

JOÃO BATISTA DE MEDEIROS

**Avaliação do Potencial Biocatalítico de Fungos Endófitos  
de Espécies Vegetais do Cerrado**

Dissertação apresentada ao Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho,” como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Química

Orientadora: Profa. Dra. Angela Regina Araujo

Coorientadora: Dra. Lucimar Pinheiro Rosseto

Araraquara  
2010

FICHA CATALOGRÁFICA

M488a	<p>Medeiros, João Batista de Avaliação do potencial biocatalítico de fungos endófitos de espécies vegetais do Cerrado / João Batista de Medeiros. – Araraquara : [s.n], 2010 102 f. : il.</p> <p>Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Química Orientador: Angela Regina Araujo Coorientador: Lucimar Pinheiro Rosseto</p> <p>1. Química orgânica. 2. Biotransformação. 3. Biodegradação. 4. <i>Nigrospora sphaerica</i>. 5. <i>Schizophyllum commune</i>. 6. <i>Phomopsis</i> sp. 7. <i>Tricoderma viridae</i>. 8. <i>Aspergillus versicollor</i>. 9. <i>Xylaria</i> sp. 10. <i>Phomopsis stipata</i>. I. Título.</p>
-------	--

Elaboração: Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação do Instituto de Química de Araraquara  
Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação

## SÚMULA CURRICULAR

### JOÃO BATISTA DE MEDEIROS

#### DADOS PESSOAIS

- ✓ Nascimento: 23/06/1983
- ✓ Nacionalidade: Brasileiro
- ✓ Naturalidade: Cruzeta/RN
- ✓ Filiação: Inacio Claudio de Medeiros e Rosita Azevedo de Medeiros

#### FORMAÇÃO ACADÊMICA

- ✓ Licenciatura Plena em Química  
Instituto de Química de Araraquara, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP  
Período: 2003-2007
  
- ✓ Mestrado em Química  
Área de concentração: Química Orgânica  
Instituto de Química de Araraquara, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP

#### ESTÁGIOS REALIZADOS

- ✓ **Iniciação à Pesquisa Científica**  
Título do projeto: Esterase de fígado suíno (PLE): extração, isolamento, imobilização e aplicação em reatores  
Orientação: Prof. Dr. Henrique Celso Trevisan  
Instituto de Química de Araraquara, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”- UNESP  
Período: 2005-2007  
Bolsa: Fundação de Amparo à Pesquisa do estado de São Paulo-FAPESP

## EXPERIÊNCIA PROFISSIONAL

- ✓ Colégio Anglo

Professor de Química no ensino médio e curso pré-vestibular

Período: 2008-2010

- ✓ Centro Educacional tecnológico

Professor de Química no ensino técnico

Período: 2008

## PARTICIPAÇÕES EM CONGRESSOS

- ✓ Avaliação do potencial biocatalítico de fungos endofíticos. In: V Workshop de Biocatálise e Biotransformação, 2010. Maringá-PR.

- ✓ Biotransformação e biodegradação da (-)-cassina por fungos endofíticos. In: V Workshop de Biocatálise e Biotransformação, 2010. Maringá-PR.

- ✓ Avaliação do potencial biocatalítico de fungos endofíticos isolados do bioma Cerrado. In: 33ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2010. Águas de Lindóia-SP.

- ✓ Biotransformação da (-)-cassina por fungos endofíticos. In: 33ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2010. Águas de Lindóia-SP.

- ✓ Biodroxilação da cânfora usando o fungo endofítico *Curvularia* sp., isolado de *Ocotea corimbosa*. In: 32ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2009. Águas de Lindóia-SP.

- ✓ Prospecção de atividades lipase e esterase em fungos endofíticos pelo método da adrenalina. In: 16º Simpósio Nacional de Bioprocessos-SINAFERM, 2007. Curitiba-PR.

- ✓ Esterase de Fígado Suíno: Imobilização e Aplicação em Síntese Enantiosseletiva. In: XIX Congresso de Iniciação Científica da UNESP, 2007. Presidente Prudente-SP.

- ✓ Triagem de atividade esterase em fungos endofíticos com indicador de pH. In: XIX Congresso de Iniciação Científica da UNESP, 2007. Presidente Prudente-SP.

- ✓ Imobilização de esterase de fígado suíno em sílica e caracterização do imobilizado. In: 30ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2007. Águas de Lindóia-SP.
- ✓ Prospecção de atividade esterase em fungos endofíticos com indicador de pH. In: 30ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2007. Águas de Lindóia-SP.
- ✓ Avaliação da Atividade Esterase em Fungos Endofíticos. In: 30ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2007. Águas de Lindóia-SP.
- ✓ Avaliação de atividade esterase extracelular em fungos endofíticos. In: 16º Encontro da Sociedade Brasileira de Química-Regional Interior Paulista Waldemar Saffioti, 2007. Franca-SP.
- ✓ Imobilização e estabilização de esterase de fígado suíno. In: 29ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2006. Águas de Lindóia-SP.
- ✓ Estabilização de esterase de fígado suíno. In: XVIII Congresso de Iniciação Científica da UNESP, 2006. Bauru-SP.
- ✓ Extração de esterase de fígado suíno para uso em síntese orgânica. In: 28ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2005. Poços de Caldas-MG.
- ✓ Extração e Imobilização de Esterase de Fígado Suíno (PLE). In: XVII Congresso de Iniciação Científica da UNESP, 2005. Araraquara-SP.
- ✓ Isolamento da esterase de fígado de porco (PLE). In: XVI Congresso de Iniciação Científica da UNESP, 2004. Ilha Solteira-SP.
- ✓ O solo como tema organizador de aprendizagens no ensino fundamental. In: Encontro Ibero-americano de Coletivos Escolares e Redes de Professores que Fazem Investigação na Sua Escola, 2005. Lajeado-RS.
- ✓ Atendimento aos estudantes através do programa plantão de dúvidas como agente facilitador do processo ensino-aprendizagem. In: Congresso de Extensão Universitária, 2004. Revista Ciência em Extensão, v. 1, p. 76.
- ✓ O Uso de folhetos explicativos em sala de aula no ensino fundamental. In: Congresso de Extensão Universitária, 2004. Revista Ciência em Extensão, v. 1, p. 137.
- ✓ Projeto Ciência Viva: o circuito da informação e conhecimento para a comunidade estudantil. In: Congresso de Extensão Universitária, 2004. Revista Ciência e Extensão. v. 1, p. 151.

- ✓ Centro de Ciências de Araraquara (CCA): plantão de dúvidas. In: Evento de Educação em Química, 2004. Araraquara-SP.
- ✓ O uso da experimentação como ferramenta facilitadora no processo ensino-aprendizagem do conceito de densidade. In: XII Encontro Nacional de Ensino de Química, 2004. Goiânia-GO.
- ✓ Experimentação: uma ferramenta no ensino de ligações químicas. In: XII Encontro Nacional de Ensino de Química, 2004. Goiânia-GO.

### **TRABALHOS CIENTÍFICOS PUBLICADOS**

- ✓ MEDEIROS, J. B.; TREVISAN, H. C.; LISBOA, H. C. F. Extração de Esterase de Fígado Suíno. **Química Nova**, v. 29, p. 865-867, 2006.

### **INFORMAÇÕES ADICIONAIS**

- ✓ **Mini-cursos ministrados**

Metodologias Alternativas para o Ensino de Ciências – aspectos didáticos e pedagógicos. In: II Jornada Científica das faculdades Integradas do vale do Ribeira, 2004. Registro-SP.

- ✓ **Participação em livros**

O Relato de um Universitário. In: Como Virar Bixo: um caminho para ser aprovado no vestibular. Araraquara: UNESP, 2007.

## JOÃO BATISTA DE MEDEIROS

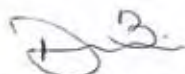
Dissertação apresentada ao Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Química.

Araraquara, 20 de dezembro de 2010.

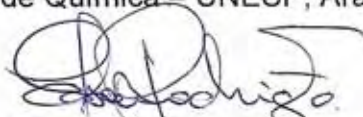
### BANCA EXAMINADORA



Profª Drª Angela Regina Araujo (Orientadora)  
Instituto de Química – UNESP, Araraquara



Profª Drª Daniela Alonso Bocchini Martins  
Instituto de Química – UNESP, Araraquara



Prof. Dr. Edson Rodrigues Filho  
Centro de Ciências Exatas – UFSCAR – São Carlos

Dedico esse trabalho aos meus pais, Inacio C. de Medeiros e Rosita A. de Medeiros, exemplos de cidadãos e perseverança. Os primeiros passos por eles ensinados foram fundamentais para que o caminho percorrido nos últimos anos me conduzisse a esse momento.

Ao saudoso Professor Dr. Henrique C. Trevisan (*in memoriam*), pesquisador que aguçou minha curiosidade a respeito da biocatálise; pessoa prestativa e sábia, cujos ensinamentos contribuíram de maneira ímpar para minha formação.

## AGRADECIMENTOS

À sociedade em geral, que através dos seus impostos financiou(a) os órgãos de fomento à pesquisa e a nobre universidade em que esse trabalho foi realizado.

Aos funcionários do Instituto de Química, em especial aos da biblioteca, da seção de pós-graduação e dos Departamentos de Química Orgânica e Bioquímica e Tecnologia Química. A competência e o esmero com que desenvolveram(vem) suas funções facilitaram(am) o desenvolvimento desse(do) trabalho científico.

Aos docentes do Instituto de Química, por contribuírem de maneira ímpar para minha formação científica e para o desenvolvimento desse trabalho.

À minha estimada professora orientadora Dra. Angela R. Araujo, pela orientação e valiosos ensinamentos transmitidos nos últimos anos. Pela constante preocupação com o meu aprendizado e minha formação. Muito obrigado pela confiança depositada ao orientar um mestrando sem dedicação exclusiva à pesquisa.

À minha estimada coorientadora Dra. Lucimar Pinheiro Rosseto, pelas inúmeras orientações no dia-a-dia do laboratório, grandioso auxílio na área de biocatálise e revisão desse manuscrito. Esse trabalho não seria o mesmo sem a valiosa contribuição dessa pesquisadora.

Aos professores André L. M. Porto e Niede A. J. C. Furtado que fizeram parte da banca do meu exame de qualificação e contribuíram com inúmeras sugestões e ensinamentos.

Aos professores Edson Rodrigues Filho e Daniela A. B. Martins, membros da banca examinadora dessa dissertação, que contribuíram imensamente para a finalização do trabalho.

Aos alunos do departamento de Química Orgânica, em especial do grupo de pesquisa NuBBE, que sempre se dispuseram em compartilhar seus conhecimentos e tornaram ainda mais prazerosos os dias de trabalho. Dentro do NuBBE, gostaria de agradecer especialmente os alunos da professora Angela, “a turma da micose”, por me ensinarem os necessários cuidados microbiológicos no manejo com os micro-organismos e por contribuírem mais diretamente para o desenvolvimento desse trabalho, assistindo e dando sugestões nos seminários e prévias ministradas.

À estagiária Thaís Ramos por ter auxiliado na realização dos experimentos e ter contribuído para minha formação por meio das discussões sobre fungos, enzimas e biotransformações.

Aos “irmãos inorgânicos” Jorge, Marco e Flávia; aos “irmãos físico-químicos” Aroldo e Leandro; aos “irmãos analíticos” Ademar e Thayz e aos “irmãos Bioquímicos” dona Maria, Fátima, Helen, Luísa, Telma e professor Nilso pelo auxílio nos momentos em que os equipamentos quebraram e pelo constante incentivo.

