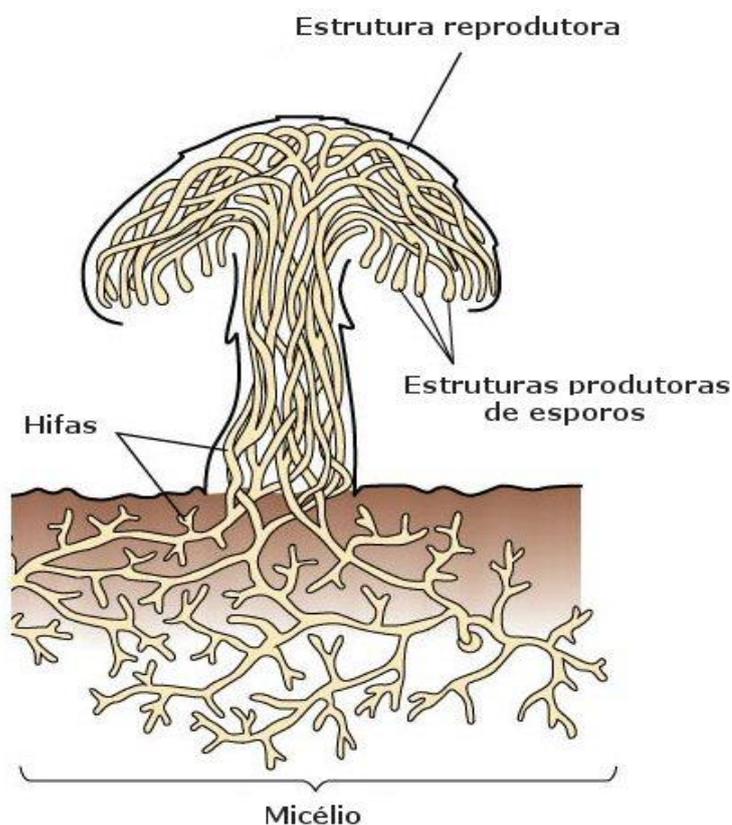
Os fungos constituem nichos ecológicos nos mais variados ambientes. Diversos compostos orgânicos e elementos químicos como carbono, hidrogênio, oxigênio, nitrogênio, fósforo e enxofre, são essenciais para a sobrevivência desses micro-organismos. A maioria é encontrada no solo, que juntamente com outros micro-organismos, participam da reciclagem e processo de remineralização dos elementos, que são essenciais para a manutenção dos ciclos biogeoquímicos (TORTORA; FUNKE; CASE, 2012).

A diversidade dos micro-organismos no solo é grande, e sua utilidade tem incentivado as pesquisas relacionadas ao isolamento de fungos a partir desse habitat, o que tem contribuído de forma significativa para o melhoramento de processos biotecnológicos com aplicações em várias áreas (MEYER et al., 2016).

Fungos se dispersam na natureza por meio do ar atmosférico, água, insetos, homem e outros animais. A eficiência dessa dispersão é relacionada à alta produção de esporos que estes possuem (TRABULSI; ALTERTHUM, 2015).

Os fungos filamentosos são micro-organismos, no qual o início do ciclo de vida pode ser marcado pelos esporos (WEBSTER; WEBER, 2007). Os esporos, para germinarem, necessitam de calor e umidade, e o resultado desta germinação é a formação de um ou mais filamentos finos, conhecidos como tubos germinativos. Estes tubos se ramificam em todos os sentidos formando uma massa filamentosa, chamada micélio, que constitui o sistema vegetativo, responsável pelo desenvolvimento fúngico e pela absorção dos alimentos, necessários para o crescimento microbiano (Figura 4). Os filamentos simples ou ramificados que formam o micélio são denominados hifas (TAKAHASHI et al., 2017).

**Figura 4.** Representação esquemática da morfologia de fungos filamentosos pertencentes ao filo Basidiomycota, cuja estrutura reprodutora constitui os cogumelos ( Fonte: CIENTIC).



Segundo Abreu e colaboradores (2015), os fungos são micro-organismos muito importantes, não somente devido ao seu papel vital no ecossistema, mas também pela sua influência exercida sobre os seres humanos. Os fungos filamentosos possuem importantes propriedades que desempenham um papel significativo no estilo de vida e no ambiente, uma vez que são utilizados na produção de alimentos, cosméticos, fármacos, e na reciclagem de diversos compostos da biosfera (ABREU et al, 2015).

Dentre um grande número de micro-organismos não patogênicos capazes de produzir enzimas úteis, os fungos filamentosos se destacam devido à sua facilidade de cultivo (produção de biomassa em curto período de tempo) e por secretarem suas enzimas diretamente no meio em que se encontram (STROPARO et al., 2012). Segundo Kavanagh (2005), os fungos filamentosos podem ser cultivados dentro do laboratório em uma variedade de meios de

cultura, sendo estes sólidos e/ou líquidos. Os fungos são importantes agentes decompositores de material orgânico, e muitos desses micro-organismos durante o processo de decomposição, atuam como produtores de enzimas de importância comercial (KAVANAGH, 2005). Eles têm a capacidade de se adaptar a novos ambientes. Estas características são essenciais para o manuseio e cultivo em grande escala, sem um alto custo (DOBLE; KRUTHIVENTI, 2007).

Santos e colaboradores (2015) comentam que entre os micro-organismos existentes, os fungos filamentosos são de grande interesse para a biotecnologia, uma vez que têm contribuído para a obtenção de produtos e processos de importância fundamental para o bem-estar da população. A biotecnologia consiste no uso de sistemas biológicos para o desenvolvimento de processos e produtos de interesse econômico ou social (AZEVEDO *apud* SILVA, 2016). Em grande escala, os fungos filamentosos são utilizados nos processos de fabricação de ácidos orgânicos, proteínas, enzimas e medicamentos, incluindo antibióticos, estatinas e esteroides (SILVA; MALTA, 2016).

Segundo Tortora, Funke e Case (2012), os processos industriais que empregam micro-organismos correspondem à otimização de reações enzimáticas já realizadas por micro-organismos, cuja a finalidade é a superprodução de bens e serviços. Madigan e colaboradores (2010) afirmam que um micro-organismo adequado no processo industrial deve atender a alguns requisitos, como: ter a capacidade de produzir a substância de interesse em altos rendimentos; crescer e sintetizar o produto em culturas de larga escala; ter crescimento rápido e sintetizar o produto desejado em período de tempo relativamente curto; ser capaz de crescer em meios de cultura líquido, disponíveis em grandes quantidades, a um custo baixo; e não deve ser patogênico, especialmente ao homem, animais, e plantas.

Em termos da Química de Produtos Naturais, é possível reconhecer que existem várias vantagens quanto à utilização dos fungos filamentosos na obtenção dos produtos naturais bioativos, pois são recursos renováveis e sua produção em escala ampliada pode ser realizada usando a tecnologia existente, como variação do meio e otimização das condições de cultivo (SANTOS et al., 2015). Nestas condições, os fungos filamentosos representam

uma fonte importante para descoberta de novos metabólitos bioativos (SILVA; MALTA, 2016).

Borges e colaboradores (2011) reconhecem que os fungos filamentosos têm sido tradicionalmente estudados no isolamento de produtos naturais, e também no uso dos mesmos como biocatalisadores para as reações de biotransformação. O isolamento dos fungos filamentosos do meio ambiente tem despertado o interesse de muitos pesquisadores. A incidência de fungos nas plantas, ocorre por infecção natural no ambiente favorecido por climas úmidos, e seu isolamento pode ser considerado como um primeiro passo para entender a origem de metabólitos secundários em plantas e as enzimas dos fungos que foram essenciais para sua produção (BORGES<sup>1</sup> et al., 2011).

Os fungos são os micro-organismos mais frequentemente estudados para a aplicação nas reações de biotransformação em suas diversas abordagens, pois eles podem produzir enzimas como lipases, invertases, lacases, proteinases, amilases, capazes de catalisar ampla variedade de reações (SILVA *apud* NASCIMENTO, 2018). Adicionalmente, os fungos filamentosos e outros micro-organismos representam uma fonte inestimável de compostos bioativos, que são explorados em vários contextos (ALBERTI; FOSTER; BAILEY, 2017).

*Aspergillus* pertence ao filo Ascomycota, no reino Fungi. Os fungos pertencentes a este gênero caracterizam-se por serem organismos filamentosos. É um dos mais importantes dentro da biotecnologia microbiana, pois a maioria apresenta resultados satisfatórios na produção de compostos de importância biotecnológica (MELO; ALVES, 2017). Os fungos filamentosos, como aqueles pertencentes ao gênero *Aspergillus*, são muito utilizados na indústria, pois são seres que possuem características úteis e vantajosas para a produção de uma diversidade de produtos e também conseguem promover a biotransformação de uma série compostos orgânicos (AFONSO, 2015).

Fungos do gênero *Aspergillus* são amplamente utilizados em biotecnologia para a produção de ingredientes alimentares ou farmacêuticos, além de enzimas industriais. Tais fungos exibem grande versatilidade metabólica, desenvolvendo-se em uma ampla quantidade de substratos e sob diferentes condições ambientais. Estes são capazes de degradar diferentes

compostos graças às suas enzimas que realizam reações como oxidações, hidroxilações e desmetilações (PEL et al., 2007).

Francisco (2017) comenta que muitas espécies de *Aspergillus* sp. são utilizadas na biotecnologia para a produção de vários metabólitos tais como antibióticos, ácidos orgânicos, enzimas, medicamentos, ou como fermentadores na indústria alimentar.

Fungos do gênero *Trametes* pertencem ao filo Basidiomycota, no reino Fungi. Usam a celulose e a hemicelulose como substrato para seu crescimento e a degradação da lignina ocorre durante o metabolismo secundário, quando há escassez de nutrientes ou situações de estresse (SILVA et al., 2012).

A lignina é um polímero aromático de origem natural, considerado após a celulose, o composto mais abundante no meio ambiente. Compreende cerca de 20–35 % da massa seca da parede celular vegetal, dependendo da fonte de biomassa (ZUCCHI, 2016). A lignina é predominantemente concentrada na parede celular. Ela envolve a celulose e hemicelulose através de estruturas de rede de lignina-carboidratos, que fornecem rigidez às paredes celulares e protege os polissacarídeos contra a degradação microbiana. Como um polímero hidrofóbico, a lignina também serve como uma barreira contra a penetração de água nos tecidos vegetais (CHRISTOPHER; JI, 2014).

*Trametes versicolor* é um fungo descrito como “podridão branca”, que promove a degradação da madeira e conseqüentemente, recicla os minerais e nutrientes para si e para os outros organismos no ecossistema (ERDEM; CIHANGIR, 2017). Uma vez que este fungo e suas enzimas apresentam estas características, os estudos são ampliados e suas aplicações tornam-se mais intensas, podendo estes serem utilizados como alternativa ao branqueamento químico da pasta de papel, na indústria têxtil para remoção de cor, no tratamento de efluentes industriais e na biorremediação de uma série de poluentes orgânicos (ALVES, 2010). O gênero *Trametes* representa uma fonte rica de compostos nutritivos com importantes propriedades farmacológicas, como antioxidantes, anti-inflamatórias e anti-cancerígenas. No entanto, fatores genéticos, período de colheita, localização geográfica, condições climáticas, entre outros, estão influenciando a biossíntese de compostos bioativos, e sua concentração (POP et al., 2018).

### 3.4 A enzima lacase

O uso de enzimas tem grande aplicação no campo industrial e tem ganhado destaque nos últimos anos. Segundo Baptista e colaboradores (2012) as enzimas são biocatalisadores utilizados em diferentes setores industriais, podendo ser empregadas em estudos da biologia molecular, aplicações biomédicas, no desenvolvimento de metodologias analíticas e no tratamento de resíduos. Muitas dessas enzimas estão distribuídas na natureza, a exemplo das lacases, que correspondem ao sistema enzimático mais antigo estudado. As lacases são amplamente distribuídas na natureza e estão presentes em fungos, plantas e insetos, tendo sido recentemente descobertas em bactérias (RAJESWARI; BHUVANESWARI, 2016).

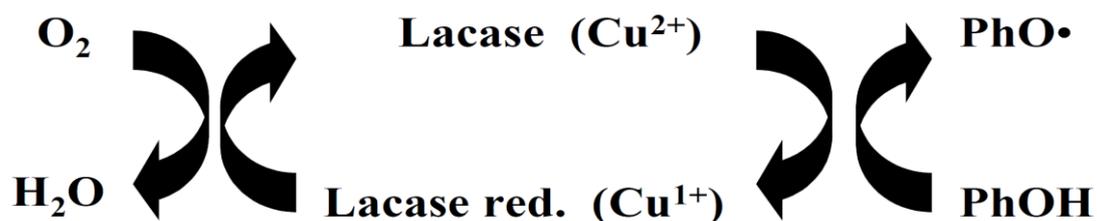
As lacases apresentam isoformas, ou seja, diferentes formas moleculares com alterações na sequência de aminoácidos, mas que catalisam as reações com os mesmos substratos (MALONE *apud* MEDRADO, 2018). Existem estudos relacionados com as isoformas da lacase que permitiram identificar que diferentes cepas, condições de cultivo, estado fisiológico do micro-organismo e, principalmente, a presença de algum indutor no meio de cultura, podem influenciar nas isoformas de lacase que serão produzidas (BERTRAND et al., 2013).

A lacase (E.C. 1.10.3.2), é uma polifenol oxidase que possui átomos de cobre em seu sítio ativo, e desempenha um papel fundamental na degradação da lignina na natureza, e seu estudo foi realizado pela primeira vez em plantas no final do século XIX (SUN et al., 2012). Esta pode oxidar substratos ricos em elétrons, de origem fenólica e não fenólica, com uma redução concomitante de oxigênio em água, levando à formação de radicais livres (MEKMOUCHE *apud* MATE e ALCADE, 2016). As reações catalisadas por lacases usam o ar como agente oxidante, sendo o oxigênio o constituinte responsável pela oxidação (RIVA, 2006).

Para Stoilova, Krastanov e Stanchev (2010), durante a reação, a lacase utiliza o oxigênio para oxidar várias substâncias aromáticas, entre elas estão os fenóis, aminofenóis, polifenóis, *o*-fenóis, *p*-fenóis, arildiaminas, entre outras.

O sítio ativo da lacase é formado por quatro átomos de cobre, sendo estes divididos em três grupos (Figuras 5 e 6), que refletem seus diferentes papéis durante o processo enzimático (DÚRAN *apud* BATISTA, 2009). O ciclo catalítico da lacase compreende três etapas principais: (a) redução do cobre T1 pelo substrato, (b) a transferência de elétrons do cobre T1 para os cobres T2 e T3, e (c) a redução do oxigênio molecular levando a formação da água através de sua interação com os cobres T2 e T3 (DÚRAN *apud* BATISTA, 2009). Essas enzimas catalisam a oxidação de quatro moléculas de substrato redutor, concomitantes à redução de quatro oxigênios moleculares em água.

**Figura 5.** Representação esquemática do ciclo catalítico da lacase (Fonte: Ferraz *apud* Silva, 2006).

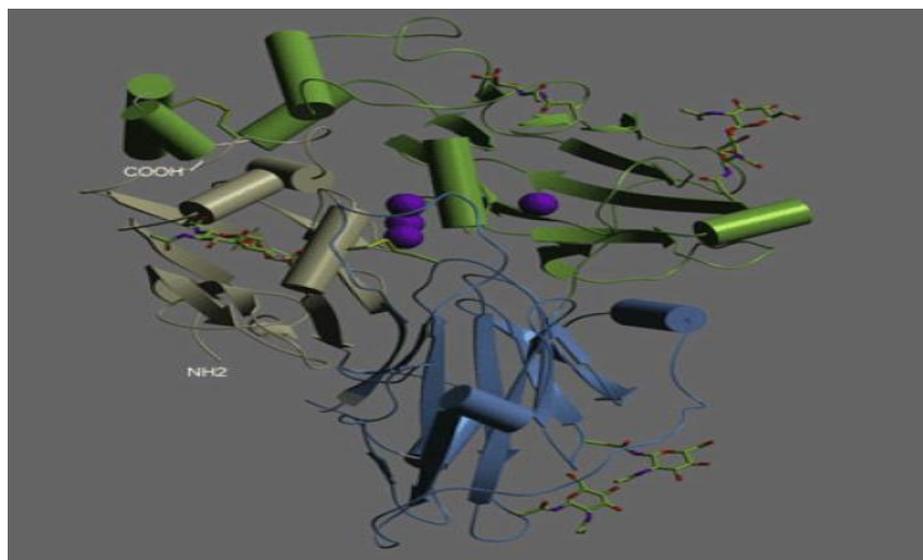


A lacase, apresenta capacidade oxidativa não-específica e pode ser obtida em altos rendimentos em culturas de micro-organismos (GIARDINA et al., 2010). Em fungos, as lacases são responsáveis pela produção de pigmentos, degradação de lignina, esporulação e degradação de vários xenobióticos, isto é, fenóis, diaminas, benzenotiois e compostos similares (MORENO et al., 2017).

A produção de lacase depende de vários fatores, como a disponibilidade de carbono e nitrogênio, as fontes desses nutrientes e suas concentrações no meio de cultivo (FABRINI et al., 2016). Para Valle (2012), a produção de lacases por fungos é influenciada por numerosos parâmetros como a espécie utilizada na fermentação, a natureza do substrato, faixa de pH, temperatura, a técnica de fermentação, agitação, aeração, o tempo de cultivo e a

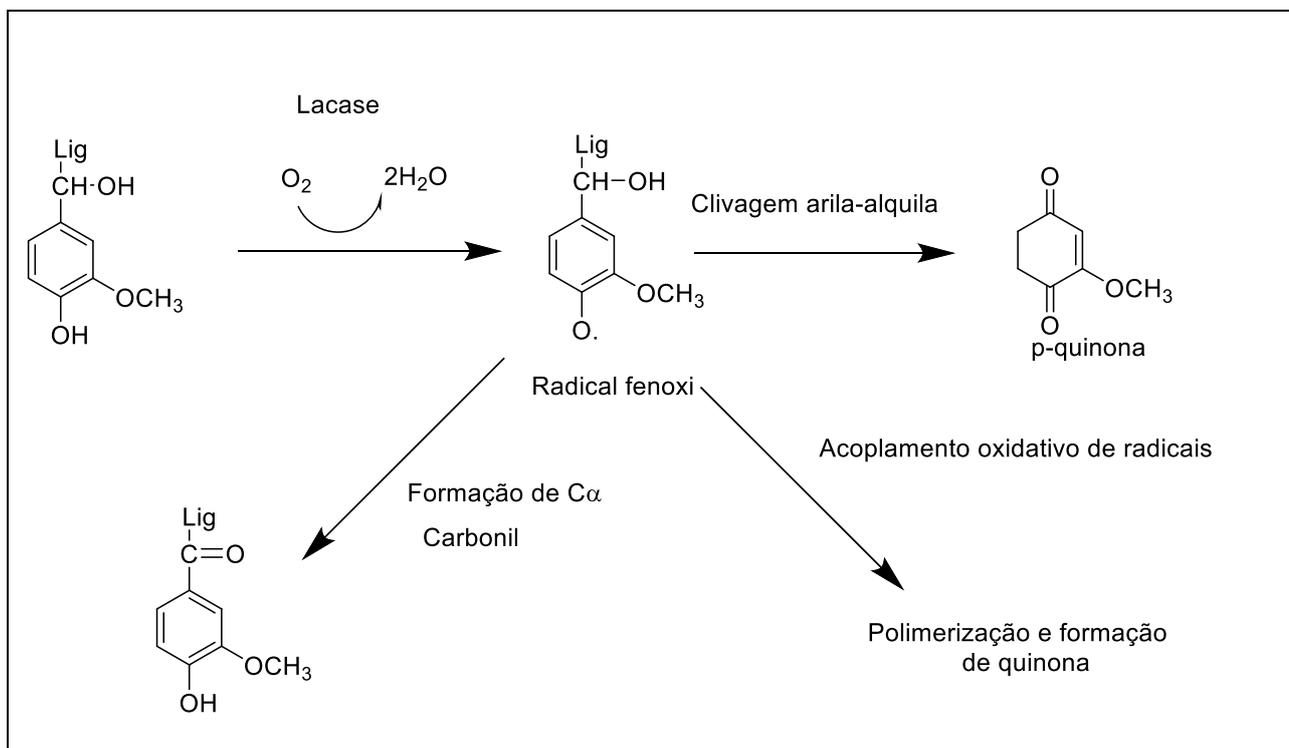
concentração de indutores (GALHAUP *apud* VALLE, 2012). As lacases fúngicas possuem massa molecular de 50-190 kDa, ponto isoeletrônico (pI) de 3,2-7,5 e temperatura ótima de 20-80°C (MOROZOVA *apud* BATISTELA, 2011). Na presença de mediadores, lacases fúngicas exibem uma faixa de substratos e podem então oxidar compostos com potencial redox superior a seus próprios (PIONTEK et al., 2002). As pesquisas realizadas ao longo dos anos, apontam o fungo *Trametes versicolor* como um excelente produtor de lacase (WANG et al., 2012). Por ser o sistema enzimático mais antigo estudado, existem propostas consistentes sobre o sítio ativo da lacase de *Trametes versicolor* (Figura 6), em termos dos domínios, da presença de cofatores e resíduos de aminoácidos (PIONTEK *apud* TAVARES, 2006).

**Figura 6.** Estrutura tridimensional da lacase de *Trametes versicolor*, na qual são apresentados três domínios (T1, T2 e T3) em cores diferentes. Os átomos de cobre são as esferas violetas e a porção de hidrato de carbono são os modelos em bola-e-bastão. A parte cinzenta é o N-terminal e a verde o C-terminal. O sítio T1 é a esfera isolada (Fonte: Piontek *apud* Tavares, 2006).



Os basidiomicetos de podridão branca são os mais eficientes degradadores de lignina. Entre as enzimas envolvidas na degradação da lignina está a lacase, que catalisa reações de oxiderredução, oxidando os compostos fenólicos à radicais fenóxi. Os diferentes graus de degradação da lignina em relação a outros componentes da madeira dependem das condições ambientais e das espécies de fungos envolvidas (CHRISTOPHER; JI, 2014). Em termos de reações químicas que justificam a formação de compostos de origem natural a partir da lignina mediadas por lacase, é possível entender que não existe apenas um mecanismo para alcançar o processo de degradação da lignina e que as enzimas dos vários micro-organismos são distintas (KUNAMNENI et al., 2007). Em termos gerais, a oxidação do substrato fenólico pela lacase gera um radical livre. O intermediário formado (fenóxi) é tipicamente instável e pode sofrer uma segunda reação produzindo compostos com estruturas mais complexas como polímeros, por meio de acoplamento oxidativo de radicais, ou a lacase pode clivar algumas ligações e levar a formação de compostos com estruturas mais simples (Figura 7).

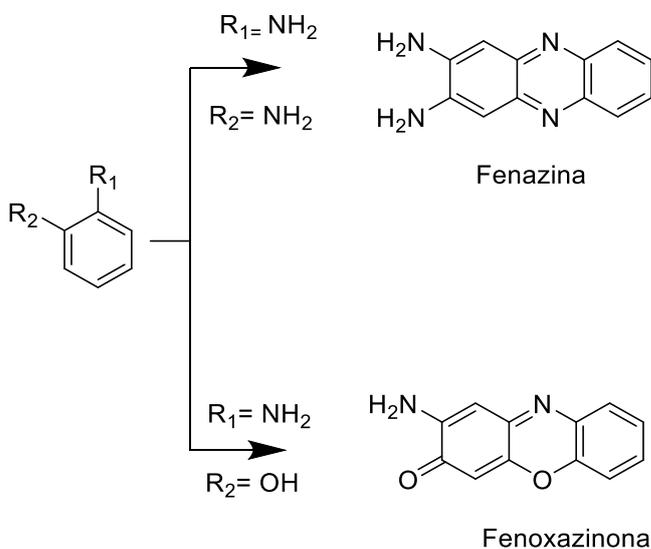
**Figura 7.** Representação esquemática da oxidação de grupos fenólicos de ligninas pela lacase (Fonte: Alves, 2010).



As lacases têm sido amplamente investigadas, devido às diversas aplicações biotecnológicas, como descoloração de corantes têxteis, desintoxicação de resíduos, e aplicações de biorremediação de solos contaminados (MONSSEF et al., 2015), tratamento de efluentes industriais, produção de etanol, clarificação de vinhos e chás e produção de biossensores (WHITELEY *apud* BROILO, 2014). Por exemplo, na biorremediação, as lacases são utilizadas para detectar traços de contaminantes orgânicos incluindo compostos farmacologicamente ativos, produtos químicos industriais, pesticidas, hormônios naturais e artificiais, os quais têm sido alvo de preocupação devido aos seus efeitos potenciais na saúde humana e no ecossistema (NGUYEN et al., 2016).

Outro exemplo de aplicação da lacase foi demonstrado por Sousa e colaboradores (2014), no qual por meio da reação de biotransformação empregando *Trametes versicolor*, foi possível obter fenazina e fenoxazinona (Figura 8), que são compostos que possuem atividades biológicas promissoras como antitumorais e antimicrobiana. Além disso, podem ser usados também como pesticidas, e no desenvolvimento de biossensores e de semicondutores.

**Figura 8.** Obtenção de fenazina e fenoxazinona empregando biotransformação por *T. versicolor* (Sousa et al., 2014).



Dessa forma, de acordo com o que foi exposto na presente seção, micro-organismos que sejam fontes de lacase, uma vez utilizados em processos de biotransformação, poderão mediar reações de oxirredução, levando a formação de derivados, que dependendo de seu potencial biológico, poderão servir como protótipos para novos fármacos, e para diversas outras aplicações químicas ou agroquímicas.

### 3.5 Biotransformação

A natureza é responsável pela maior fonte de inspiração para a síntese de substâncias bioativas. Muitas vezes, estas substâncias precisam passar por transformações estruturais, para que seus efeitos farmacológicos sejam potencializados, e as toxicidades sejam minimizadas, ou ainda para melhorar suas propriedades físico-químicas (CSEKE et al., 2006).

A biotransformação tem sido considerada uma área promissora de pesquisas voltadas para o desenvolvimento de novas tecnologias e processos sustentáveis, e para a produção de moléculas bioativas com alta eficiência (ROMAGNOLO et al., 2013). Biotransformações são definidas como o uso de sistemas biológicos para realizar transformações químicas em substâncias que não constituem seus substratos naturais (HANSON *apud* PALUDO, 2013). Estes processos permite substituir a síntese orgânica tradicional (SCALVENZI, 2012). Por outro lado, Borges e colaboradores (2009) comentam que nas reações de biotransformação, um determinado composto é modificado pela transformação de grupos funcionais, com ou sem a degradação de seu esqueleto carbônico.

As características mais promissoras envolvendo os processos de biotransformação são as possibilidades de obtenção de produtos por meio de reações regioespecíficas e estereoespecíficas, por processos realizados nas condições normais de temperatura e pressão. Além disso, as reações de biotransformação permitem potencializar os efeitos das moléculas bioativas já

conhecidas (GIRI *apud* SCALVENZI, 2012). Sousa e colaboradores (2018) afirmam que a biotransformação também pode originar metabólitos potencialmente mais ativos que as substâncias originais.

Cseke e colaboradores (2006) apresentam outros benefícios que as reações de biotransformação oferecem, quando comparada com a síntese química tradicional, como o surgimento de rotas alternativas mais eficientes e econômicas para obtenção de compostos orgânicos, a capacidade de produção de moléculas que são difíceis de serem obtidas por processos tradicionais, a capacidade dos micro-organismos, por exemplo, fungos filamentosos, produzirem grandes quantidades de biomassa e uma grande variedade de enzimas em tempo relativamente curto. Micro-organismos têm grande potencial para induzir novos sistemas enzimáticos capazes de converter substratos complexos (CSEKE et al., 2006).

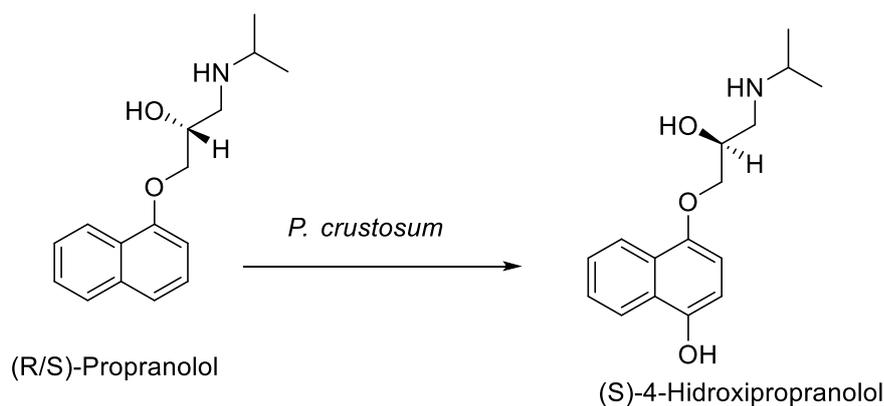
Segundo Ratledge e Kristiansen (2006), a utilização de micro-organismos nos processos de biotransformação, pode contribuir para a redução do impacto ambiental. Uma vez utilizados como biocatalisadores, existe a possibilidade de minimização do uso de reagentes químicos e solventes orgânicos, e do consumo de energia, o que torna o processo sustentável e de acordo com os preceitos da Química Verde. Além disso, a transformação microbiana é rápida, eficiente, econômica e ecologicamente correta (SINGAB et al., 2018).

Quando as enzimas de micro-organismos catalisam a transformação de um substrato, elas podem distinguir entre diferentes estereoisômeros ou orientações diferentes de compostos pró-quirais, meso (estereosseletividade), entre diferentes grupos funcionais (quimiosseletividade), ou entre grupos funcionais que são quimicamente idênticos, mas situado em posições diferentes da mesma molécula (regiosseletividade). As transformações estereosseletivas empregando enzimas, são altamente desejáveis na síntese orgânica, pois evitam etapas de reações adicionais, associadas à proteção e/ou desproteção de grupos funcionais, resultando em processos mais simples, econômicos, e sustentáveis (MONTEIRO et al., 2018).

Um exemplo de reação estereosseletiva, pode ser visto no trabalho Borges<sup>2</sup> e Bonato (2011), no qual apresentam a biotransformação do (*R*)-*Propranolol* por *Penicillium crustosum* (Figura 9). Os resultados obtidos

mostram que as enzimas do fungo filamentososo utilizado converteram o substrato preferencialmente no enantiômero S, descrito pelos autores como o metabólito mais ativo.

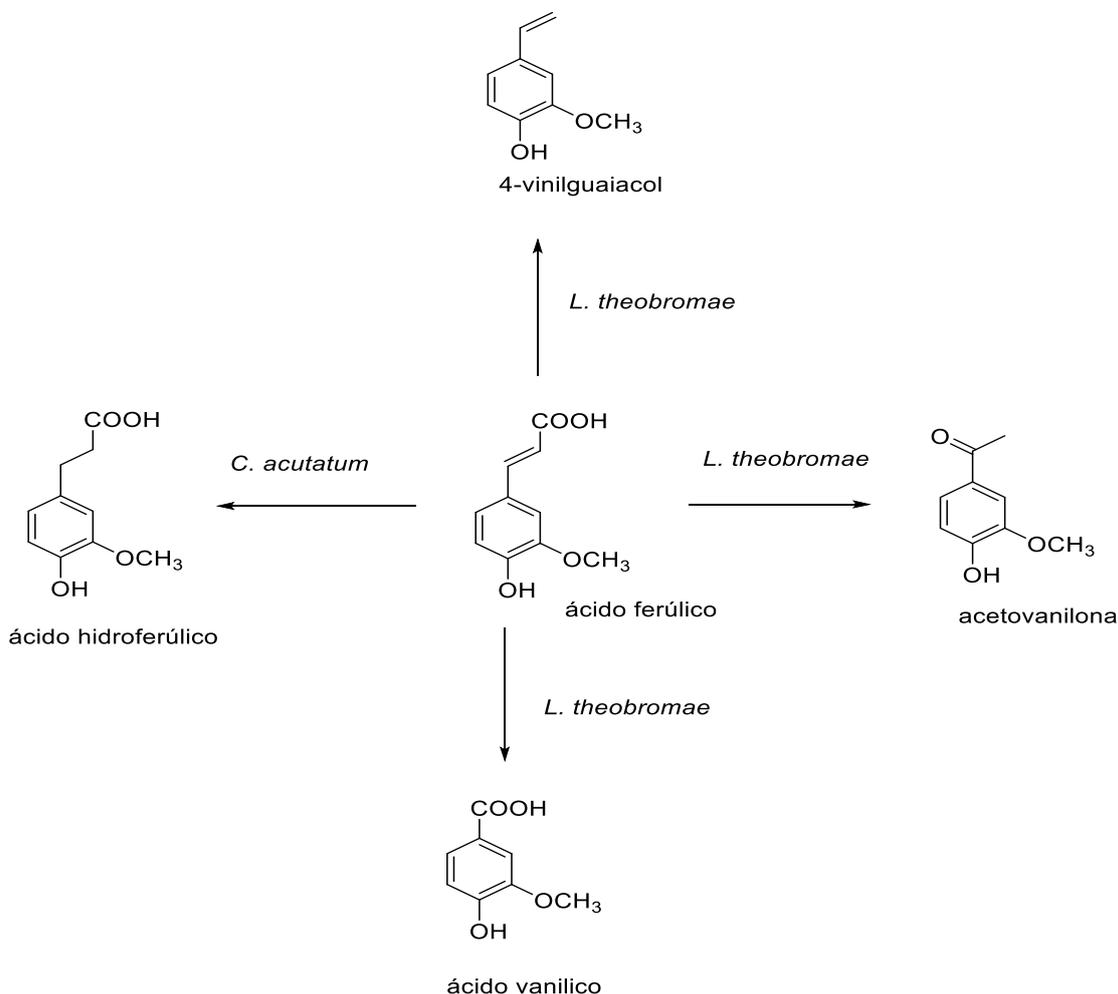
**Figura 9.** Biotransformação do (R)-Propranolol por *P. crustosum* (Fonte: Borges<sup>2</sup> e Bonato, 2011).



Processos de biotransformação tornaram-se uma alternativa economicamente competitiva para a modificação de compostos químicos para as indústrias químicas fina, farmacêutica e agroquímica (NASCIMENTO, CONCEIÇÃO; SILVA, 2019).

Uma variedade de reações por enzimas fúngicas, como hidroxilação, hidrogenação e descarboxilação, foram observadas no trabalho de Numpaque e colaboradores (2016), no qual apresentam a biotransformação do ácido ferúlico, utilizando duas linhagens de fungos filamentosos. Segundo os autores, a biotransformação do ácido ferúlico por *Colletotrichum acutatum* e por *Lasiodiplodia theobromae* (Figura 10) oferece uma alternativa mais econômica para a produção de derivados que possuem aromas e fragrâncias, que podem ser amplamente utilizados em indústrias de alimentos, bebidas e cosméticos.

**Figura 10.** Derivados obtidos a partir da biotransformação de ácido ferúlico por *C. acutatum* e *L. theobromae* (Fonte: Numpaque et al., 2016).



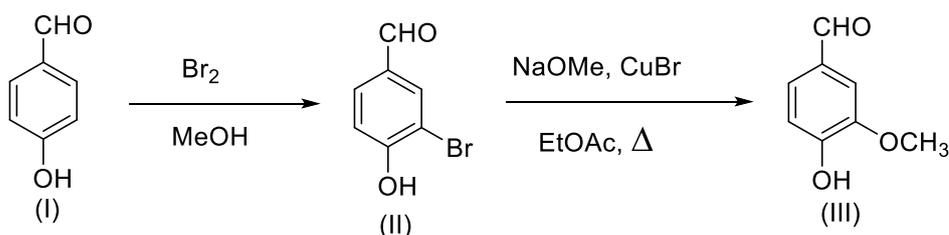
As reações de biotransformação correspondem a uma das ferramentas da Química Verde, que são constantemente utilizadas na Química Orgânica (CORTEZ; CASTRO; ANDRADE, 2016). Em termos de Química Verde, Doble e Kruthiventi (2007) afirmam que o uso de enzimas de micro-organismos é sem dúvida uma escolha ideal para obtenção de produtos químicos considerados “verdes”.

Kumar e colaboradores (2012) propuseram uma síntese para obtenção da vanilina (III), cujo reagente de partida é o 4-hidroxibenzaldeído (I). Esta síntese envolve a bromação eletrofílica do 4-hidroxibenzaldeído, a qual é catalisada por cobre. Este método ocorre em duas etapas: a bromação de 4-hidroxibenzaldeído (I) para formar o 3-bromo-4-hidroxibenzaldeído (II), e na

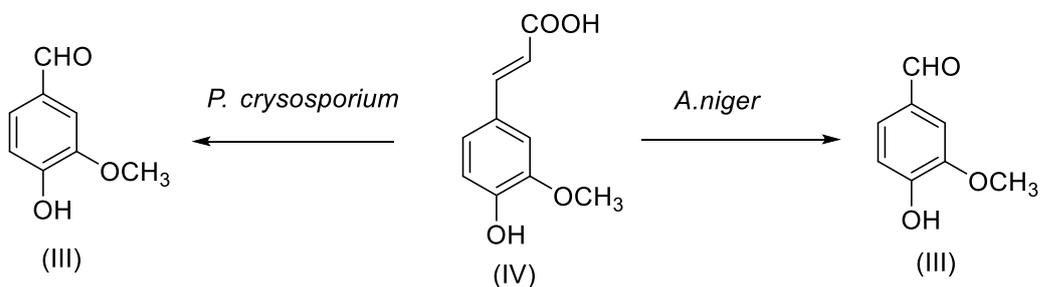
segunda etapa, o bromo é substituído pelo grupo metoxila na presença de catalisador e sob condições de aquecimento. Uma alternativa para obtenção da vanilina (III) foi descrita por Motedayen e colaboradores (2013), que corresponde a biotransformação do ácido ferúlico empregando duas linhagens de fungos filamentosos: *Aspergillus niger* e *Phanerochaete cryosporium*, no qual as reações ocorreram em única etapa (Figura 11).

**Figura 11.** (a) Síntese química tradicional para obtenção da vanilina. (b) Biotransformação do ácido ferúlico por *Aspergillus niger* e *Phanerochaete cryosporium* gerando vanilina (Fonte: Kumar et al., 2012; Motedayen et al., 2013).

(a) Método tradicional



(b) Biotransformação

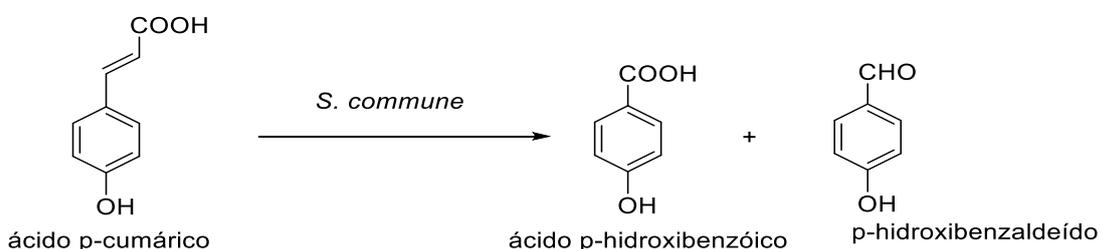


Ambos métodos descritos na Figura 11, foram utilizados para obtenção do mesmo produto (vanilina), o qual é largamente utilizado em alimentos, bebidas, perfumes e fármacos, devido a suas atividades antioxidante e antimicrobiana (PACHECO; DAMASIO, 2010). Pode-se perceber que o método tradicional requer um maior número de etapas, uso de catalisadores, reagentes

e aquecimento para sua produção. Já a biotransformação requer apenas o substrato, o micro-organismo para atuar como biocatalisador, e o processo ocorre à temperatura ambiente. As enzimas são catalisadores biológicos eficazes que ao serem utilizadas em muitas reações, apresentam vantagens se comparados aos processos químicos tradicionais. Estas reações podem ser realizadas em temperatura ambiente e sob pressão atmosférica, o que em muitos casos evitam a formação de subprodutos provenientes de reações de isomerização e de rearranjos (GONÇALVES; MARSAIOLI, 2013). Nestas condições, é possível reconhecer que a biotransformação é um método alternativo promissor para obtenção de derivados, obedecendo aos princípios da Química Verde.

Sachan e colaboradores (2014) estudaram a biotransformação do ácido cumárico por *Schizophyllum commune*, que permitiu a formação do ácido *p*-Hidroxibenzóico (Figura 12). Este possui propriedades biológicas, como antioxidantes, antimicrobiano, antidiabético. Além disso, pode ser utilizado como conservante para cosméticos e alimentos e também como monômero para polímeros de cristais líquidos, usados atualmente em vários dispositivos eletrônicos.

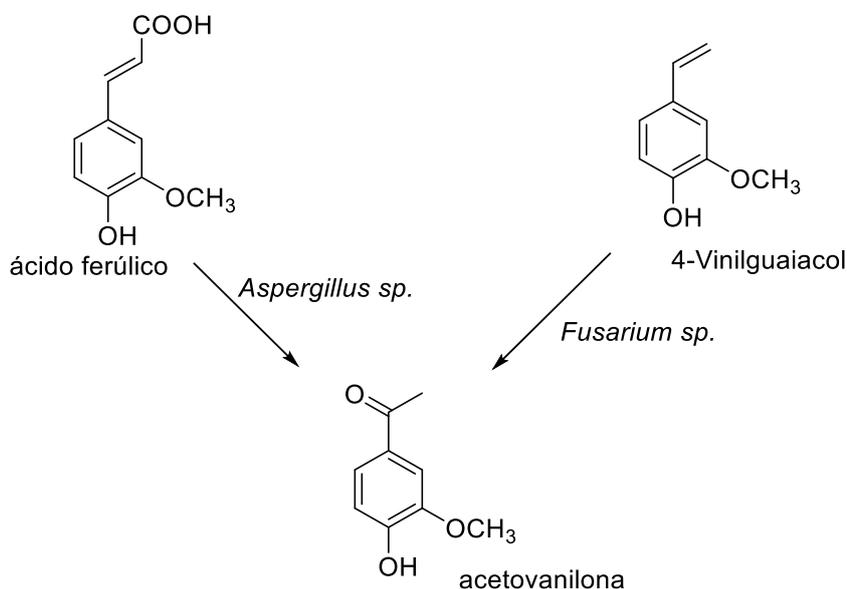
**Figura 12.** Biotransformação do ácido cumárico por *Schizophyllum commune* (Fonte: Sachan et al., 2014).



A literatura indica que a acetovanilona tem uma ampla gama de aplicações, principalmente na produção de fármacos. A acetovanilona, uma vez obtida, poderá ser eficaz no tratamento de várias doenças inflamatórias, como colite e aterosclerose. Mabinya e colaboradores (2010) apresentam a biotransformação de substratos diferentes, utilizando duas linhagens de fungos

filamentosos, que levaram a formação da acetovanilona (Figura 13). Os autores comentam que a importância deste estudo, está na obtenção da acetovanilona, por meio do processo alternativo à síntese química tradicional, além contribuir para a compreensão da via biossintética, utilizando fungos, que levaram à produção de acetovanilona a partir do ácido ferúlico.

**Figura 13.** Biotransformação do ácido ferúlico por *Aspergillus sp.* e *Fusarium sp.* (Fonte: Mabinya et al., 2010).

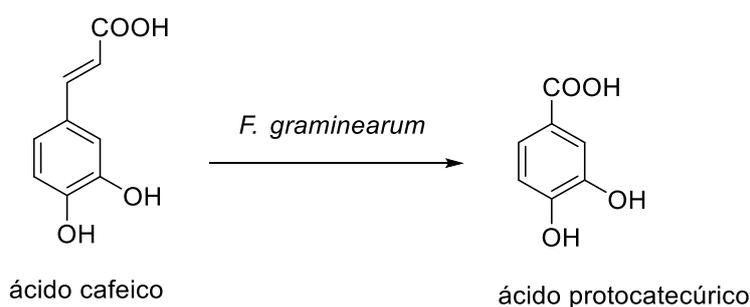


O ácido cafeico é um metabolito secundário natural produzido por muitas espécies de plantas. Devido à alta versatilidade química, o ácido cafeico pode potencialmente servir como um promissor material de partida (SINGAB et al., 2018). Semaming e colaboradores (2015) comentam que o ácido cafeico e alguns de seus derivados possuem propriedades antifúngica e antiviral.

O ácido protocatecúrico pode ser obtido a partir do ácido cafeico, cuja alternativa para sua obtenção é vista no trabalho de Gauthier e colaboradores (2016), no qual apresentam a biotransformação do ácido cafeico empregando *Fusarium graminearum* (Figura 14). O ácido protocatecúrico apresenta interessantes propriedades farmacológicas, como antioxidante, anti-

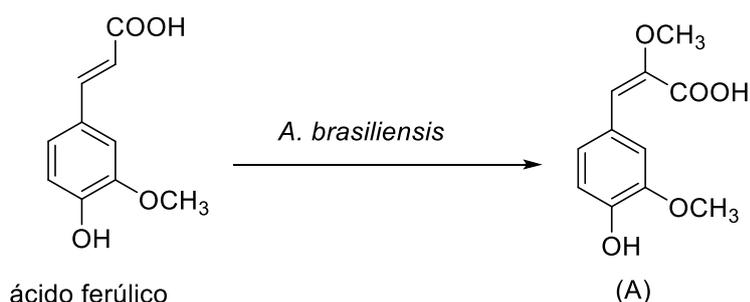
inflamatório, anti-hiperglicemia, antimicrobianas (SEMAMING et al., 2015), antibacteriana, anticancerígena, antiúlcera, antiviral, analgésica (KAKKAR; BAIS, 2014), o que torna viável a sua produção.

**Figura 14.** Biotransformação do ácido cafeico por *Fusarium graminearum* (Fonte: Gauthier et al., 2016).



Rodrigues e colaboradores (2019), apresentaram a biotransformação do ácido ferúlico por *Aspergillus brasiliensis* ATCC 16404 (Figura 15). Os resultados obtidos mostraram que o fungo filamentososo utilizado converteu o substrato em um derivado inédito (A) com a adição específica do grupo metoxila no carbono  $\alpha$  carbonílico, demonstrando a regioespecificidade da reação. Levando-se em consideração a importância do sistema  $\pi$ -conjugado para a atividade antioxidante, a derivatização do ácido ferúlico e a manutenção da insaturação da cadeia lateral consistiu em um método valioso.

**Figura 15.** Biotransformação do ácido ferúlico por *Aspergillus brasiliensis* ATCC 16404 (Fonte: Rodrigues et al., 2019).



Os trabalhos encontrados apresentam a biotransformação como um processo alternativo para obtenção de derivados a partir de substâncias fenólicas, empregando fungos filamentosos. Sabe-se que muitos metabólitos secundários fenólicos biossintetizados pela via do chiquimato das plantas, podem ser obtidos por meio do emprego de técnicas fitoquímicas clássicas. Porém, em muitos casos, os processos para sua aquisição são demorados e as quantidades obtidas não são atrativas.

Outra abordagem empregada na obtenção de metabólitos secundários de interesse consiste no emprego da síntese orgânica, cujas desvantagens estão na utilização de muitos reagentes tóxicos, na necessidade de trabalhar a altas pressões e a impossibilidade de realização de certas rotas biomiméticas. Os descartes destes reagentes de forma incorreta, podem contribuir também para os impactos ambientais. Então, o uso dos processos de biotransformação confere uma alternativa viável para a obtenção de análogos de compostos fenólicos, uma vez que utilizam micro-organismos como biocatalisadores de reações químicas, eliminando o uso de reagentes tóxicos, além de proporcionarem a obtenção de produtos com alta seletividade, bons rendimentos, e obedecendo aos princípios da Química Verde.

### **3.6 Acoplamento Molecular**

A descoberta de novos fármacos representa um desafio para a química orgânica (sintética e de produtos naturais), uma vez que os processos de pesquisas e desenvolvimento nessa área são considerados complexos, demorados e de alto custo (BARREIROS, 2008). Por outro lado, as técnicas computacionais têm sido frequentemente utilizadas em associação aos processos químicos, visando complementar os estudos experimentais, bem

como melhorar/direcionar os resultados no que diz respeito aos planejamentos racionais de novos fármacos (BAI et al., 2018).

Nos anos 80, a modelagem molecular tornou-se uma ferramenta essencial para a descoberta de fármacos. Investigações envolvendo os modos de ligação do ligante, o reconhecimento molecular e as interações que estabilizam o complexo ligante-receptor passaram a ser realizadas e empregadas na otimização da descoberta de compostos bioativos.

As pesquisas na área de química farmacêutica e medicinal, incorporaram com sucesso uma grande variedade de métodos de ancoragem molecular, contando com uma variedade de programas para o planejamento de fármacos, com a finalidade de estudar os sistemas químicos complexos (PARVATHI et al., 2016). A integração de estratégias computacionais e experimentais têm sido de grande valor na identificação e desenvolvimento de novos compostos bioativos (FERREIRA et al., 2015). Coleman e colaboradores (2013) afirmam que modelagem molecular consiste em um conjunto de ferramentas úteis para a construção, edição, visualização, análise e armazenamento de sistemas moleculares complexos.

A modelagem molecular, além de permitir a visualização tridimensional (3D) do complexo ligante-receptor, também fornece informações e parâmetros essenciais sobre a interação adequada do ligante no sítio receptor. Esta ferramenta também tem o potencial de planejar teoricamente novas moléculas que satisfaçam as propriedades eletrônicas e estruturais, que resultem em um perfeito encaixe no sítio receptor (RODRIGUES, 2001). Atualmente, a modelagem molecular tem sido uma ferramenta indispensável não somente no processo de descoberta de novos fármacos, mas também na otimização de protótipos já existentes e no planejamento racional de candidatos a fármacos (ANDRADE, 2010).

No campo da modelagem molecular, o *docking* ou acoplamento molecular é uma técnica computacional que permite investigar as possíveis conformações e orientações que uma molécula pode assumir no interior do sítio ativo de um biorreceptor, ou ainda permite o desenvolvimento de estudos envolvendo interações proteína-proteína, caracterizando o *docking* macromolecular (SILVA, 2007).

O conhecimento da conformação e da orientação preferencial de uma molécula, por sua vez, pode ser usado para prever a afinidade de ligação entre duas moléculas, usando funções de pontuação, bem como o potencial da atividade biológica da molécula analisada. O acoplamento molecular tenta mimetizar o processo natural de interação do ligante e seu receptor, resultando na predição do complexo de menor energia (DAHLSTROM, 2015).

O acoplamento molecular entre duas moléculas é considerada como um sistema complexo. Isso pode ser explicado pela existência de muitas forças que estão envolvidas nas interações intermoleculares: interações hidrofóbicas, de Van der Waals, interações de emparelhamento entre aminoácidos, ligações de hidrogênio e forças eletrostáticas (PIMENTEL; BUENO, 2016).

O processo de acoplamento molecular envolve duas etapas básicas: (I) previsão da conformação e orientação da molécula no sítio ativo do receptor, e (II) a previsão da afinidade de ligação do complexo receptor-ligante, que corresponde à energia livre de ligação (MENG et al., 2011).

Quanto à avaliação da conformação mais adequada da molécula no sítio ativo, os parâmetros estruturais como rotação da ligação, mudança nos ângulos, tensões torcionais ou diédricas das ligações, graus de liberdade translacional e rotacional, cálculos correspondentes à energia estérica, decorrente da sobreposição espacial de átomos não-ligados, são modificados em incrementos. O resultado mais aceitável converge para a solução energética mínima (ANDRADE, 2010).

Os métodos de busca no banco de dados, geram uma grande quantidade de conformações do ligante durante o acoplamento molecular. As funções de pontuação são combinadas aos métodos de busca para avaliar a qualidade destas conformações de forma a ordená-las de acordo com a sua afinidade pelo receptor. Estas funções de pontuação são modelos matemáticos, geralmente lineares, que são formados por diferentes termos relacionados às propriedades físico-químicas envolvidas na interação da molécula ligante com o sítio ativo (VERLI, 2014).

As funções de pontuação são divididas em três grupos que são descritos como: campo de força, empírico e funções do conhecimento. As funções de pontuação baseadas no campo de força criam uma representação física do sistema estudado, estimam a energia de ligação, somando as contribuições do

comprimento da ligação e tensão torcional, e as interações eletrostáticas, de van der Waals e ligação de hidrogênio. Nas funções de pontuação empírica, cada termo da função descreve um tipo de evento físico, envolvido na formação do complexo ligante-receptor. Esses eventos incluem ligações de hidrogênio, interações iônicas e apolares, bem como efeitos de dessolvatação e entropia, e são ajustados de forma a reproduzir os dados experimentais de afinidade de ligação de forma mais precisa. E por fim, as funções de pontuação baseadas em conhecimento, que utilizam informações vindas de estruturas determinadas experimentalmente, para se basear e criar possíveis geometrias assumidas pelos ligantes no sítio ativo (OLIVEIRA *apud* SOUZA, 2015). Segundo Coleman e colaboradores (2013), um maior o número de parâmetros físico-químicos avaliados, resultará na maior a precisão da função de avaliação.

Um ligante pode ter sua orientação variada no sítio ativo através de movimentos de translação e rotação (graus de liberdade translacionais e rotacionais). Além destas modificações, a presença de ângulos diedrais rotacionais (ligações químicas simples) do ligante correspondem aos graus de liberdade conformacionais (COLEMAN et al., 2013).

Pimentel e Bueno (2016) descrevem que a flexibilidade das moléculas é considerada de maneira variada pelos diversos métodos de acoplamento molecular. Três principais estratégias são utilizadas: (I) a proteína é considerada rígida, e apenas os graus de liberdade translacionais e rotacionais do ligante são considerados, ou seja, o ligante é fixado em uma conformação rígida; (II) a proteína é considerada rígida, mas todos os graus de liberdade do ligante (translacionais, rotacionais e conformacionais) são levados em conta; (III) a proteína é considerada totalmente ou parcialmente flexível, e todos os graus de liberdade do ligante também são considerados.

Nas metodologias que utilizam a estratégia (I) é possível considerar a flexibilidade do ligante através da construção prévia de um conjunto de conformações representativas e a subsequente realização de vários cálculos de acoplamento molecular do tipo receptor rígido. De modo análogo, com relação à segunda estratégia, é possível considerar a flexibilidade da proteína em acoplamento do tipo receptor rígido através da geração de um conjunto de

conformações representativo da flexibilidade do receptor proteico (LIPKOWITZ *apud* SOUZA, 2015).

Quanto à avaliação das energias de ligação ou afinidade de ligação, os programas de acoplamento molecular usam funções de avaliação já mencionadas, para estimar a energia de ligação do complexo ligante-receptor. A energia de ligação entre o ligante e o receptor provém da composição química dos grupos funcionais presentes na molécula bioativa e da conformação tridimensional destes grupos no sítio ativo do receptor (ANDREI *apud* SOUZA, 2015).

O processo de reconhecimento molecular proteína-ligante é dependente de uma combinação de efeitos entálpicos e entrópicos. Estes efeitos podem ser estimados através da energia livre de ligação de Gibbs que, por sua vez, está diretamente relacionada à constante de equilíbrio de ligação  $K_{eq}$ , a qual pode ser medida experimentalmente (VERLI, 2014). A energia livre de Gibbs ( $\Delta G$ ) é uma função de estado que fornece informações importantes sobre a espontaneidade de processos que ocorrem a temperatura e pressão constantes (BROWN et al., 2016). A variação de energia, devido à formação da estrutura ligante-receptor é dada pela constante de ligação ( $K_d$ ) e pela energia livre de Gibbs ( $\Delta G$ ) (equação 1).

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S = -RT\ln K_{eq} \quad (1)$$

onde  $\Delta H$  é a variação de entalpia,  $T$  é a temperatura absoluta,  $\Delta S$  é a variação de entropia e  $R$  é a constante universal dos gases. A constante de equilíbrio de ligação  $K_{eq}$  é determinada experimentalmente com relação a um estado de referência (usualmente, para sistemas biológicos, utilizando uma concentração de 1 M e 25 °C). Esta constante de equilíbrio pode ser representada pela constante de dissociação ( $K_d$ ) ou de associação ( $K_a$ ), as quais dependem da representação da reação química sendo uma o inverso da outra (equação 2).

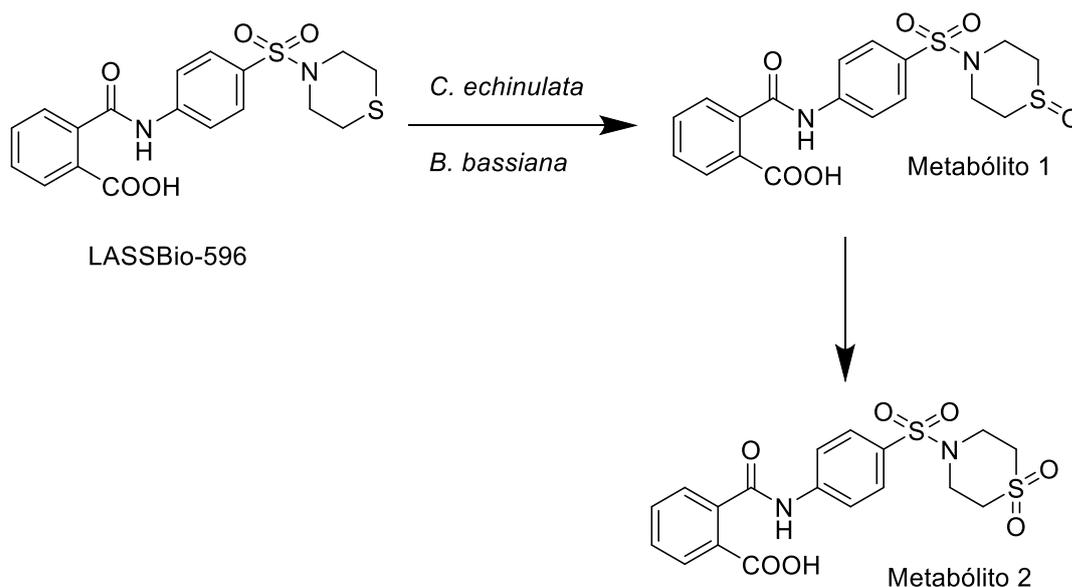
$$K_d = ([R][L])/[RL] \quad K_a = [RL]/([R][L]) \quad (2)$$

onde  $[R]$ ,  $[L]$  e  $[RL]$  são as concentrações de receptor, do ligante e do complexo receptor-ligante respectivamente (SOUZA, 2015).

Existem muitos trabalhos que utilizaram o acoplamento molecular para descoberta de novos fármacos, ou para potencializar protótipos já conhecidos, no qual foram apresentadas propostas de interação efetiva entre um ligante e um receptor, resultando em ativação ou inibição da enzima (EWEAS et al., 2014).

Um exemplo de estudo utilizando o acoplamento molecular foi desenvolvido por Cavaion (2012), no qual apresenta a obtenção de derivados bioativos empregando biotransformação por *Cunninghamella echinulata* ATCC 9244 e *Beauveria bassiana* ATCC 7159 (Figura 16).

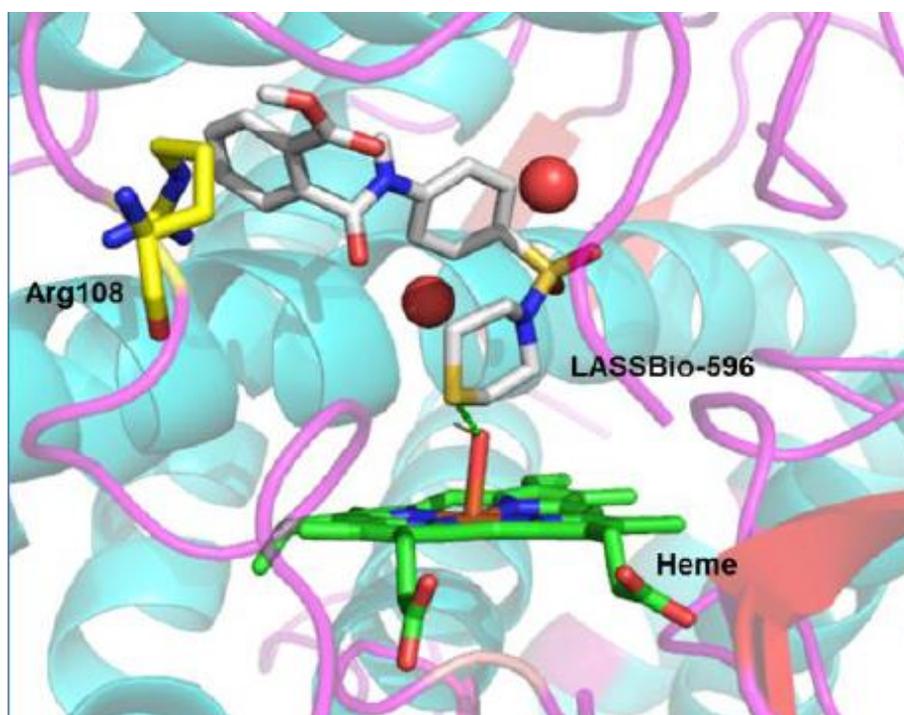
**Figura 16.** Biotransformação do LASSBio-596 empregando *C. echinulata* e *B. bassiana* (Fonte: CAVAION, 2012).



Mediante estudos da ancoragem molecular, a autora descreveu que o átomo de enxofre do anel tiomorfolina está numa proximidade de 4,2 Å do ferro do heme (Figura 16), o que sugere que o metabolismo possa ocorrer por sulfoxidação. As reações de sulfoxidação correspondem a S-oxidação de sulfetos para sulfóxidos (Metabolito 1, Figura 16), que podem ainda ser oxidados a sulfonas (Metabolito 2, Figura 16) (CAVAION, 2012).

A autora afirma ainda que em alguns casos, o metabólito 2 sulfona, é mais ativo que a molécula de partida, ambos com atividade antiasmática, ou tem atividade diferente, reafirmando a importância do estudo do metabolismo para a descoberta de um novo fármaco. Os resultados da análise do *docking* com a CYP2C9 foram consistentes com os dados experimentais, em que LASSBio-596 adotou uma orientação a favor da sulfoxidação seguida pela sulfonação (Figura 17) (CAVAION, 2012).

**Figura 17.** LASSBio-596 no sitio ativo da CYP2C9 (Fonte: Cavaion, 2012).



No planejamento de novos fármacos, os estudos de reconhecimento molecular em sistemas biológicos assumem grande importância, pois constituem as bases fundamentais para o entendimento das propriedades como potência, afinidade e seletividade (SOUSA, 2018). Procedimentos como o ancoramento molecular são aplicados para obter informações sobre a interação entre os ligantes e sua proteína-alvo (BARREIROS, 2015). Barreiros (2008) comenta que estudos dessa natureza permitem que se hierarquize entre os ligantes virtuais, os candidatos mais promissores que mereçam ser obtidos sinteticamente para posterior avaliação do efeito farmacológico.

Considerando que as reações de biotransformação utilizam sistemas biológicos para promover transformações químicas em substâncias (substratos ou ligantes), e uma vez conhecendo o substrato e as enzimas provenientes de fontes produtoras (por exemplo, fungos filamentosos), pode-se utilizar a técnica de ancoragem molecular para a predição do modo de ligação e do reconhecimento molecular do complexo substrato-enzima, de forma que seja possível compreender mais detalhadamente a formação dos possíveis derivados, no que diz respeito a descrição das reações envolvidas e propostas de mecanismos.

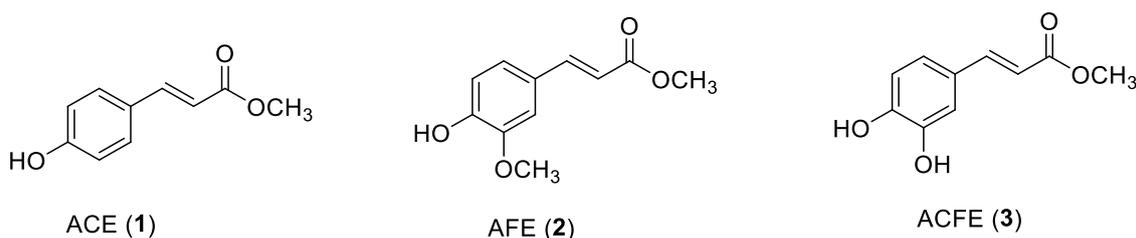
### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Obtenção dos substratos fenólicos

Os ensaios de biotransformação foram realizados utilizando como substratos três compostos fenólicos, sendo estes: o *p*-cumarato de metila (**1**), ferulato de metila (**2**) e o cafeato de metila (**3**) (Figura 18).

Os substratos foram cedidos pelo Grupo de Pesquisa em Síntese Química, do Departamento de Química da Faculdade de Filosofia, ciências e Letras da Universidade de São Paulo (FFCLRP-USP) sob coordenação do Prof. Dr. Antônio Eduardo Miller Crotti.

**Figura 18.** Estruturas químicas dos substratos utilizados: *p*-cumarato de metila (**1**), ferulato de metila (**2**) e cafeato de metila (**3**).



#### 3.2 Preparação dos substratos fenólicos

O cumarato de metila, ferulato de metila e cafeato de metila foram obtidos pela FFCLRP-USP a partir de 4 g dos ácidos cumárico, ferúlico e cafeico, respectivamente, por esterificação com metanol (25 mL), sob aquecimento (85 °C) e refluxo, durante 12 horas. Em seguida, o produto foi obtido por filtração e evaporado sob pressão reduzida, sendo então utilizado sem prévia purificação.

### 3.3 Origem dos fungos filamentosos

Todos os fungos filamentosos utilizados nos estudos de biotransformação foram adquiridos da *American Type Culture Collection* (ATCC), sendo estes: *Aspergillus brasiliensis* ATCC 16404, e *Trametes versicolor* ATCC 200801.

### 3.4 Meios de cultura

- **Malte:** 2,0 % de extrato malte (Acumedia), 2,0 % de glicose (Synth), 0,1 % de peptona (Merck), 1,8 % de Ágar (Theoberg emp. e exp. LTDA).
- **Batata Dextrose Ágar (BDA):** Meio preparado de acordo com as recomendações do fabricante (Acumedia), adicionado de 0,5 g de glicose (Synth).
- **Koch's K1:** 0,18 % de glicose (Synth), 0,06 % de peptona (Merck) e 0,04 % de extrato de levedura (Merck), nas condições de pH 5-6 (SILVA et al., 2015).
- **Meio com indutores de lacase:** 0,20 % de glicose (Synth), 0,20 % de extrato malte (Acumedia), 0,10 % de peptona (Merck), 0,10 % de Tween 80 (Inlab), 0,0005 % de sulfato de cobre II (Dinâmica), nas condições de pH 5-6.

### 3.5 Manutenção dos fungos filamentosos

Para confecção dos estoques das culturas fúngicas, todos os fungos utilizados neste estudo foram cultivados separadamente em placas de Petri contendo o meio sólido extrato de malte, no caso do *A. brasiliensis*, e BDA, no caso de *T. versicolor*, e incubados à temperatura ambiente durante sete dias. Após esse período, 10 discos contendo micélio-ágar de aproximadamente 6 mm de diâmetro, obtidos com auxílio de um tubo de transferência esterilizado,

foram transferidos para frascos do tipo eppendorf® esterilizados, contendo 1 mL de água destilada autoclavada. Os frascos foram, então, vedados com filme plástico e armazenados sob refrigeração (4 °C).

### **3.6 Biotransformação dos substratos fenólicos**

Antes da realização dos experimentos de biotransformação, cada fungo filamentososo, obtido a partir dos estoques, foi reativado. Para a reativação dos fungos, cada um deles foi repicado em meio sólido adequado (meio malte ou BDA) e incubados à temperatura ambiente durante sete dias. Após esse período, cinco discos contendo micélio-ágar de aproximadamente 6 mm de diâmetro, obtidos com auxílio de um tubo de transferência esterilizado, foram adicionados ao meio líquido fermentativo (50 mL) contidos em frascos tipo Erlenmeyer de 125 mL de capacidade. Para o fungo *A. brasiliensis* o meio fermentativo utilizado foi o Koch's K1, enquanto que para *T. versicolor* utilizou-se o meio com indutores de lacase.

Para os ensaios de biotransformação dos substratos fenólicos, foram adicionados aos frascos contendo o meio fermentativo 5 mg do substrato dissolvidos em 250  $\mu$ L de dimetilsufóxido (DMSO). As culturas foram desenvolvidas sob agitação constante de 120 rpm, à temperatura de 28°C em incubadora com agitação (Tecnal, TE-420). Amostras foram retiradas nos períodos de 24, 48 e 72 horas. Frascos controles foram incubados simultaneamente. Para realizar o controle da atividade metabólica dos fungos, foram incubados frascos contendo cinco discos de micélio-ágar e meios de cultura, na ausência dos substratos.

### **3.7 Obtenção dos extratos brutos**

Decorrido o período de incubação, os meios fermentativos foram filtrados à vácuo para a sua separação da massa micelial. Os filtrados obtidos

(caldos das culturas) foram submetidos à partição líquido-líquido para obtenção dos extratos em acetato de etila (Synth). O procedimento de partição foi realizado por três vezes consecutivas. O volume de solvente extrator utilizado em cada partição foi correspondente à 1/3 do volume total de meio fermentativo. As soluções em acetato de etila foram posteriormente concentradas em evaporador rotativo (IKA, RV 10). Todos os extratos brutos obtidos foram pesados (para cálculo dos rendimentos) e armazenados sob refrigeração para as análises posteriores.

### **3.8 Avaliação dos perfis químicos dos extratos obtidos das culturas dos fungos filamentosos**

Os perfis químicos de todos os extratos brutos obtidos foram analisados por meio de técnicas cromatográficas. Avaliações preliminares foram realizadas por meio de Cromatografia em Camada Delgada (CCD) em placas incorporadas com sílica-gel (Sigma-Aldrich, 60 Å) com sistema solvente apropriado, particularmente misturas de hexano (Synth) e acetato de etila (Synth), e acetato de etila (Synth) e metanol (Synth), em diferentes proporções. As placas foram reveladas por exposição à radiação ultravioleta (254 e 365 nm) e por vapores de iodo.