Aos amigos de república Alisson, Arthur, Daniel, Edilson, Edson (Araketu), Emerson, Jean, Juliano, José Carlos, José Flávio (Cajobi), Lucas (Jesus), Marcos, Marlon, Max, Murilo, Ricardo (Brasa), Sandro e Tiago (DDD). Se morar em república foi um curso a parte, vocês foram os professores.

## Agradecimentos

Ao amigo e mestre Daniel D. de Souza, por sempre ter compartilhado seus conhecimentos sobre biotransformação e por tanto ter contribuído para minha formação docente.

À minha querida namorada Sheila Pasqualotto, por ter me acompanhado durante toda essa jornada, me fortalecendo e motivando a todo momento, além do auxílio na revisão dessa dissertação.

Aos meus pais, Inacio e Rosita, e aos meus irmãos José, Maria, Junior, João, Dimas, Valdeci, José Azevedo, Valdemar e Leocardio, pelo constante incentivo aos estudos e ensinamentos de vida.

**“Tenho a impressão de ter sido uma criança brincando à beira mar,  
divertindo-me em descobrir a pedrinha mais lisa ou a concha mais bela,  
enquanto o imenso oceano continua misterioso diante dos meus olhos”**

**Isaac Newton**

## RESUMO

A área de biocatálise está em franco desenvolvimento e fungos associados a espécies vegetais dos biomas brasileiros são biocatalisadores em potencial, praticamente inexplorados. Nesse contexto, o presente trabalho descreve a avaliação do potencial biocatalítico de 7 fungos endófitos isolados de espécies vegetais do Cerrado. Foi avaliada a capacidade dos micro-organismos *Nigrospora sphaerica*, *Schizophyllum commune*, *Phomopsis* sp., *Tricoderma viridae*, *Aspergillus versicolor*, *Xylaria* sp. e *Phomopsis stipata* biotransformarem ou biodegradarem os substratos ácido gálico e cassina. O estudo de tolerância dos micro-organismos aos substratos permitiu selecionar as concentrações nas quais o ácido gálico (1,0 g L<sup>-1</sup>) e a cassina (0,5 g L<sup>-1</sup>) foram adicionados ao meio reacional na etapa de biotransformação/biodegradação. Todos os micro-organismos estudados se mostraram capazes de biotransformar o substrato ácido gálico. Os 26 produtos biotransformados são mais apolares que o composto de partida e foram encontrados na fase aquosa ou no micélio microbiano. Em relação à cassina, os endófitos *Schizophyllum commune*, *Tricoderma viridae* e *Xylaria* sp. não a metabolizaram, mesmo após 14 dias de incubação. Os endófitos *Nigrospora sphaerica* e *Aspergillus versicolor* a biodegradaram, enquanto que *Phomopsis stipata* e *Phomopsis* sp. a biotransformaram em 6 e 3 novos compostos, respectivamente. Os produtos de biotransformação do ácido gálico e da cassina terão suas estruturas determinadas em trabalhos futuros, e a partir desses dados poderemos inferir as reações que os fungos são capazes de realizar, e conseqüentemente sugerir as atividades enzimáticas presentes nos fungos endófitos estudados.

**Palavras chave:** Fungos endófitos. *Nigrospora sphaerica*. *Schizophyllum commune*. *Phomopsis* sp. *Tricoderma viridae*. *Aspergillus versicolor*. *Xylaria* sp. *Phomopsis stipata*. Biotransformação. Biodegradação. Ácido gálico e cassina.

## ABSTRACT

The area of biocatalysis is developing fast and fungi associated with plant species of Brazilian biomes are potential biocatalysts, virtually unexplored. In this context, this work describes the evaluation of biocatalytic potential of seven fungal endophytes isolated from species of the Cerrado. We evaluated the ability of the micro-organisms *Nigrospora sphaerica*, *Schizophyllum commune*, *Phomopsis* sp., *Tricoderma viridae*, *Aspergillus versicolor*, *Xylaria* sp. and *Phomopsis stipata* to biotransform or biodegrade the substrates gallic acid and cassine. The study of microorganisms tolerance to the substrate allowed to select the concentrations in which the gallic acid ( $1.0 \text{ g L}^{-1}$ ) and cassine ( $0.5 \text{ g L}^{-1}$ ) were added to the reaction medium in step biotransformation/biodegradation. All microorganisms studied are quite capable of biotransform substrate gallic acid. The 26 biotransformed products are less polar than the starting compound and were found in the aqueous phase or microbial mycelium. In relation to the cassine, the endophytes *Schizophyllum commune*, *Tricoderma viridae* and *Xylaria* sp. didn't metabolize it, even after 14 days of incubation. Endophytes *Nigrospora sphaerica* and *Aspergillus versicolor* biodegraded the cassine, while *Phomopsis stipata* and *Phomopsis* sp. biotransformed this substrat in six and three new compounds, respectively. The biotransformation products of gallic acid and cassine will have their structures determined in future studies, allowing to infer which biotransformations occurred, and therefore suggest which the enzyme activities are found in the fungal endophyte studied.

**Keywords:** Fungal endophytes. *Nigrospora sphaerica*. *Schizophyllum commune*. *Phomopsis* sp. *Tricoderma viridae*. *Aspergillus versicolor*. *Xylaria* sp. *Phomopsis Stipata*. Biotransformation. Biodegradation. Gallic acid and cassine.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Exemplos de produtos obtidos em larga escala por bioconversões.	24
Figura 2 - Exemplo de bioconversão quimiosseletiva (AMARAL et al., 2008).	25
Figura 3 - Exemplo de bioconversão regiosseletiva (FABER, 2004).	25
Figura 4 - Exemplo de bioconversão enantiosseletiva (SOLOMONS; CRAIG, 2009).	26
Figura 5 - Exemplo de bioconversão diastereosseletiva (FABER, 2004).	26
Figura 6 - Fungos endófitos selecionados para o estudo biocatalítico e suas respectivas espécies vegetais hospedeiras.	32
Figura 7 - Estruturas dos substratos utilizados na avaliação biocatalítica dos fungos endófitos.	32
Figura 8 - Montagem da placa de 96 poços na avaliação da tolerância dos micro-organismos ao ácido gálico, à cassina e ao corante azul de metileno.	38
Figura 9 - Estrutura do corante azul de metileno.	38
Figura 10 - Ilustração do procedimento geral utilizado para as reações de biotransformação/biodegradação.	40
Figura 11 - Avaliação da tolerância do micro-organismo <i>P. stipata</i> ao ácido gálico, cassina e azul de metileno (linhas A, C e F, respectivamente).	43
Figura 12 - Avaliação da tolerância do micro-organismo <i>Phomopsis</i> sp. ao ácido gálico, cassina e azul de metileno (linhas A, C e F, respectivamente).	44
Figura 13 - Avaliação da tolerância do micro-organismo <i>N. sphaerica</i> ao ácido gálico, cassina e azul de metileno (linhas A, C e F, respectivamente).	44
Figura 14 - Avaliação da tolerância do micro-organismo <i>A. versicolor</i> ao ácido gálico, cassina e azul de metileno (linhas A, C e F, respectivamente).	45
Figura 15 - Avaliação da tolerância do micro-organismo <i>T. viridae</i> ao ácido gálico, cassina e azul de metileno (linhas A, C e F, respectivamente).	46
Figura 16 - Avaliação da tolerância do micro-organismo <i>Xylaria</i> sp. ao ácido gálico, cassina e azul de metileno (linhas A, C e F, respectivamente).	46
Figura 17 - Avaliação da tolerância do micro-organismo <i>S. commune</i> ao ácido gálico, cassina e azul de metileno (linhas A, C e F, respectivamente).	47
Figura 18 - Avaliação da tolerância do micro-organismo <i>S. commune</i> ao ácido gálico, cassina e azul de metileno (linhas A, C e F, respectivamente); Imagem da parte inferior da placa.	48
Figura 19 - Cromatograma obtido na avaliação da estabilidade do ácido gálico nas condições em que o estudo biocatalítico foi realizado. Coluna e condições de análise: parte experimental, item 3.7.	50
Figura 20 - Cromatograma e espectro no UV do padrão do ácido gálico. Coluna e condições de análise: parte experimental, item 3.7.	50
Figura 21 – Cromatogramas, em diferentes $\lambda$ , da biotransformação do ácido gálico por <i>S. commune</i> .	51
Figura 22 - Cromatogramas da biotransformação do ácido gálico por <i>S. commune</i> em diferentes períodos de incubação. Coluna e condições de análise: parte experimental, item 3.7.	52
Figura 23 - Cromatogramas da biotransformação do ácido gálico por <i>S. commune</i> e dos controles microbiano e meio de cultura. Coluna e condições de análise: parte experimental, item 3.7.	52
Figura 24 - Espectros na região do UV dos compostos 1 e 2, e do ácido gálico.	53

## Lista de Figuras

Figura 25 - Cromatograma da derivação do ác. gálico com diazometano. Coluna e condições de análise: parte experimental, item 3.7.	54
Figura 26 - Espectros na região do UV dos derivados do ác. gálico pela reação com diazometano.	54
Figura 27 - Cromatograma obtido na co-injeção da biorreação do ác. gálico por <i>S. commune</i> e da amostra de derivação do ác. gálico com diazometano. Coluna e condições de análise: parte experimental, item 3.7.	55
Figura 28 - Cromatograma e espectro no UV do padrão do galato de metila. Coluna e condições de análise: parte experimental, item 3.7.	55
Figura 29 - Produtos de biotransformação do ác. gálico por <i>B. sulfurescens</i> . Reportado por HSU et al., 2007.	56
Figura 30 - Cromatogramas dos extratos dos micélios da biotransformação do ác. gálico por <i>S. commune</i> e do controle microbiano. Coluna e condições de análise: parte experimental, item 3.7.	58
Figura 31 - Espectros na região do UV dos compostos presentes no micélio do endófito <i>S. commune</i> .	58
Figura 32 - Cromatogramas, em diferentes $\lambda$ , da biotransformação do ác. gálico por <i>P. stipata</i> .	59
Figura 33 - Cromatogramas do extrato da biotransformação do ác. gálico por <i>P. stipata</i> em diferentes períodos de incubação. Coluna e condições de análise: parte experimental, item 3.7.	59
Figura 34 - Cromatogramas dos extratos da biotransformação do ác. gálico por <i>P. stipata</i> e dos controles microbiano e meio de cultura. Coluna e condições de análise: parte experimental, item 3.7.	60
Figura 35 - Espectros na região do UV dos compostos 1, 2 e 3 formados após 5 dias de incubação.	60
Figura 36 - Cromatogramas dos extratos dos micélios da biotransformação do ác. gálico por <i>P. stipata</i> e do controle microbiano. Coluna e condições de análise: parte experimental, item 3.7.	61
Figura 37 - Espectros na região do UV dos compostos presentes no micélio do endófito <i>P. stipata</i> .	62
Figura 38 - Cromatogramas, em diferentes $\lambda$ , da biotransformação do ác. gálico por <i>T. viridade</i> .	62
Figura 39 - Cromatogramas do extrato da biotransformação do ác. gálico por <i>T. viridae</i> em diferentes períodos de incubação. Coluna e condições de análise: parte experimental, item 3.7.	63
Figura 40 - Cromatogramas dos extratos da biotransformação do ác. gálico por <i>T. viridae</i> e dos controles microbiano e meio de cultura. Coluna e condições de análise: parte experimental, item 3.7.	64
Figura 41 - Espectros na região do UV dos compostos formados após 5 dias de incubação.	64
Figura 42 - Cromatogramas dos extratos dos micélios da biotransformação do ác. gálico por <i>T. viridae</i> e do controle microbiano. Coluna e condições de análise: parte experimental, item 3.7.	65
Figura 43 - Espectros na região do UV dos compostos presentes nos micélios do endófito <i>T. viridae</i> : 1 e 2: compostos da biorreação; 1: composto presente no controle microbiano.	65
Figura 44 - Cromatogramas, em diferentes $\lambda$ , da biotransformação do ác. gálico por <i>Phomopsis</i> sp.	66

## Lista de Figuras

Figura 45 - Aspecto do meio reacional da biorreação (frasco à direita) e do controle microbiano (frasco à esquerda).	66
Figura 46 - Cromatogramas do extrato da biotransformação do ác. gálico por <i>Phomopsis</i> sp. em diferentes períodos de incubação. Coluna e condições de análise: parte experimental, item 3.7.	67
Figura 47 - Cromatogramas dos extratos da biotransformação do ác. gálico por <i>Phomopsis</i> sp. e dos controles microbiano e meio de cultura. Coluna e condições de análise: parte experimental, item 3.7.	68
Figura 48 - Espectros na região do UV dos compostos 1, 2, 3, 4 e 5 formados após 8 dias de incubação.	68
Figura 49 - Cromatogramas dos extratos dos micélios da biotransformação do ác. gálico por <i>Phomopsis</i> sp. e do controle microbiano. Coluna e condições de análise: parte experimental, item 3.7.	69
Figura 50 - Espectros na região do UV dos compostos presentes nos micélios do endófito <i>Phomopsis</i> sp.	69
Figura 51 - Cromatogramas, em diferentes $\lambda$ , da biotransformação do ác. gálico por <i>N. sphaerica</i> .	70
Figura 52 - Cromatogramas do extrato da biotransformação do ác. gálico por <i>N. sphaerica</i> em diferentes períodos de incubação. Coluna e condições de análise: parte experimental, item 3.7.	70
Figura 53 - Aspecto do meio reacional da biorreação (frasco à direita) e do controle microbiano (frasco à esquerda).	70
Figura 54 - Cromatogramas da biotransformação do ác. gálico por <i>N. sphaerica</i> e dos controles microbiano e meio de cultura. Espectro no UV do composto 1. Coluna e condições de análise: parte experimental, item 3.7.	71
Figura 55 - Cromatogramas dos extratos dos micélios da biotransformação do ác. gálico por <i>N. sphaerica</i> e do controle microbiano. Coluna e condições de análise: parte experimental, item 3.7.	72
Figura 56 - Cromatogramas, em diferentes $\lambda$ , da biotransformação do ác. gálico por <i>Xylaria</i> sp.	72
Figura 57 - Cromatogramas do extrato da biotransformação do ác. gálico por <i>Xylaria</i> sp. em diferentes períodos de incubação. Coluna e condições de análise: parte experimental, item 3.7.	73
Figura 58 - Cromatogramas dos extratos da biotransformação do ác. gálico por <i>Xylaria</i> sp. e dos controles microbiano e meio de cultura. Coluna e condições de análise: parte experimental, item 3.7.	73
Figura 59 - Cromatogramas dos extratos dos micélios da biotransformação do ác. gálico por <i>Xylaria</i> sp. e do controle microbiano. Coluna e condições de análise: parte experimental, item 3.7.	74
Figura 60 - Espectros na região do UV dos compostos presentes no micélio do endófito <i>Xylaria</i> sp.	75
Figura 61 - Cromatogramas, em diferentes $\lambda$ , da biotransformação do ác. gálico por <i>A. versicolor</i> .	75
Figura 62 - Cromatogramas do extrato da biotransformação do ác. gálico por <i>A. versicolor</i> em diferentes períodos de incubação. Coluna e condições de análise: parte experimental, item 3.7.	76
Figura 63 - Cromatogramas da biotransformação do ác. gálico por <i>A. versicolor</i> e dos controles microbiano e meio de cultura. Coluna e condições de análise: parte experimental, item 3.7.	76

## Lista de Figuras

- Figura 64 - Cromatogramas dos extratos dos micélios da biotransformação do ác. gálico por *A. versicolor* e do controle microbiano. Coluna e condições de análise: parte experimental, item 3.7. 77
- Figura 65 - Cromatograma da amostra da cassina na concentração 0,5 g L<sup>-1</sup>. Coluna: SPB-5; condições de análise: parte experimental, item 3.7. 79
- Figura 66 - Cromatograma obtido na avaliação da estabilidade da cassina nas condições em que a avaliação biocatalítica foi desenvolvida. Coluna: SPB-5; condições de análise: item 3.7. 80
- Figura 67 - Cromatogramas da biorreação (em diferentes períodos de incubação) obtidos no estudo de biotransformação/biodegradação da cassina por *S. commune*. Coluna: SPB-5; condições de análise: parte experimental, item 3.7. 81
- Figura 68 - Aspecto do micélio fúngico no estudo de biotransformação/biodegradação da cassina por *S. commune* (após 2 semanas de incubação): a) Controle microbiano; b) Biorreação. 82
- Figura 69 - Aspecto dos meios reacionais no estudo de biotransformação/biodegradação da cassina por *P. stipata*, no quinto dia de incubação a) Controles microbianos; b) Biorreações. 82
- Figura 70 - Cromatogramas da biorreação (em diferentes períodos de incubação) obtidos no estudo de biotransformação/biodegradação da cassina por *P. stipata*. Coluna: SPB-5; condições de análise: parte experimental, item 3.7. 83
- Figura 71 - Cromatograma do controle microbiano obtido no estudo de biotransformação/biodegradação da cassina por *P. stipata* após 3 dias de incubação. Coluna: SPB-5; condições de análise: parte experimental, item 3.7. 84
- Figura 72 - Cromatogramas dos micélios do controle microbiano e da biorreação obtidos no estudo de biotransformação/biodegradação da cassina por *P. stipata*. Coluna: SPB-5; condições de análise: parte experimental, item 3.7. 85
- Figura 73 - Cromatogramas da biorreação (em diferentes períodos de incubação) obtidos no estudo de biotransformação/biodegradação da cassina por *T. viridae*. Coluna: SPB-5; condições de análise: parte experimental, item 3.7. 86
- Figura 74 - Cromatogramas da biorreação (em diferentes períodos de incubação) obtidos no estudo de biotransformação/biodegradação da cassina por *Phomopsis* sp. Coluna: SPB-5; condições de análise: parte experimental, item 3.7. 88
- Figura 75 - Cromatogramas da biorreação e do controle microbiano obtidos no estudo de biotransformação/biodegradação da cassina por *Phomopsis* sp. após 9 dias de incubação. Coluna: SPB-5; condições de análise: parte experimental, item 3.7. 89
- Figura 76 - Cromatogramas dos micélios do controle microbiano e da biorreação obtidos no estudo de biotransformação/biodegradação da cassina por *Phomopsis* sp. Coluna: SPB-5; condições de análise: parte experimental, item 3.7. 89
- Figura 77 - Cromatograma da amostra da cassina (concentração 0,5 g L<sup>-1</sup>) que evidencia a alteração no t<sub>R</sub> dessa substância devido a troca de coluna. Coluna: ZB-5; condições de análise: item 3.7. 90
- Figura 78 - Cromatogramas da biorreação (em diferentes períodos de incubação) obtidos no estudo de biotransformação/biodegradação da cassina por *N. sphaerica*. Coluna e condições de análise: parte experimental, item 3.7. 91
- Figura 79 - Cromatogramas da biorreação e do controle microbiano obtidos no estudo de biotransformação/biodegradação da cassina por *N. sphaerica* após 7 dias de incubação. Coluna: ZB-5; condições de análise: parte experimental, item 3.7. 92
- Figura 80 - Cromatogramas dos micélios do controle microbiano e da biorreação obtidos no estudo de biotransformação/biodegradação da cassina por *N. sphaerica*. Coluna: ZB-5; condições de análise: parte experimental, item 3.7. 92

## Lista de Figuras

- Figura 81 - Cromatogramas da biorreação (em diferentes períodos de incubação) obtidos no estudo de biotransformação/biodegradação da cassina por *Xylaria* sp.  
Coluna: ZB-5; condições de análise: parte experimental, item 3.7. 94
- Figura 82 - Cromatogramas da biorreação (em diferentes períodos de incubação) obtidos no estudo de biotransformação/biodegradação da cassina por *A. versicolor*.  
Coluna: ZB-5; condições de análise: parte experimental, item 3.7. 95
- Figura 83 - Cromatogramas dos micélios do controle microbiano e da biorreação obtidos no estudo de biotransformação/biodegradação da cassina por *A. versicolor*.  
Coluna: ZB-5; condições de análise: parte experimental, item 3.7. 96

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Tabela que resume os resultados obtidos no estudo de biotransformação do ác. gálico.	78
Tabela 2 - Tabela que resume os resultados obtidos no estudo de biotransformação/ biodegradação da cassina.	97

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b>	<b>22</b>
1.1. Bioconversões: aspectos gerais	23
1.2. Fungos: fonte rica de moléculas bioativas e enzimas	28
1.3. Fungos endófitos: biocatalisadores praticamente inexplorados	29
1.4. Fungos endófitos associados a espécies de biomas brasileiros	31
<b>2. OBJETIVO</b>	<b>34</b>
2.1. Objetivo geral	34
2.2. Objetivos específicos	34
<b>3. PARTE EXPERIMENTAL</b>	<b>35</b>
3.1. Materiais, equipamentos e técnicas utilizadas	35
3.2. Coleta e identificação das espécies vegetais	36
3.3. Isolamento das linhagens fúngicas	36
3.4. Identificação das linhagens fúngicas	37
3.5. Avaliação da tolerância dos micro-organismos ao ác. gálico e cassina	37
3.6. Procedimento geral para as reações de biotransformação/biodegradação	39
3.7. Avaliação da biotransformação ou biodegradação dos substratos	40
3.8. Extração dos compostos adsorvidos ao micélio	41
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	<b>42</b>
<b>4.1. Avaliação da tolerância dos micro-organismos aos substratos</b>	<b>42</b>
4.1.1. Micro-organismo <i>Phomopsis stipata</i>	42
4.1.2. Micro-organismo <i>Phomopsis</i> sp.	43
4.1.3. Micro-organismo <i>Nigrospora sphaerica</i>	44
4.1.4. Micro-organismo <i>Aspergillus versicolor</i>	45
4.1.5. Micro-organismo <i>Trichoderma viridae</i>	45
4.1.6. Micro-organismo <i>Xylaria</i> sp.	46
4.1.7. Micro-organismo <i>Schizophyllum commune</i>	47
<b>4.2. Avaliação do potencial biocatalítico dos fungos endófitos nas reações de biotransformação/biodegradação</b>	<b>49</b>
4.2.1. Substrato ácido gálico	49
4.2.1.1. Micro-organismo <i>Schizophyllum commune</i>	51
4.2.1.1.1. Análise dos micélios	57
4.2.1.2. Micro-organismo <i>Phomopsis stipata</i>	59