Com o objetivo de refinar as análises dos extratos obtidos dos caldos das culturas, esses foram também analisados utilizando-se CLAE-DAD. O sistema CLAE analítico utilizado (Shimadzu<sup>®</sup>) apresenta degaseificador DGU-20A<sub>3R</sub>, duas bombas LC-20AD XR, injetor automático SIL-20A, forno CTO-20A, detector de arranjo de diodos (DAD) SPD-M20A e sistema controlador CBM-20A. As análises foram processadas com auxílio do software LabSolutions versão 5.57 SP1. As análises foram realizadas em fase reversa, empregando coluna C<sub>18</sub> (Shimadzu, 250,0 x 4,6 mm, 5 µm, Shim-pack, PREP-ODS(H)KIT) e fase móvel composta por gradiente formado por metanol (JT Baker) e água acrescentada de 0,1 % de ácido acético glacial (Merck). O gradiente iniciou-se com 10 % de metanol, atingindo 100 % após 30 minutos de eluição. O fluxo da fase móvel foi de 0,8 mL/min. Todas as amostras foram preparadas na

concentração de 1 mg/mL e 20  $\mu$ L de cada foram injetados. Os cromatogramas obtidos foram avaliados em todos os comprimentos de onda contidos no espectro ultravioleta-visível (varredura) e o comprimento de onda de 254 nm foi selecionado.

O extrato obtido a partir da biotransformação do *p*-cumarato de metila (**1**) por *Aspergillus brasiliensis* teve seu perfil químico avaliado por CG-EM.

A análise cromatográfica do extrato do *p*-cumarato de metila (**ACE**) foi realizada no Laboratório Integrado de Pesquisa Aplicada em Química (LIPAQ) do Centro Universitário SENAI CIMATEC.

As análises foram feitas utilizando um cromatógrafo a gás acoplado a um espectrômetro de massas da marca Shimadzu (modelo GCMS-2010 SE), equipado com um injetor automático split/splitless (modelo AOC-20i), operando com razão de divisão (razão de split de 1:1) a uma temperatura de 250°C, com tempo de purga de 0,80 min. Foi injetado um volume de 1  $\mu$ L da amostra em uma coluna capilar Agilent J&W DB-5MS (30 m x 0,25 mm ID; 0,25  $\mu$ m de espessura de filme). Como gás de arraste foi utilizado hélio UP (pureza de 99,999%) sob um fluxo de 1,64 mL min<sup>-1</sup>. A programação de temperatura do forno foi 80°C (5,0 min.); 100°C a 5,0°C min<sup>-1</sup> (2,0 min.); 220°C a 15°C min<sup>-1</sup> (13,0 min.), com tempo total de corrida de 32 min.

Para o detector de massas foram utilizadas as temperaturas da linha de transferência em 280°C e fonte de íons a 250°C, e modo de ionização por impacto de elétrons a 70 eV. Para a confirmação da identidade dos picos, a amostra foi injetada no modo SCAN (40 m/z – 400 m/z) e os espectros dos picos foram comparados ao banco de dados espectrais da biblioteca NIST 11.

Os pontos de fusão foram determinados utilizando o aparelho Microquímica MQAPF 301. Os espectros na região do infravermelho (IV) foram obtidos no equipamento FT-IR Modelo IRAffinity-1 da Marca Shimadzu, com números de onda em cm<sup>-1</sup>, preparando-se as amostras líquidas em filme de clorofórmio e as sólidas em pastilha de KBr.

### **3.9 Biotransformação em escala preparativa**

A partir dos dados obtidos por meio das técnicas cromatográficas utilizadas, os métodos mais promissores para a biotransformação dos substratos, foram selecionados para realização de ensaio em escala preparativa. As condições utilizadas foram as mesmas dos ensaios iniciais (item 3.6 dessa seção), tendo sido aumentado o número de frascos utilizados nas biotransformações (técnica batelada), sendo 20 frascos.

A obtenção dos extratos em escala preparativa foi realizada de acordo com procedimento descrito no item 3.7 dessa seção. Os extratos obtidos foram avaliados por métodos cromatográficos como descrito no item 3.8 dessa seção, tendo em vista a averiguação da reprodutibilidade da biotransformação e sendo está confirmada, passou-se para a fase de isolamento dos derivados de interesse.

### **3.10 Isolamento e identificação estrutural dos derivados da biotransformação**

Os extratos obtidos das culturas desenvolvidas em escalas preparativas foram submetidos a fracionamentos sucessivos por métodos cromatográficos até a obtenção dos derivados de interesse na forma pura. Os métodos utilizados foram Cromatografia em Coluna Clássica (CC), empregando como fase estacionária sílica gel (Sigma-Aldrich, 60 Å) e gradientes formados por hexano, acetato de etila e metanol.

A escolha do sistema eluente foi sempre feita por meio de análises prévias a partir de CCD. O método de eluição (isocrático ou com gradiente de polaridade) foi definido a partir de avaliação da complexidade do extrato que se pretendia fracionar e da dificuldade de separação das substâncias de interesse. Tais avaliações foram feitas considerando os cromatogramas e CCDs obtidos. Havendo necessidade, as frações promissoras foram submetidas a novos fracionamentos.

Uma vez obtidos os derivados de interesse em sua forma pura, os mesmos foram enviados para obtenção de dados espectrais tendo em vista a elucidação estrutural. Os dados de Ressonância Magnética Nuclear uni- e bidimensionais (RMN de  $^1\text{H}$ , HMBC e HSQC) dos derivados isolados foram adquiridos em tubos próprios para uso em RMN, em espectrômetro Varian (NMR AS 400) operado a 400MHz. Os deslocamentos químicos ( $\delta$  em ppm) foram calculados com base nos picos residuais do solvente utilizado: metanol deuterado ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ), sendo a utilização definida a partir da solubilidade de cada amostra. Os espectros obtidos foram processados com auxílio do software MestReNova versão 12.0.2-20910. Os dados espectrais de RMN foram obtidos em parceria com a Central de Análises do Departamento de Química da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). Para auxiliar na identificação da estrutura do derivado obtido a partir da biotransformação do *p*-cumarato de metila (**1**) por *Aspergillus brasiliensis*, foi utilizado o espectro de massas. Para identificação dos grupos funcionais de alguns derivados obtidos, foram utilizados espectros de infravermelho.

### **3.11 Ensaio computacional de acoplamento molecular**

#### **3.11.1 Acoplamento molecular dos ácidos fenólicos com a lacase**

Para realização dos cálculos de acoplamento molecular dos três substratos fenólicos na estrutura da Lacase foi empregado um computador pessoal contendo sistema operacional Linux (Ubuntu 12.0.4) com processador Intel® Core 2 Quad com 4GB de RAM e 160GB de disco rígido. As estruturas químicas das moléculas dos substratos selecionados para a triagem foram desenhadas no programa ChemBioDraw v.12 (ChemBioDraw® Ultra 12.0.2) e as imagens 3D dos complexos Lacase-ligantes foram analisadas e geradas no Pymol (The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.5.0.4 Schrödinger, LLC).

### 3.11.2 Preparação das estruturas da proteína e dos ligantes

A estrutura da proteína Lacase de *Trametes versicolor* (TVLac) empregada no acoplamento molecular foi obtida no Protein Data Bank (PDB ID: 1GYC, <https://www.rcsb.org/structure/1gyc>), resolvida em 1,9 Å (PIONTEK et al., 2002). A estrutura da TvLac foi preparada utilizando as ferramentas do AutoDock v.4.2 no qual as moléculas dos coadjuvantes de cristalização (N-acetil Glicosamina e Álcool isopropílico) e água foram automaticamente removidas. Além disso, os átomos de hidrogênio polares (hidrogênios ligados a átomos eletronegativos) foram adicionados à estrutura e os átomos de hidrogênio não polares foram unidos aos átomos de carbono vizinhos. As cargas (GASTEIGER; MARSILI, 1980) foram calculadas e os tipos de átomos foram assinalados para todos os átomos da proteína.

### 3.11.3 Geração da rede

A rede é um método empregado no AutoDock v.4.2 onde os pontos em cada dimensão (x, y e z) são ajustados com a finalidade de se ocupar praticamente as regiões do sítio que tenham interações importantes com os ligantes. Os parâmetros da rede do nosso estudo tiveram as seguintes configurações:

- i) Número de pontos nas dimensões x, y e z: 126 em cada eixo.
- ii) Coordenadas do centro da rede= 16,994; 5,888; 37,27, respectivamente (valores em Å).
- iii) Espaçamento da rede= 0,375 Å.

Neste trabalho, a configuração da rede considerou alguns resíduos de aminoácidos da TvLac que possuem interações fundamentais com o seu substrato natural (compostos fenólicos), destacando-se: SER235, ILE236, GLN237, PHE239, GLN242, TYR244, PRO299, LEU300, GLU302, ALA410, ARG423, VAL426 e SER427 (LYASHENKO et al., 2006). Seguiram-se os

cálculos dos parâmetros da rede através do comando AutoGrid, um executável dentro do programa AutoDock v.4.2.

#### **3.11.4 Acoplamento molecular utilizando o AutoDock v.4.2**

O acoplamento molecular foi realizado utilizando o AutoDock v.4.2 onde está implementado o Algoritmo Genético Lamarckiano (AGL). No nosso estudo, foram utilizadas 600 gerações. Para cada cálculo de acoplamento realizado, usamos os parâmetros padrão, excetuando-se os seguintes: 250 indivíduos na população (`ga_pop_size`, 250), 2.500.000 avaliações energéticas (`ga_num_evals`, 2,500,000) e 25.000 número de gerações (`ga_num_generations`, 25.000).

Das moléculas acopladas no sítio da Lacase, foram discriminados os melhores complexos proteína-ligante. Esta classificação é baseada na energia de ligação ( $\Delta G_{bind}$ ) proteína-ligante (Lacase-substrato fenólico), pois as funções de pontuação no AutoDock v.4.2 empregam, para o cálculo energético, o campo de força AMBER.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 4.1 Estudos preliminares das biotransformações dos compostos fenólicos selecionados

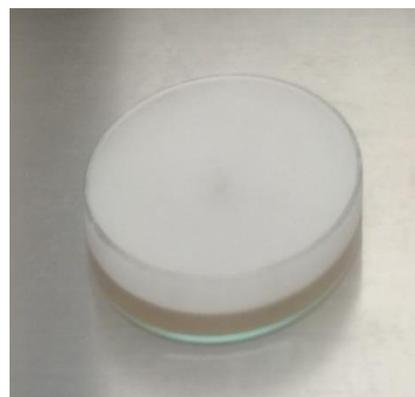
Nos experimentos, inicialmente pretendeu-se verificar se os substratos fenólicos poderiam ser biotransformados, utilizando como biocatalisadores as enzimas dos fungos filamentosos *Trametes versicolor* ATCC 200801 e *Aspergillus brasiliensis* ATCC 16404 (Figura 19). As culturas foram desenvolvidas à 28°C, sob agitação constante de 120 rpm, e as amostras foram tomadas em 24, 48 e 72 horas (Figura 20), para investigar como o tempo de incubação influencia no processo de biotransformação. Os perfis químicos dos extratos brutos obtidos das culturas de *T. versicolor* e do *A. brasiliensis* foram avaliados utilizando cromatografia em camada delgada (CCD), CLAE-DAD e CG-EM, para identificar se ocorreu a formação dos derivados e caracterizar a polaridade dos mesmos.

**Figura 19.** Cultura do (A) *Aspergillus brasiliensis* ATCC 16404 em meio malte e (B) *Trametes versicolor* ATCC 200801 em meio ágar.

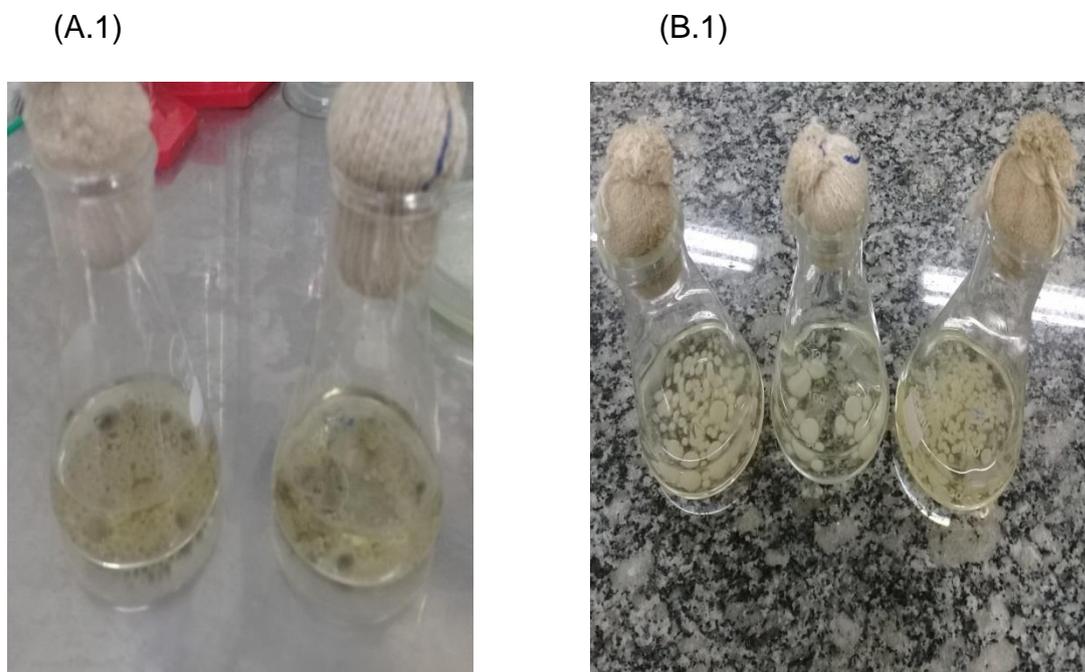
(A)



(B)



**Figura 20.** Meio de Cultura do (A.1) *Aspergillus brasiliensis* ATCC 16404 em meio Koch's K1 e (B.1) *Trametes versicolor* ATCC 200801 em meio com indutores de lacase.

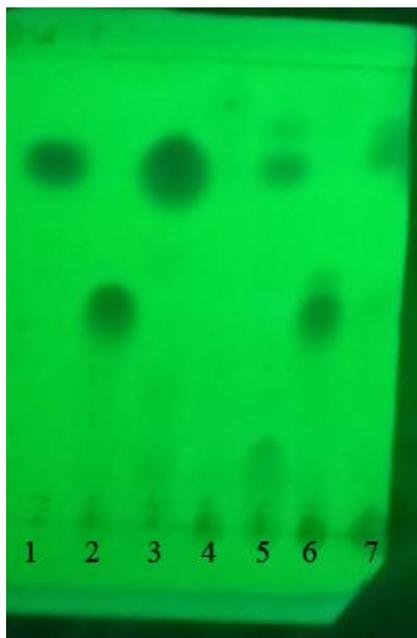


#### 4.1.1 Avaliação dos perfis químicos dos ensaios da biotransformação empregando *T. versicolor*

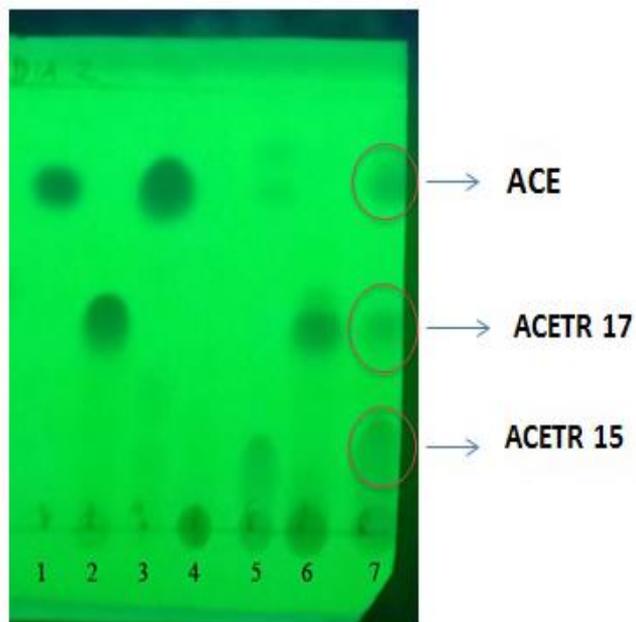
Os perfis químicos dos extratos resultantes da biotransformação do *p*-cumarato de metila, ferulato de metila e cafeato de metila por *Trametes versicolor*, foram avaliados por CCD, cujo eluente foi o sistema hexano:acetato de etila 60:40 (v/v). Após a eluição, as placas foram expostas à radiação ultravioleta, sendo possível observar os perfis abaixo (Figura 21).

**Figura 21:** Cromatoplasmas das biotransformações dos substratos fenólicos selecionados. (I) em 24 horas, (II) em 48 horas e (III) em 72 horas. (1) Ferulato de metila, (2) cafeato de metila, (3) *p*-cumarato de metila, (4) controle, (5) extrato do ferulato de metila, (6) extrato do cafeato de metila e (7) extrato do *p*-cumarato de metila, reveladas a 254 nm.

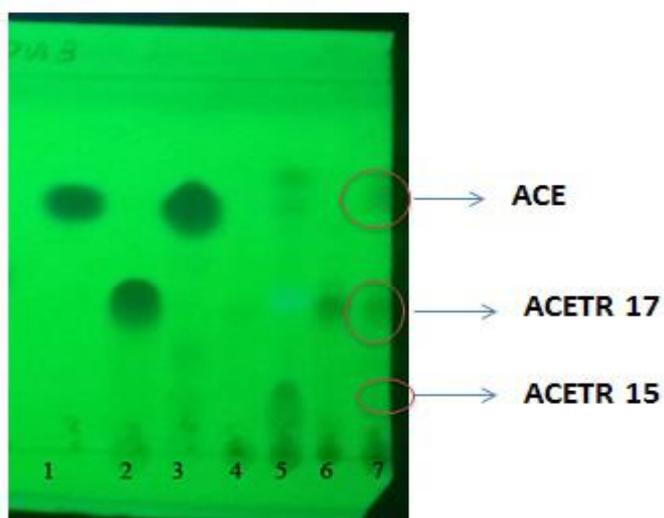
(I)



(II)



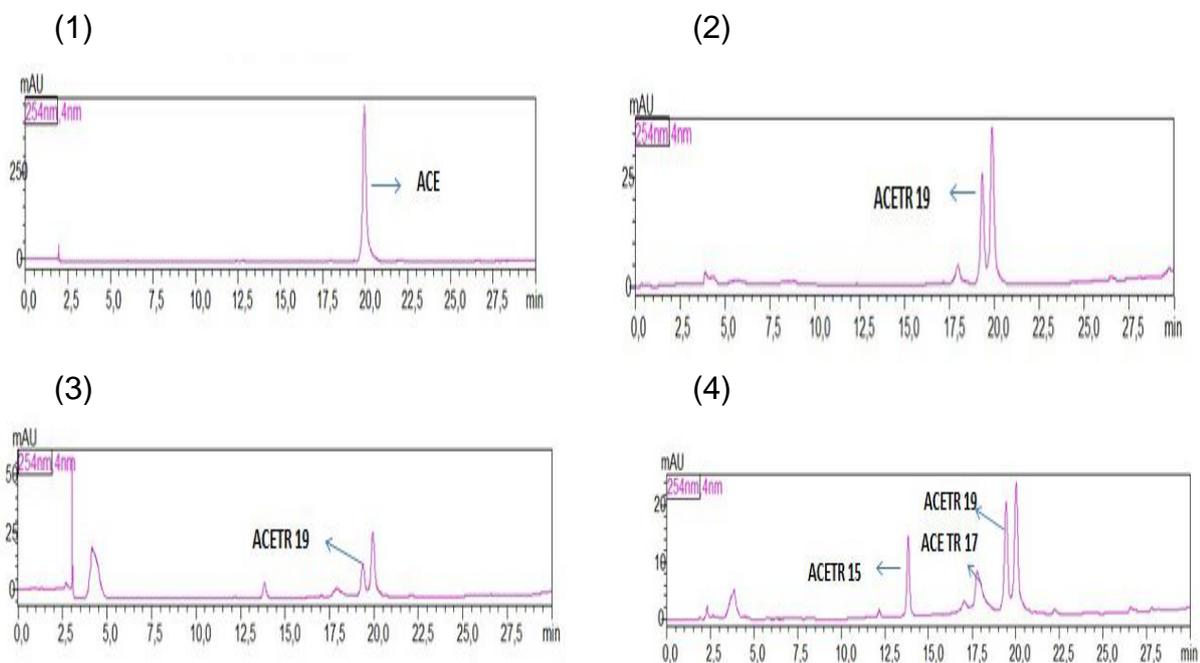
(III)



Considerando os perfis químicos apresentados na CCD (Figura 21), concluiu-se que o cafeato de metila e ferulato de metila não foram biotransformados, mesmo aumentando o tempo de incubação. Somente o p-cumarato de metila apresentou um resultado positivo no ensaio realizado, e pode ser observado que a produção dos derivados ocorreram nos períodos de 48 e 72 horas. Considerando que o tempo é um fator fundamental para atividade enzimática, porque a enzima permanece em contato com o substrato, então foi escolhido o processo de biotransformação no período de 72 horas para desenvolver os experimentos em escala preparativa, pois considerou-se que este tempo foi suficiente para aumentar a concentração dos derivados de interesse.

Após a obtenção dos extratos das biotransformações das substâncias fenólicas por *T. versicolor*, foram realizadas análises cromatográficas para investigar a presença de derivados. As análises dos extratos das biotransformações e dos controles foram realizadas por CLAE-DAD, de acordo com as condições descritas no item 3.8 (página 62). Os perfis cromatográficos obtidos estão apresentados a seguir (Figuras 22, 23, 24, 25).

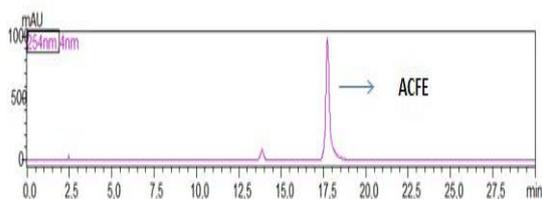
**Figura 22:** Cromatogramas obtidos em  $\lambda$  254 nm: (1) padrão **ACE** TR 20 min. Extratos da biotransformação do **ACE** por *T. versicolor*, (2) em 24 horas, (3) em 48 horas e (4) em 72 horas.



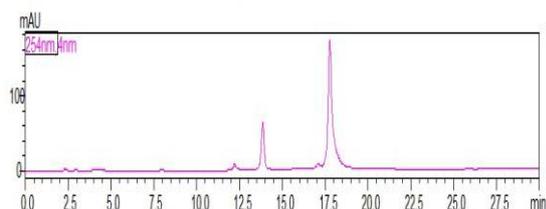
A análise comparativa dos perfis cromatográficos entre o padrão do *p*-cumarato de metila e dos extratos de biotransformação, permite concluir que os derivados **ACETR 17** e **ACETR 19** são produzidos desde o período de 24 horas. Já em 48 horas é formado o derivado **ACETR 15**. Porém, no período de 72 horas os picos se apresentaram mais intensos, o que pode estar relacionado ao aumento da concentração dos derivados.

**Figura 23:** Cromatogramas obtidos em  $\lambda$  254 nm: (1.1) padrão **ACFE** TR 17.6 min. Extratos da biotransformação do **ACFE** por *T. versicolor*, (1.2) em 24 horas, (1.3) em 48 horas e (1.4) em 72 horas.

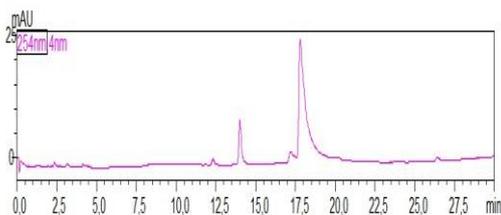
(1.1)



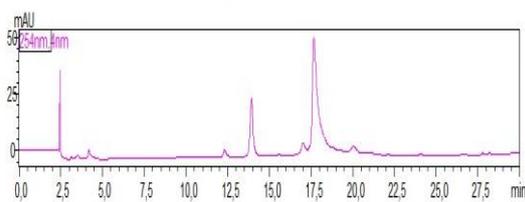
(1.2)



(1.2)

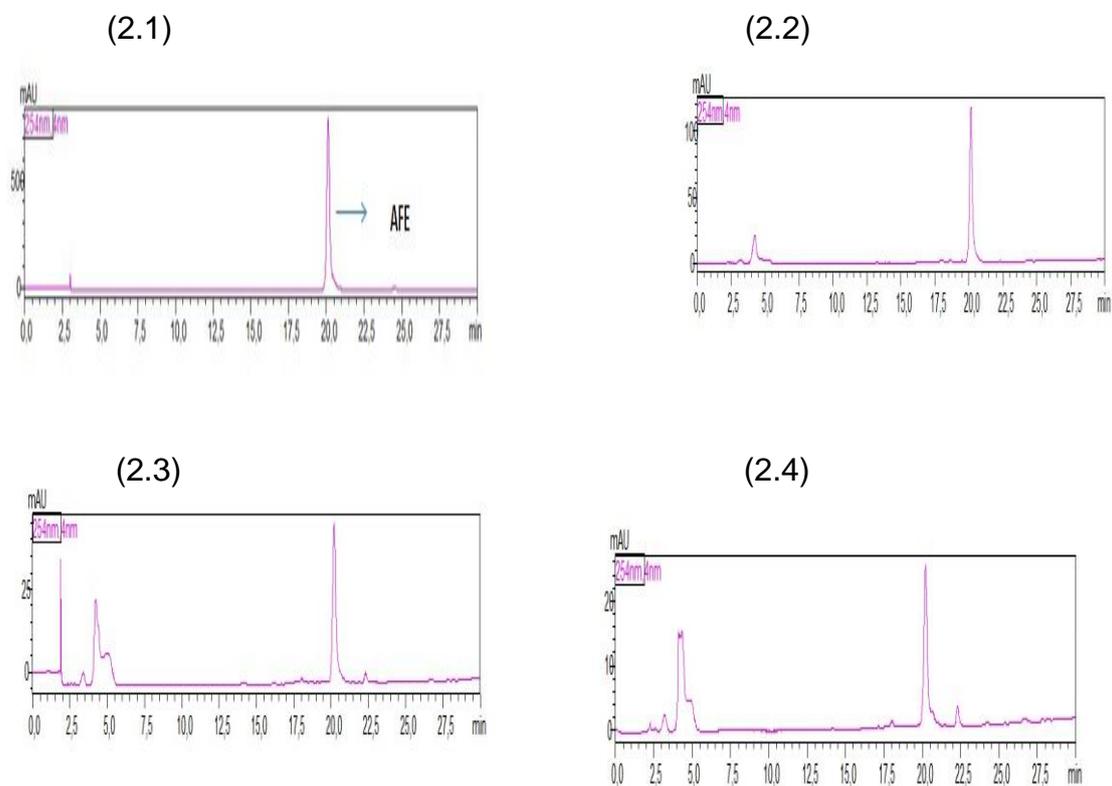


(1.4)



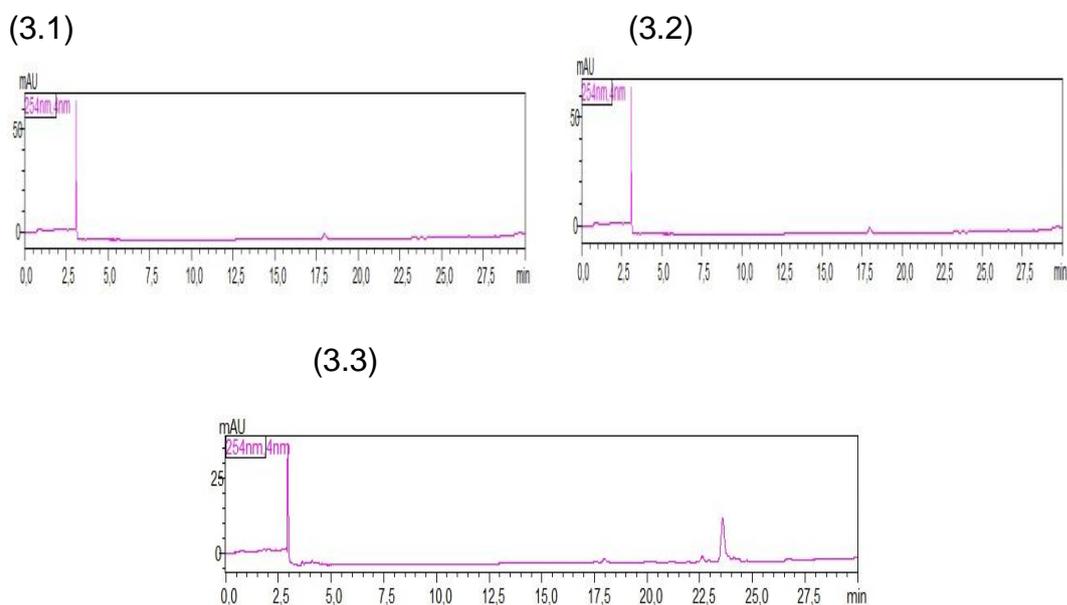
A análise comparativa dos perfis cromatográficos entre o padrão do cafeato de metila e dos extratos de biotransformação, permite concluir que não ocorreram biotransformação deste substrato fenólico por *T. versicolor*, nos períodos de incubação estudados.

**Figura 24:** Cromatogramas obtidos em  $\lambda$  254 nm: (2.1) padrão **AFE** TR 20 min. Extratos da biotransformação do **AFE** por *T. versicolor*, (2.2) em 24 horas, (2.3) em 48 horas e (2.4) em 72 horas.



A análise comparativa dos perfis cromatográficos entre o padrão do ferulato de metila e dos extratos de biotransformação, permite concluir que não ocorreram biotransformação deste substrato fenólico por *T. versicolor*, nos períodos de incubação estudados.

**Figura 25.** Cromatogramas dos controles obtidos a partir da biotransformação das substâncias, em  $\lambda$  254 nm. (3.1) em 24 horas, (3.2) em 48 horas, e (3.3) em 72 horas.



A análise dos perfis cromatográficos dos extratos controle de biotransformação, permite concluir que não ocorreram formação de derivados por *T. versicolor* com ausência dos substratos, nos períodos de incubação estudados.

#### 4.2 Fracionamento dos extratos da biotransformação do *p*-cumarato de metila por *T. versicolor*

Após a obtenção do extrato dos derivados de biotransformação do *p*-cumarato de metila por *T. versicolor* em escala preparativa (165 mg), este foi submetido ao fracionamento por CC (15,56 g de sílica gel) resultando em 11 frações (Tabela 3). A eluição foi realizada com gradiente de polaridade e, para tanto, utilizaram-se os solventes hexano, acetato de etila e metanol em

diferentes proporções (iniciando com 100% de hexano e chegando a 100% metanol).

**Tabela 3.** Fracionamento do extrato de ensaio preparativo da biotransformação do *p*-cumarato de metila por *T. versicolor*.

Código da fração	Massa(mg)	Eluente (% v/v)
Fr 1	0,8	hexano 100
Fr 2	2,3	hexano:acetato de etila 90:10
Fr 3	3,7	hexano:acetato de etila 80:20
Fr 4	5,8	hexano:acetato de etila 60:40
Fr 5	26,6	hexano:acetato de etila 60:40
Fr 6	14,3	hexano:acetato de etila 50:50
Fr 7	8,5	hexano:acetato de etila 30:70
Fr 8	3,2	hexano:acetato de etila 10: 90
Fr 9	17,8	acetato de etila 100
Fr 10	22,5	acetato de etila:metanol 70:30
Fr 11	31,2	metanol 100

As frações Fr 4, Fr 5 e Fr 6 foram reunidas com rendimento total de 46,7 mg, e foi realizado um novo fracionamento por CC (9,32 g de sílica gel), utilizando método gradiente composto por hexano, acetato de etila e metanol. Este fracionamento resultou na obtenção 14 frações cujos rendimentos estão apresentados a seguir (Tabela 4). Sendo que, para obtenção das frações entre Fr 2 e Fr 11, foi utilizado o método isocrático constituído por gradiente de hexano:acetato de etila na proporção de 60:40 (% v/v).

**Tabela 4.** Fracionamento do extrato de ensaio preparativo da biotransformação do *p*-cumarato de metila por *T. versicolor*.

<b>Código da fração</b>	<b>Massa(mg)</b>	<b>Eluente (% v/v)</b>	
Frd 1	0,6	hexano	100
Frd 2	1,8	hexano:acetato de etila 60:40	
Frd 3	2,2	hexano:acetato de etila 60:40	
Frd 4	1,5	hexano:acetato de etila 60:40	
Frd 5	2,6	hexano:acetato de etila 60:40	
Frd 6	2,4	hexano:acetato de etila 60:40	
Frd 7	1,2	hexano:acetato de etila 60:40	
Frd 8	1,7	hexano:acetato de etila 60: 40	
Frd 9	0,8	hexano:acetato de etila 60:40	
Frd 10	1,3	hexano:acetato de etila 60:40	
Frd 11	3,2	hexano:acetato de etila 60:40	
Frd 12	1,2	hexano: acetato de etila 30:70	
Frd 13	7,8	acetato de etila	100
Frd 14	10,5	metanol	100

As frações Frd 4, Frd 5 e Frd 6 foram reunidas e identificada como derivado **ACETR 19** em mistura. A fração Frd 8 foi identificada como derivado **ACETR 17**. As frações entre Frd 9 e Frd 12 foram reunidas e identificada como derivado **ACETR 15**. Os derivados isolados apresentaram os rendimentos (em mg) a seguir (Tabela 5).

**Tabela 5.** Fracionamento de Frd.

<b>Código do derivado</b>	<b>Massa (mg)</b>
ACETR 15	6,5
ACETR 17	1,7
ACETR 19	5,0

Para aumentar a quantidade em massa dos derivados identificados, foi repetido experimento de obtenção do extrato em escala preparativa (152,3 mg). Isso foi necessário para que fosse possível realizar a aquisição dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e bidimensionais, sendo estes considerados fundamentais para a elucidação das estruturas químicas dos derivados. O extrato foi submetido ao fracionamento por CC (13,67 g de sílica gel) resultando em 18 frações (Tabela 6). A eluição foi realizada com gradiente de polaridade e, para tanto, utilizaram-se os solventes hexano, acetato de etila e metanol em diferentes proporções (iniciando com 100% de hexano e chegando a 100 % metanol).

**Tabela 6.** Fracionamento do extrato de ensaio preparativo da biotransformação do *p*-cumarato de metila por *T. versicolor*.