4.2.1.2.1. <i>Análise do micélio</i> _____	61
4.2.1.3. Micro-organismo <i>Trichoderma viridae</i> _____	62
4.2.1.3.1. <i>Análise do micélio</i> _____	64
4.2.1.4. Micro-organismo <i>Phomopsis</i> sp. _____	66
4.2.1.4.1. <i>Análise do micélio</i> _____	68
4.2.1.5. Micro-organismo <i>Nigrospora sphaerica</i> _____	69
4.2.1.5.1. <i>Análise do micélio</i> _____	72
4.2.1.6. Micro-organismo <i>Xylaria</i> sp. _____	72
4.2.1.6.1. <i>Análise do micélio</i> _____	74
4.2.1.7. Micro-organismo <i>Aspergillus versicolor</i> _____	75
4.2.1.7.1. <i>Análise do micélio</i> _____	77
4.2.2. Substrato Cassina _____	79
4.2.2.1. Micro-organismo <i>Schizophyllum commune</i> _____	80
4.2.2.2. Micro-organismo <i>Phomopsis stipata</i> _____	82
4.2.2.2.1. <i>Análise do micélio</i> _____	84
4.2.2.3. Micro-organismo <i>Trichoderma viridae</i> _____	85
4.2.2.4. Micro-organismo <i>Phomopsis</i> sp. _____	87
4.2.2.4.1. <i>Análise do micélio</i> _____	89
4.2.2.5. Micro-organismo <i>Nigrospora sphaerica</i> _____	90
4.2.2.5.1. <i>Análise do micélio</i> _____	92
4.2.2.6. Micro-organismo <i>Xylaria</i> sp. _____	93
4.2.2.7. Micro-organismo <i>Aspergillus versicolor</i> _____	95
4.2.2.7.1. <i>Análise do micélio</i> _____	96
<b>5. CONCLUSÕES</b> _____	<b>98</b>
<b>REFERÊNCIAS</b> _____	<b>99</b>

# 1. INTRODUÇÃO

A demanda por novos produtos veterinários, agroquímicos, farmacêuticos, e qualquer outro que seja usado para mediar ou controlar interações entre organismos vivos, é cada dia maior, principalmente para as populações dos países em desenvolvimento econômico (MAYOR, 1992; MARTINS, 2001; RODRIGUES; SILVA, 2010).

A produção dessas substâncias, devido, em partes, à crescente necessidade de preservação ambiental e redução das etapas envolvidas, tem exigido metodologias alternativas, como uso de biocatalisadores (DOUBLE; KRUTHIVENTI; GAIKAR, 2004).

As bioconversões (conversões químicas realizadas por métodos biológicos - uso de organismos vivos ou parte destes) (MEYER; LERESCHE, 2006) apresentam grande potencial na obtenção de novos compostos e na produção mais eficiente de compostos já conhecidos (GIRI et al., 2001). As bioconversões têm despertado interesse inclusive de companhias químicas tradicionais como DuPont, Dow, Basf e Monsanto (FURTADO, 2004).

Nesse contexto, se fazem necessárias triagens que visem encontrar enzimas que supram as necessidades catalíticas da indústria e que sejam estáveis nas condições de trabalho. Essas triagens são feitas em diversos seres vivos, incluindo animais, vegetais e principalmente micro-organismos, pois estes últimos apresentam as seguintes vantagens: ciclo de vida curto; fácil manipulação e rico sistema enzimático (PINEDO-RIVILLA et al, 2009; SEXTON et al., 2009).

Entre os micro-organismos, os fungos se destacam pela habilidade de habitarem diversos ambientes (GUNATILAKA, 2006) e conseqüentemente apresentarem maquinário enzimático diversificado e peculiar. De maneira geral, o habitat natural do fungo fornece informações importantes sobre o potencial biocatalítico desse organismo, e é um fator que deve ser considerado na busca de novos biocatalisadores (BORGES et al., 2007; PINEDO-RIVILLA et al., 2009). Por exemplo, há micro-organismos que habitam regiões vulcânicas e, portanto, apresentam enzimas termoestáveis, as quais são úteis em alguns

setores da indústria: de detergentes (SAID; PIETRO, 2004) e de corantes (SHUMACHER; HEINE; HOCKER, 2001), entre outros.

Outro exemplo são os fungos endófitos, fungos que colonizam o interior dos tecidos de espécies vegetais sem causarem dano aparente (BORGES et al., 2007). Estima-se que esse nicho de micro-organismos apresenta elevado grau de interação ecológica com seu hospedeiro (SCHULZ; BOYLE, 2005), produzindo diversas substâncias que são úteis à espécie vegetal. Essa diversidade metabólica indica que os fungos endófitos possuem rico sistema enzimático, o que os evidencia como fonte, em potencial, de diversas classes de enzimas.

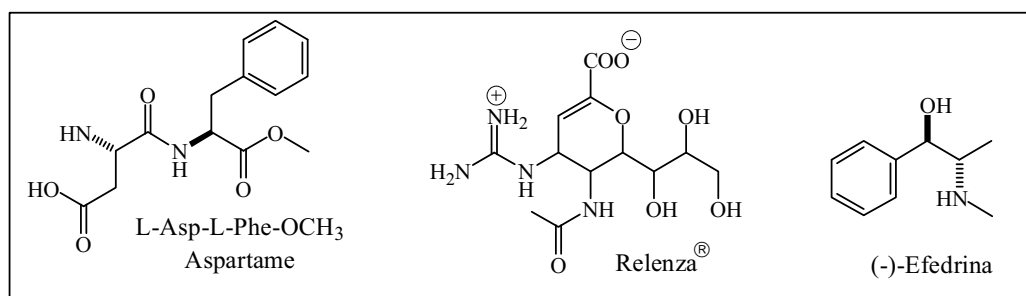
### **1.1. Bioconversões: aspectos gerais**

A fermentação alcoólica do suco de uva, a produção de cerveja e o preparo de pão são exemplos de transformações químicas realizadas por sistemas biológicos relatados há pelo menos 4000 anos (LIMA, 1975), embora os agentes responsáveis por esses processos fossem ainda desconhecidos (MEYER; LERESCHE, 2006). Somente em 1856, após a invenção do microscópio, Louis Pasteur evidenciou que as fermentações eram feitas por micro-organismos, e que cada processo fermentativo era característico de um tipo particular de organismo (OLIVEIRA; MONOVANI, 2009).

Desde então, as bioconversões são frequentemente descritas na literatura científica, empregando-se micro-organismos, organelas celulares ou enzimas isoladas como biocatalisadores (FABER, 2004).

Os objetivos das pesquisas mudaram ao longo desse período. Há algumas décadas, os pesquisadores estavam interessados em utilizar as bioconversões para elucidarem rotas bioquímicas e mecanismos enzimáticos dos organismos. A partir de 1980, o principal objetivo passou a ser a avaliação da capacidade dos biocatalisadores transformarem compostos orgânicos que não eram seus substratos naturais (FABER, 2004), despertando curiosidade e entusiasmo dos químicos orgânicos.

As bioconversões tornaram-se assunto constante na área de química orgânica sintética na década de 90, sendo que em 1991, 8% de todos os artigos publicados nessa área relatavam alguma bioconversão (FABER, 2004). Nos últimos anos, esses bioprocessos, além de serem objetos de estudos cada vez mais comuns em laboratórios de pesquisa, têm sido aplicados em diversos setores da indústria, principalmente no farmacêutico e alimentício (STRAATHOF; PANKE; SCHMID, 2002; DOUBLE; KRUTHIVENTI; GAIKAR, 2004; PANKE; WUBBOLTS, 2005), como, por exemplo, na produção do adoçante aspartame, do agente antiviral Zanamivir [comercializado como Relenza<sup>®</sup> (MAGANO, 2009)] e do descongestionante e broncodilatador (-)-Efedrina (PANKE; WUBBOLTS, 2005; DOUBLE; KRUTHIVENTI; GAIKAR, 2004) (**Figura 1**).



**Figura 1** - Exemplos de produtos obtidos em larga escala por bioconversões.

Esse crescente interesse na área de transformações químicas realizadas por sistemas biológicos, está relacionado às vantagens que esta apresenta em relação aos correspondentes métodos químicos, como por exemplo:

- Biocatalisadores são facilmente degradados, diferentemente dos catalisadores químicos metálicos.
- As bioconversões são desenvolvidas em condições brandas de pH, temperatura e pressão.
- As bioconversões podem ser quimiosseletivas: permitem que apenas determinado grupo funcional do substrato seja transformado, enquanto que as outras funcionalidades, que poderiam ser transformadas por catálise química, permanecem inalteradas. Por exemplo, a glicosilação realizada pelo fungo *Xylaria* sp. no ácido oleanólico ocorre apenas na hidroxila, o grupamento carboxílico permanece sem qualquer transformação (**Figura 2**). A

quimiosseletividade é importante porque dispensa etapas de proteção e desproteção de grupos funcionais, evitando, assim, uma indesejável etapa adicional de purificação dos produtos.

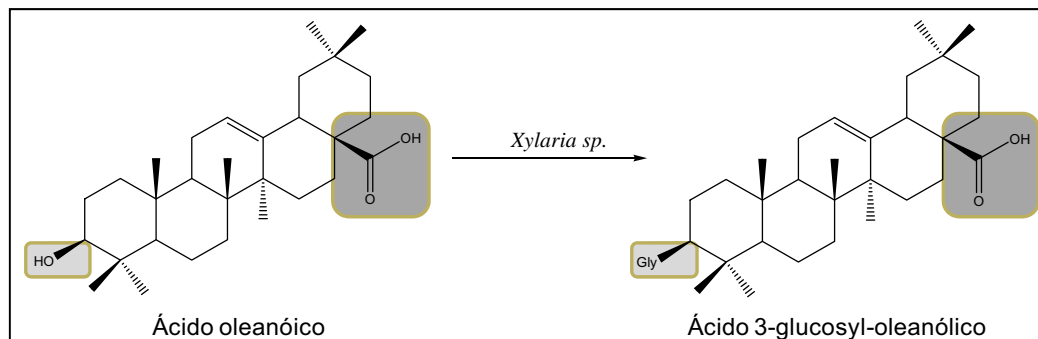


Figura 2 - Exemplo de bioconversão quimiosseletiva (AMARAL et al., 2008).

- As bioconversões podem ser regioseletivas: devido à estrutura tridimensional das enzimas, grupos funcionais idênticos, situados em diferentes regiões da molécula, são distinguidos e apenas um sofre transformação química (**Figura 3**).

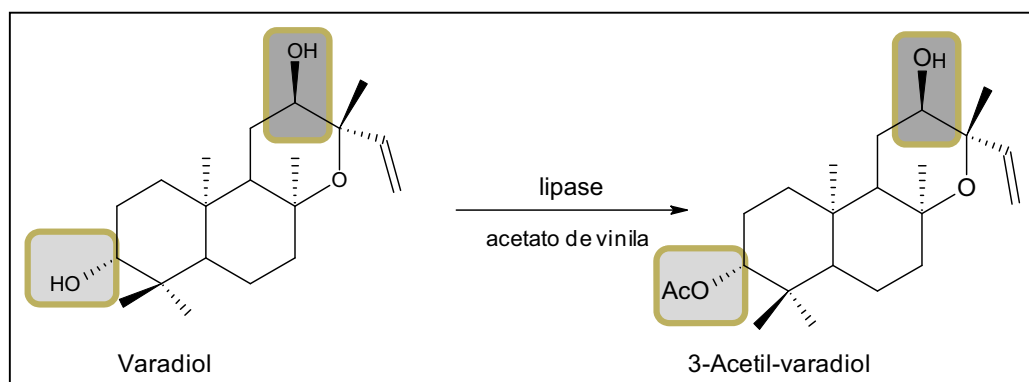
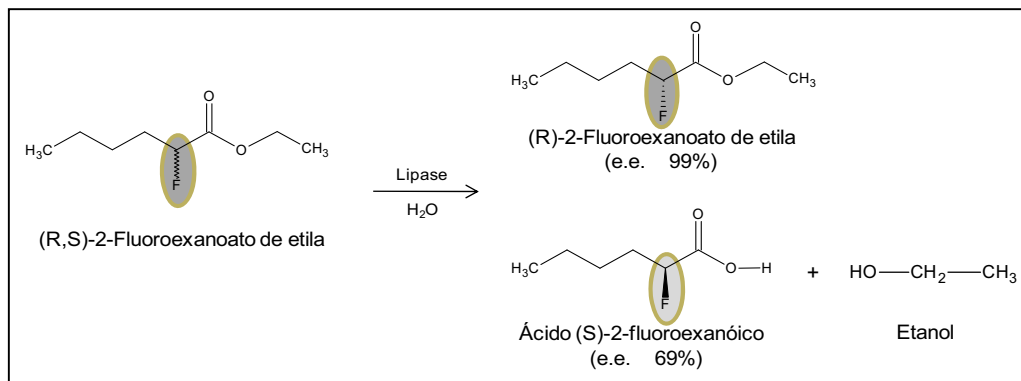


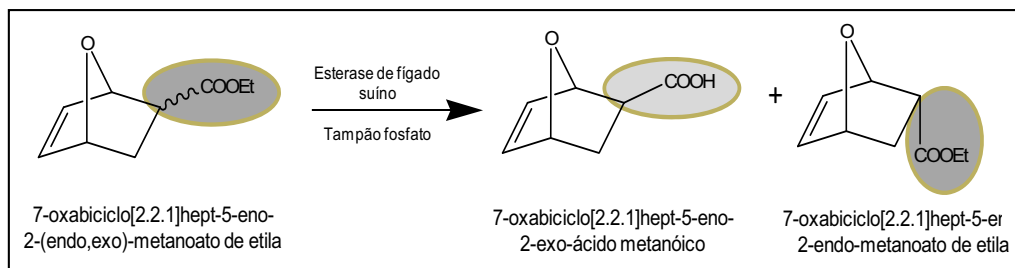
Figura 3 - Exemplo de bioconversão regioseletiva (FABER, 2004).

- As bioconversões podem ser enantiosseletivas: devido à quiralidade das enzimas, os enantiômeros de uma mistura racêmica são distinguidos e reagem a diferentes taxas, de modo que um deles é transformado preferencialmente (**Figura 4**). As bioconversões enantiosseletivas são especialmente importantes, pois se apresentam como alternativa para a síntese de compostos enantiomericamente puros, os quais são amplamente necessários na indústria farmacêutica (PANKE; WUBBOLTS, 2005).



**Figura 4** - Exemplo de bioconversão enantiosseletiva. (SOLOMONS; CRAIG, 2009).

- As bioconversões podem ser diastereosseletivas: possibilitam a separação de diastereoisômeros de misturas diastereoisoméricas (**Figura 5**).



**Figura 5** - Exemplo de bioconversão diastereosseletiva (FABER, 2004).

- Adicionalmente, as bioconversões podem viabilizar reações impossíveis no tocante da química orgânica clássica: funcionalização seletiva de posições não ativadas em moléculas orgânicas, como é o caso das hidroxilações alifáticas (FABER, 2004).

As bioconversões têm sido ordenadas de acordo com diversos critérios, como por exemplo: a complexidade do substrato e o número de etapas biológicas envolvidas na transformação (RODRIGUES; SILVA, 2010); se o substrato é xenobiótico ou não (HANSON, 1995); ou ainda, de acordo com a forma física do biocatalisador empregado (MEYER; LERESCHE, 2006).

Utilizando os dois primeiros critérios, Faber (2004) define como fermentação a transformação de fontes de carbono simples (como carboidratos), suplementadas por uma mistura de sais, em produtos mais complexos, por meio de diversas etapas bioquímicas utilizando-se células em crescimento. Esse pesquisador, ainda define como “enzimação” a transformação de um substrato orgânico, com estrutura relativamente complexa, em um produto desejado por meio de uma ou poucas etapas bioquímicas, utilizando-se células em repouso.

Fazendo uso do terceiro critério, Hanson (1995) define como biotransformação xenobiótica o processo em que o composto transformado é totalmente estranho ao agente biológico, ou seja, não é encontrado no ambiente natural desse agente. O pesquisador também reporta outro tipo de biotransformação, a biossinteticamente direcionada, na qual o composto transformado se assemelha a algum intermediário natural biossintético do agente biológico.

O termo biotransformação é usado pelos pesquisadores Meyer e Leresche (2006), assim como nesse trabalho, no sentido de conversão de um composto por meio do maquinário enzimático presente em células íntegras. Esses pesquisadores utilizam o termo biocatálise, por sua vez, como sendo a transformação de um composto utilizando-se (necessariamente) enzimas isoladas.

De fato, ainda não há um consenso em relação às terminologias apresentadas acima, de modo que algumas vezes o termo biocatálise é utilizado para expressar uma área multidisciplinar (CONTI; RODRIGUES; MORAN, 2001) e o termo biotransformação é reportado com o sentido de reação mediada tanto por organismos vivos, quanto por seus extratos enzimáticos isolados (IUPAC, 1997; MARÓSTICA JUNIOR; PASTORE, 2007; STEPHENSON et al., 2006).

Em muitas bioconversões relatadas na literatura, os biocatalisadores utilizados têm origem microbiana: micro-organismos ou seus sistemas enzimáticos isolados. Cada uma das possibilidades apresenta vantagens e desvantagens: sistemas enzimáticos isolados são comercialmente disponíveis e alguns são relativamente fáceis de serem obtidos. No entanto, alguns desses sistemas isolados exigem a presença de co-fatores e a necessária regeneração desse material pode ser uma complicação. Organismos inteiros, por sua vez, não requerem uso de co-fatores e de maneira geral são mais baratos que os sistemas enzimáticos isolados. Por outro lado, as etapas de crescimento e manutenção desses organismos exigem árduo trabalho manual (COLLADO; ALEU, 2001; FABER, 2004).

## 1.2. Fungos: fonte rica de moléculas bioativas e enzimas

Os fungos são organismos uni e pluricelulares que, devido às condições relativamente simples requeridas para o crescimento, são encontrados em diferentes ecossistemas, tais como água, solo, ar, animais e plantas, desde que haja matéria orgânica disponível (HAWKSWORTH, 2001). São organismos heterotróficos, isto é, não possuem clorofila e, portanto, necessitam de material orgânico para se desenvolverem, sendo sua nutrição feita por absorção de nutrientes obtidos pela ação de exoenzimas (produzidas por eles) a partir de compostos orgânicos presentes no ambiente.

Os fungos comumente prosperam em ambientes competitivos, mantendo relações simbióticas (mutualismo ou comensalismo), tróficas (predação e parasitismo) e de competição, por território e alimento, com outros organismos do ecossistema (AZEVEDO, 1998). São denominados, segundo seu habitat ou hospedeiro, como coprófilos, de água doce, marinhos, termofílicos, epifíticos e endófitos, entre outros.

Com relação à ocorrência e biodiversidade constituem o segundo maior grupo de espécies sobre a Terra, perdendo apenas para os insetos. Estimativas sugerem que há aproximadamente 1,5 milhão de espécies diferentes de fungos, sendo que menos de 5% foram descritas (HAWKSWORTH, 2001).

Entre as propriedades dos fungos é importante ressaltar a grande capacidade de produzir moléculas bioativas, muitas das quais apresentam aplicação terapêutica. Em 1994, dos vinte medicamentos mais vendidos, representando um mercado de aproximadamente US\$ 6,7 bilhões, seis foram obtidos *in natura* ou por transformações químicas de metabólitos provenientes de fungos (CZARNIK, 1996).

Além da propriedade de produzirem moléculas bioativas, os fungos se apresentam como uma das fontes mais ricas e convenientes de enzimas (FABER, 2004), as quais são cada vez mais utilizadas em processos biocatalíticos industriais (DOUBLE; KRUTHIVENTI; GAIKAR, 2004).

### **1.3. Fungos endófitos: biocatalisadores praticamente inexplorados**

A exemplo do que ocorre com as terminologias biocatálise e biotransformação, ainda não há um consenso em relação ao termo fungo endófito. Desde os primeiros relatos, vários pesquisadores têm definido esse termo em diferentes caminhos, de acordo com as particularidades das áreas de estudos (STROBEL; DAISY, 2003).

Às vezes o termo fungo endófito é usado para definir fungos que vivem no interior das espécies vegetais (SILVA, 2009), designando apenas o habitat do qual o micro-organismo foi isolado. Em outros casos, como no presente trabalho, o termo fungo endófito é usado para designar fungos que foram detectados (isolados), em um momento particular, no (do) interior dos tecidos de uma espécie vegetal aparentemente saudável (SCHULZ; BOYLE, 2005).

Os fungos endófitos vivem sistematicamente em espaços intercelulares das plantas, habitando de modo geral, suas partes aéreas como folhas e caules, podendo também estar presentes nas raízes. Com a evolução das espécies, estes micro-organismos se especializaram em adentrar espaços celulares dos tecidos vegetais (ANDREWS; HIRANO, 1991) através das raízes do hospedeiro e aberturas naturais como estômatos, e feridas causadas por choques mecânicos e por insetos. Uma vez instalado, o endófito pode habitar a planta por toda sua vida, sendo transmitido, em alguns casos, para futuras gerações através da semente do hospedeiro (AZEVEDO, 1998; SILVA, 2005).

Embora os fungos endófitos sejam descritos desde 1904 (STROBEL et al., 2004), só receberam maior atenção a partir de 1970, quando foi verificado que haviam relações ecológicas entre esses micro-organismos e as espécies vegetais hospedeiras (AZEVEDO, 1998).

Com o desenvolvimento dos estudos, hoje se sabe que as relações ecológicas entre fungos endófitos e os vegetais hospedeiros podem ser de simbiose e de comensalismo. No primeiro caso, os dois organismos se beneficiam: o vegetal além de proteger o fungo, também o fornece substâncias que são usadas no seu metabolismo; o fungo em contra partida, produz ou induz a produção de metabólitos que protegem a planta do ataque de insetos ou micro-organismos fitopatógenos. Já na relação de comensalismo, um dos organismos, o fungo, se beneficia por ser protegido fisicamente e nutrido pela

espécie vegetal, enquanto que esta não é beneficiada, nem prejudicada pelo fungo (GUNATILAKA, 2006).

Os fungos endófitos apresentam produção metabólica rica (GUNATILAKA, 2006), sendo até 73% maior que a observada para outros fungos filamentosos (DREYFUSS; CHAPELA, 1994; CAFÊU, 2007). Os produtos naturais isolados pertencem a inúmeras classes de substâncias e têm potencial de aplicação na medicina, agricultura e na indústria em geral (STROBEL et al., 2004).