Código da fração	Massa (mg)	Eluente (% v/v)
Frb 1	0,6	hexano 100
Frb 2	1,3	hexano:acetato de etila 90:10
Frb 3	1,7	hexano:acetato de etila 80:20
Frb 4	2,2	hexano:acetato de etila 70:30
Frb 5	1,6	hexano:acetato de etila 60:40
Frb 6	3,3	hexano:acetato de etila 60:40
Frb 7	2,3	hexano:acetato de etila 50:50
Frb 8	4,5	hexano:acetato de etila 40: 60
Frb 9	2,8	hexano:acetato de etila 40:60
Frb 10	2,5	hexano:acetato de etila 30:70
Frb 11	3,8	hexano:acetato de etila 20:80
Frb 12	11,4	hexano:acetato de etila 20:80
Frb 13	7,9	hexano: acetato de etila 10:90
Frb 14	3,7	acetato de etila 100
Frb 15	4,1	acetato de etila: metanol 80:20
Frb 16	5,8	acetato de etila:metanol 50:50
Frb 17	6,4	acetato de etila:metanol 30:70
Frb 18	13,2	metanol 100

As frações entre Frb 5 e Frb 7 foram reunidas e identificada como derivado **ACETR 19** em mistura. A fração Frb 8 foi identificada como derivado **ACETR 17**. A fração Frb 12 foi identificada como derivado **ACETR 15**. Os derivados isolados apresentaram os rendimentos (em mg) a seguir (Tabela 7).

**Tabela 7.** Fracionamento de Frb.

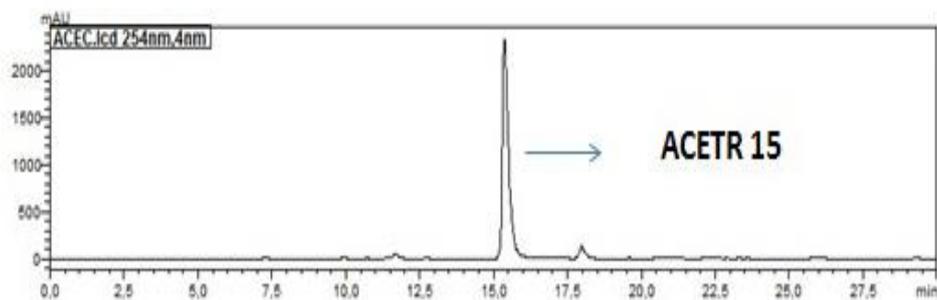
<b>Código do derivado</b>	<b>Massa (mg)</b>
ACETR 15	11,4
ACETR 17	4,5
ACETR 19	7,2

As frações foram reunidas de acordo com os códigos dos derivados presentes nas Tabelas 11 e 12, cujo rendimento total foram: 17,9 mg para **ACETR 15**, 6,5 mg do **ACETR 17**, e 12,2 mg do **ACETR 19**. Estas frações foram selecionadas para aquisição dos dados de RMN  $^1\text{H}$ , bidimensionais e de  $^{13}\text{C}$ .

Após a obtenção das frações da biotransformação do p-cumarato de metila por *T. versicolor*, foram desenvolvidas análises cromatográficas para verificar a presença de derivados com grau de pureza. As análises das frações obtidas foram realizadas por CLAE-DAD, de acordo com as condições descritas no item 3.8 (página 62). Os perfis cromatográficos obtidos estão apresentados a seguir (Figuras 26, 27 e 28).

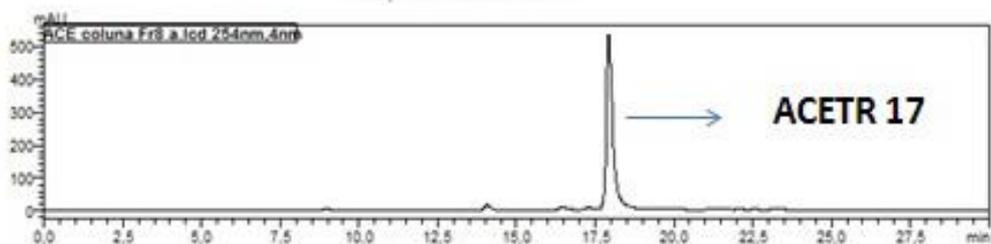
Analisando o perfil cromatográfico (Figura 26), observa-se somente um pico intenso com tempo de retenção de 15,2 min, que foi atribuído ao derivado **ACETR 15** isolado.

**Figura 26.** Cromatograma do **ACETR 15** isolado, obtido em  $\lambda$  254 nm.



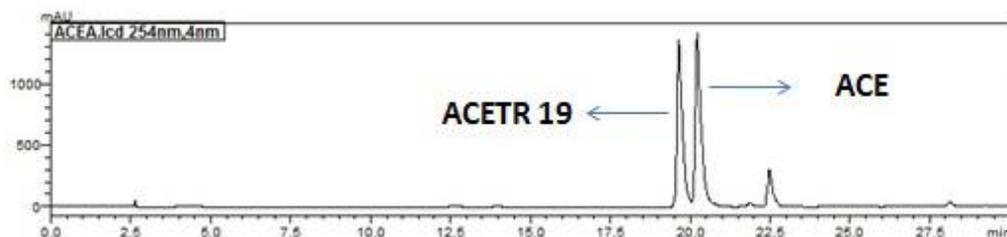
Analisando o perfil cromatográfico (Figura 27), observa-se somente um pico intenso com tempo de retenção de 17,6 min, que corresponde ao derivado **ACETR 17** isolado.

**Figura 27.** Cromatograma do **ACETR 17** isolado, obtido em  $\lambda$  254 nm.



Analisando o perfil cromatográfico (Figura 28), observa-se a presença de dois picos intensos com tempos de retenção de 19,7 min e 20,2 min, que foram atribuídos ao derivado **ACETR 19** (formado em mistura) e ao substrato **ACE**, respectivamente.

**Figura 28.** Cromatograma do **ACETR 19** isolado, obtido em  $\lambda$  254 nm.



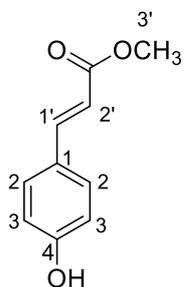
#### 4.3 Identificações estruturais dos derivados obtidos da biotransformação do **ACE** por *T. versicolor*

Inicialmente, foi realizada a aquisição do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do *p*-cumarato de metila padrão para facilitar a elucidação estrutural dos derivados da biotransformação do **ACE** por *Trametes versicolor*. Os valores de deslocamentos químicos do **ACE** estão presentes na Tabela 8.

**Tabela 8.** Dados de RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) do **ACE** padrão.

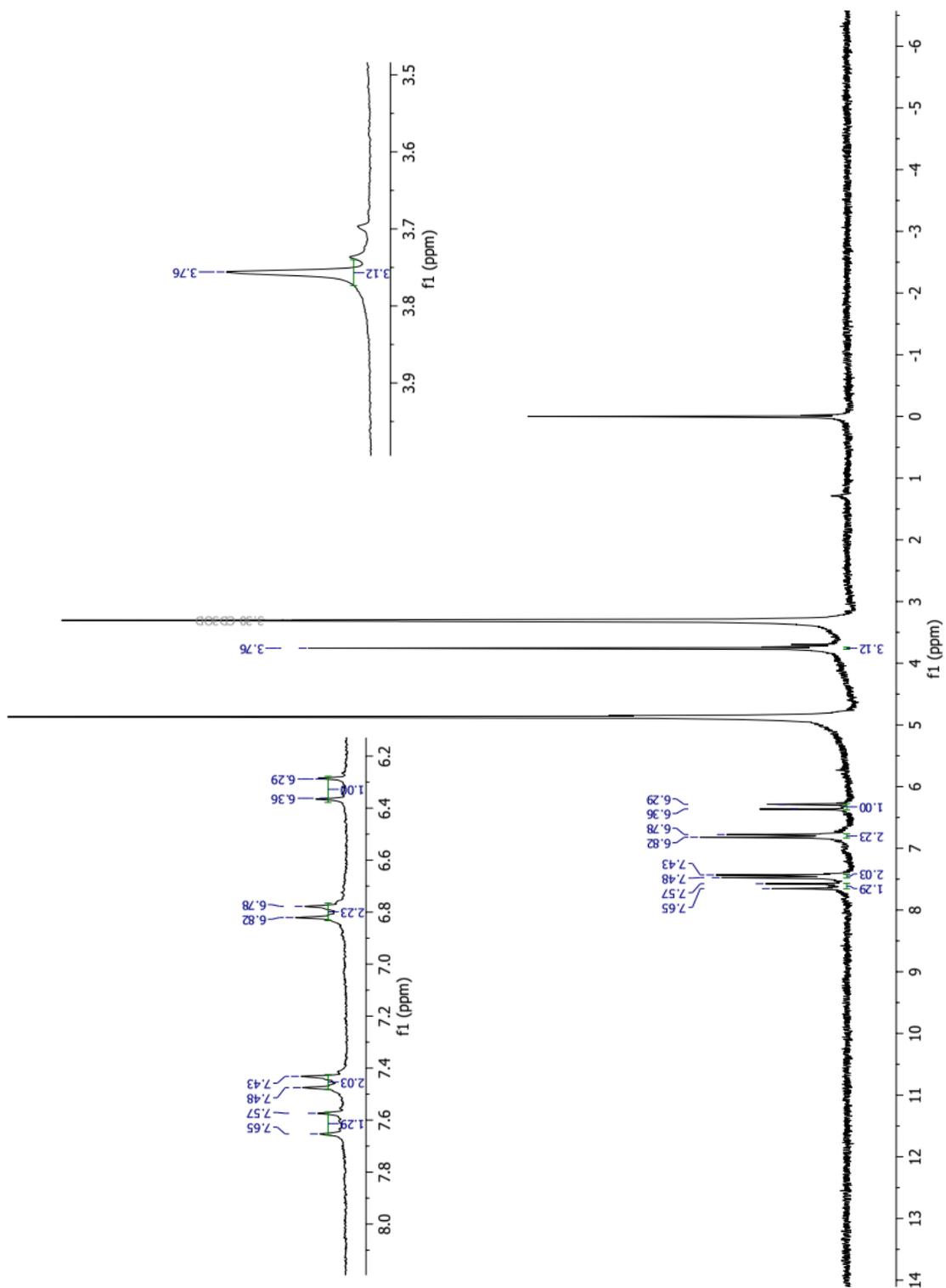
ACE Padrão	
Posição	$\delta_{\text{H}}$ (ppm), multiplicidade, $J$ (Hz)
1'	7,62, <i>d</i> , $J = 16,04$
2'	6,32, <i>d</i> , $J = 16,04$
3'	3,76, <i>s</i>
2	7,46, <i>d</i> , $J = 8,46$
3	6,80, <i>d</i> , $J = 8,46$

**Figura 29.** Estrutura química do *p*-cumarato de metila (**ACE**)



No espectro do **ACE** (Figura 30), os sinais dos hidrogênios do anel aromático aparecem nos seguintes deslocamentos químicos:  $\delta$  7,46 (H-2, *d*, 2H); 6,80 (H-3, *d*, 2H). Os hidrogênios da olefina com acoplamento em *trans*, apresentam os seguintes deslocamentos químicos:  $\delta$  7,62 (H-1', *d*, 1H); 6,32 (H-2', *d*, 1H). Apresenta também um grupo metoxila em  $\delta$  3,76 (H-3', *s*, 3H).

**Figura 30.** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do *p*-cumarato de metila (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ).

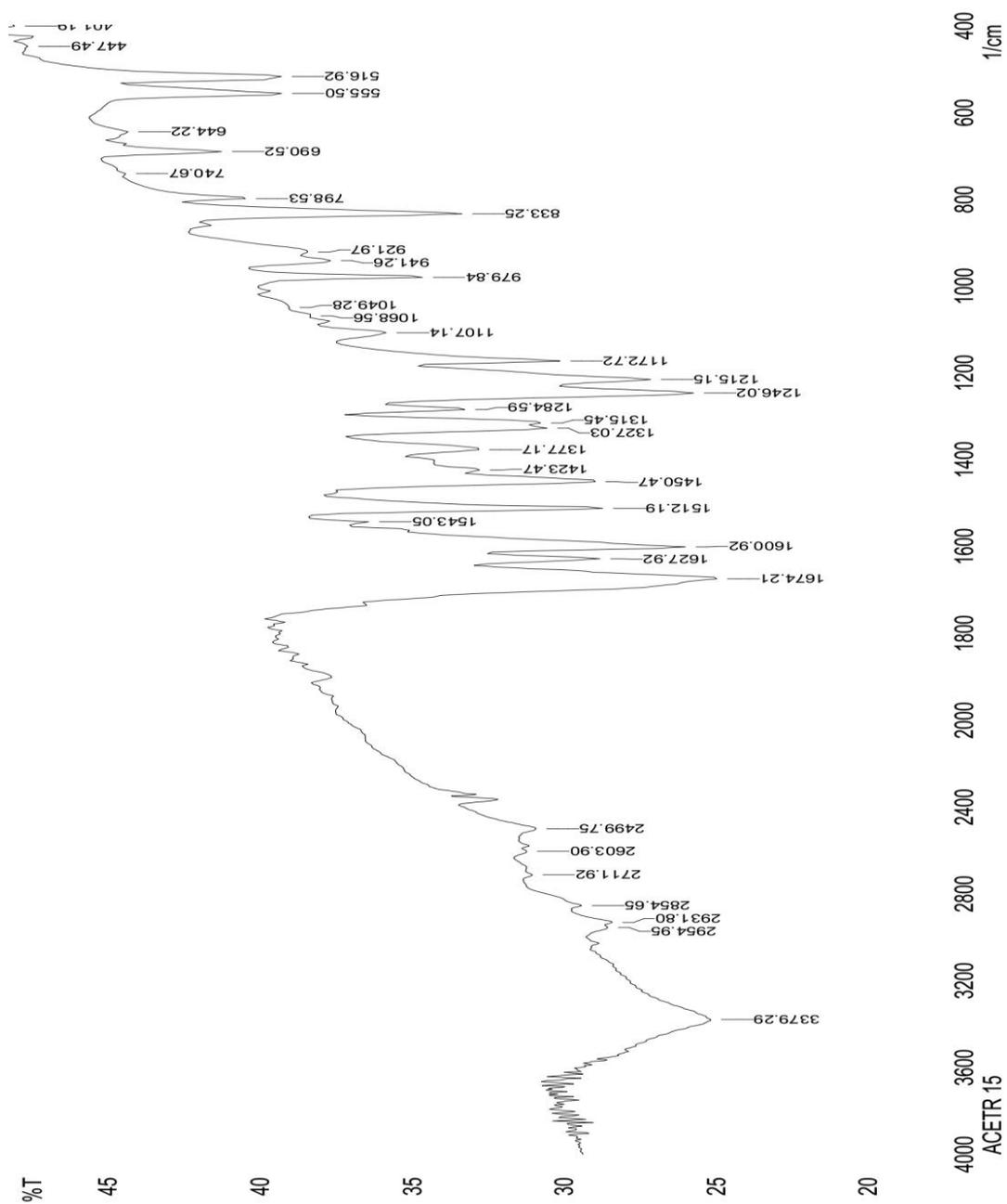


#### 4.3.1 Identificação estrutural do derivado **ACETR 15**

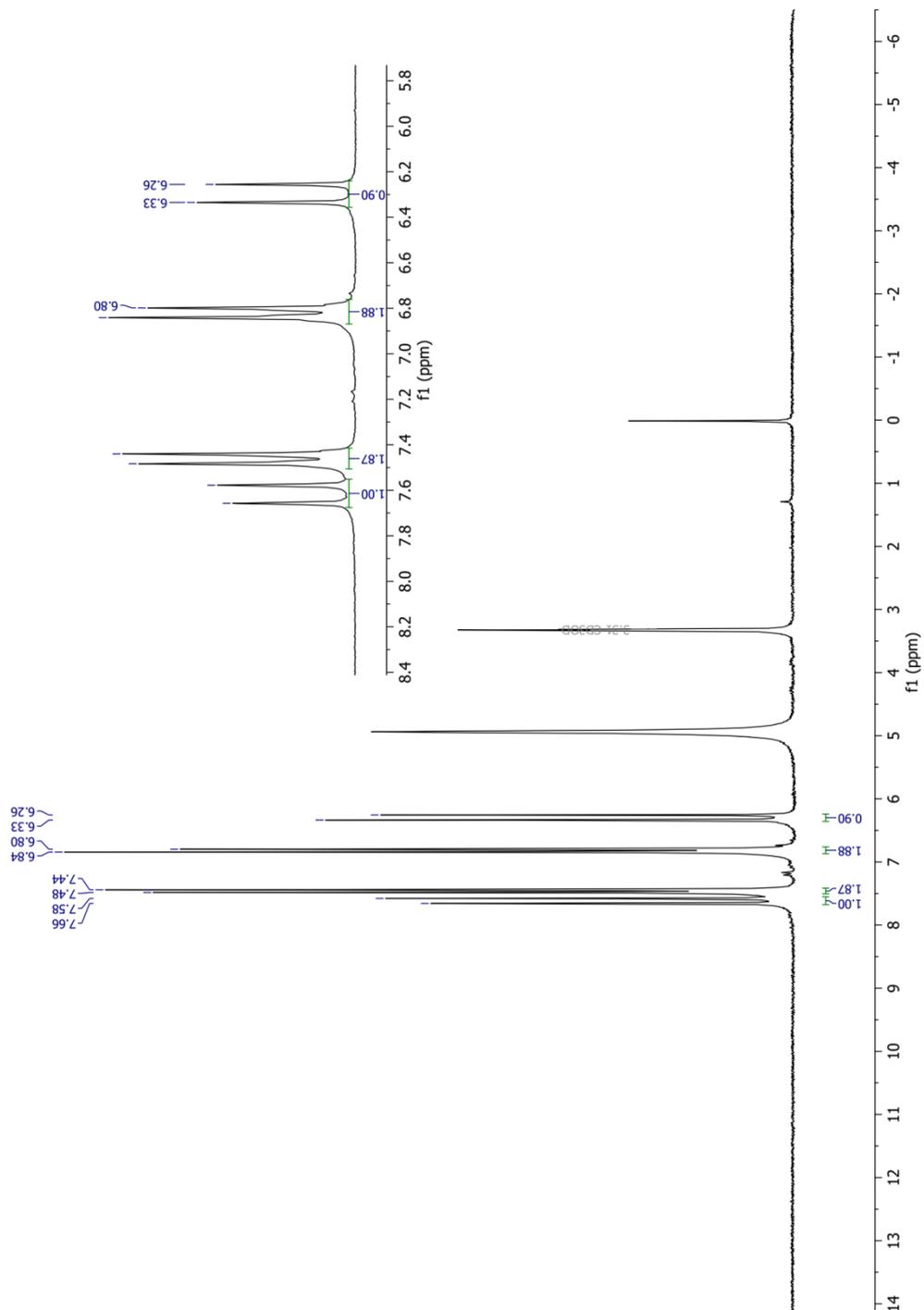
O derivado **ACETR 15**, identificado como ácido (*E*)-3-(4-hidroxifenil)acrílico ou ácido cumárico, apresentou-se como um sólido castanho claro, com faixa de fusão 206,1- 207,2°C, solúvel em CH<sub>3</sub>OH, e teve rendimento de 12,18%. A faixa de fusão deste composto encontrado na literatura é 210-213°C. A identificação foi realizada através da análise dos dados espectroscópicos de RMN de <sup>1</sup>H e IV.

O espectro no IV (Figura 31) apresentou sinal em 3379 cm<sup>-1</sup> referente ao estiramento da ligação O-H de hidroxila fenólica. A banda larga na faixa entre 3600-2500 cm<sup>-1</sup> é característica de estiramento da ligação O-H de ácido carboxílico. Apresentou banda de absorção em 2931 cm<sup>-1</sup> corresponde ao estiramento da ligação Csp<sup>2</sup>-H de alceno. A banda em 1674 cm<sup>-1</sup> é característica de estiramento da ligação C=O de ácido carboxílico conjugado. A banda em 1600 cm<sup>-1</sup> corresponde ao estiramento da ligação C=C de anel aromático, o sinal em 1246 cm<sup>-1</sup> é característica de estiramento da ligação C-O de ácido carboxílico, e a banda em 833 cm<sup>-1</sup> é característico de deformação da ligação C-H de aromático 1,4-dissubstituído.

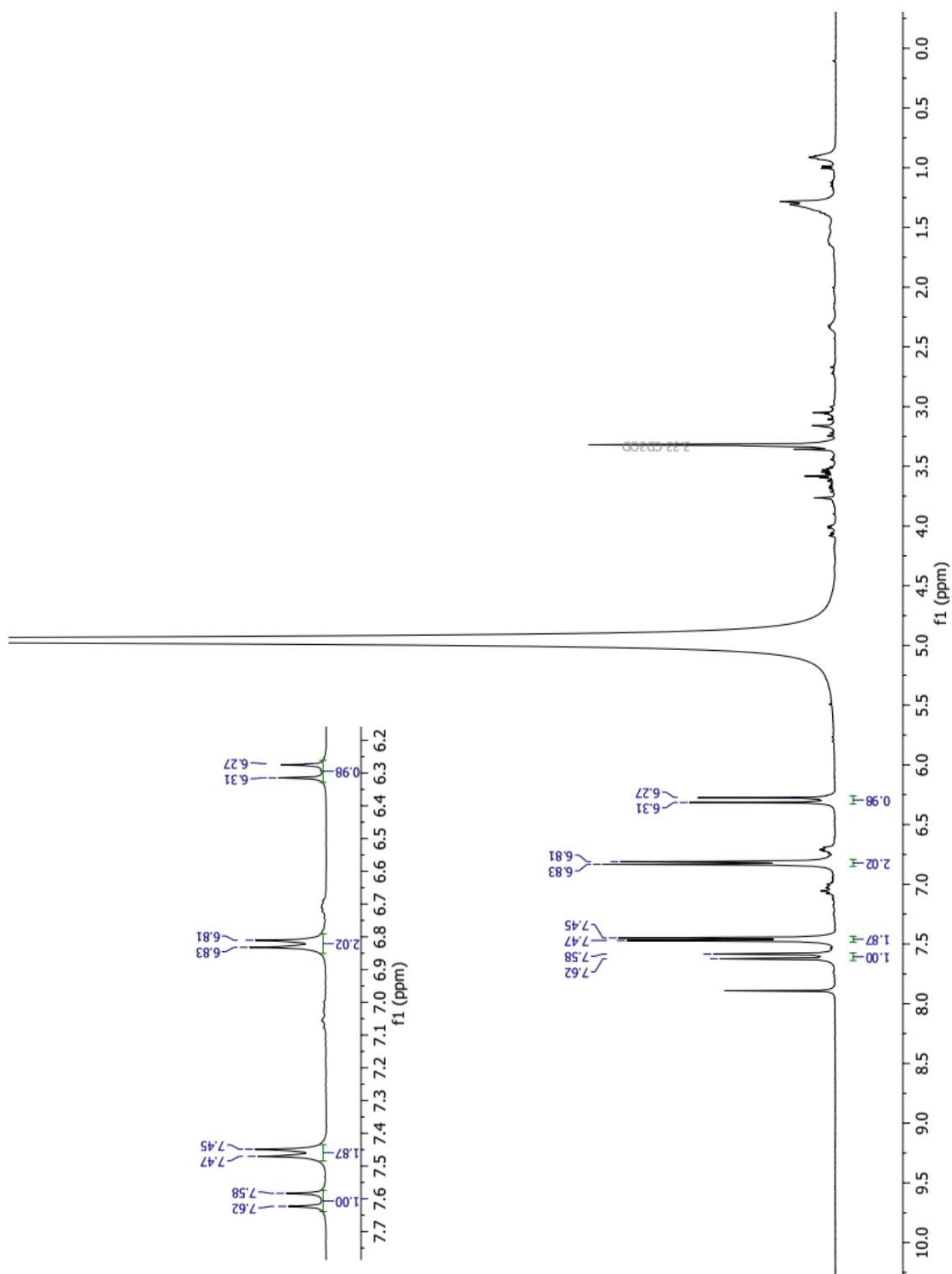
**Figura 31.** Espectro de Infravermelho do ácido cumárico (**ACETR 15**), obtido em pastilha de KBr.



**Figura 32.** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do ácido cumárico padrão (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ).



**Figura 33.** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do ácido cumárico (**ACETR 15**) (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ).



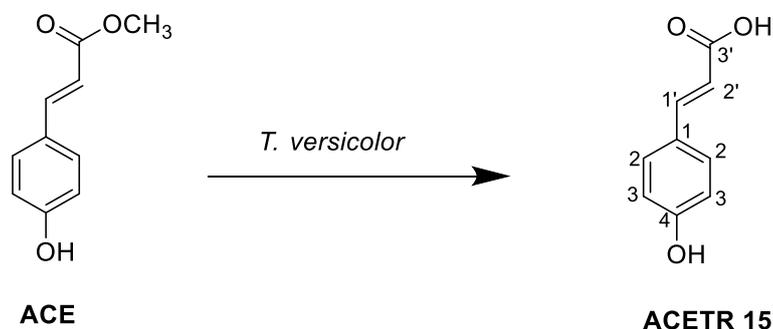
**Tabela 9.** Dados de RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) do derivado **ACETR 15**, e comparação com os dados da literatura (em 300 MHz).

<b>Posição</b>	<b>ACETR 15</b> , $\delta_{\text{H}}$ (ppm), multiplicidade, $J$ (Hz)	<b>SALAMEH et al. 2010</b> $\delta_{\text{H}}$ , multiplicidade
1'	7,60, <i>d</i> , $J= 15,86$	7,50, <i>m</i>
2'	6,30, <i>d</i> , $J= 15,86$	6.30, <i>d</i>
2	7,46, <i>d</i> , $J= 8,56$	7,40, <i>d</i>
3	6,82, <i>d</i> , $J= 8,56$	6,70, <i>d</i>

A análise do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do **ACETR 15** (Figura 33, página 87) permitiu com base nos valores de deslocamentos químicos (Tabela 9), obter informações relacionadas a estrutura química do mesmo. Os sinais dos hidrogênios do anel aromático aparecem nos seguintes deslocamentos químicos:  $\delta$  7,46 (H-2, *d*, 2H); 6,82 (H-3, *d*, 2H). No espectro de RMN de  $^1\text{H}$  os hidrogênios da olefina com acoplamento em *trans*, apresentam os seguintes deslocamentos químicos:  $\delta$  7,60 (H-1', *d*, 1H); 6,30 (H-2', *d*, 1H). Foi observado que estes sinais estão de acordo com os deslocamentos químicos do ácido cumárico padrão (Figura 32, página 86). Comparando os deslocamentos químicos dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  do **ACE** (Figura 30, página 83) e do **ACETR 15** (Figura 33, página 87), pode-se concluir que a biotransformação não ocorreu no anel aromático e/ou na olefina. A hidrólise resultante da biotransformação ocorreu no carbono da carbonila (Figura 29, página 82). Diante dos resultados obtidos, foi possível propor a estrutura química do derivado **ACETR 15** (Figura 34).

Salameh e colaboradores (2010), identificaram o ácido *p*-cumárico utilizando informações espectrais de RMN de  $^1\text{H}$ , cujos valores estão coerentes com os resultados do **ACETR 15**, obtido pela biotransformação do **ACE**.

**Figura 34.** Proposta estrutural para o derivado **ACETR 15**, obtido a partir da biotransformação do **ACE** por *T. versicolor*.



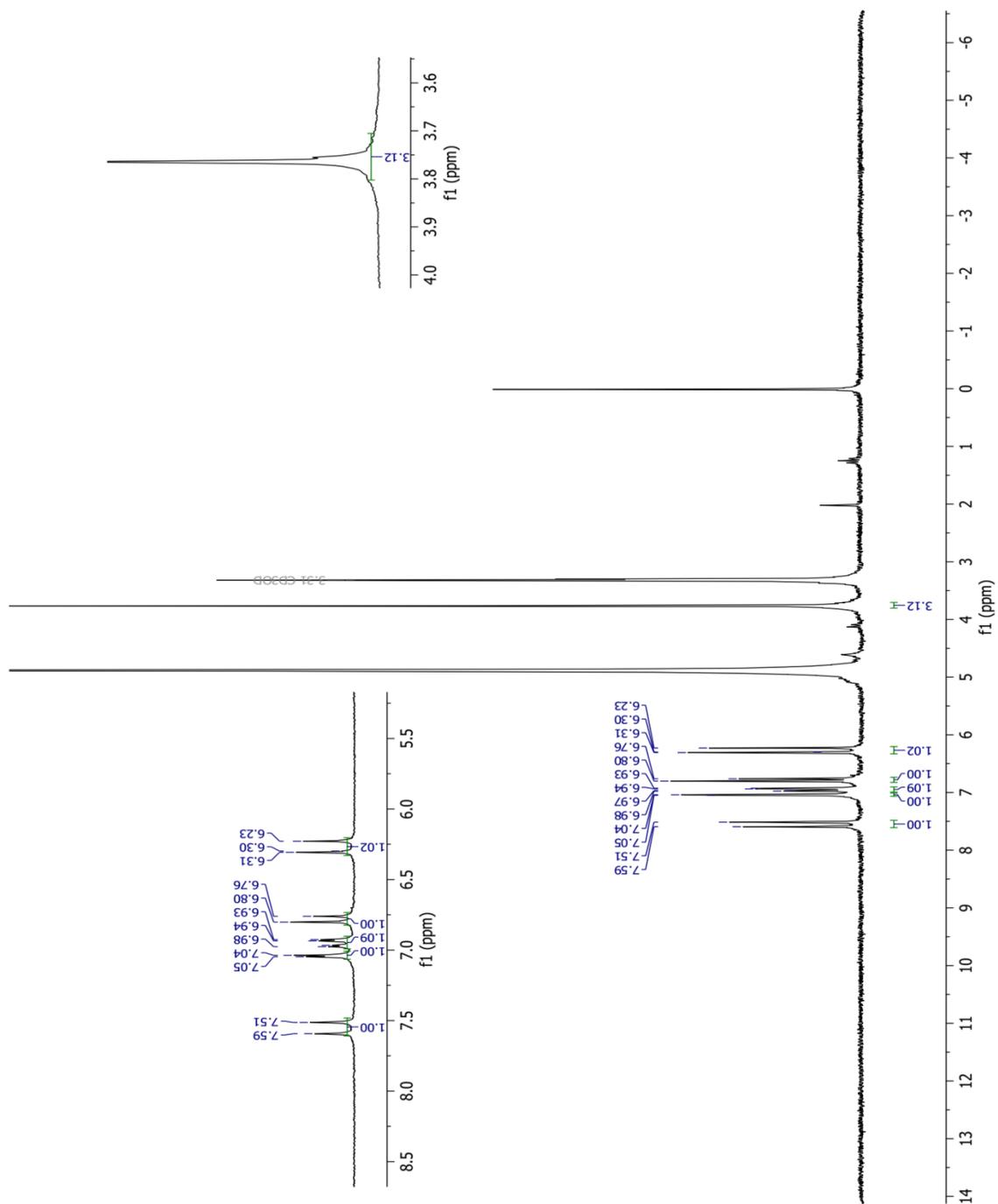
#### 4.3.2 Identificação estrutural do derivado **ACETR 17**

O derivado **ACETR 17**, identificado como (*E*)-3-(3,4-dihidroxifenil) acrilato de metila ou cafeato de metila (**ACFE**), apresentou-se como um sólido alaranjado, com faixa de fusão 163,5-165,8°C, solúvel em CH<sub>3</sub>OH, e teve rendimento de 3,56%. A faixa de fusão para este composto encontrado na literatura é de 158-161°C. A identificação foi realizada através da análise dos dados espectroscópicos de RMN de <sup>1</sup>H.

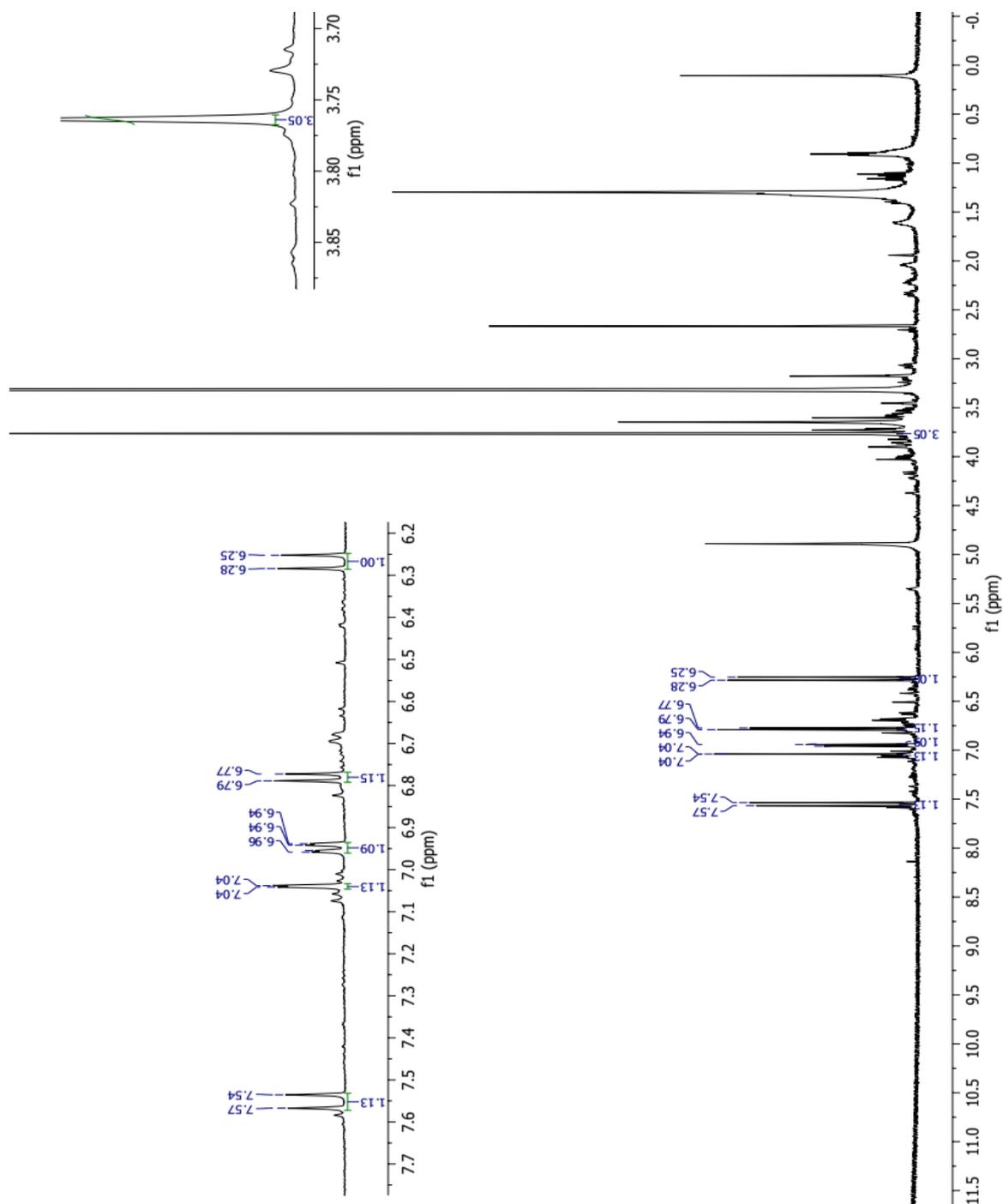
**Tabela 10.** Dados de RMN de <sup>1</sup>H (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD) do derivado **ACETR 17**, e comparação com os dados da literatura (500 MHz)

<b>Posição</b>	<b>ACETR 17, <math>\delta_H</math> (ppm), multiplicidade, <math>J</math> (Hz)</b>	<b>TAKAHASHI et al., 2010 <math>\delta_H</math>, multiplicidade</b>
1'	7,56, <i>d</i> , $J= 15,86$	7,47, <i>d</i>
2'	6,27, <i>d</i> , $J= 15,86$	6,25, <i>d</i>
3'	3,76, <i>s</i>	3,67, <i>s</i>
2	7,04, <i>d</i> , $J= 1,98$	7,04, <i>d</i>
5	6,78, <i>d</i> , $J= 8,13$	6,74, <i>d</i>
6	6,95, <i>dd</i> , $J= 8,13; 1,98$	6,99, <i>dd</i>

**Figura 35.** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do cafeato de metila padrão (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ).