Nos anos 90 do século passado, estudos realizados por Stierle, Strobel, Stierle (1993) aumentaram o interesse biotecnológico pelos fungos endófitos, pois ficou evidenciado que a espécie *Taxomyces andreanae* é capaz de produzir um complexo diterpenóide, o taxol, que é um agente antitumoral de alto valor no mercado internacional.

Devido essa capacidade de produzir inúmeros metabólitos secundários e o fato de muitos destes apresentarem aplicação terapêutica, uma parte expressiva dos artigos sobre fungos endófitos têm como objetivo o isolamento, identificação e a avaliação da bioatividade dos seus metabólitos.

A diversidade metabólica dos fungos endófitos indica que esses micro-organismos apresentam rico sistema enzimático e, portanto, são biocatalisadores em potencial. Nesse contexto, é crescente, mas ainda pequeno, o número de publicações que reportam estudos biocatalíticos com fungos endófitos, como por exemplo, biotransformação (BORGES et al., 2007; PEDRINI et al., 2009) e biodegradação (DAI et al., 2010; PHILLIPS et al., 2008) de compostos orgânicos.

As biotransformações e biodegradações catalisadas por fungos endófitos são reportadas na literatura com interesse nas áreas farmacêutica, alimentícia, agroquímica e ambiental, entre outras. Algumas classes de substâncias tais como terpenos, flavonoides, alcaloides, esteroides e polihidrocarbonetos aromáticos são utilizados como substratos.

Revisão bibliográfica nas bases de dados SciFinder Scholar e Web of Science apontou apenas um número aproximado de cinquenta espécies (32 gêneros) de fungos endófitos sendo aplicadas em processos de biotransformação ou biodegradação. Dentre estas, 10 são do gênero *Fusarium*, 4 *Acremonium*, 3 *Phomopsis*, sendo o restante pertencente a uma série de

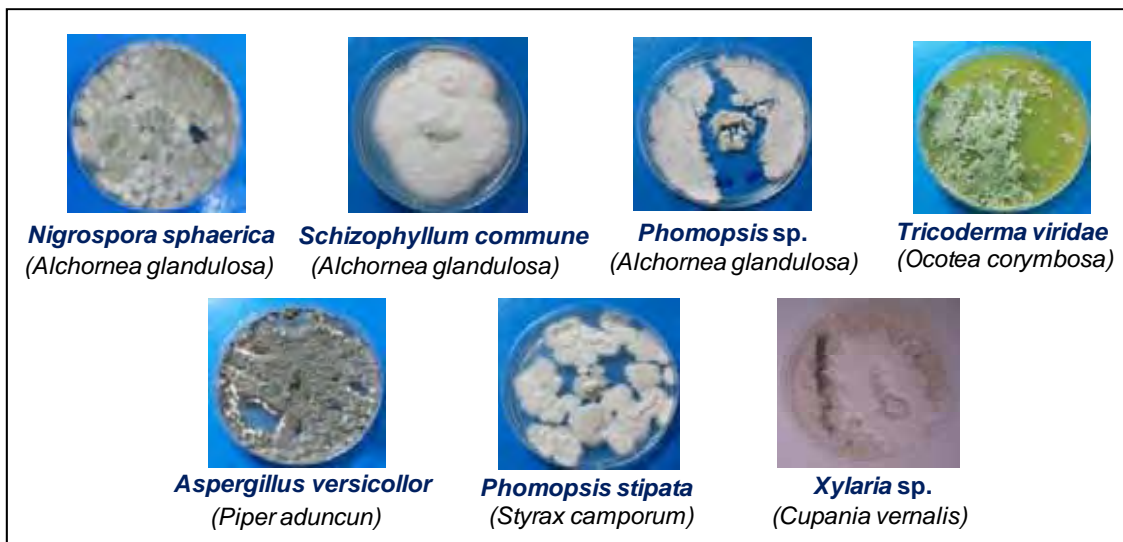
outros gêneros (AGUSTA, et al., 2005; BACON, et al., 2001; BORGES et al., 2007, 2008; DAI et al., 2010; GLENN et al., 2003; MIYAZAWA; HASHIMOTO, 2001; OLIVEIRA; STRAPASSON, 2000; PARSHIKOV et al., 1999; PEDRINI et al., 2009; PHILLIPS et al., 2008; PINEDO-RIVILLA et al., 2009; SHIBUIA et al., 2003; WERNER et al., 1997; YUE; BACON; RICHARDSON, 1998; ZHANG et al., 1998; ZIKMUNDOVÁ et al., 2002).

As espécies vegetais a partir das quais estes endófitos foram isolados são: *Tithonia diversifolia*, *Viguiera robusta*, *Viguiera arenaria*, *Camellia sinensis*, *Zea mays*, *Aphelandra tetragona*, *Taxus yunnanensis*, *Casearia sylvestris*, *Euphorbia pekinensis*, *Euphorbia helioscopia*, *Cinchona pubescens*, *Bischofia polycarpam* e *Sapium sebiferum*, sendo poucas delas são endêmicas de biomas brasileiros.

#### **1.4. Fungos endófitos associados a espécies de biomas brasileiros**

O NuBBE (Núcleo de Bioensaios, Biossíntese e Ecofisiologia de Produtos Naturais), através da linha de pesquisa “Isolamento e determinação estrutural de substâncias bioativas de fungos endófitos associados a espécies vegetais de Cerrado e Mata Atlântica”, está há mais de oito anos trabalhando no isolamento, cultivo e avaliação química e biológica de fungos endófitos de 2 importantes biomas brasileiros, visando a busca de metabólitos com atividades biológicas diversas (ARAUJO et al., 2008; CARVALHO et al., 2010; OLIVEIRA et al., 2009).

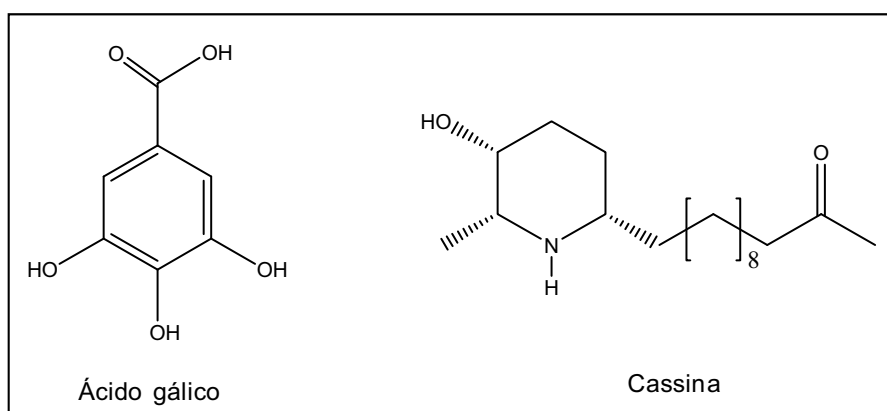
Mais recentemente, esses endófitos têm sido avaliados quanto ao seu potencial biocatalítico em parcerias com outros pesquisadores (PINEDO-RIVILLA et al., 2009; SOUZA, 2008). Visando dar continuidade aos estudos biocatalíticos com esse nicho de micro-organismos, sete espécies (*Nigrospora sphaerica*, *Schizophyllum commune*, *Phomopsis* sp., *Trichoderma viridae*, *Aspergillus versicolor*, *Xylaria* sp. e *Phomopsis stipata*), isoladas de vegetais do bioma Cerrado (*Alchornea glandulosa*, *Ocotea corymbosa*, *Piper aduncun*, *Styrax camporum* e *Cupania vernalis*) (**Figura 6**), foram selecionadas para terem seu potencial biocatalítico avaliado no presente trabalho.



**Figura 6** - Fungos endófitos selecionados para o estudo biocatalítico e suas respectivas espécies vegetais hospedeiras.

Essas espécies foram selecionadas porque já haviam sido identificadas ou estavam em processo de identificação, e por terem apresentado pelo menos uma atividade enzimática considerada alta (esterase, lipase ou protease) em estudos desenvolvidos pelos pesquisadores colaboradores do NuBBE Henrique Celso Trevisan, Helen Cristina F. Lisboa e Carolina Rabal Biasetto.

Os compostos selecionados para serem empregados como substratos no estudo biocatalítico são a cassina e o ácido gálico (**Figura 7**). Esses compostos foram selecionados pelo fato do NuBBE estudar a síntese e a bioatividade de alguns de seus derivados (MORAIS et al, 2010; SILVA et al, 2010; XIMENES et al, 2010), de modo que os resultados desse trabalho de mestrado podem complementar essas pesquisas.



**Figura 7** - Estruturas dos substratos utilizados na avaliação biocatalítica dos fungos endófitos.

Adicionalmente, Calvo (2007) reportou o isolamento de ácido gálico e galato de metila da espécie vegetal *Alchornea glandulosa*, espécie que os micro-organismos *Nigrospora sphaerica*, *Schizophyllum commune* e *Phomopsis* sp., estudados no presente trabalho, foram isolados. É possível que o galato de metila, isolado da planta, tenha sido obtido a partir da esterificação do ácido gálico pelos micro-organismos que colonizam esse vegetal, e um estudo que avalie a ocorrência dessa biotransformação *in vitro* pode fornecer informações que contribuam para o entendimento das relações existentes entre os fungos endófitos *Nigrospora sphaerica*, *Schizophyllum commune* e *Phomopsis* sp. e sua espécie vegetal hospedeira *Alchornea glandulosa*.

## 2.OBJETIVO

### 2.1.Objetivo geral

Avaliar o potencial dos fungos endófitos *Nigrospora sphaerica*, *Schizophyllum commune*, *Phomopsis* sp., *Tricoderma viridae*, *Aspergillus versicolor*, *Xylaria* sp. e *Phomopsis stipata* em biotransformar ou biodegradar os substratos orgânicos cassina e ácido gálico.

### 2.2.Objetivos específicos

- 1) Avaliar a tolerância dos micro-organismos aos substratos ácido gálico e cassina, visando selecionar a concentração em que esses substratos serão usados na etapa de biotransformação/ biodegradação;
- 2) Avaliar a capacidade dos micro-organismos em biotransformar ou biodegradar os substratos ácido gálico e cassina.

## 3. PARTE EXPERIMENTAL

### 3.1. Materiais, equipamentos e técnicas utilizadas

#### *Solventes*

- AcOEt, MeOH, EtOH (Merck) e BuOH (TEDIA).

#### *Substratos usados na avaliação biocatalítica*

- Ácido gálico pureza 97,5% (Sigma-Aldrich®).
- Cassina isolada das flores da espécie vegetal *Senna spetabilis* (Leguminosae, Caesalpinioideae) pela Dra. Luciana de Ávila Santos.

#### *Meios para cultivo dos micro-organismos*

- BDA: batata, dextrose e ágar (Sigma®). Concentração 39 g (4 g de fécula de batata, 20 g de dextrose e 5 g de ágar) por litro de água.
- MBD: batata e dextrose (Difco®). Concentração 24 g (4 g de fécula de batata e 20 g de dextrose) por litro de água.

#### *Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)*

As análises por CLAE foram realizadas no modo analítico e em gradiente exploratório, em cromatógrafo Varian ProStar acoplado ao detector ProStar 330 de arranjos de diodos (DAD) UV-Vis. Foi utilizada coluna analítica Phenomenex tipo Luna com sílica tipo octadesil silano (C-18) de dimensões 25 cm x 4,6 mm x 5 µm.

#### *Cromatografia gasosa (CG)*

As análises por CG foram realizadas em cromatógrafo Varian, modelo 3300, equipado com detector de ionização de chama (FID), injetor split/splitless (modelo 1078) e integrador Varian modelo 4290. Foram utilizadas duas colunas: 1) SPB-5 (5% fenil – 95% dimetilpolisiloxano) de dimensões 30 m x 0,25 mm x 0,25 µm, da marca Supelco®; 2) coluna ZB-5 (5% fenil – 95% dimetilpolisiloxano) de dimensões 30 m x 0,25 mm x 0,25 µm, da marca Phenomenex-Zebron.

### 3.2. Coleta e identificação das espécies vegetais

As espécies vegetais *Alchornea glandulosa*, *Cupania vernalis* e *Styrax camporum* foram coletadas pela professora Dra. Angela Regina Araujo em 11/06/2001, na Estação Ecológica Experimental da cidade de Mogi-Guaçu, região que compreende o bioma Cerrado no estado de São Paulo. As espécies *Piper aduncum* e *Ocotea corymbosa* foram coletadas pelo Dr. Geraldo H. Silva em 15/05/2001 e 13/06/2001, no Instituto de Química de Araraquara-SP e no Horto Municipal de Araraquara, respectivamente.

A identificação desses vegetais foi realizada pela Dra. Inês Cordeiro, do Instituto de Botânica de São Paulo. As exsicatas estão depositadas no herbário do Jardim Botânico de São Paulo.

### 3.3. Isolamento das linhagens fúngicas

O isolamento dos endófitos foi realizado pelo Dr. Geraldo Humberto Silva (SILVA, 2005). Folhas saudáveis e jovens das espécies vegetais foram lavadas com água e sabão, e em seguida esterilizadas por imersão em NaClO 1% (5 minutos), em etanol 70% (1 minuto) e posteriormente em água estéril (10 minutos). Após o processo de esterilização, as folhas foram cortadas em pedaços de aproximadamente 1 cm<sup>2</sup> e inoculadas em placas de Petri contendo meio de cultura BDA e antibiótico sulfato de gentamicina (100 µg/mL), para evitar o crescimento bacteriano.

Repiques sucessivos em outras placas de Petri contendo BDA resultaram na obtenção de 95 linhagens fúngicas puras, as quais se encontram preservadas em frascos com água estéril a temperatura ambiente (metodologia Castelani). Dos 95 fungos isolados, sete foram selecionados (*Nigrospora sphaerica*, *Schizophyllum commune*, *Phomopsis* sp., *Trichoderma viridae*, *Aspergillus versicolor*, *Xylaria* sp. e *Phomopsis stipata*) para terem suas potencialidades biocatalíticas avaliadas.

### 3.4. Identificação das linhagens fúngicas

As linhagens fúngicas *Nigrospora sphaerica* e *Phomopsis* sp. foram identificadas pelo Prof. Dr. Marcos Paz Saraiva Câmara, da Universidade Federal Rural de Pernambuco. A identificação foi realizada com base em análises comparativas das características morfológicas dos micro-organismos com dados reportados na literatura.

As linhagens *Xylaria* sp., *Aspergillus versicolor*, *Trichoderma viridae* e *Phomopsis* sp. também foram identificadas com base nas suas características morfológicas, pelo Prof. Dr. Ludwig H. Pfenning da Universidade Federal de Lavras.

A linhagem *Schizophyllum commune* foi identificada por biologia molecular na Fundação André Toselho, em Campinas-SP.

### 3.5. Avaliação da tolerância dos micro-organismos ao ác. gálico e cassina

Os 7 micro-organismos, inicialmente preservados em água estéril, foram inoculados em placas de Petri contendo meio de cultura sólido BDA e incubados por 7 dias a 28 °C para reativação das culturas microbianas.

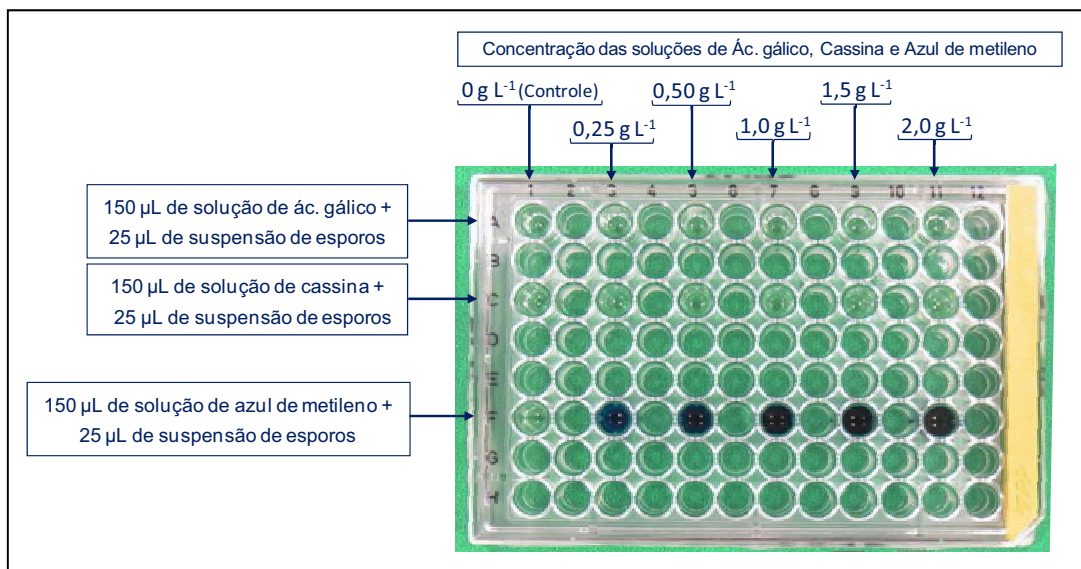
Em seguida, adicionou-se 10 mL de água esterilizada a cada placa de Petri e raspou-se o micélio cuidadosamente com auxílio de uma alça de Drigalsky, obtendo-se as suspensões das estruturas formadoras de colônia dos micro-organismos.

As suspensões obtidas foram analisadas em microscópio óptico para verificar a presença de esporos. Nos casos em que estas estruturas foram visualizadas (fungos *A. versicolor* e *Xylaria* sp.), estas foram quantificadas utilizando-se uma câmara de Neubauer e o resultado foi expresso em unidades formadoras de colônia (UFC) por mL da suspensão.

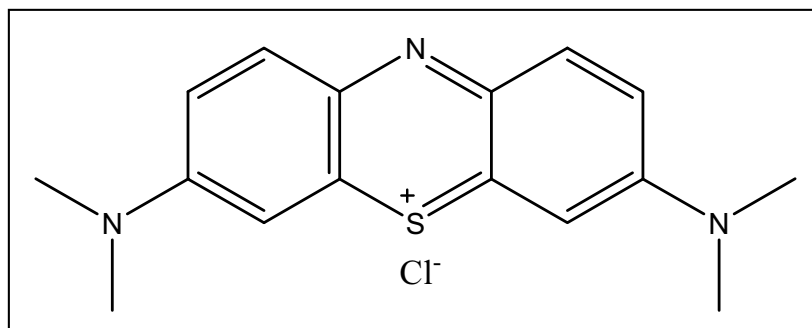
Posteriormente, avaliou-se a capacidade dos micro-organismos se desenvolverem, a partir das suas respectivas suspensões de estruturas formadoras de colônia, na presença dos substratos ácido gálico e cassina em diferentes concentrações. Esse estudo foi realizado em placas de 96 poços (uma placa para cada micro-organismo). Foram adicionados 150 µL de solução do ácido gálico e da cassina (em meio líquido MBD) aos poços ímpares das linhas A e C, respectivamente, nas concentrações 0,25; 0,50; 1,0; 1,5 e

2,0 g L<sup>-1</sup> (**Figura 8**). Em seguida, 25 µL da suspensão de unidades formadoras de colônia dos micro-organismos (3x10<sup>6</sup> UFC/mL, no caso dos micro-organismos *A. versicolor* e *Xylaria* sp.; a concentração das suspensões dos 5 micro-organismos que não esporularam não foi determinada) foram adicionados aos poços e acompanhou-se o desenvolvimento dos endófitos fotografando-se as placas a cada 24h, por 15 dias.

Visando fornecer informações preliminares para futuros estudos do nosso grupo de pesquisa, na área de biodegradação de poluentes ambientais por fungos endófitos, avaliou-se também a capacidade dos micro-organismos se desenvolverem na presença do corante azul de metileno (linha F, **Figura 8**) (**Figura 9**).



**Figura 8** - Montagem da placa de 96 poços na avaliação da tolerância dos micro-organismos ao ácido gálico, à cassina e ao corante azul de metileno.



**Figura 9** - Estrutura do corante azul de metileno.

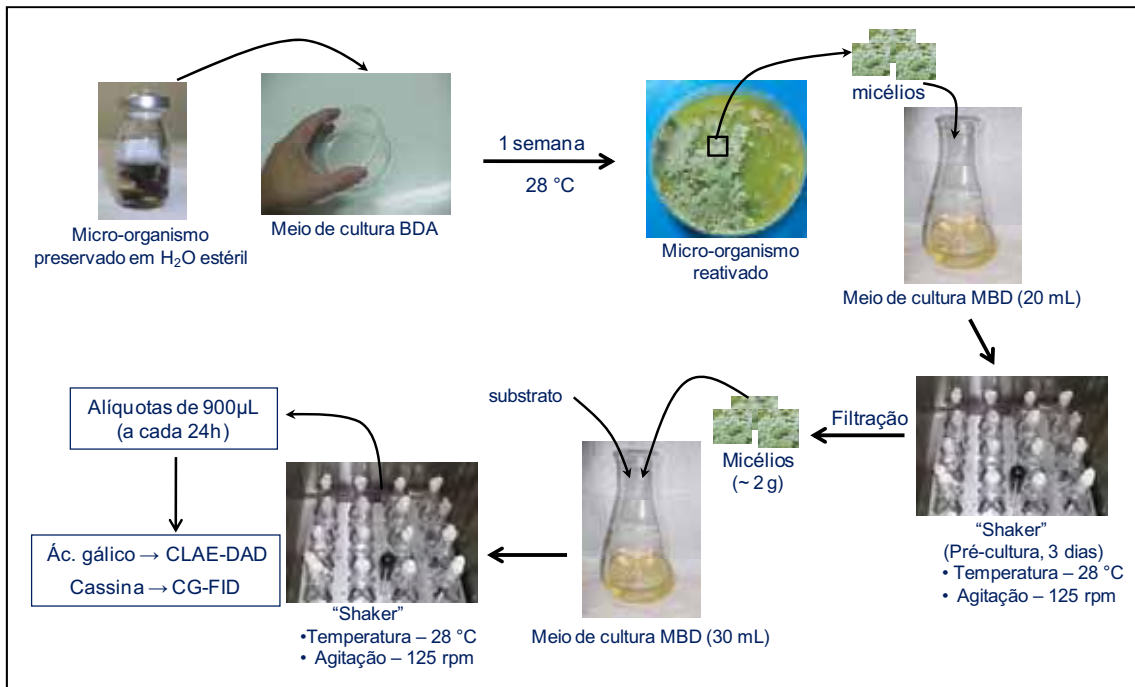
### 3.6. Procedimento geral para as reações de biotransformação/ biodegradação

Os micro-organismos, inicialmente preservados em água estéril, foram cultivados em placas de Petri contendo meio BDA por 7 dias a 28 °C.