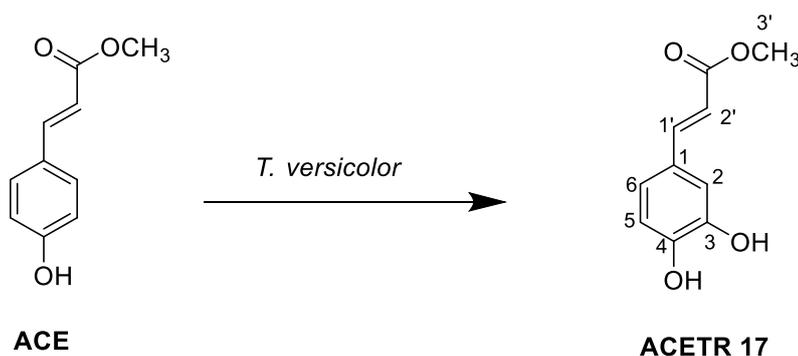
**Figura 36.** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do cafeato de metila (**ACETR 17**) (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ).



A análise do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do **ACETR 17** (Figura 36, página 91) permitiu obter informações relacionadas a estrutura química do mesmo. Os sinais dos hidrogênios do anel aromático aparecem nos seguintes deslocamentos químicos:  $\delta$  7,04 (H-2, *d*, 1H); 6,78 (H-5, *d*, 1H); 6,95 (H-6, *dd*, 1H). Os hidrogênios da olefina com acoplamento em *trans*, apresentam os seguintes deslocamentos químicos:  $\delta$  7,56 (H-1', *d*, 1H); 6,27 (H-2', *d*, 1H). Foi observado que os deslocamentos químicos do **ACETR 17** estão de acordo com os deslocamentos químicos do cafeato de metila padrão (Figura 35, página 90). Pode ser observado que o **ACE** possui hidrogênios quimicamente equivalentes (H-2 e H-3, Figura 29, página 82), no entanto, não foi constatada a presença destes no espectro do derivado **ACETR 17**, o que permite concluir que a biotransformação ocorreu no anel aromático. A hidroxilação resultante da biotransformação do *p*-cumarato de metila por *T. versicolor* ocorreu no C-3 (Figura 29, página 82). Diante dos resultados obtidos, foi possível propor a estrutura química do derivado **ACETR 17** (Figura 37).

Takahashi e colaboradores (2010), identificaram por RMN de  $^1\text{H}$ , o cafeato de metila, cujos deslocamentos químicos estão coerentes com os resultados encontrados para o **ACETR 17**, obtido experimentalmente por biotransformação (Tabela 10, página 89).

**Figura 37.** Proposta estrutural para o derivado **ACETR 17**, obtido a partir da biotransformação do **ACE** por *T. versicolor*.



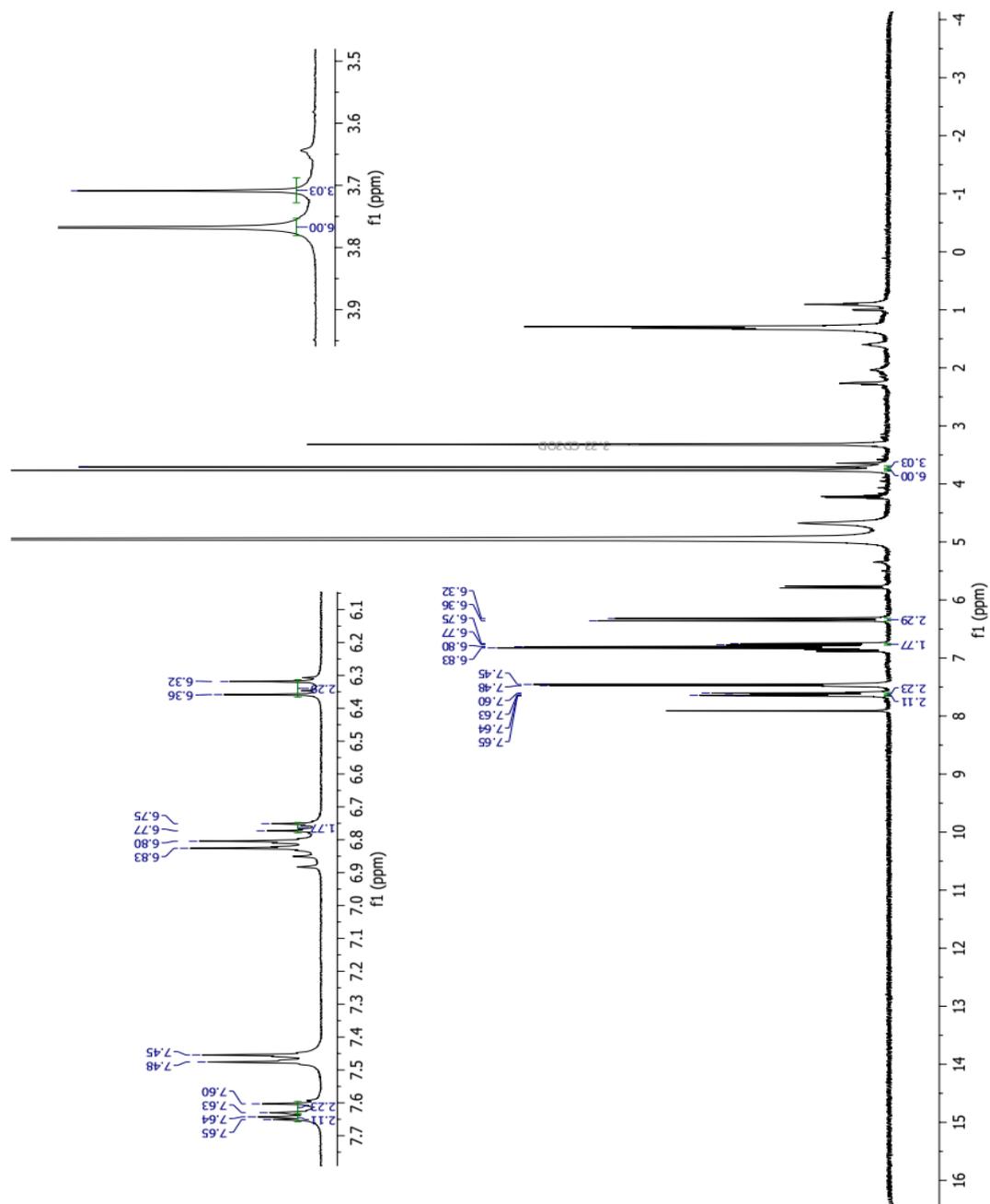
### 4.3.3 Identificação estrutural do derivado **ACETR 19**

O derivado **ACETR 19**, identificado como o (*E*)-3-(4-metoxifenil) acrilato de metila ou *p*-metoxicinamato de metila, apresentou-se como um sólido amarelo em mistura, solúvel em CH<sub>3</sub>OH. A identificação foi realizada através da análise dos dados espectroscópicos de RMN de <sup>1</sup>H.

**Tabela 11.** Dados de RMN de <sup>1</sup>H (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD) do derivado **ACETR 19**

<b>ACETR 19</b>	
<b>Posição</b>	<b>δ<sub>H</sub> (ppm), multiplicidade, J (Hz)</b>
1'	7,62, <i>d</i> , <i>J</i> = 15,92
2'	6,34, <i>d</i> , <i>J</i> = 15,92
3'	3,77, <i>s</i>
4'	3,71, <i>s</i>
2	7,64, <i>d</i> , <i>J</i> = 8,54
3	6,76, <i>d</i> , <i>J</i> = 8,54

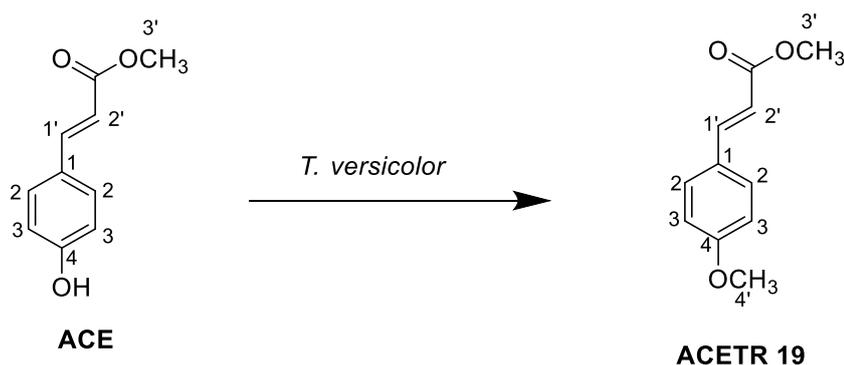
**Figura 38.** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do (*E*)-3-(4-metoxifenil) acrilato de metila (**ACETR 19**) em mistura com o **ACE** (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ).



A análise do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do **ACETR 19** (Figura 38, página 94) permitiu obter informações da estrutura química do mesmo. Como foi obtido em mistura, foi utilizado o espectro do padrão **ACE** (Figura 30, página 83) para facilitar a identificação dos sinais do **ACETR 19**. As informações sobre os deslocamentos químicos do **ACE** padrão estão na Tabela 8 (página 81).

Já no espectro da mistura (Figura 38), os sinais dos hidrogênios do anel aromático aparecem nos seguintes deslocamentos químicos:  $\delta$  7,64 (H-2, *d*, 2H); 6,76 (H-3, *d*, 2H). Os hidrogênios da olefina com acoplamento em *trans*, apresentam os seguintes deslocamentos químicos:  $\delta$  7,62 (H-1', *d*, 1H); 6,34 (H-2', *d*, 1H). Porém, aparecem deslocamentos químicos referentes a duas metoxilas: em  $\delta$  3,77 (H-3', *s*, 3H) e em 3,71 (H-4', *s*, 3H), o que pode-se concluir que a biotransformação resultou na adição de um grupo metoxila no C-4 (Figura Figura 30, página 84). Diante dos resultados obtidos, foi possível propor a estrutura química do derivado **ACETR 19** (Figura 39).

**Figura 39.** Proposta estrutural para o derivado **ACETR 19**, obtido a partir da biotransformação do **ACE** por *T. versicolor*



#### 4.4 Estudos *in silico* das biotransformações dos compostos fenólicos selecionados

Ensaio *in vitro* mostraram que a biotransformação das substâncias fenólicas por *T. versicolor*, resultou na derivatização exclusiva do *p*-cumarato de metila (**ACE**). Com a finalidade de compreender a especificidade do fungo *T. versicolor* e, conseqüentemente, a das suas enzimas pelo substrato mencionado, foi utilizada a técnica de acoplamento molecular.

Uma das características mais valiosas dos métodos de acoplamento molecular é a capacidade de mimetização dos modos de ligação observados experimentalmente, funcionando até mesmo como forma de validação dos mesmos (SILVA, 2007). No presente estudo, foi hipotetizado que a enzima majoritariamente produzida no meio reacional contendo *T. versicolor* tratava-se da lacase (TvLac). Para os ensaios *in silico*, a estrutura da lacase foi obtida a partir do banco de dados Protein Data Bank (PDB).

Conforme descrito no item 3.11.3 (página 66), os aminoácidos presentes no sítio ativo estudado foram: SER235, ILE236, GLN237, PHE239, GLN242, TYR244, PRO299, LEU300, GLU302, ALA410, ARG423, VAL426 e SER427.

Os resíduos de aminoácidos utilizados nas predições, apresentam características hidrofílicas, onde se destacam a serina e glutamina, e alguns com características hidrofóbicas, como alanina e leucina. Sendo assim, considerando que os substratos fenólicos (**ACE**, **ACFE** e **AFE**) possuem um anel aromático, no sítio ativo, o mesmo pode ser posicionado em regiões hidrofóbicas, interagindo com resíduos de aminoácidos menos polares, prevalecendo assim as interações de van der Waals (BARREIRO; FRAGA, 2015). Por outro lado, os grupos polares, como a carbonila do éster e a hidroxila fenólica, podem interagir com resíduos de aminoácidos polares, constituindo dessa forma as interações por ligação de hidrogênio.

No ensaio de acoplamento molecular, foram obtidos os valores da afinidade de ligação entre os substratos fenólicos (**ACE**, **ACFE** e **AFE**) e o sítio ativo do receptor biológico. Os dados energéticos do acoplamento realizado no Autodock, resultantes das interações mais efetivas entre proteína-ligante encontram-se na Tabela 12.

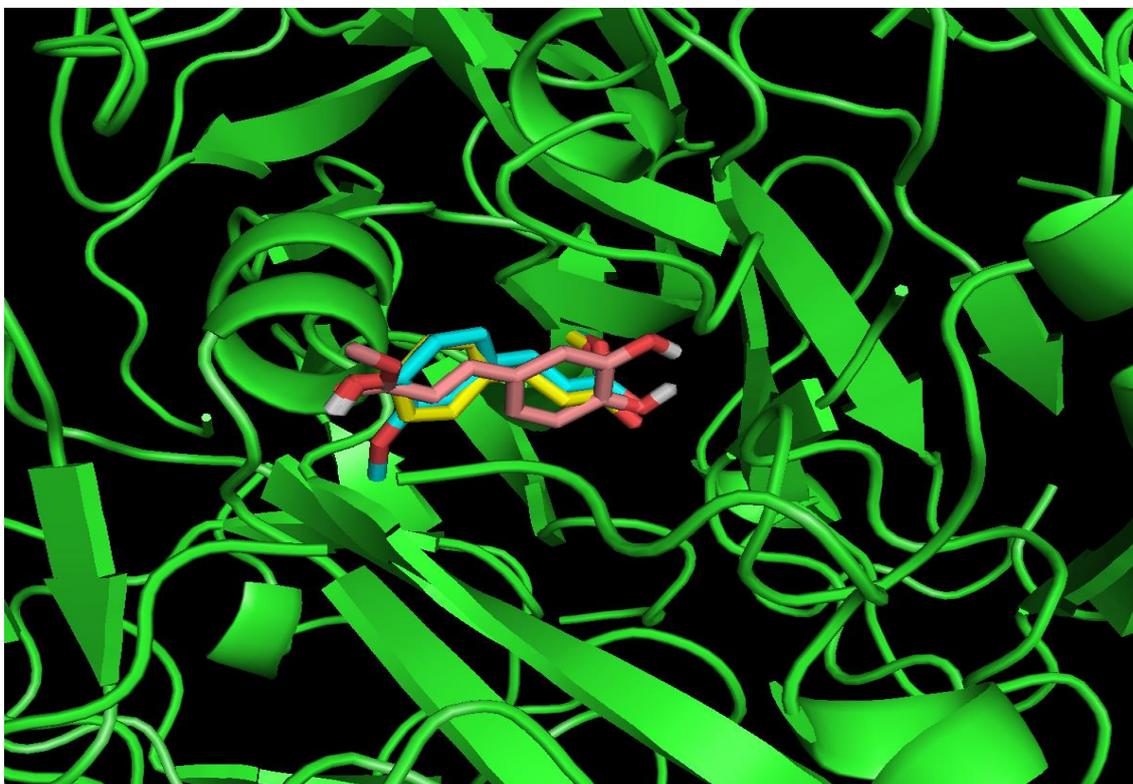
**Tabela 12.** Energias de ligação resultantes do acoplamento molecular entre as substâncias fenólicas e a lacase

Ligante	$\Delta G$ (Kcal.mol <sup>-1</sup> )
Cafeato de metila	- 7,55
Ferulato de metila	- 7,37
<i>p</i> -cumarato de metila	- 6,89

Os valores das energias de ligação permitiram concluir que os ligantes fenólicos testados interagiram de forma espontânea com o receptor biológico. Porém, os valores diferentes de  $\Delta G$  podem ser atribuídos às diferentes orientações que os mesmos assumiram no sítio ativo da lacase ensaiada.

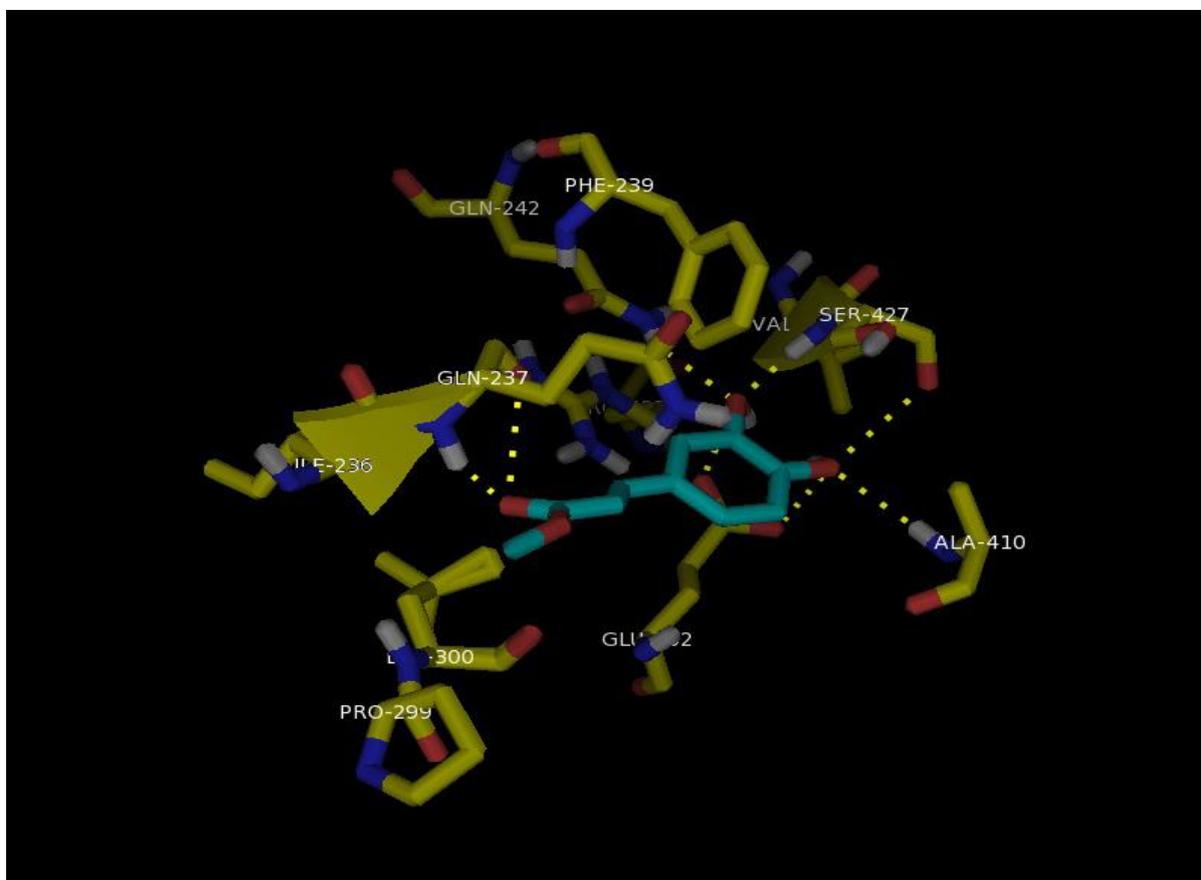
Os resultados do acoplamento molecular apontaram que o cafeato de metila (**ACFE**) pode se ligar ao sítio que melhor posiciona o ferulato de metila (**AFE**) e *p*-cumarato de metila (**ACE**), alcançando desta forma energia de ligação diferente (Figura 40).

**Figura 40.** Sítio de ligação na TvLac com ferulato de metila (azul), cumarato de metila (amarelo) e cafeato de metila (rosa).



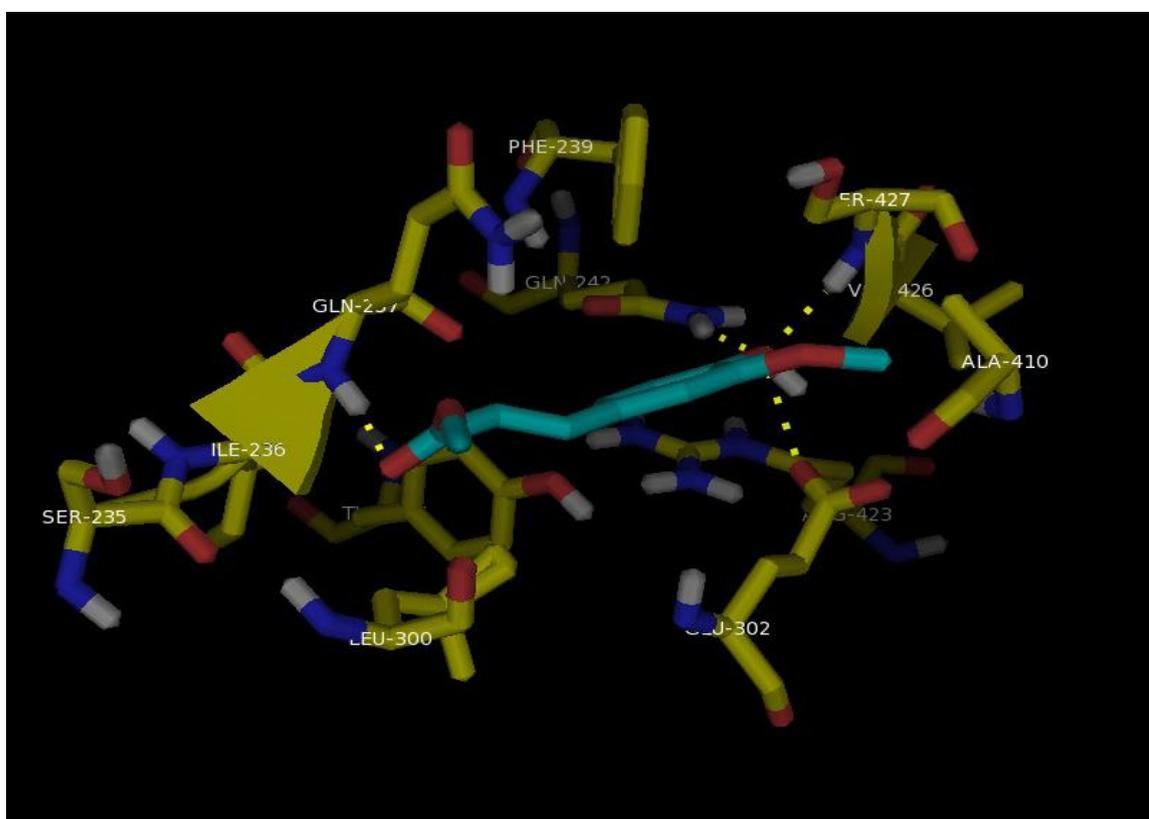
O ensaio do acoplamento molecular do cafeato de metila (**ACFE**) no sítio ativo da TvLac mostrou que este ligante alcançou os resíduos de aminoácidos (linhas tracejadas em amarelo) GLN237, GLN242, SER427 e GLU302, ALA 410. A interação com o resíduo GLN 237 ocorreu por ligação de hidrogênio na região que se encontra a carbonila. A hidroxila estava sobre uma região que permitiu as interações por ligação de hidrogênio com os resíduos SER427 e GLN242. O resíduo GLU302 interagiu diretamente com hidrogênio da hidroxila. No sítio de ligação pode ser observado que o anel aromático estava posicionado na região desfavorável a interações hidrofóbicas, com os resíduos PHE239, TYR244, LEU300 e ILE236. Em comparação com os acoplamentos dos outros substratos, o acoplamento do cafeato de metila no sítio de ligação, resultou no maior número de interações por ligação de hidrogênio, o que contribuiu para a formação de um complexo mais estável (Figura 41).

**Figura 41.** Sítio de ligação do TvLac com cafeato de metila (**ACFE**), visualizado no Pymol.



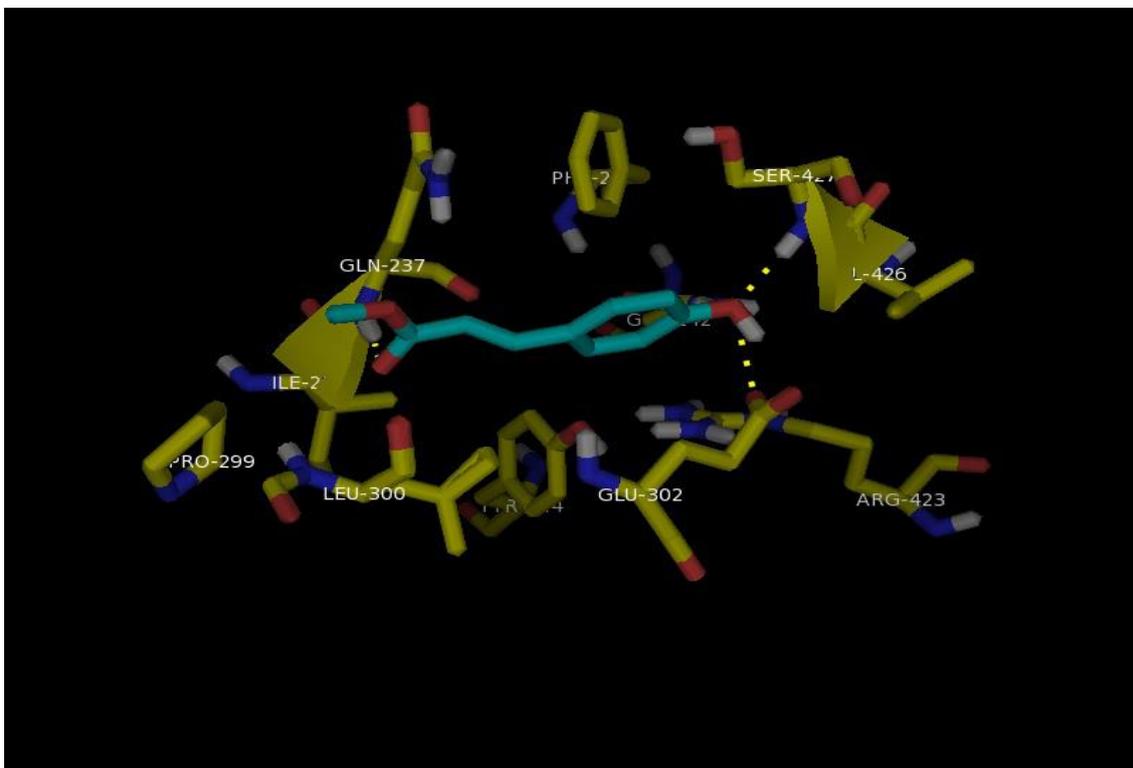
O ensaio de acoplamento molecular do ferulato de metila (**AFE**) mostrou que este ligante foi orientado no sítio de ligação da TvLac, de forma que alcançou os resíduos de aminoácidos GLN237, GLN242, SER427 e GLU302. A interação com o resíduo GLN 237 ocorreu por ligação de hidrogênio na região que se encontra a carbonila. A hidroxila localizou-se sobre uma região que permitiu as interações por ligação de hidrogênio com os resíduos SER427 e GLN242. O resíduo GLU302 interagiu diretamente com o hidrogênio da hidroxila. No sítio de ligação, pode ser observado ainda que o anel aromático estava posicionado na região desfavorável a interações hidrofóbicas, com os resíduos PHE239, TYR244, LEU300 e ILE236 (Figura 42). Pode ser visto que, embora o **AFE** tenha apresentado interação com os mesmos resíduos de aminoácidos que o **ACFE**, seu acoplamento resultou em uma energia maior. Tal fato pode ser atribuído ao menor número de ligações de hidrogênio que o **AFE** estabeleceu (Figura 42).

**Figura 42.** Sítio de ligação do TvLac com ferulato de metila (**AFE**), visualizado no Pymol.



O acoplamento molecular do *p*-cumarato de metila (**ACE**) mostrou que este ligante assumiu uma orientação no sítio ativo da lacase que permitiu interações com os resíduos de aminoácidos GLN237, GLN242, SER427 e GLU302. A interação com o resíduo GLN 237 ocorreu por ligação de hidrogênio na região que se encontra o oxigênio da carbonila. A hidroxila localizou-se sobre uma região que permitiu as interações por ligação de hidrogênio com os resíduos SER427 e GLN242. O resíduo GLU302 interagiu diretamente com o hidrogênio da hidroxila. No sítio de ligação, pode ser observado que o anel aromático estava posicionado na região desfavorável a interações hidrofóbicas, com os resíduos PHE239, TYR244, LEU300 e ILE236. Pode ser observado que o **ACE** estabeleceu um menor número de ligação de hidrogênio em comparação com os ligantes **ACFE** e **AFE**, sendo assim formado um complexo de maior energia. Além disso, a orientação assumida pelo **ACE** mostrou-se mais favorável, permitindo que regiões (como o carbono carbonílico e carbono em *orto* à hidroxila fenólica) estivessem menos bloqueadas pelos resíduos de aminoácidos. Dessa forma, foram facilitadas as reações de biotransformação (Figura 43).

**Figura 43.** Sítio de ligação do TvLac com *p*-cumarato de metila (**ACE**) visualizado no Pymol.

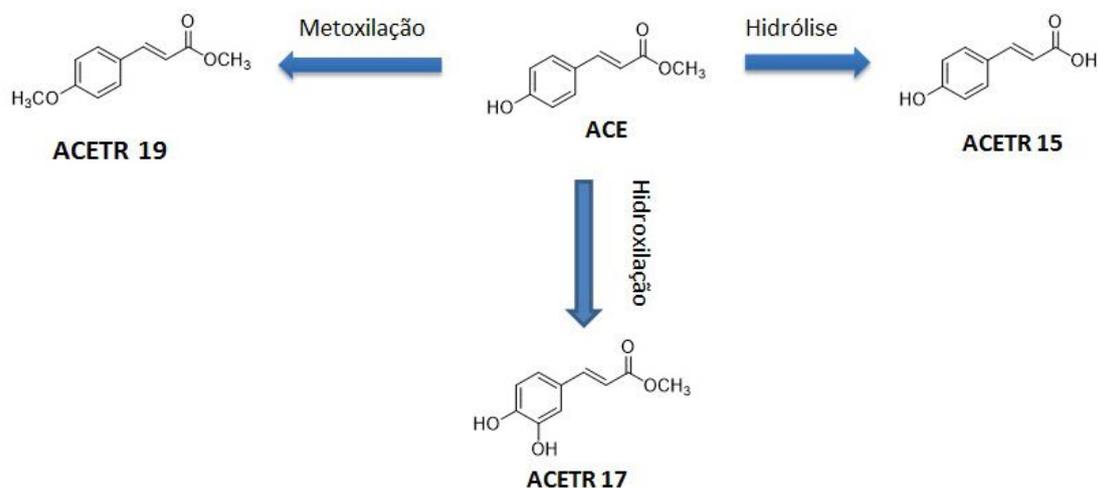


A partir de cada conformação espacial, são obtidas energias livres de ligação (entre ligante e alvo), onde a menor energia é considerada a mais provável para justificar a conformação da interação (KITCHEN *apud* REBOREDO, 2012).

Os resultados alcançados permitiram reconhecer que o sítio ativo utilizado em predições preliminares de acoplamento molecular, pode ser utilizado para obtenção de derivados mais polares que gerem complexos proteína-ligante mais estáveis.

Os resultados do acoplamento molecular dos substratos no sítio ativo da lacase, permitiram propor uma explicação válida que pudesse justificar por que somente o *p*-cumarato de metila foi biotransformado por *T. versicolor*. Considerando que entre os três substratos utilizados nos ensaios, o *p*-cumarato de metila ao interagir com o sítio ativo da lacase, gerou um complexo ligante-proteína menos estável, uma vez que apresentou maior valor no  $\Delta G$  (Tabela 12, página 97). Com isso, a derivatização por processo de biotransformação foi favorecida para formar ligantes que pudessem interagir espontaneamente com o receptor biológico, levando a formação de complexo de menor energia. Neste caso, admitiu-se que o *p*-cumarato de metila assumiu uma orientação favorável, cujo posicionamento no sítio ativo permitiu a interação efetiva com radicais, resultando nas reações de hidrólise, hidroxilação e metoxilação (Figura 44).

**Figura 44.** Reações Químicas resultantes da biotransformação do **ACE** por *T. versicolor*.



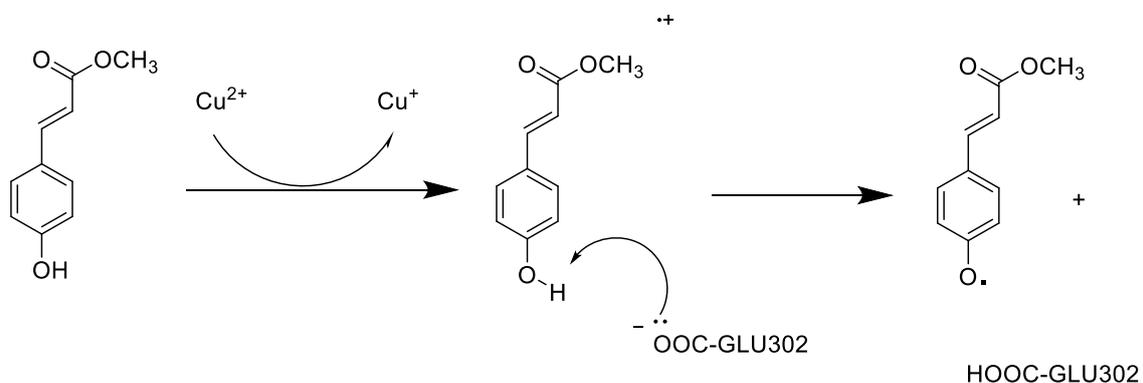
#### 4.4.1 Propostas de mecanismos de reação para obtenção dos derivados da biotransformação do **ACE** por *T. versicolor*

As lacases participam de vários processos fisiológicos por meio da catálise de reações de oxidorredução. Nas plantas, por exemplo, as lacases estão envolvidas com a polimerização da lignina (CAPARRÓS-RUIZ et al., 2006). Embora presente em diversos organismos vivos, as lacases mais estudadas são as de origem fúngicas, em particular dos Basidiomicetos, como *Trametes versicolor*. A lacase produzida por *T. versicolor* tem um dos maiores potenciais redox e compõe o principal componente extracelular de tal fungo (LIMURA et al., 2018).

Considerando que biotransformação das substâncias fenólicas podem ocorrer utilizando enzimas de micro-organismos, e sabendo que foram utilizadas para o processo lacases fúngicas, que atuam em reações de oxirredução, foi possível propor o mecanismo para justificar a formação dos derivados. A reação ocorre em duas etapas: a primeira é a redução de íons

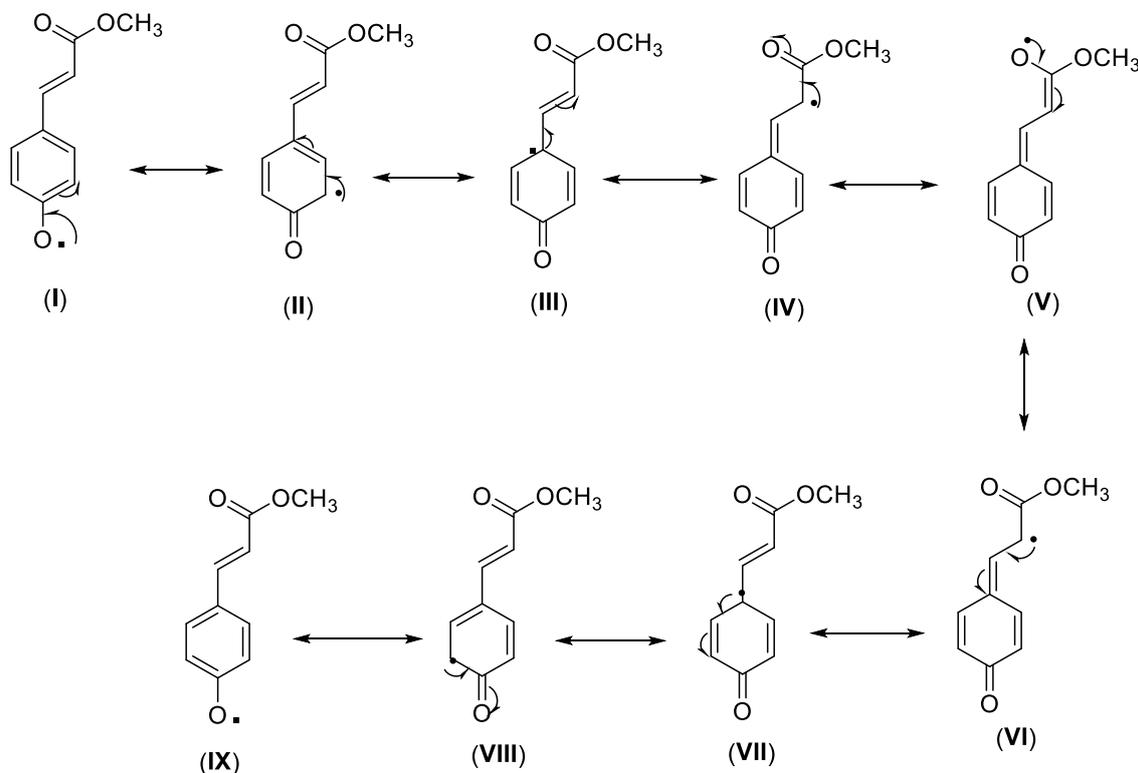
$\text{Cu}^{2+}$  para  $\text{Cu}^+$  paralelo a oxidação das substâncias fenólicas, sendo removido um próton pelo GLU302, levando a formação de radicais (Figura 45).

**Figura 45.** Oxidação do *p*-cumarato de metila (**ACE**) no sítio ativo da lacase.

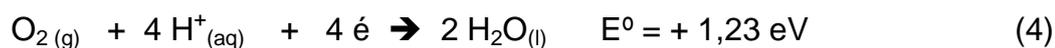
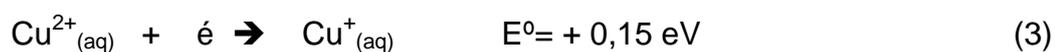


Neste caso, os experimentos realizados revelaram que a única substância que foi biotransformada por *T. versicolor* foi o *p*-cumarato de metila. O *p*-cumarato de metila com a perda de um elétron e com o auxílio do resíduo GLU302 na retirada de um próton, converte-se a um radical fenoxi que pode ser estabilizado por efeito de ressonância (Figura 46).

**Figura 46.** Estruturas de ressonância do radical fenoxi (DEWICK, 2009).



Na segunda etapa, o  $\text{Cu}^+$  é oxidado a  $\text{Cu}^{2+}$  paralelo a redução do oxigênio. Consultando a tabela de Potenciais de Redução, é possível atribuir que o  $\text{O}_2$  pode atuar como agente oxidante frente ao  $\text{Cu}^+$ , pois seu potencial de redução é mais elevado, contribuindo dessa forma para que a diferença de potencial resulte em um processo espontâneo (Equações 3 e 4).



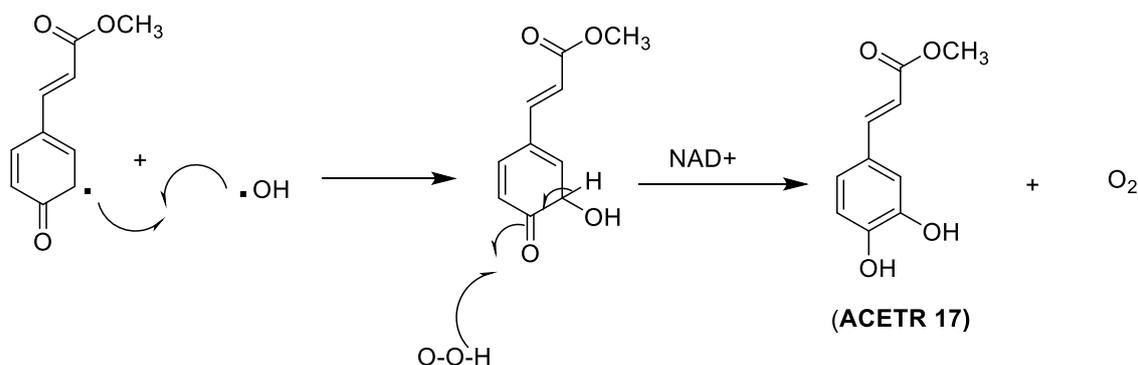
Ferreira e Matsubara (1997) comentam que espécies reativas do metabolismo do oxigênio são encontrados em todos sistemas biológicos. Em

condições fisiológicas do metabolismo celular aeróbico, o  $O_2$  sofre redução tetravalente, com aceitação de quatro elétrons, resultando na formação de  $H_2O$ . Durante esse processo são formados intermediários reativos, como os radicais superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), hidroperoxila ( $HO_2^{\cdot}$ ) e hidroxila ( $\cdot OH$ ), e o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ).

Estes fragmentos reagem entre si e levam a formação de  $H_2O$ , que é uma das espécies produzida no ciclo catalítico da lacase. Estes fragmentos também podem reagir com o radical fenoxi e formar outros produtos.

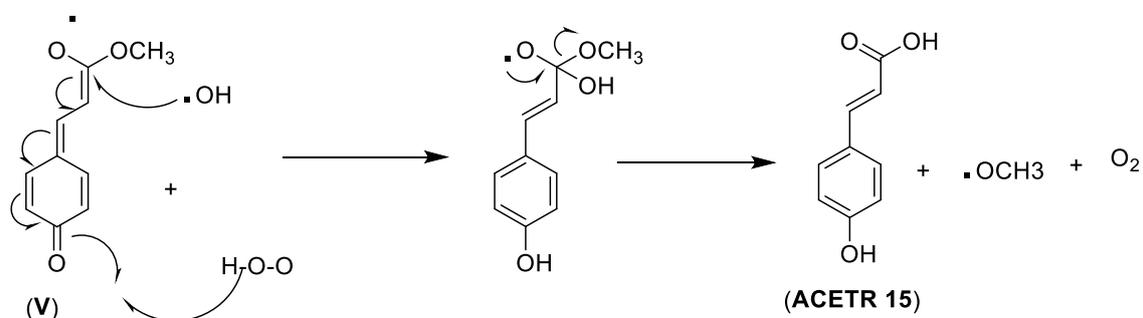
Para explicar a formação do derivado **ACETR 17**, foi proposto um mecanismo de reação radicalar, no qual o fragmento (II) reage com o radical  $\cdot OH$ . Forma-se um intermediário, que posteriormente é oxidado na presença de  $NAD^+$  e ocorre a adição simultânea de hidrogênio proveniente do radical hidroperoxila ( $HO_2^{\cdot}$ ) (Figura 47).

**Figura 47.** Proposta do mecanismo de reação radicalar de formação do **ACETR 17**.



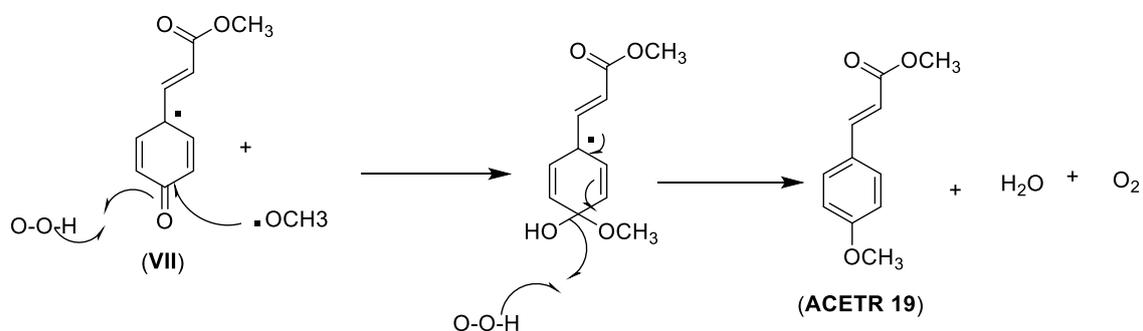
Na formação do derivado **ACETR 15**, o fragmento (V) reage com o radical  $\cdot OH$ , e simultaneamente com o radical  $HO_2^{\cdot}$ , levando a formação de um intermediário. Posteriormente, ocorre a restauração da carbonila e a saída do radical metoxi ( $\cdot OCH_3$ ) (Figura 48).

**Figura 48.** Proposta do mecanismo de reação radicalar de formação do **ACETR 15**



Na proposta de mecanismo de formação do derivado **ACETR 19**, inicialmente o radical  $\text{HO}_2$  e o radical  $\cdot\text{OCH}_3$  (proveniente do fragmento V) reagem simultaneamente com o fragmento (VII). Forma-se um intermediário, que em outra etapa reage com radical  $\text{HO}_2$ , restaurando a aromaticidade da molécula e libera água (Figura 49).

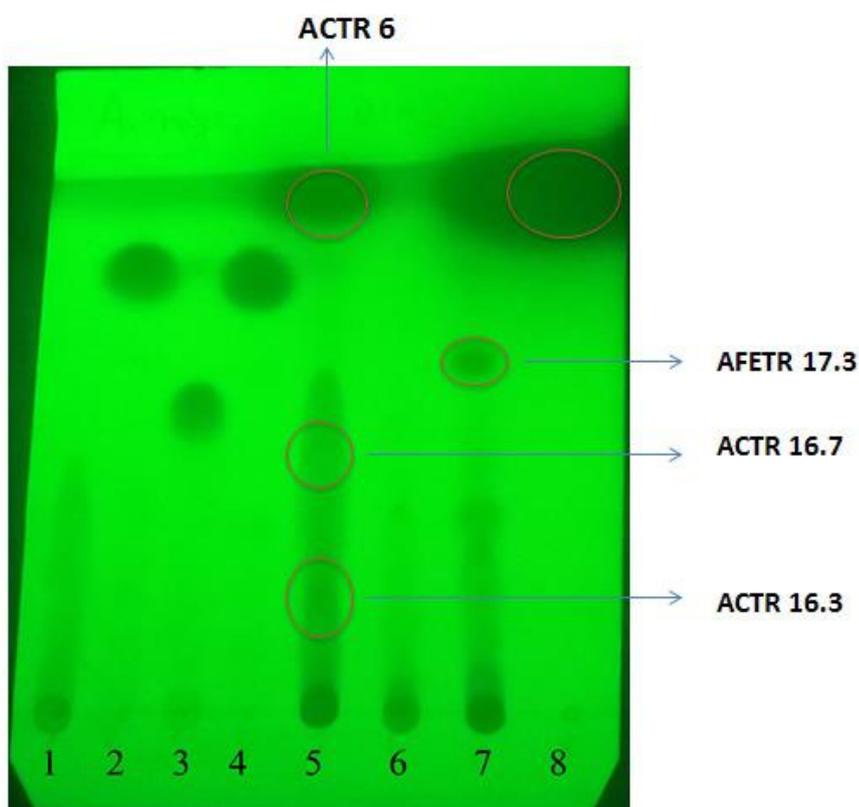
**Figura 49.** Proposta do mecanismo de reação radicalar de formação do **ACETR 19**.



#### 4.5 Avaliação dos perfis químicos dos extratos da biotransformação das substâncias fenólicas por *A. brasiliensis*

Os perfis químicos dos extratos resultantes da biotransformação do *p*-cumarato de metila (**ACE**), ferulato de metila (**AFE**) e cafeato de metila (**ACFE**) por *Aspergillus brasiliensis*, foram avaliados por CCD, cujo eluente utilizado foi hexano:acetato de etila 60:40 (v/v). Após a eluição, as placas foram expostas à radiação ultravioleta (Figura 50). O tempo escolhido para desenvolver os ensaios de biotransformação foi de 72 horas, pois nossos resultados prévios (com o fungo *T. versicolor*) comprovaram que o aumento do tempo de incubação favorece a produção dos derivados.

**Figura 50.** Cromatoplas das biotransformações dos substratos fenólicos selecionados. (1) Controle, (2) *p*-cumarato de metila, (3) cafeato de metila, (4) ferulato de metila, (5) extrato do *p*-cumarato de metila, (6) extrato do cafeato de metila e (7) extrato do ferulato de metila, (8) acetofenona, reveladas a 254 nm.

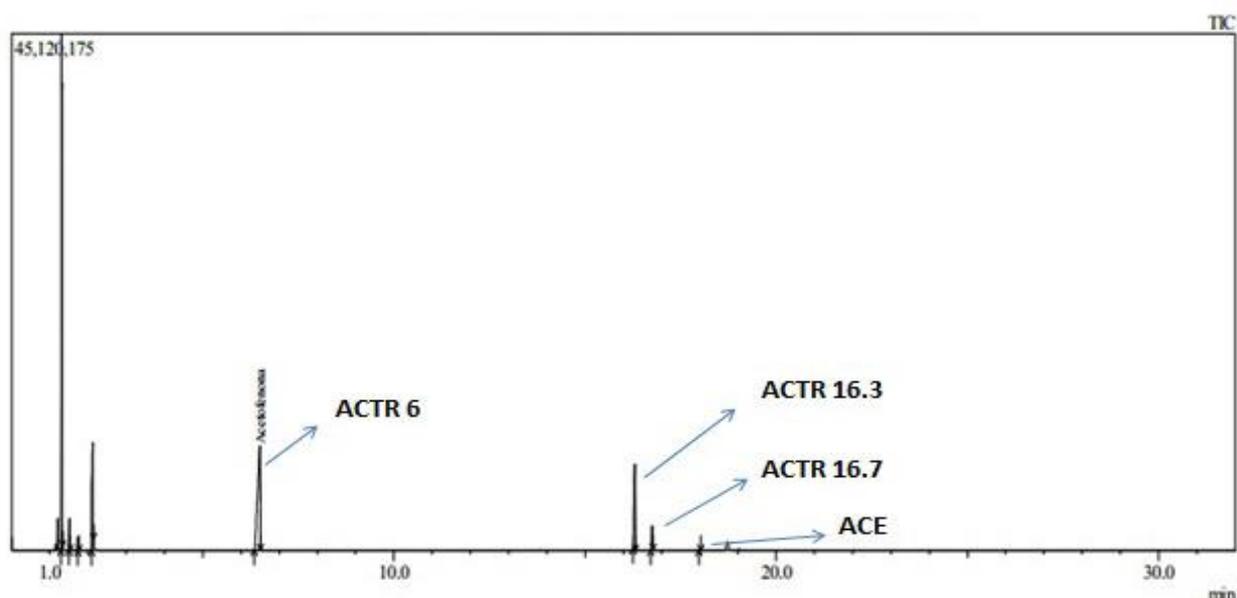


Considerando os perfis químicos apresentados na CCD (Figura 50), concluiu-se que o cafeato de metila não foi biotransformado. O *p*-cumarato de metila foi biotransformado, resultando na formação de três derivados. O ferulato de metila foi biotransformado resultando na formação de um derivado.

#### 4.5.1 Avaliação dos perfis químicos em CG-EM do extrato da biotransformação do **ACE** por *A. brasiliensis*

O extrato da biotransformação do *p*-cumarato de metila (**ACE**) por *A. brasiliensis*, foi submetido ao CG-EM, de acordo com as condições descritas no item 3.8 (página 62), cujo perfil químico está apresentado na Figura 51.

**Figura 51.** Cromatograma obtido no CG-EM. Derivados resultantes da biotransformação do **ACE** por *A. brasiliensis*.



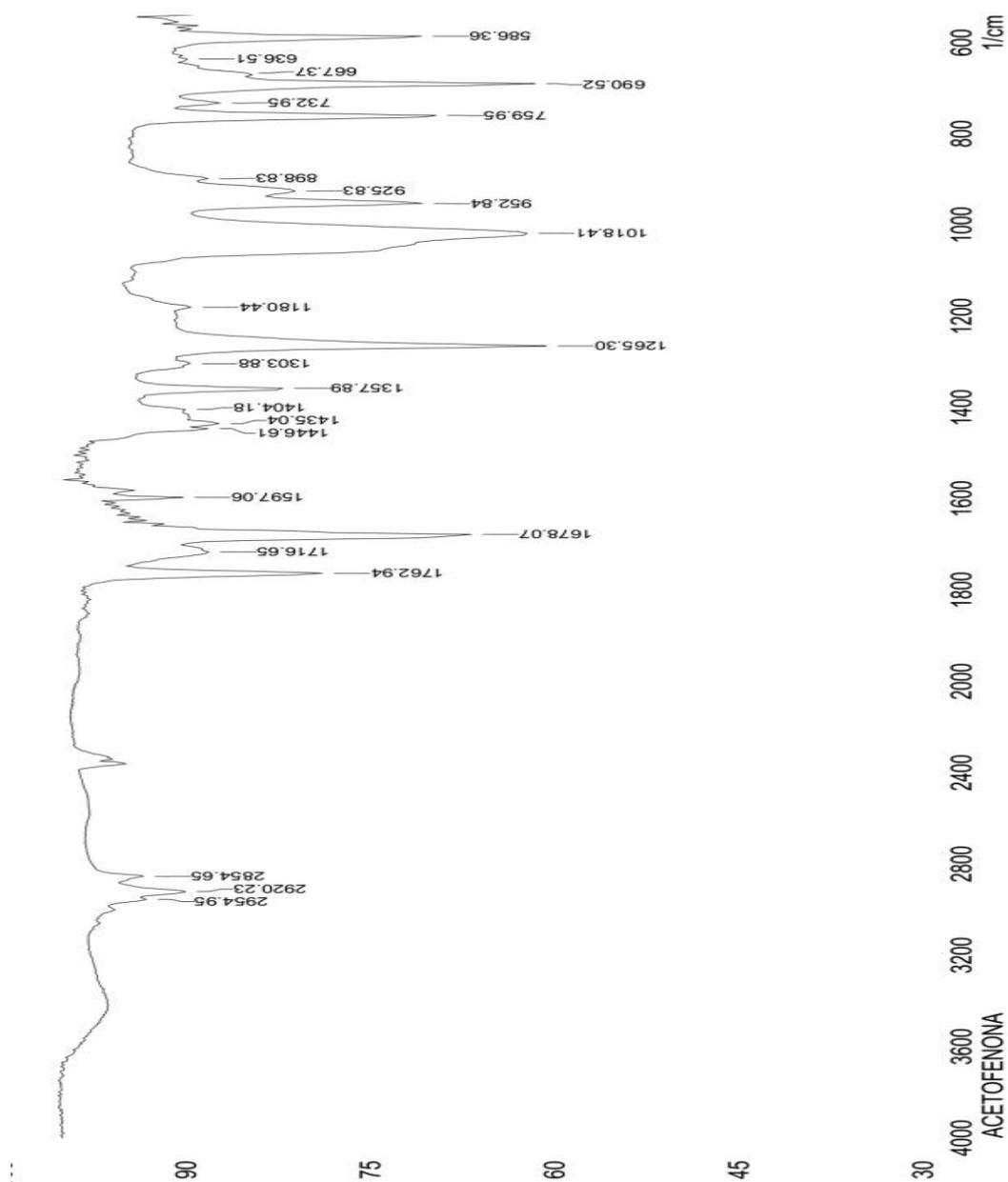
A análise do perfil cromatográfico do extrato, permitiu concluir que foram produzidos três derivados, no qual o **ACTR 6** com TR 6,5 min foi o mais volátil detectado, os derivados **ACTR 16.3** com TR 16,3 min e **ACTR 16.7** com TR 16,7 min são isômeros, pois nos espectros de massas dos mesmos, o ion molecular tem a mesma razão *m/z*. O **ACE** com TR 17 min corresponde ao substrato que não foi metabolizado por *A. brasiliensis*.

#### 4.6 Identificações estruturais dos derivados obtidos da biotransformação do **ACE** por *A. brasiliensis*

As identificações dos derivados provenientes da biotransformação do cumarato de metila (**ACE**) por *A. brasiliensis* foram realizadas através da análise dos dados espectroscópicos de IV e espectrométricos.

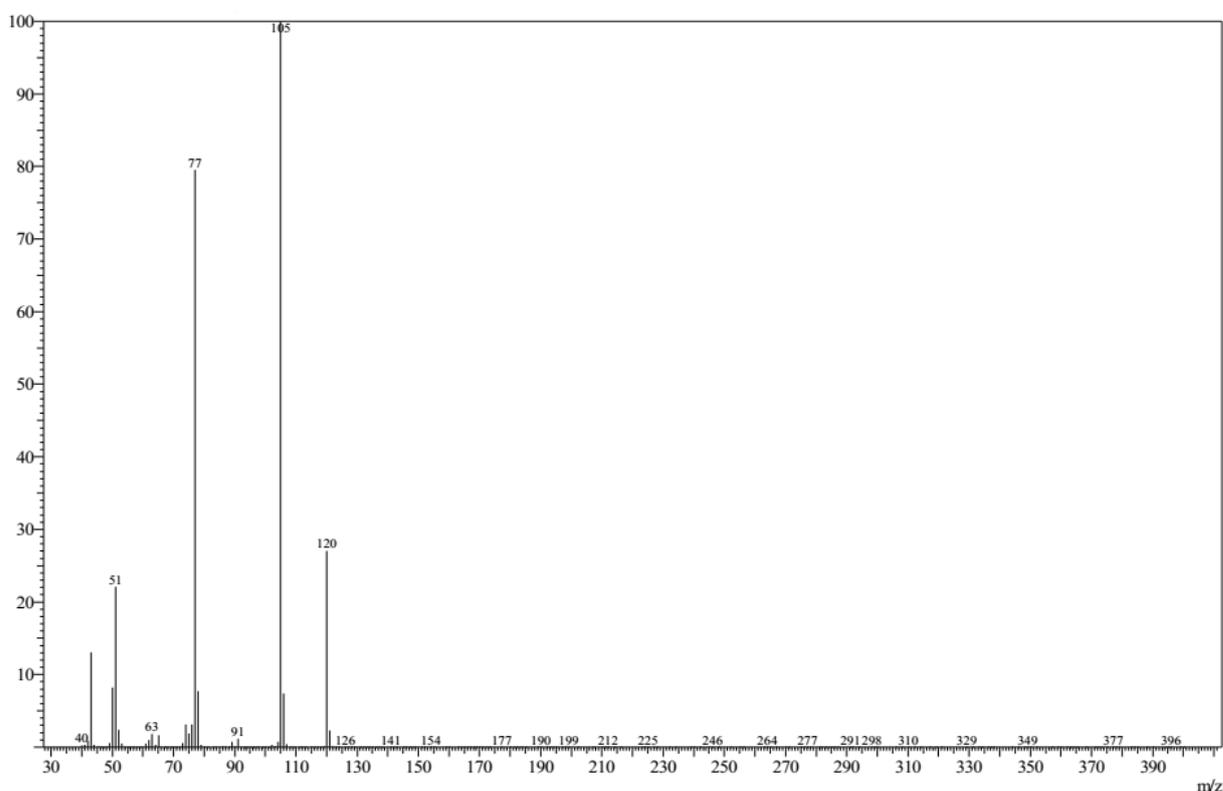
O espectro no IV da mistura (Figura 52) apresentou sinal em  $2920\text{ cm}^{-1}$  corresponde ao estiramento da ligação  $\text{Csp}^3\text{-H}$  de alcano. Apresentou banda de absorção em  $1762\text{ cm}^{-1}$  característica de estiramento da ligação  $\text{C=O}$  de éster. A banda em  $1678\text{ cm}^{-1}$  corresponde ao estiramento da ligação  $\text{C=O}$  de cetona conjugada. A banda em  $1597\text{ cm}^{-1}$  corresponde ao estiramento da ligação  $\text{C=C}$  de anel aromático. O sinal em  $1265\text{ cm}^{-1}$  é característica de estiramento da ligação  $\text{C-O}$  de éster. A banda em  $1018\text{ cm}^{-1}$  corresponde ao estiramento da ligação  $\text{C-O}$  de álcool primário. A banda em  $926\text{ cm}^{-1}$  é característico de deformação da ligação  $\text{C-H}$  de aromático 1,2,4-trissubstituído. A banda em  $759\text{ cm}^{-1}$  é correspondente a deformação da ligação  $\text{C-H}$  de aromático 1,4-dissubstituído. A banda em  $690\text{ cm}^{-1}$  é correspondente a deformação da ligação  $\text{C-H}$  de aromático monossubstituído.

**Figura 52.** Espectro de Infravermelho do extrato obtido a partir da biotransformação do **ACE** por *A. brasiliensis*.



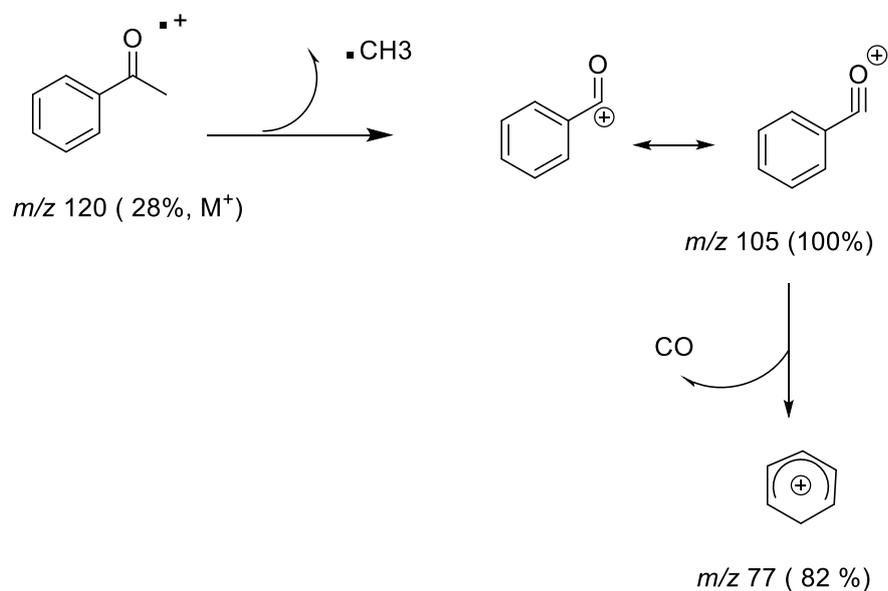
O espectro de massa do **ACTR 6** (Figura 53) apresenta um pico do íon molecular  $m/z$  igual a 120, e o pico base em  $m/z$  igual a 105. Com as informações obtidas por IV e EM, pode-se propor que a estrutura química do derivado **ACTR 6**, foi resultado de reações de hidroxilação e descarboxilação, formando a acetofenona.

**Figura 53.** Espectro de massas do derivado **ACETR 6** obtido a partir da biotransformação do **ACE** por *A. brasiliensis*



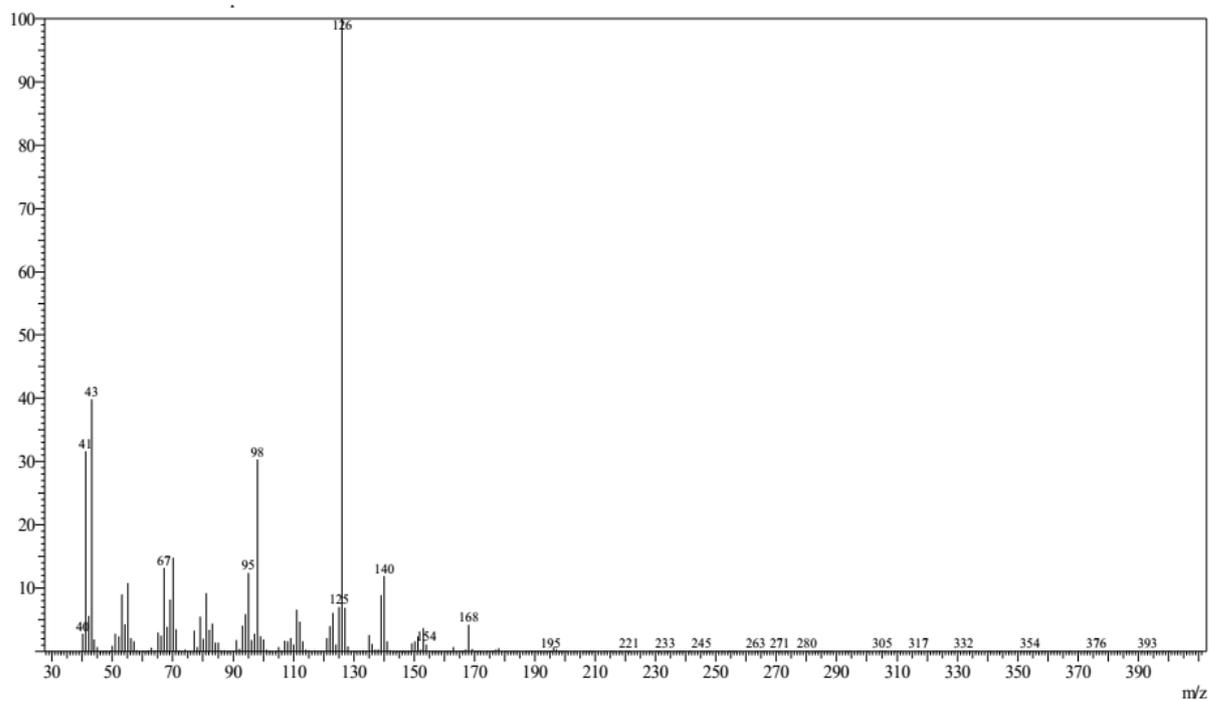
Com base nos picos apresentados no espectro de massas da acetofenona (**ACTR 6**) (Figura 53), foi possível propor a fragmentação a seguir (Figura 54).

**Figura 54:** Proposta de fragmentos no espectro de massas da acetofenona (ACTR 6).



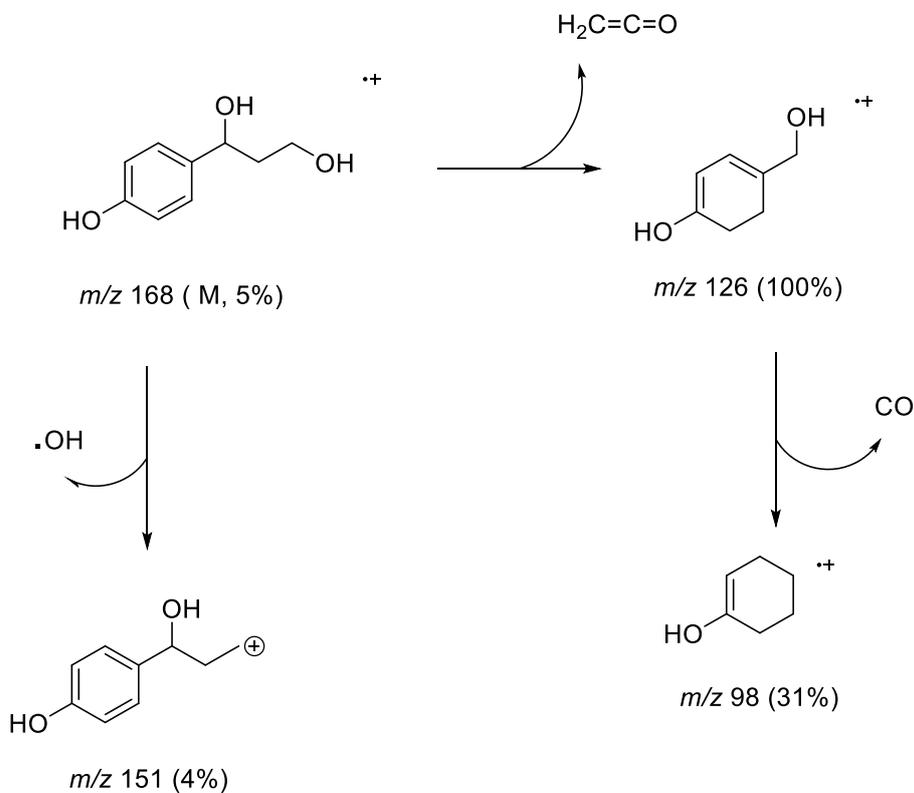
O espectro de massa do **ACTR 16.3** (Figura 55) apresenta um pico do íon molecular  $m/z$  igual a 168, e o pico base em  $m/z$  igual a 126. Com as informações obtidas por IV e EM, pode-se propor que a estrutura química do derivado **ACTR 16.3**, foi resultado de reações de hidroxilação no alceno e redução, formando o 1-(4-hidroxifenil) propano-1,3-diol.

**Figura 55.** Espectro de massas do derivado **ACETR 16.3** obtido a partir da biotransformação do **ACE** por *A. brasiliensis*



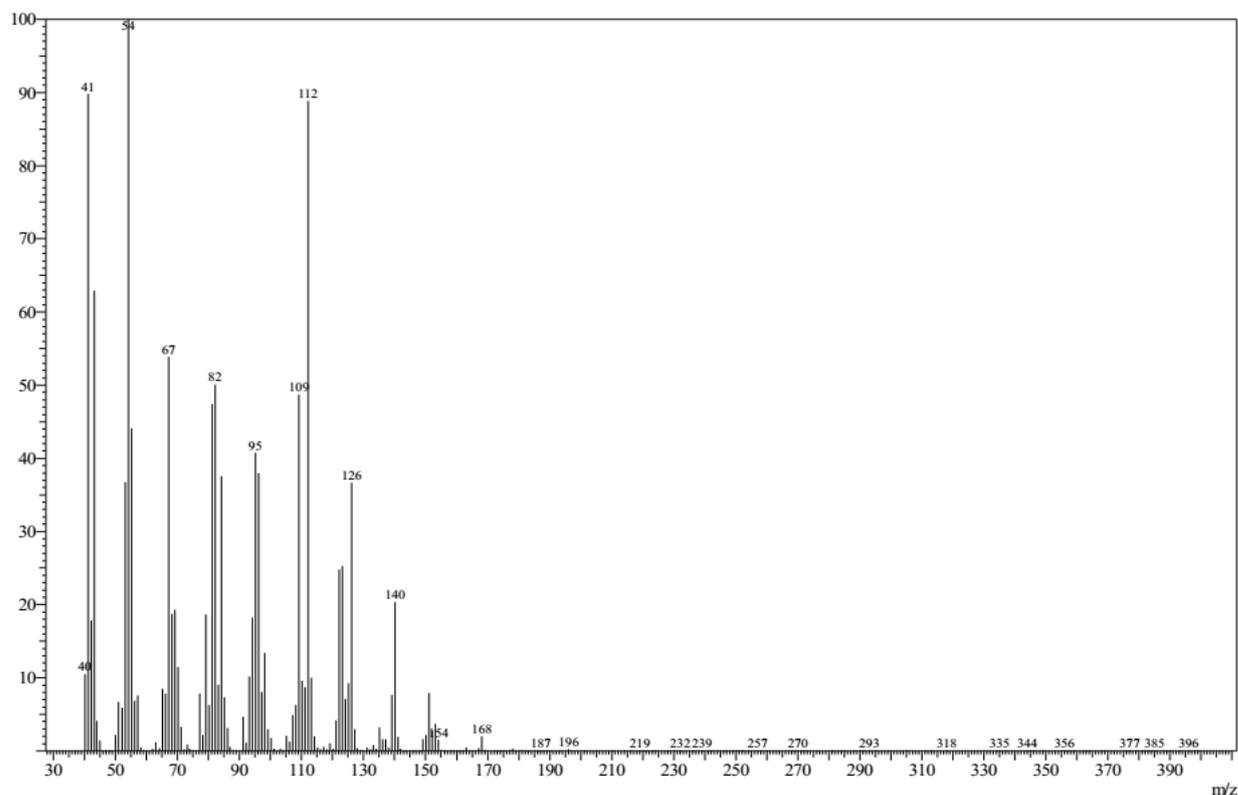
Com base nos picos apresentados no espectro de massas do 1-(4-hidroxifenil) propano-1,3-diol (**ACTR 16.3**) (Figura 55), foi possível propor a fragmentação a seguir (Figura 56).

**Figura 56.** Proposta de fragmentos no espectro de massas do 1-(4-hidroxifenil) propano-1,3-diol (**ACTR 16.3**).



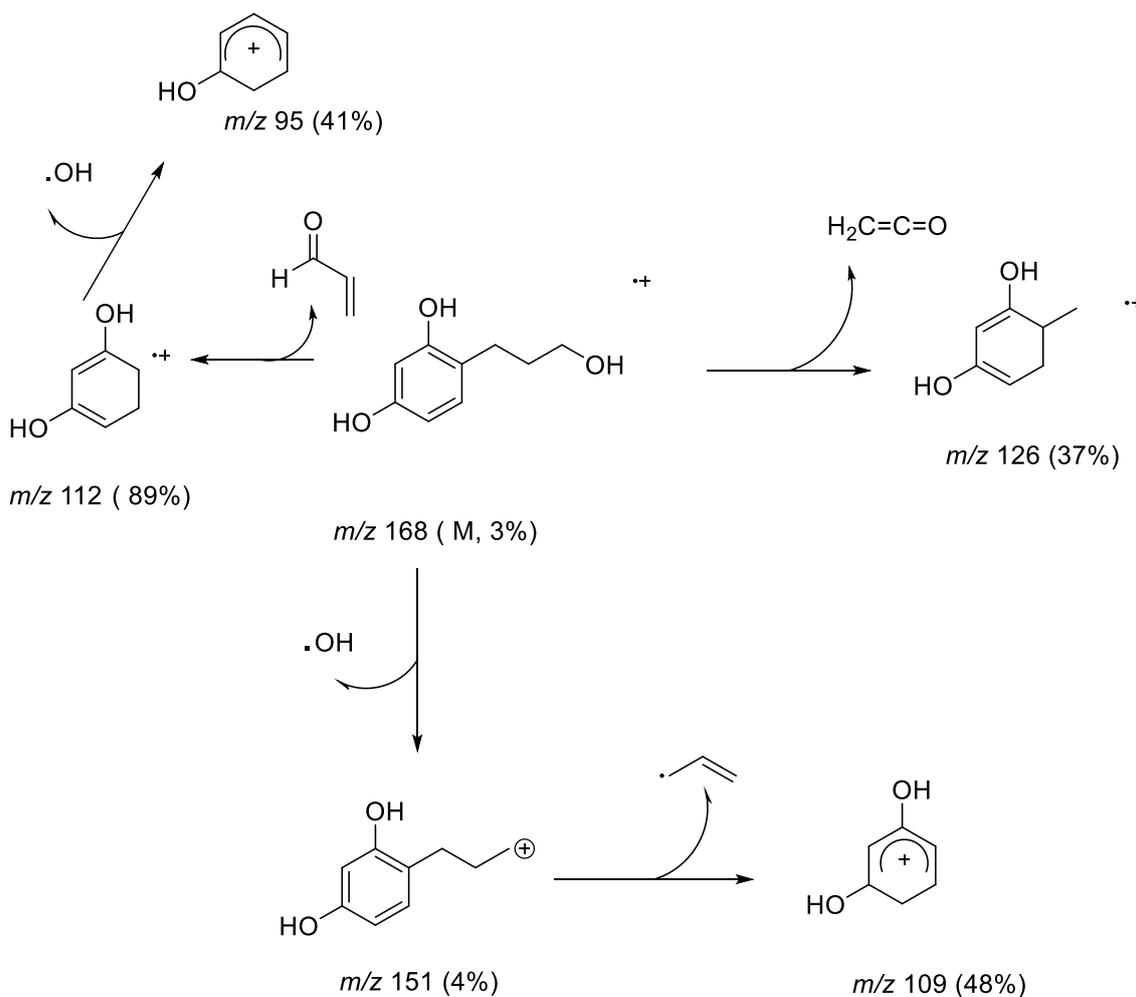
O espectro de massa do **ACTR 16.7** (Figura 57) apresenta um pico do íon molecular  $m/z$  igual a 168, e o pico base em  $m/z$  igual a 54. Com as informações obtidas por IV e EM, pode-se propor que a estrutura química do derivado **ACTR 16.7**, foi resultado de reações de hidroxilação no anel aromático e redução, formando o 4-(3-hidroxiopropil) benzeno-1,3-diol.

**Figura 57.** Espectro de massas do derivado **ACETR 16.7** obtido a partir da biotransformação do **ACE** por *A. brasiliensis*



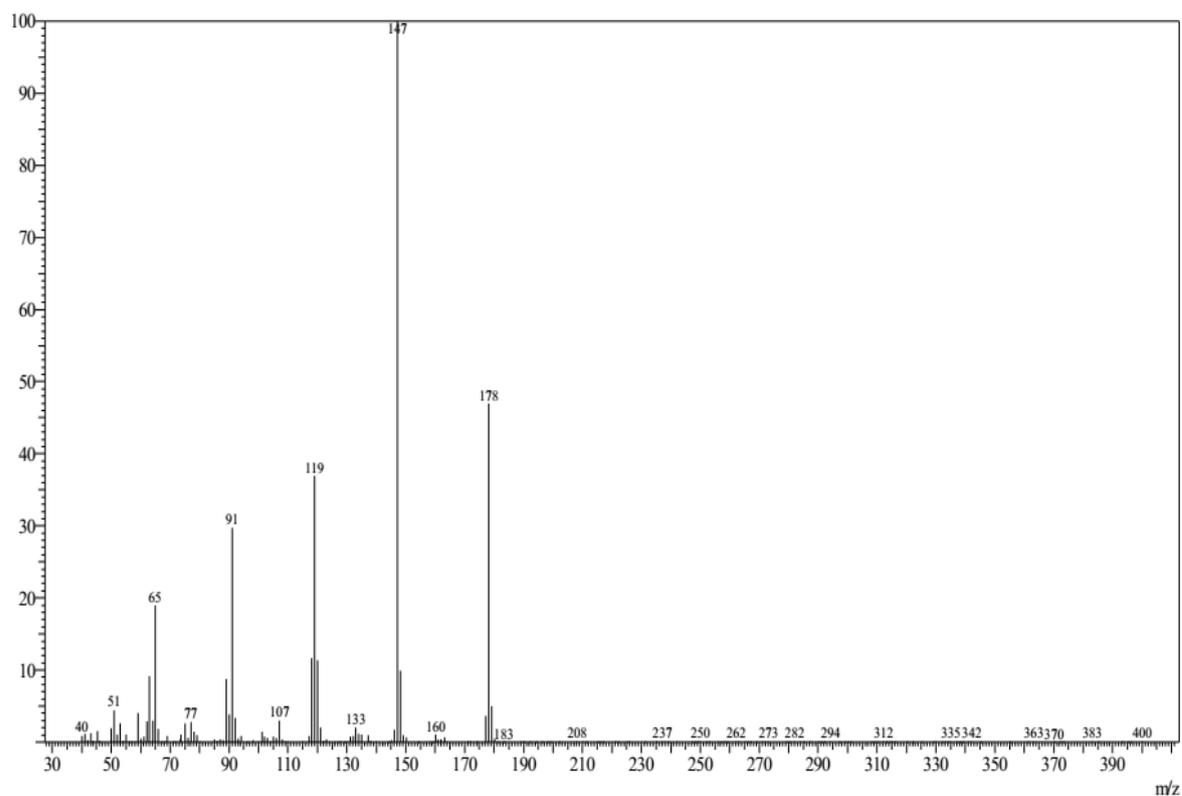
Com base nos picos apresentados no espectro de massas do 4-(3-hidroxipropil) benzeno-1,3-diol (Figura 57), foi possível propor a fragmentação a seguir (Figura 58).

**Figura 58.** Proposta de fragmentos no espectro de massas do 4-(3-hidroxiopropil) benzeno-1,3-diol.

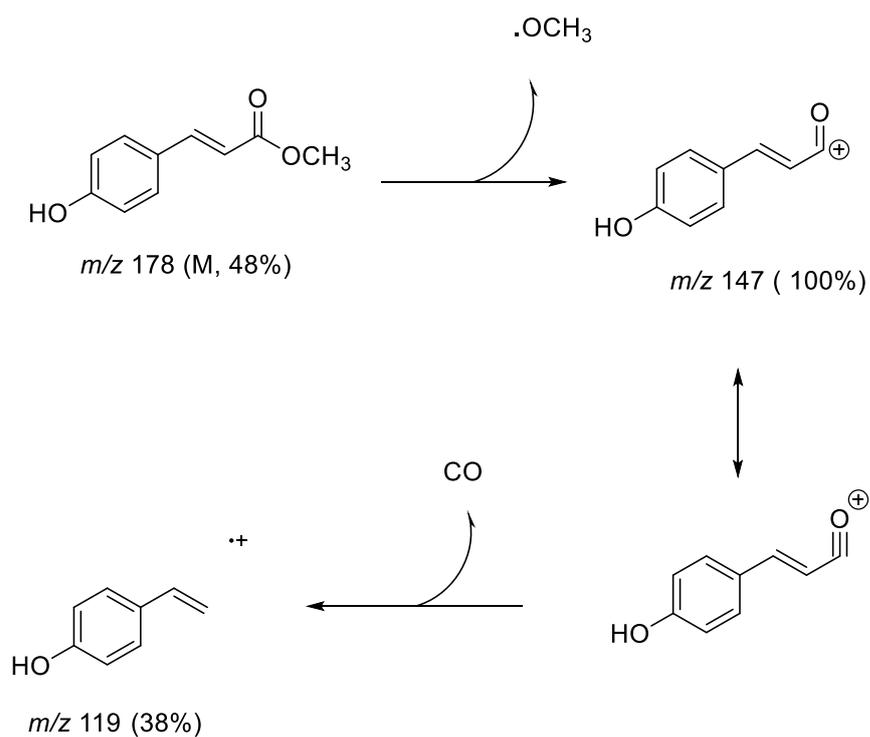


O espectro de massa do **ACE** (Figura 59) apresenta um pico do íon molecular  $m/z$  igual a 178, e o pico base em  $m/z$  igual a 147. Com as informações obtidas por IV e EM, e conhecendo a estrutura química do **ACE**, foi possível propor a fragmentação na sequência (Figura 60).

**Figura 59.** Espectro de massas do *p*-cumarato de metila (**ACE**).



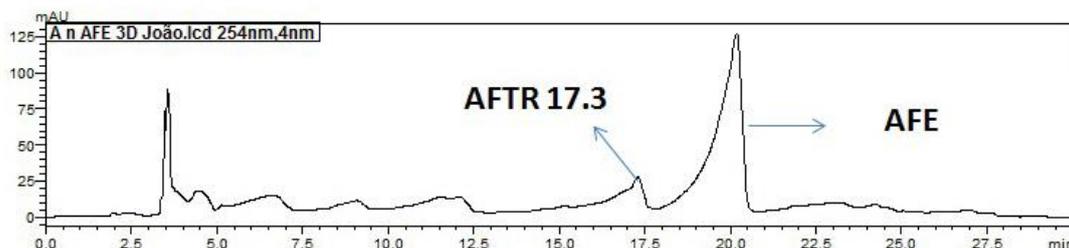
**Figura 60.** Proposta de fragmentos no espectro de massas do *p*-cumarato de metila.



#### 4.7 Avaliação dos perfis químicos em CLAE-DAD dos extratos da biotransformação do ferulato de metila por *A. brasiliensis*

Após a obtenção dos extratos da biotransformação do ferulato de metila por *A. brasiliensis*, foram realizadas análises cromatográficas para investigar a presença de derivados. A análise do extrato da biotransformação foi realizada por CLAE-DAD, de acordo com as condições descritas no item 3.8 (página 62). Os perfis cromatográficos obtidos estão apresentados a seguir (Figura 61).

**Figura 61.** Cromatograma do extrato obtido da biotransformação do **AFE** por *A. brasiliensis* no período de 72 horas.



A análise do perfil cromatográfico do extrato da biotransformação do ferulato de metila permite concluir que o derivado **AFTR 17.3** é produzido no período de 72 horas.

#### 4.8 Fracionamento do extrato obtido a partir da biotransformação do **AFE** por *A. brasiliensis*.

Após a obtenção do extrato do produto de biotransformação do ferulato de metila por *A. brasiliensis* em escala preparativa (80 mg), este foi submetido ao fracionamento por CC (10,38 g de sílica gel) resultando em 18 frações (Tabela 13). A eluição foi realizada com gradiente constituído pelos solventes hexano, acetato de etila e metanol, em diferentes proporções (iniciando com 100% de hexano e chegando a 100% metanol).

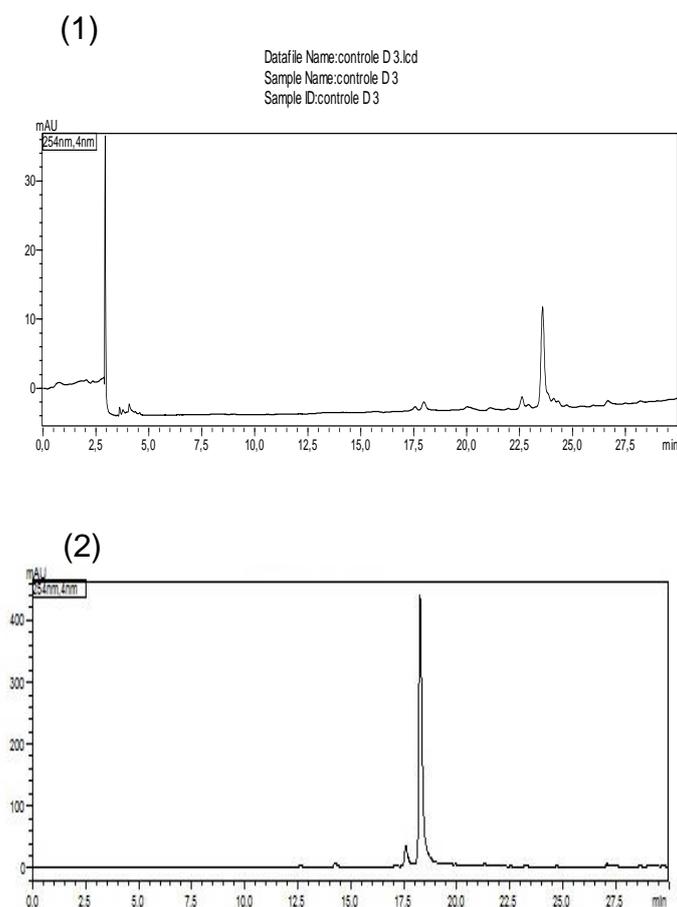
**Tabela 13.** Fracionamento do extrato de ensaio preparativo da biotransformação do ferulato de metila por *A. brasiliensis*.

<b>Código da fração</b>	<b>Massa (mg)</b>	<b>Eluente (% v/v)</b>
Frk 1	0,4	hexano 100
Frk 2	0,9	hexano:acetato de etila 90:10
Frk 3	1,2	hexano:acetato de etila 80:20
Frk 4	1,6	hexano:acetato de etila 70:30
Frk 5	2,1	hexano:acetato de etila 60:40
Frk 6	2,4	hexano:acetato de etila 60:40
Frk 7	1,3	hexano:acetato de etila 50:50
Frk 8	2,5	hexano:acetato de etila 40: 60
Frk 9	2,1	hexano:acetato de etila 40:60
Frk 10	2,5	hexano:acetato de etila 30:70
Frk 11	2,9	hexano:acetato de etila 20:80
Frk 12	6,8	hexano:acetato de etila 20:80
Frk 13	7,4	hexano: acetato de etila 10:90
Frk 14	3,2	acetato de etila 100
Frk 15	4,6	acetato de etila: metanol 80:20
Frk 16	5,8	acetato de etila:metanol 50:50
Frk 17	7,4	acetato de etila:metanol 30:70
Frk 18	9,2	metanol 100

As frações entre Frk 7 e Frk 9 foram reunidas e identificada como o derivado **AFTR 17.3**, cujo rendimento total foi 5,9 mg. A fração reunida foi selecionada para aquisição dos dados de RMN  $^1\text{H}$ .

Após a obtenção das frações da biotransformação do ferulato de metila por *A. brasiliensis*, foram realizadas análises cromatográficas para investigar a presença do derivado com grau de pureza. As análises das frações foram realizadas por CLAE-DAD, de acordo com as condições descritas no item 3.8 (página 62). Os perfis cromatográficos obtidos estão apresentados a seguir (Figura 62).

**Figura 62.** Cromatogramas do (1) Controle e do (2) **AFTR 17.3** isolado a partir da biotransformação do **AFE** por *A. brasiliensis*, obtidos em  $\lambda$  254 nm.



Analisando o perfil cromatográfico (Figura 62) após isolamento, observa-se a presença de um pico intenso (2) com tempo de retenção de 17,7 min, que correspondeu ao derivado **AFTR 17.3**.

#### 4.9 Identificação estrutural do derivado **AFTR 17.3** obtido da biotransformação do **AFE** por *A. brasiliensis*

O derivado **AFTR 17.3**, identificado como (*Z*)-3-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-3-metoxiacrilato de metila, apresentou-se como um sólido castanho claro, com faixa de fusão 102,5-103,7°C, solúvel em CH<sub>3</sub>OH, e teve rendimento de 10,31%. A identificação foi realizada através da análise dos dados espectroscópicos de RMN de <sup>1</sup>H.

**Tabela 14.** Dados de RMN de <sup>1</sup>H (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD) do derivado **AFTR 17.3** e **AFE** padrão.

<b>Posição</b>	<b>AFTR 17.3, <math>\delta_H</math> (ppm), multiplicidade, <i>J</i> (Hz)</b>	<b>AFE <math>\delta_H</math> multiplicidade, <i>J</i>(Hz)</b>
1'	-	7,60, <i>d</i> , <i>J</i> = 15,89
2'	5,95, <i>s</i>	6,36, <i>d</i> , <i>J</i> = 15,89
3'	3,82, <i>s</i>	3,89, <i>s</i>
4'	3,76, <i>s</i>	3,76, <i>s</i>
5'	3,79, <i>s</i>	-
2	6,79, <i>d</i> , <i>J</i> = 1,71	7,17, <i>d</i> , <i>J</i> = 1,47
5	6,68, <i>d</i> , <i>J</i> = 7,83	6,80, <i>d</i> , <i>J</i> = 8,19
6	6,75, <i>d</i> , <i>J</i> = 7,83; 1,71	7,06, <i>d</i> , <i>J</i> = 8,19; 1,47

Figura 63. Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do AFE Padrão (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ).

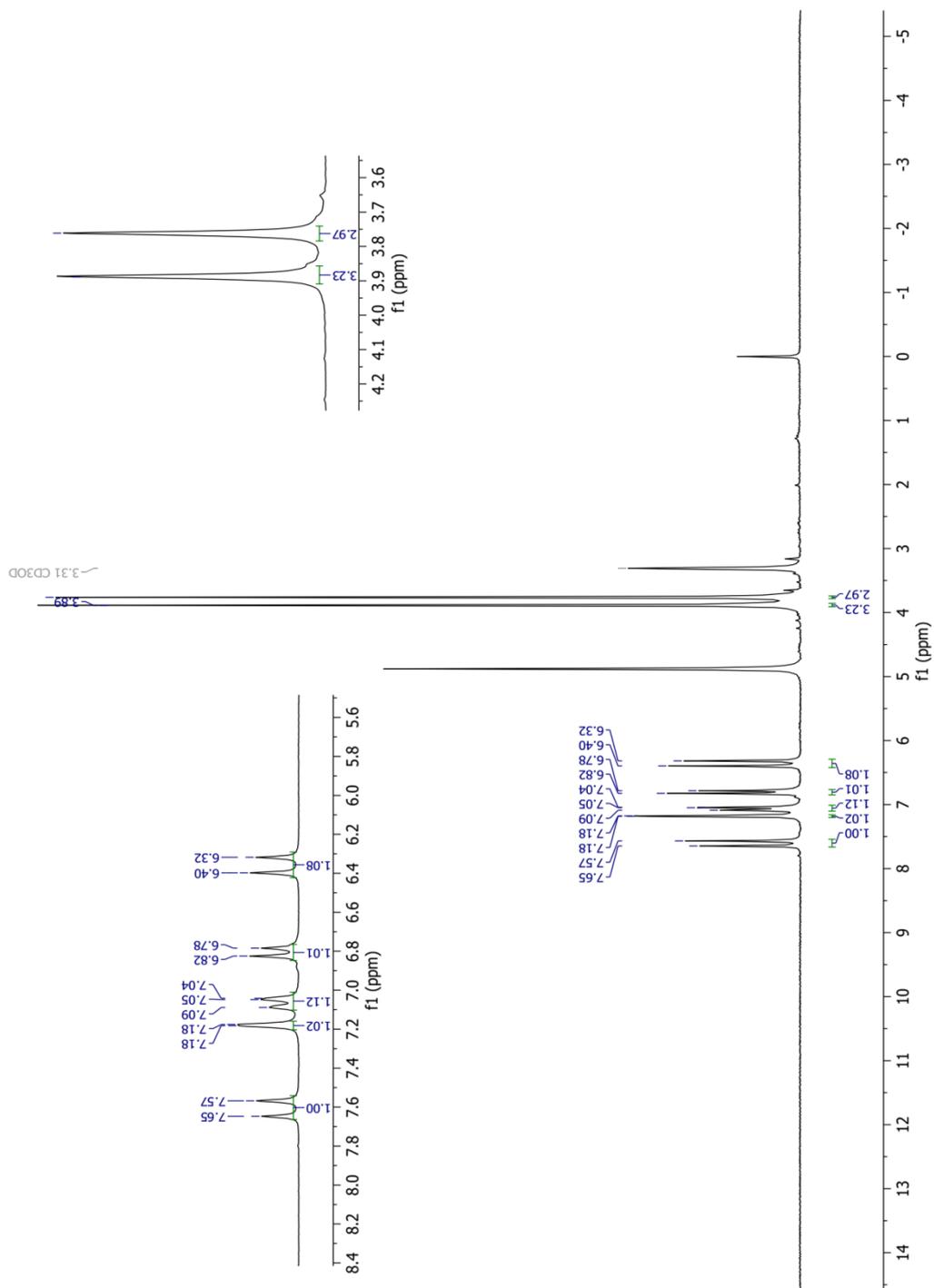
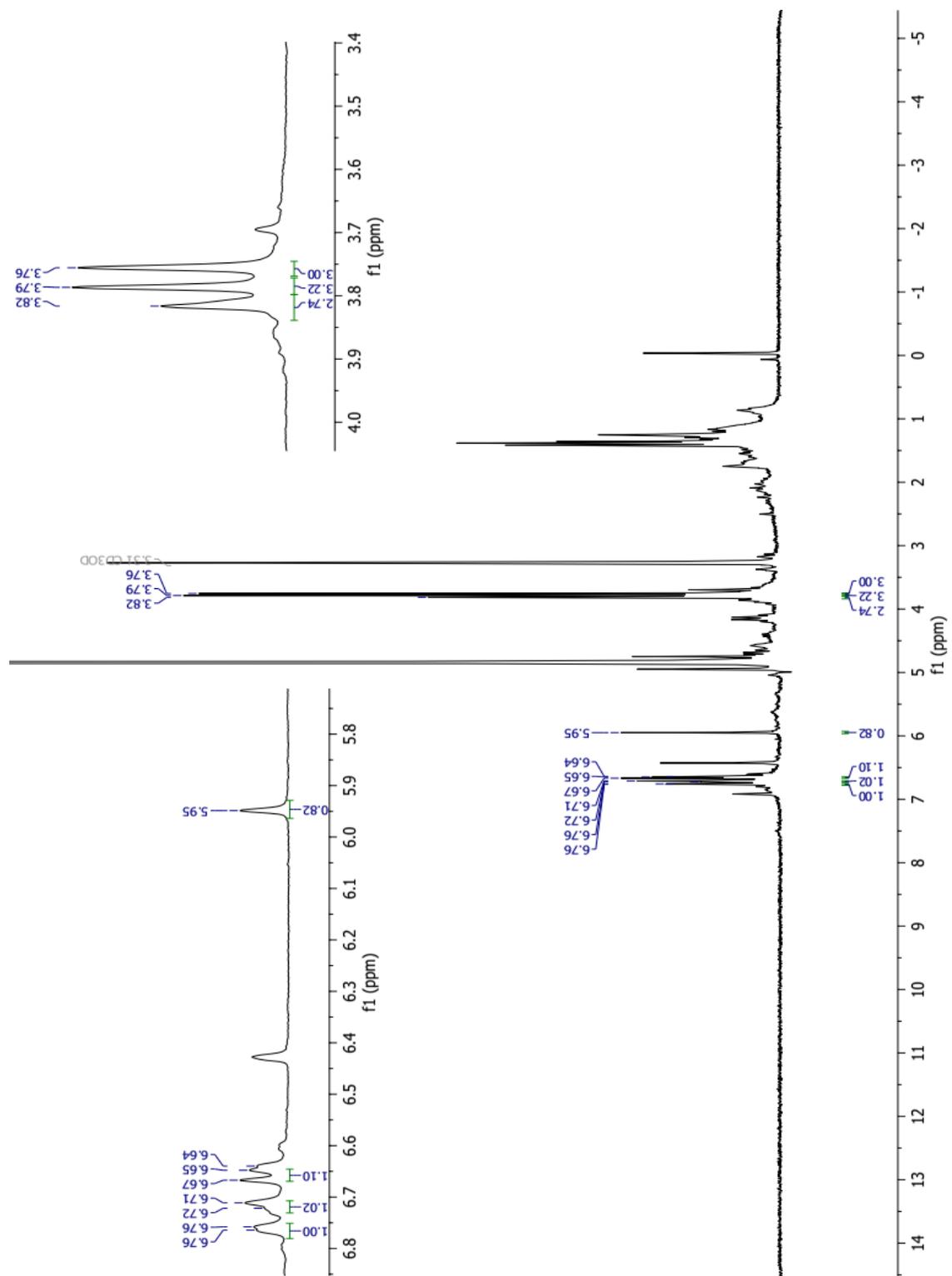


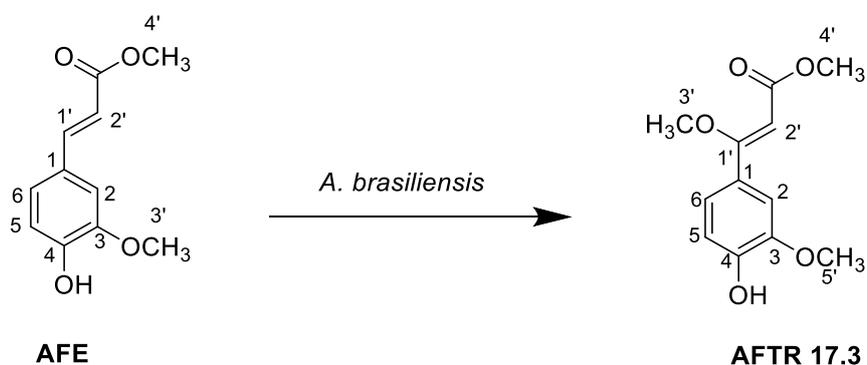
Figura 64. Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do **AFTR 17.3** (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ).



A análise do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do **AFTR 17.3** (Figura 64) permitiu por meio de valores de deslocamentos químicos (Tabela 14, página 121), obter informações relacionadas a estrutura química do mesmo. Foi utilizado o espectro do RMN de  $^1\text{H}$  do **AFE** padrão para facilitar a elucidação do **AFETR 17.3**. No espectro do **AFE** (Figura 63, página 122), os sinais dos hidrogênios do anel aromático apareceram nos seguintes deslocamentos químicos:  $\delta$  7,17 (H-2, *d*, 1H); 7,06 (H-6, *dd*, 1H); 6,80 (H-5, *d*, 1H). Os hidrogênios da olefina com acoplamento em *trans*, apresentaram os seguintes deslocamentos químicos:  $\delta$  7,60 (H-1', *d*, 1H); 6,36 (H-2', *d*, 1H). Aparece um sinal em  $\delta$  3,76 (H-4', *s*, 3H) correspondente a metoxila.

Já no espectro do **AFTR 17.3** (Figura 64, página 123), os sinais dos hidrogênios do anel aromático aparecem nos seguintes deslocamentos químicos:  $\delta$  6,79 (H-2, *d*, 1H); 6,75 (H-6, *dd*, 1H); 6,68 (H-5, *d*, 1H). Pode-se concluir que a biotransformação não ocorreu no anel aromático. Não foram observados no espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (Figura 68), os hidrogênios da olefina com acoplamento em *trans*, neste caso, pode-se inferir que a biotransformação teve como resultado a adição do substituinte à olefina. Foram observados três sinais com deslocamentos químicos:  $\delta$  3,76 (H-4', *s*, 3H); 3,79 (H-5', *s*, 3H); 3,82 (H-3', *s*, 3H), que pode-se concluir que o derivado possui três grupos metoxilas, sendo que a adição da metoxila ligada ao C-1' (Figura 65), foi resultante da biotransformação do ferulato de metila por *A. brasiliensis*. Diante dos resultados obtidos, foi possível propor a estrutura química do derivado **AFTR 17.3** (Figura 65). Foram realizadas buscas nos bancos de dados, e não foi encontrada a estrutura do derivado **AFTR 17.3**, o que permitiu concluir que a biotransformação do ferulato de metila por *A. brasiliensis* levou a formação de um derivado inédito.

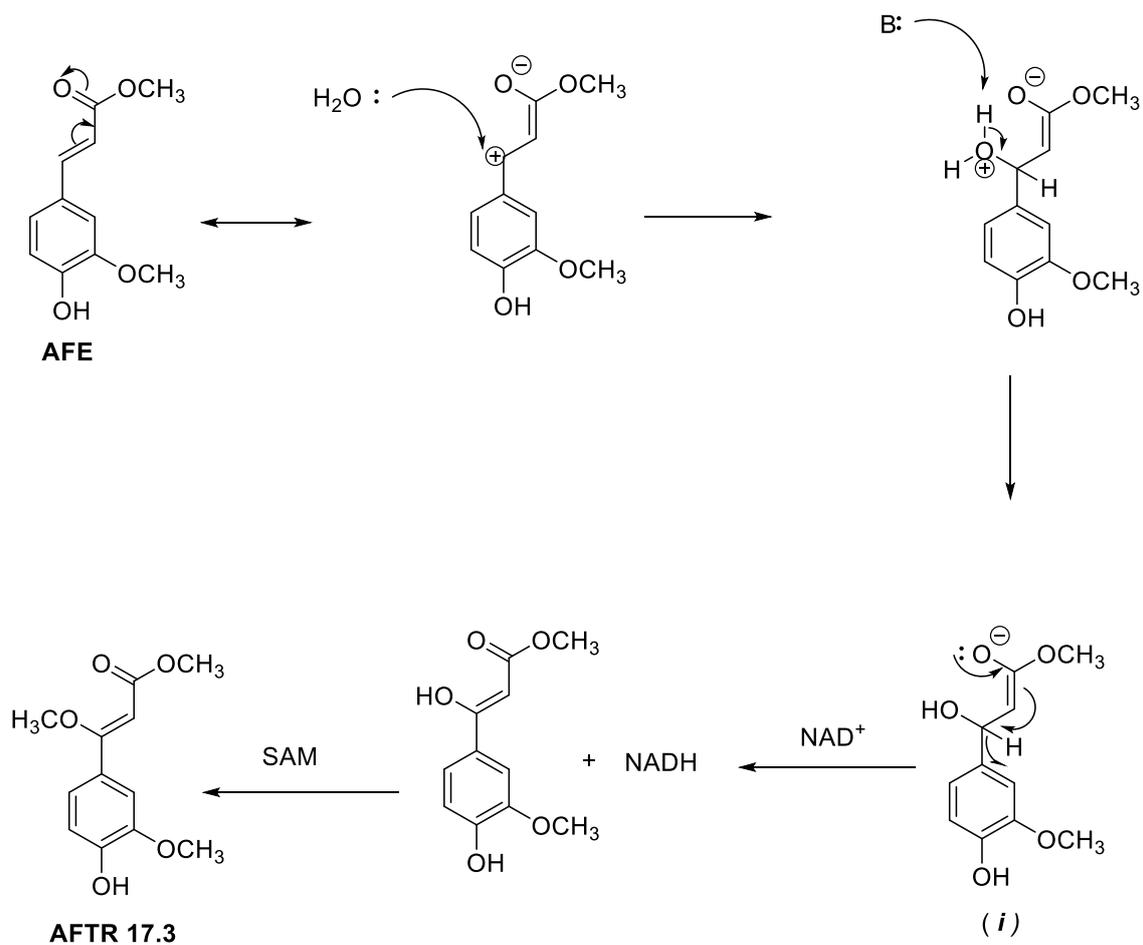
**Figura 65.** Proposta estrutural para o derivado **AFTR 17.3**, obtido a partir da biotransformação do **ACE** por *A. brasiliensis*.



#### 4.10 Proposta do mecanismo de reação de formação do **AFTR 17.3**

A biotransformação do **AFE** por *A. brasiliensis* teve como resultando a obtenção do derivado **AFTR 17.3**. O mecanismo proposto pode ser explicado da seguinte forma: na primeira etapa a água atua como nucleófilo, atacando a região deficiente da molécula. Na segunda etapa, uma base (B) que pode ser outra molécula de água ou resíduo de aminoácido, atua como base de Bronsted, removendo próton. Na terceira etapa, ocorre oxidação do composto intermediário (*i*) na presença de NAD<sup>+</sup>. Na última etapa, a enzima S-Adenosilmetionina sintetase ou metiltransferase (SAM) catalisa a reação, convertendo o grupo OH em OCH<sub>3</sub> (metilação) (GIBSON; SKETT, 2001 e FREY; HEGEMAN, 2007), levando a formação do produto **AFTR 17.3** (Figura 66).

**Figura 66.** Proposta do mecanismo de reação de formação do **AFTR 17.3**.



## 5 CONCLUSÕES

Os ensaios de biotransformação foram realizados utilizando como substratos três compostos fenólicos, *p*-cumarato de metila (**ACE**), ferulato de metila (**AFE**) e cafeato de metila (**ACFE**), e dois fungos filamentosos *Trametes versicolor* ATCC 200801 e *Aspergillus brasiliensis* ATCC 16404.

Estudos utilizando como biocatalisador o *T. versicolor*, apontaram que o cafeato de metila e ferulato de metila não foram biotransformados, mesmo aumentando o tempo de incubação. Somente o *p*-cumarato de metila apresentou um resultado positivo no ensaio realizado, resultando na formação de três derivados identificados como ácido cumárico (**ACETR 15**), cafeato de metila (**ACETR 17**) e o (*E*)-3-(4-metoxifenil) acrilato de metila (**ACETR 19**). Vale ressaltar que a biotransformação dos substratos pelo fungo *T. versicolor* foi realizada em meio de cultura contendo sulfato de cobre, pois íons  $\text{Cu}^{2+}$  promovem o aumento da concentração de lacase.

Para analisar a especificidade da lacase de *T. versicolor* pelo substrato *p*-cumarato de metila (**ACE**), foi utilizado o método computacional de ancoragem molecular. Foram obtidas informações mais precisas em relação à conformação e orientação que o substrato assumiu no sítio ativo da enzima, resultando na formação de complexo proteína-ligante. Durante os ensaios *in silico*, as interações entre os ligantes e os resíduos de aminoácidos do sítio ativo da lacase foram avaliadas. Nestes experimentos, os anéis aromáticos dos substratos fenólicos foram posicionados em regiões hidrofóbicas, interagindo com resíduos de aminoácidos menos polares, prevalecendo assim as forças de dispersão de London. Por outro lado, os grupos polares puderam interagir com resíduos de aminoácidos polares, constituindo dessa forma as interações de hidrogênio. Os valores das energias de ligação ( $\Delta G$ ) permitiram concluir que os ligantes fenólicos interagiram de forma espontânea com o sítio da lacase. Os valores diferentes de  $\Delta G$  para as interações entre os três substratos fenólicos e a lacase foram atribuídos às diferentes orientações e conformações que os mesmos assumem no sítio ativo enzimático. Neste caso, admitiu-se que o *p*-cumarato de metila assumiu uma conformação e orientação favorável, cujo

posicionamento no sítio ativo permitiu a interação efetiva, resultando na sua biotransformação.

Ao realizar experimentos que permitissem avaliar o comportamento dos substratos fenólicos frente às enzimas do *A. brasiliensis*, concluiu-se que o cafeato de metila não foi biotransformado. O *p*-cumarato de metila foi biotransformado, resultando na formação de três derivados, identificados como: a acetofenona (**ACTR 6**), 1-(4-hidroxifenil) propano-1,3-diol (**ACTR 16.3**), e 4-(3-hidróxi-propil) benzeno-1,3-diol (**ACTR 16.7**). O ferulato de metila foi biotransformado resultando na formação de um derivado identificado como o (*Z*)-3-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-3-metoxiacrilato de metila (**AFTR 17.3**). Assim, as biotransformações dos mesmos substratos fenólicos pelos fungos filamentosos *T. versicolor* e *A. brasiliensis* geraram derivados diferentes.

Durante a realização deste trabalho, foi confirmado que a biotransformação é uma ferramenta que pode ser utilizada para a obtenção de derivados interessantes. Neste processo, foram empregados micro-organismos, que atuaram como biocatalisadores, resultando em reações de hidrólise, hidroxilação, metoxilação, descarboxilação e redução. Todas as reações foram realizadas sob condições sustentáveis, a temperatura ambiente, sob pressão atmosférica, com uso mínimo de reagentes químicos e solventes orgânicos. Além disso, os derivados foram obtidos sem necessidade de uma série de etapas de reações químicas, o que confere alternativa viável aos processos químicos tradicionais. O acoplamento molecular mostrou-se uma ferramenta valiosa, pois ela auxiliou na compreensão da especificidade da lacase por substratos fenólicos.

Os estudos sobre a biotransformação dos intermediários biossintéticos da via do chiquimato, mostraram-se importantes como uma alternativa à fitoquímica clássica, contornando alguns inconvenientes relacionados ao isolamento dos metabólitos secundários vegetais. A derivatização biológica resultou no fornecimento de análogos estruturais dos metabólitos secundários fenólicos.

## 6 REFERÊNCIAS

ABREU, J. A. S. et al. Fungos de interesse: aplicações biotecnológicas. **Revista Uningá Review**. vol. 21, n. 1, p. 55-59, 2015.

AGUIAR, E. F. S. et al. Química verde: a evolução de um conceito. **Química Nova**. vol. 37, n. 7, p. 1257- 1261, 2014.

AFONSO, S. O. M. ***Aspergillus niger*: sua utilização na indústria farmacêutica**. 2015. 87f. Dissertação (mestrado em Ciências Farmacêuticas)-Instituto Superior de Ciências da Saúde EGAS MONIZ, p. 21-30.

ALBERTI, F.; FOSTER, G. D.; BAILEY, A. M. Natural products from filamentous fungi and production by heterologous expression. **Application Microbiology Biotechnology**. v. 101, p. 493-500, 2017.

ALVES, F. **Modelagem e simulação de biorreator operando com fungos *Trametes versicolor* para a produção de enzima laccase**. 2010. 90f. Dissertação (mestrado em Engenharia de Processos Químicos e Bioquímicos)-Instituto Mauá de Tecnologia, São Paulo, p. 1-40.

ANDRADE, C. H.; TROSSINI, G. H. G.; FERREIRA, E. I. Modelagem molecular no ensino de Química Farmacêutica. **Revista eletrônica de farmácia**. v. 7, n. 1, p.1-23, 2010.

ARAÚJO, M. E. Produtos naturais ou farmácia verde? Mitos e factos. **Sociedade Portuguesa de Química**. p. 15-21, 2015.

AVERESCH, N. J. H.; KROMER, J. O. Metabolic engineering of the shikimate pathway for production of aromatics and derived compounds-present and future strain construction strategies. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**. v. 6, n. 32, p. 1-19, 2018.

BAI, Q. et al. Drug design progress of in silico, in vitro and in vivo reseasches. **Open access publishing**. v. 1, n. 16, p.1-22, 2018.

BARREIROS, E. J. **Química medicinal**: as bases moleculares da ação dos fármacos. 2 ed. Porto Alegre: Artmed, 2008, p. 429-450.

BARREIROS, E. J.; FRAGA, C. A. M. **Química medicinal**: as bases moleculares da ação dos fármacos. 3 ed. Porto Alegre: Artmed, 2015, p. 1-32. 2015.

BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**. v. 29, n. 1, p. 113-123, 2006.

BATISTA, F. L. **Produção de lacase e bioconversão de flavonoides por *Pycnoporus sanguineus***. 2009. 81f. Dissertação (mestrado em Ciências Farmacêuticas)- Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Goiás, Goiás, p. 1-20.

BAPTISTA, N. M. Q. et al. Produção das enzimas lignina peroxidase e lacase por fungos filamentosos. **Scientia Plena**. v. 8, n. 1, p. 1-7, 2012.

BATISTELA, D. M. **Estudo da atividade e estabilidade de lacases em líquidos iônicos**. 2011. 93f. Dissertação (mestrado em Química Orgânica)-Universidade de São Paulo, São Paulo, p. 10-34.

BERTRAND, B. Fungal laccases: inductio and production. **Revista mexicana de Ingenieria Química**. v. 12, n. 3, p. 473-488, 2013.

BRAITHWAITE, A.; SMITH, F. J. **Chromatographic methods**. Kluwer Academic publishers, 5 ed. 1996, p. 44-360.

BROWN, T. L. et al. **Química: a ciência central**. 13 ed. São Paulo: Pearson, 2016, p. 868-870.

BORGES<sup>1</sup>, L. R. et al. Diversidade de fungos filamentosos em solo de monocultivo de erva mate, *Ilex paraguayensis* St. Hil. **Revista Acadêmica: ciências agrárias e ambientais**. v. 9, n. 2, p. 185-194, 2011.

BORGES, K. B. et al. Stereoselective biotransformations using fungi as biocatalysts. **Elsevier**, v. 20, p. 385-397, 2009.

BORGES<sup>2</sup>, K. B.; BONATO, P. S. Enantioselective biotransformation of propranolol to the active metabolite 4-hydroxypropranolol by endophytic fungi. **Química Nova**. v. 34, n. 8, p. 1354-1357, 2011.

BROILO, F. et al. **Imobilização de lacase de *Aspergillus sp.* Em nanofolhas de grafeno e sua aplicação na bioconversão de fenol**. In: XX CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA QUÍMICA, 2014, Florianópolis-SC, p. 1-3.

CAPARRÓS-RUIZ, D. et al.. Isolation and characterisation of a family of laccases in maize. **Plant Science**. v. 171, p. 217- 225, 2006.

CAVAION, J. C. L. **Aplicação de fungos filamentosos para S-oxidação do ácido 2-[4-(1,4-tiazinan-4-ilsulfonil)fenilcarbamoil]benzoico (LASSBio-596)**. 2012. 92f. Dissertação (mestrado em Ciências Farmacêuticas)- Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Goiás, Goiás, p. 28-30.

CHINTOJU, N. et al. Importance of natural products in the modern history. **Research and reviews: journal of hospital and clinical pharmacy**. v. 1, p. 5-11, 2015.

CIANCIOSI, D. et al. Phenolic compounds in honey and their associated health benefits: a review. **Molecules**. v. 23, n. 2322, p. 1-20, 2018.

COLEMAN, R. G. et al. Ligand Pose and orientational sampling in molecular docking. **Plosone**. v. 8, n. 10, p. 1-19, 2013.

COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. **Introdução a métodos cromatográficos**. Unicamp, 7 ed. 1997, p. 45-240.

CONSTANTIN, M.; JÜRGEN, C.; UWE, B. Laccase-catalyzed oxidative phenolic coupling of vanillidene derivatives. **Green Chemistry**, v. 14, p. 2375-2379, 2012.

CORTEZ, D. V.; CASTRO, H. F.; ANDRADE, G. S. S. Potencial catalítico de lipases ligadas ao micélio de fungos filamentosos em processos de biotransformação. **Química Nova**. Vol. 40, n. 1, p. 85-96, 2016.

CHRISTOPHER, L. P.; JI, Y. Lignin biodegradation with laccase-mediator systems. **Frontiers in energy research**. v. 2, n. 12, p. 1- 13, 2014.

CSEKE, L. J. et al. **Natural products from plants**. 2 ed. CRC Press, 2006, p. 221-245.

CZECHOWSKI, T. et. al. An *Artemisia Annu* mutante impaired in artemisinin synthesis demonstrates importance for non-enzymatic conversion in terpenoid metabolism. **PNAS**. 2016.

CUNHA, A. L. et al. Os metabólitos secundários e sua importância para o organismo. **Diversitas Journal**. v. 1, n. 2, p. 175-181, 2016.

DEWICK, P. M. **Medicinal natural products: A biosynthetic approach**. 3 ed. Wiley. 2009, p. 28-50.

DAHLSTROM, K. M. **From protein structure to function with bioinformatics**. Abo Akademi University. p.21-26, 2015.

DZIALO, M. et al. The potential of plant phenolics in prevention and therapy of skin disorders. **International Journal of Molecular Sciences**. v. 17, n. 160, p.1-41, 2016.

DOBLE, M.; KRUTHIVENTI, A. K. **Green chemistry & engineering**. Elsevier, 2007, p. 69-88.

ERDEM, O.; CIHANGIR, N. Color removal of some textile dyes from aqueous solutions using *Trametes versicolor*. **Hecettepe Journal of Biology & Chemical**. v. 45, n. 2, p. 499-507, 2017.

EWEAS, A. F. Advances in molecular modeling and docking as a tool for modern drug discovery. **Der Pharma Chemica**. v. 6, n. 6, p. 211-228, 2014.

FABRINI, F. F. et al. Produção de lacase de *Pycnoporus sanguineus* em meio de cultivo à base de melão soja. **Arquivo de Ciência, Veterinária e Zoologia**. v. 19, n. 3, p. 159-164, 2016.

FERREIRA, L. G. et al. Molecular docking and structure-based drug design strategies. **Molecules**. v. 20, p. 13384-13421, 2015.

FERREIRA, A.L.A.; MATSUBARA, L.S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista Associação Médica Brasileira**. v. 43, n. 1, p. 61-68, 1997.

FRANCISCO, M. R. C. M. **Caracterização de isolados de *Aspergillus* provenientes de ambiente hospitalar-identificação molecular e determinação dos padrões de susceptibilidade aos antifúngicos**. 2017. 68f. Dissertação (mestrado em Biologia Humana e Ambiente)-Universidade de Lisboa, p. 6-38.

FREY, P. A.; HEGEMAN, A. D. **Enzymatic reaction mechanisms**. Oxford. 2007, p. 665-670.

FULMER, G. R. et al. NMR chemical shifts of trace impurities: common laboratory solvents, organics and gases in deuterated solvents relevant to the organometallic chemist. **Organometallics**. v. 29, n. 9, p. 2176-2179, 2010.

GARY, S. et al. Combining semi-synthesis with plant and microbial biocatalysis: new frontiers in producing a chemical arsenal against cancer. **Royal Society of Chemistry**. v. 8, p. 21332-21339, 2018.

GASTEIGER, J.; MARSILI, M. Iterative partial equalization of orbital electronegativity—a rapid access to atomic charges. **Tetrahedron**, v. 36, n. 22, p.3219-3228, 1980.

GAUTHIER, L. et al. Fungal biotransformation of chlorogenic and caffeic acids by *Fusarium graminearum*: new insights in the contribution of phenolic acids to resistance to deoxynivalenol accumulation in cereals. **Elsevier**. v. 221, p. 61-68, 2016.

GIARDINA, P., FARACO, V., PEZZELLA, C., PISCITELLI, A., VANHULLE, S., SANNIA, G. Laccases: a never-ending story. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 67, p. 369-385, 2010.

GIBSON, G.G.; SKETT, P. **Introduction to drug metabolism**. 3 th. Nelson Thornes, 2001, p. 1-45.

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

GRANADOS, A. G. et al. Biotransformation of ent-1,3-epi-manoyl oxides difunctionalized at C-3 and C-12 by filamentous fungi. **ELSEVIER**. vol. 65, p. 107- 115, 2003.

GU, J. et al. Use of natural products as chemical library for drug discovery and network pharmacology. **Plosone**. v. 8, p. 1-10, 2013.

HEINRICH, M. et al. **Fundamentals of pharmacognosy and phytotherapy**. 2 ed. Elsevier. 2012, p. 3-20.

HOFFMAN, E.; STROOBANT, V. **Mass spectrometry: principles and applications**. Wiley, 3 ed. 2007, p. 273-300.

HORING, P. et al. Oxidative biotransformation of phenol substrates catalyzed by toluene dioxygenase: A molecular docking study. **Elsevier**. v. 134, p. 396-406, 2016.

KAKKAR, S.; BAIS, S. A review on protocatechuic acid and its pharmacological potential. **Hindawi Publishing Corporation**. p.1-10, 2014.

KAMALI, E.; HASHIM, H. The importance of basic and applied natural sciences in service of medicine. **Journal of Scientific & Technical Research**. v. 2, p.2, 2018.

KAVANAGH, K. **Fungi: biology and applications**. Wiley, 2005, p. 1-34.

KENNEDY, J. Mutasythesis, chemiobiosynthesis, and black to semi-synthesis: combining synthetic chemistry and biosynthetic engineering for diversifying natural products. **Royal Society Chemistry**. v.25, p.25-34, 2007.

KHODDAMI, A.; WILKES, M. A.; ROBERTS, T. H. Techniques for analysis of plant phenolic compounds. **Molecules**. v. 18, p. 2328-2375, 2013.

KUMAR, R. et al. A review on the vanillin derivatives showing various biological activities. **International Journal of PharmaTech Research**. v. 4, n. 1, p. 266-279, 2012.

KUNAMMENI, A. et al. Fungal laccase-a versatile enzyme for biotechnological applications. **Formatex**. p. 1-13, 2007.

LERESCHE, J. E.; MEYER, H. P. Chemocatalysis and biocatalysis( biotransformation): some thoughts of a chemist and of a biotechnologist. **Organic Process Research & Development**. vol. 10, p. 572- 580, 2006.

LIERS, C. et al. Substrate oxidation by dye-decolorizing peroxidases (DyPs) from wood- and litterdegrading agaricomycetes compared to other fungal and plant heme-peroxidases. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 97, p. 5839-5849, 2013.

LIMURA, Y. et al. Heterologous expression of *Trametes versicolor* laccase in *Saccharomyces cerevisiae*. **Protein Expression and Purification**. v.141, p.39-43, 2018.

LYASHENKO, A. V. et al. Purification, crystallization and preliminary X-ray study of the fungal laccase from *Cerrena maxima*. **Protein structure communications**. v. 62, p. 954-957, 2006.

MA, L.; LIU, X.; LIANG, J.; ZHANG, Z. Biotransformations of cinnamaldehyde, cinnamic acid and acetophenone with *Mucor*. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 27, n. 9, p. 2133 -2137, 2011.

MABINYA, L. V. et al. Bioconversion of ferulic acid and 4-vinylguaiacol by a White-rot fungus isolated from decaying wood. **African Journal of Biotechnology**. v.9, n. 13, p. 1955-1958, 2010.

MACIEL, M. A. M. et al. Aspectos sobre os produtos naturais na descoberta de novos agentes antitumorais e antimutagênicos. **Revista Fitos**. v.3, n. 1, p. 38-56, 2007.

MADIGAN, M. T. et al. **Microbiologia do Brock**. 12 ed. Porto Alegre: Artmed, 2010, p. 733-753.

MATE, D. M.; ALCADE, M. Laccase: a multi-purpose biocatalyst at the forefront of biotechnology. **Microbial Biotechnology**. v. 10, p. 1457-1467, 2016.

MEDRADO, L. C. L. **Biorremediação do antibiótico oxitetraciclina utilizando lacases produzidas pelo fungo *Pleurotus ostreatus***. 2018.7 109f. Dissertação (mestrado em Tecnologia de Sistemas de Produção Limpa)- Programa de Pós-graduação em Tecnologia de Processos Sustentáveis, Instituto Federal de Educação Ciência e Tecnologia de Goiás, Goiás, p. 16-35.

MELO, T. L.; ALVES, C. A. Produção de lacase utilizando planejamento fatorial em meios contendo resíduos agroindustriais. **Engevista**. v. 19, n. 3, p. 759-773, 2017.

MENG, X. Y. et al. Molecular docking: a powerful approach for structure-based drug discovery. **Current Computational Aided Drug design**. v. 7, n. 2, p. 146-157, 2011.

MEYER, V. et al. Current challenges of research on filamentous fungi in relation to human welfare and a sustainable bio-economy: a White paper. **Fungal Biology and Biotechnology**. v. 3, n. 6, p. 1-17, 2016.

MONSSEF, R. A. A. E. et al. Production of laccase enzyme for their potential application to decolorize fungal pigments on aging paper and parchment. **ELSEVIER**. vol. 61, p. 145- 154, 2015.

MONTEIRO, L. M.. et al. Regioselective biocatalytic transformations employing transaminases and tyrosine phenol lyases. **Springer**. p. 1-10, 2018.

MORENO, L. F. et al. Phylogenomic analyses reveal the diversity of laccase-coding genes in *Fonsecaea genomes*. **Plosone**. v. 10, p. 1-17, 2017.

MOTEDAYEN, N. et al. Bioconversion of ferulic acid to vanillin by combined action of *Aspergillus niger* K8 and *Phanerochaete crysosporium* ATCC 24725. **African Journal of Biotechnology**. v. 12, n. 47, p. 6618-6624, 2013.

NASCIMENTO, J. S. **Biotransformação de substâncias fenólicas por fungos filamentosos e avaliação das atividades biológicas dos derivados**

**obtidos**. 2018. 114f. Dissertação (mestrado em Química Orgânica)- Programa de Pós-graduação em Química, Universidade Federal da Bahia, Bahia, p. 1-32.

NASCIMENTO, J. S.; CONCEIÇÃO, J. C. S.; SILVA, E. O. Biotransformation of Coumarins by Filamentous Fungi: An Alternative Way for Achievement of Bioactive Analogs. **Mini-Reviews in Organic Chemistry**, Ahead of print, 2019.

NGUYEN, L. N. et al. Laccase-syringaldehyde-mediated degradation of trace organic contaminants in a enzymatic membrane reactor: removal efficiency and effluent toxicity. **Bioresource Technology**. p. 477-484, 2016.

NUMPAQUE, M. A. et al. Biotransformation of ferulic acid by the phytopathogenic fungi *Colletotrichum acutatum* and *Lasiodiplodia theobromae*. **Facultad Nacional de Agronomía**. v. 69, n. 1, p. 7835-7844, 2016.

OLIVEIRA<sup>1</sup>, M. H. et al. Semi-síntese: uma solução para os problemas farmacológicos de produtos naturais. **Revista eletrônica de farmácia**. v. 9, n. 1, p. 62-88, 2012.

OLIVEIRA<sup>2</sup>, K. B.; OLIVEIRA, B. H. Obtenção de substâncias bioativas através da biotransformação de produtos naturais. **Revista Eletrônica de Farmácia**. vol. 9, n. 1, p. 89-99, 2012.

PACHECO, S. M. V.; DAMASIO, F. Valina: origem, propriedades e produção. **Química Nova na Escola**. v. 32, n.4, p. 215-219, 2010.

PALUDO, C. R. **Biotransformação da  $\beta$ -lapachona utilizando culturas microbianas: uma alternativa para estudos de metabolismo *in vitro***. 2013.

200f. Dissertação (mestrado em Ciências Farmacêuticas)- Universidade de São Paulo, São Paulo, p. 1-29.

PARVATHI, R. et al. Molecular docking studies of bioactive compounds from 'Njavara', the medicinal rice of kerala, as phospholipase A<sub>2</sub> inhibitors. **International Journal of Research in Ayurveda & Pharmacy**. v. 7, n. 3, p. 159-165, 2016.

PAVIA, D. L. et al. **Introdução à espectroscopia**. Cengage Learning, 4 ed. 2010, p. 15-350.

PEL, H. J. Genome sequencing and analysis of the versatile cell factory *Aspergillus niger* CBS 513.88. **Nature biotechnology**. v. 25, n. 2, p. 1-11, 2007.

PEREIRA, R. J.; CARDOSO, M. G. Metabólitos secundários vegetais e benefícios antioxidantes. **Journal of Biotechnology and Biodiversity**. v. 3, n.4, p. 146-152, 2012.

PERVAIZ, I. et al. Microbial biotransformations: a tool for drug designing. **Applied Biochemistry and Microbiology**. v. 49, n. 5, p. 437-450, 2013.

PIMENTEL, A. L.; BUENO, S. A. **Ferramentas de bioinformática na caracterização de alvos de medicamentos**. In: VI CURSO DE INVERNO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR DO PBC, 2016, Paraná, p. 39-50.

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

PIONTEK, K. et al. Crystal structure of a laccase from the fungus *Trametes versicolor* at 1,90-°A resolution containing a full complement of coppers. **Journal of Biological Chemistry**. v.3, n.4, p. 146-152, 2002.

POP, R. M. et al. Characterization of *Trametes versicolor*: Medicinal Mushroom with importante health benefits. **Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca**. v. 46, n. 2, p. 343-349, 2018.

PUPO, M. T.; GALLO, M. B. C.; VIEIRA, P. C. Biologia Química: uma estratégia moderna para a pesquisa em produtos naturais. **Química Nova**. v. 30, n. 6, p. 1446-1455, 2007.

RAJESWARI, M.; BHUVANESWARI, V. Production of extracellular laccase from the newly isolated *Bacillus sp.* PK4. **African Journal of Biotechnology**. v. 15, n. 34, p. 1813-1826, 2016.

RATLEDGE, C.; KRISTIASSEN, B. **Basic biotechnology**. 3 ed, Cambridge, 2006, p. 579-585.

REBOREDO, B. M. **Modelagem molecular aplicada ao estudo de ligantes candidatos a fármacos com atividades antileishmaniais**. 2012. 98f. Dissertação (mestrado em Química)-Programa de Pós-graduação em Química, Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, Campo Grande, p. 23-33.

RICHARDS, S. A.; HOLLERTON, J. C. **Essential practical NMR for organic chemistry**. Wiley, 2011, p. 11-172.

RIVA, S. Laccases: blue enzymes for green chemistry. **Trends in Biotechnology**, v. 24, n. 5, p. 219- 226, 2006.

RODRIGUES, C. C. S.; DIAS, A. L. T.; SILVA, E. O. Unprecedented derivatization of ferulic acid through selective methoxylation by *Aspergillus brasiliensis* ATCC 16404. **Biocatalysis and Biotransformation**. p. 1-6, 2019.

RODRIGUES, C. R. Processos modernos no desenvolvimento de fármacos: modelagem molecular. **Química Nova na Escola**. n. 3, p. 43-48, 2001.

ROMAGNOLO, A. et. al. Fungal laccases and enoate reductases as biocatalysts of fine chemical transformations. **Chemical engineering transactions**. v. 32, p. 961-964, 2013.

ROMEK, K. M. et. al. A retro-biosynthetic approach to the prediction of biosynthetic pathways from position-specific isotope analysis as shown for tramadol. **PNAS**. v. 112, n. 27, p. 8296-8301, 2015.

SACHAN, A. et al. Transforming p-coumaric acid into p-hydroxybenzoic acid by the mycelial culture of a white rot fungus *Schizophyllum commune*. **Advanced Journal of Microbiology**. p. 1-7, 2014.

SALAMEH, D. et al. Highlight on the problems generated by p-coumaric analysis in wine fermentations. **Analytical Methods**. p. 1-7, 2010.

SANTOS, J. L. P. **Modelagem preditiva da deterioração de pães integrais multigrãos por fungos filamentosos**. 2015. 186f. Dissertação (mestrado em Ciências de alimentos), Universidade Estadual de Campinas, São Paulo. Cap. 1.

SANTOS, L. C.; FURLAN, M.; AMORIM, M. R. **Produtos naturais bioativos**. São Paulo: Cultura Acadêmica, 2016, p. 265-280.

SANTOS, T. C. et al. Quantificação da atividade de lignin peroxidase através da fermentação em estado sólido do resíduo de batata. **Enciclopédia Biosfera**. Vol. 7, n. 12, p. 1-6, 2011.

SARKER, S. D.; LATIF, Z.; GRAY, A. I. **Natural products isolation**. 2 ed. Humana Press, 2006, p. 1-27.

SCALVENZI, L. Biotransformations by endophytic fungi isolated from traditional Ecuadorian medicinal plants: connecting ethnomedicine with biotechnology. **Revista Amazônica: Ciência y Tecnología**. v 1, n. 3, p. 248-270, 2012.

SEMAMING, Y. et al. Pharmacological properties of Protocatechuic acid and its potential roles as complementary medicine. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**. p. 1-11, 2015.

SILVA, DE O. E.; GONÇALVES, DOS S. N.; DOS SANTOS, A. R.; FURTADO, N. A. J. C.; Microbial Metabolism of Atovaquone and Cytotoxicity of the Produced Phase I Metabolite. **European Journal of Drug Metabolism and Pharmacokinetics**, v. 41, n. 5, p. 645–650, 2015. Fontes de Produtos Naturais. In: Nieve Araçari Jacometti Cardoso Furtado; Rodrigo Cassio Sola Veneziani; Sérgio Ricardo Ambrósio. (Org.). **Farmacognosia**. 1ed. Rio de Janeiro: Atheneu, 2017, v. 7, p. 15-20.

SILVA, L. S. **Biotransformação dos ácidos gálico e elágico por microorganismos do cerrado brasileiro**. Goiânia: UFG, p. 158, 2015.

SILVA, C. J. A.; MALTA, D. J. N. A importância dos fungos na biotecnologia. **Cadernos de graduação**. v. 2, n. 3, p. 49-66, 2016.

SILVA, V. B. **Estudos de modelagem molecular e relação estrutura proteína hnRNP K e ligantes**. 2007. 129f. Dissertação (mestrado em Física Biológica)-Universidade de São Paulo, p. 23-28.

SILVA, E. A. **Atividade enzimática da lacase e crescimento micelial de três fungos amazônicos degradadores de madeira**. 2006. 137f. Dissertação (mestrado em Biotecnologia e Recursos Naturais)-Universidade do Estado de Amazonas, UEA , p. 6-38.

SILVA, J. J. et al. Produção de lacase de fungos basidiomicetos por fermentação submersa com cascas de café. **Arquivo de Veterinária e Zoologia**. v. 15, n. 2, p. 191-196, 2012.

SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X.; KIEMLE, D. J. **Spectrometric identification of organic compounds**. Wiley, 7 ed. 2005, p. 1-280.

SINGAB, R. A. et al. Biotransformation of caffeic acid into a promising biologically active metabolite by *Candida albicans* isolate CI-24. **Archives of Pharmaceutical Sciences Ain Shams University**. v. 2, n. 1, p. 37-46, 2018.

SINHA, A. K. et al. Green methodologies in synthesis and natural product chemistry of phenolic compounds. **Indian Journal of Chemistry**. v. 48, p. 1771- 1779, 2009.

SOUSA, A. C. et al. Towards the rational biosynthesis of substituted phenazines and phenoxazinones by laccases. **Royal Society of Chemistry**. v. 16, p. 4127-4136, 2014.

SOUSA, I. P. et al. An overview of biotransformation and toxicity of diterpenes. **Molecules**. v. 23, p. 1-32, 2018.

SOUZA, V. A.; NAKAMURA, C. V.; CORREA, A. G. Atividade antichagásica de lignanas e neolignanas. **Revista Virtual de Química**. v. 4, n. 3, p. 197- 207, 2012.

SOUZA, R. L. **Aplicação da técnica de ancoragem molecular na otimização do fármaco hipoglicemiante metformina**. 2015. 40f. Trabalho de Conclusão de Curso. Centro Universitário Luterano de Palmas, p. 13-30.

SOUZA, N. S. et al. **Estudos de acoplamento molecular e das propriedades farmacocinéticas das tiazolidinedionas diidroquinazolinonas frente a tripanotona redutase de *Trypanosoma cruzi***. In: IV International symposium of innovation and technology. 2018, Salvador-Ba, p. 1-7.

SRISILAM, K.; VEERESHAM, C. Biotransformation of drugs by microbial cultures for predicting mammalian drug. **Biotechnology Advances**, v. 21, p. 339, 2003.

STARCEVIC, A et al. Enzymes of the shikimic acid pathway encoded in the genome of a basal metazoan, *Nematostella vectensis*, have microbial origins. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 105, n. 7, p. 2533-2537, 2008.

STOILOVA, I.; KRASTANOV, A.; STANCHEV, V. Properties of crude laccase from *Trametes Versicolor* produced by solid-substrate fermentation. **Advances in Bioscience and Biotechnology**. vol. 1, p. 208-215, 2010.

STROPARO, E. C. et al. Seleção de fungos filamentosos e de resíduos agroindustriais para a produção de enzimas de interesse biotecnológico. **Semina: Ciências Agrárias**. v. 33, n. 6, p. 2267-2278, 2012.

SUN, J. et al. A laccase with antiproliferative and HIV-1 reverse transcriptase inhibitory activities from the mycorrhizal fungus *Agaricus placomyces*. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**. p. 1-8, 2012.

TABELA DE POTENCIAIS DE REDUÇÃO. Disponível em: <  
[http://www.dqi.iq.ufrj.br/tabela\\_de\\_potenciais.pdf](http://www.dqi.iq.ufrj.br/tabela_de_potenciais.pdf)> Acesso em: 30. Mar. 2019.

TALARO, K. P.; CHESS, B. **Foundations in microbiology**. 9 ed. Mc Graw Hill Education, p. 667-680, 2015.

TAKAHASHI, J. A. et al. Fungos filamentosos e Química: velhos conhecidos, novos aliados. **Revista Virtual de Química**. v. 9, n. 6, p. 2351-2382, 2017.

TAKAHASHI, K. et al. Methyl as na  $\alpha$ -glucosidade inibitor from *Solanum torvum* fruits and activity of related compounds. **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**. v. 74, n. 4. P. 741-745, 2010.

TAVARES, A. P. M. **Produção de lacase para potencial aplicação como oxidante na indústria papelreira**. 2006. 189f. Tese (Doutorado em Engenharia Química)- Universidade de Aveiro, p. 1-58.

TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. **Microbiologia**. 6 ed. Atheneu. p. 569-590, 2015.

TEPONNO, R. B.; KUSARI, S.; SPITELLER, M. Recent avances in research on lignans and neolignans. **Royal Society of Chemistry**. v. 33, p. 1044- 1092, 2015.

TINIKUL, R. et al. Biotransformation of plant-derived phenolic acids. **Biotechnology Journal**. v. 13, p. 1-12, 2018.

TOHGE, T. et al. Shikimate and phenylalanine biosynthesis in the green lineage. **Frontiers in plant science**. v. 4, n. 62, p. 1-13, 2013.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 10 ed, Porto Alegre: Artmed, 2012, p. 331-339.

TZIN, V.; GALILI, G. New insights into the shikimate and aromatic amino acids biosynthesis pathways in plants. **Molecular Plant**. v. 3, n. 6, p. 956-972, 2010.

VERLI, H. **Bioinformática: da biologia à flexibilidade molecular**. 1 ed. São Paulo: Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, 2014, p. 188-207.

VIEIRA, T. M. et al. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Artemisia absinthium* Asteraceae Leaves. **Journal of essential oil bearing plants**. P. 1-10, 2017.

VALLE, J. S. **Produção, identificação e caracterização molecular de lacases de *Agaricus blazei* por fermentação de resíduos agroindustriais**.

2012. 170f. Tese (Doutorado em Processos Biotecnológicos)- Programa de Pós-graduação em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, Universidade Federal do Paraná, Paraná, p. 18-60.

WANG, W. et al. Decolorization of industrial synthetic dyes using engineered *Pseudomonas putida* cells with surface-immobilized bacterial laccase. **Microbial cell factories**. v. 11, p. 1-114, 2012.

WEBSTER, J.; WEBER, R. W. S. **Introduction to Fungi**. 3 ed. Cambridge. 2007, p. 658-670.

WHITELEY, C. G.; LEE, D. J. Enzyme technology and biological remediation. **Enzyme Microbial Technology**, v.38, n.3-4, p. 291-316, 2006.

ZUCCHI, M. C. **Estudo da atividade antibacteriana de isolados do gênero *Pisolithus microcarpus***. 2016. 60f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências Biológicas)- Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, p. 25-35.

YEO, H.; LEE, J. H.; KIM, J. Enzymatic Synthesis of a dihydrobenzofuran neolignan by oxidative coupling. **Seoul National University**. vol. 22, n. 3, p. 306- 308, 1999.