O estudo biocatalítico foi realizado em duas etapas (BORGES et al, 2007). Na primeira, fragmentos de BDA (de aproximadamente 1 cm<sup>2</sup>) contendo o micélio fúngico foram inoculados em frascos de Erlenmeyers-125 mL com 20 mL de meio líquido MBD, os quais foram mantidos em incubadora rotatória a 28 °C e 125 rpm por 3 dias (pré-cultura).

Na segunda etapa, os micélios fúngicos foram assepticamente separados do meio de cultura por filtração a pressão reduzida e transferidos para outros frascos Erlenmeyers-125 mL (aproximadamente 2 gramas de massa úmida em cada frasco) contendo 30 mL de MBD, aos quais os substratos foram adicionados nas concentrações 1 g L<sup>-1</sup> (ácido gálico) e 0,5 g L<sup>-1</sup> (cassina). Estes frascos foram incubados a 28 °C e 125 rpm e alíquotas de 900 µL dos meios reacionais foram retiradas a cada 24h (por no máximo 14 dias) para avaliação da biotransformação dos substratos. Essa metodologia foi realizada em triplicata e é ilustrada na **Figura 10**.

Frascos contendo apenas o meio de cultura (controle do meio de cultura), meio de cultura e o substrato (controle do substrato) e o meio de cultura e o fungo (controle microbiano) foram incubados sob as mesmas condições, e suas alíquotas foram utilizadas como controles no estudo biocatalítico.



**Figura 10** - Ilustração do procedimento geral utilizado para as reações de biotransformação/biodegradação.

### 3.7. Avaliação da biotransformação ou biodegradação dos substratos

As alíquotas foram centrifugadas a 9000 rpm por 1 min, separando as fases líquidas das suspensões de micélio.

As fases líquidas onde o substrato era a cassina foram extraídas 3 vezes com BuOH (300 µL), e os extratos orgânicos obtidos foram analisados por CG. No estudo com o ácido gálico, as fases aquosas foram analisadas diretamente por CLAE, sem serem partionadas com solvente orgânico. Esse procedimento foi realizado tanto para os meios reacionais das biorreações, quanto para os dos controles.

Os extratos da biotransformação da cassina foram analisados por CG-FID utilizando as colunas SPB-5 (Supelco) e ZB-5 (Phenomenex) com rampa de aquecimento 100 a 290 °C (10 °C min<sup>-1</sup>), injetor operando a 220 °C e detector a 250 °C. O volume de injeção da amostra (em butanol) foi 1 µL, "split" igual a 5 e fluxo de 1 mL min<sup>-1</sup>.

Os extratos da biotransformação do ácido gálico foram analisados por CLAE-DAD em gradiente exploratório, utilizando como fase estacionária coluna Phenomenex de fase reversa, e eluição em gradiente de H<sub>2</sub>O/MeOH (95:05

V/V a 0:100 V/V em 40 min, permanecendo nesta condição por mais 10 min) suplementado com ácido acético 0,1% (V/V) e fluxo de  $1\text{ mL min}^{-1}$ .

Após constatar que o substrato havia sido completamente metabolizado (seu sinal deixou de ser observado no cromatograma), a incubação foi interrompida e o pH dos meios reacionais medido. Posteriormente, os meios reacionais foram filtrados e a fase aquosa separada do micélio, o qual teve sua massa determinada e em seguida foi extraído conforme metodologia apresentada a seguir.

### **3.8. Extração dos compostos adsorvidos ao micélio**

Tanto os micélios das biorreações (meio de cultura + fungo + substrato) quanto os micélios dos controles microbianos (sem adição do substrato) foram submetidos à extração. A metodologia utilizada foi reportada por Ortega et al. (2011).

Em béqueres de 80 mL foram adicionados os micélios e 10 mL de água, e as misturas resultantes foram agitadas por 30 min. Em seguida, adicionou-se 10 mL de AcOEt (no caso do substrato ácido gálico) ou BuOH (no caso da cassina) e agitou-se por mais 30 min.

Os micélios foram separados da fase líquida por filtração à pressão reduzida e armazenados a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ . A fase líquida foi centrifugada por 5 min a 4000 rpm, de modo que a fase orgânica foi recolhida e a aquosa extraída três vezes com o respectivo solvente orgânico. Realizou-se a junção das fases orgânicas e a evaporação do solvente, obtendo-se os extratos brutos. Os extratos foram analisados por cromatografia líquida ou gasosa (na concentração padrão  $1\text{ g L}^{-1}$ ), utilizando-se as condições cromatográficas descritas no item 3.7.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. Avaliação da tolerância dos micro-organismos aos substratos

A avaliação da tolerância dos micro-organismos aos substratos foi importante para selecionar a concentração em que o ácido gálico e a cassina foram empregados na etapa de biotransformação/biodegradação.

Também se avaliou a tolerância dos endófitos ao corante azul de metileno, visando fornecer informações preliminares para futuros estudos do nosso grupo de pesquisa na área de biodegradação de poluentes ambientais por fungos endófitos. Os corantes são um sério problema nos efluentes da indústria têxtil e há relatos na literatura de que fungos filamentosos são capazes de degradar e descolorir esses materiais (BALAN; MONTEIRO, 2001; KAMIDA et al, 2005; MACHADO et al, 2006).

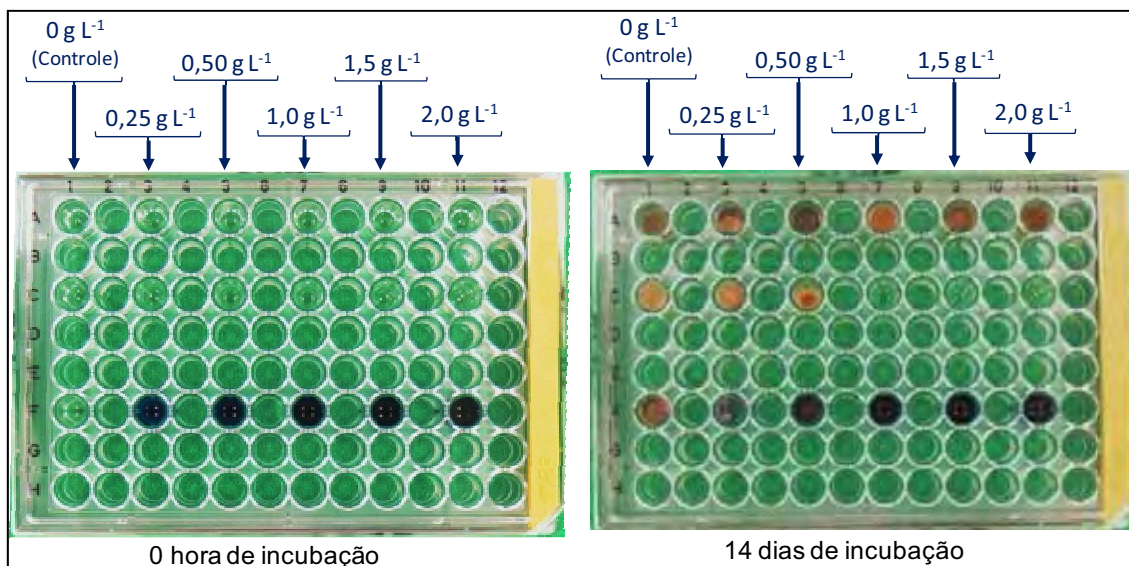
#### 4.1.1. Micro-organismo *Phomopsis stipata*

O micro-organismo *Phomopsis stipata* desenvolveu-se normalmente em todas as concentrações do substrato ácido gálico. Após 14 dias de incubação, verificou-se a presença do micélio fúngico tanto no poço em que não havia ácido gálico (poço controle: A1), quanto nos poços em que esse substrato estava presente (**Figura 11**).

Na presença do substrato cassina, o micro-organismo se desenvolveu apenas nas concentrações 0,25 e 0,50 g L<sup>-1</sup> (**Figura 11**). Esse resultado indica que a cassina, nas demais concentrações, inibe o crescimento do micro-organismo e, portanto, a sua concentração na etapa de biotransformação/biodegradação deve ser igual ou inferior a 0,50 g L<sup>-1</sup>.

Em relação ao azul de metileno, *P. stipata* cresceu nas concentrações 0,25 e 0,50 g L<sup>-1</sup>, descolorindo a solução na concentração menor (**Figura 11**). O volume e o aspecto do micélio fúngico são diferentes na presença do corante, evidenciando que esta substância alterou o desenvolvimento do fungo.

Os corantes presentes nos efluentes da indústria têxtil podem ocasionar danos severos ao meio ambiente, pois além de causarem efeito visual indesejável nos cursos de água, muitos são tóxicos e carcinogênicos (CHEQUER et al, 2009). O fato do endófito *P. stipata* ser capaz de descolorir o azul de metileno indica a potencialidade desse fungo endófito na degradação biológica de corantes, resultado que nos estimula a realizar estudos mais detalhados sobre o assunto no futuro.

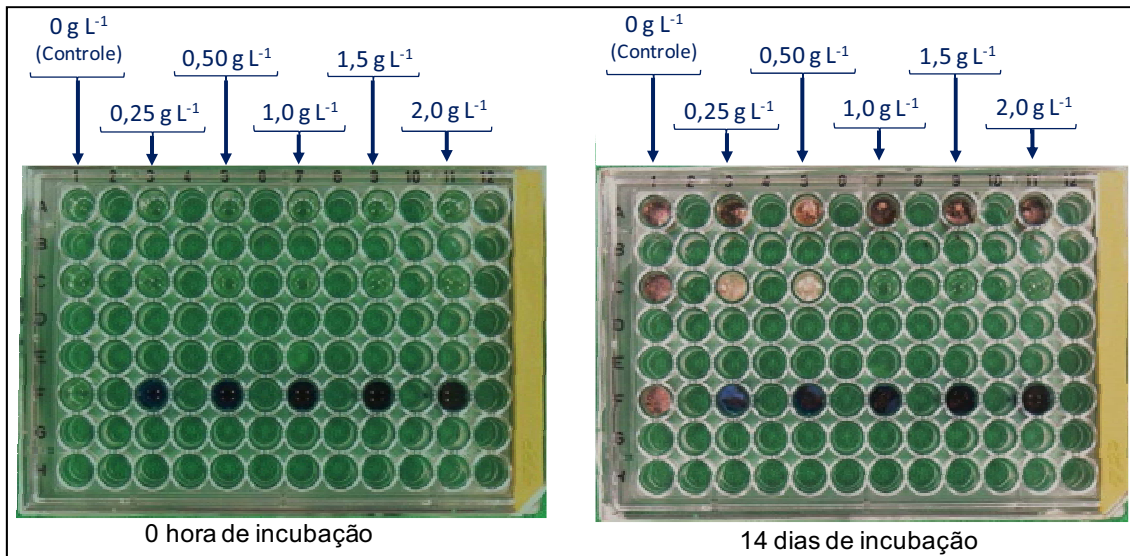


**Figura 11** - Avaliação da tolerância do micro-organismo *P. stipata* ao ác. gálico, cassina e azul de metileno (linhas A, C e F, respectivamente).

#### 4.1.2. Micro-organismo *Phomopsis* sp.

O endófito *Phomopsis* sp. apresentou tolerância ao ácido gálico, de forma que seu micélio foi observado em todas as concentrações desse substrato (**Figura 12**).

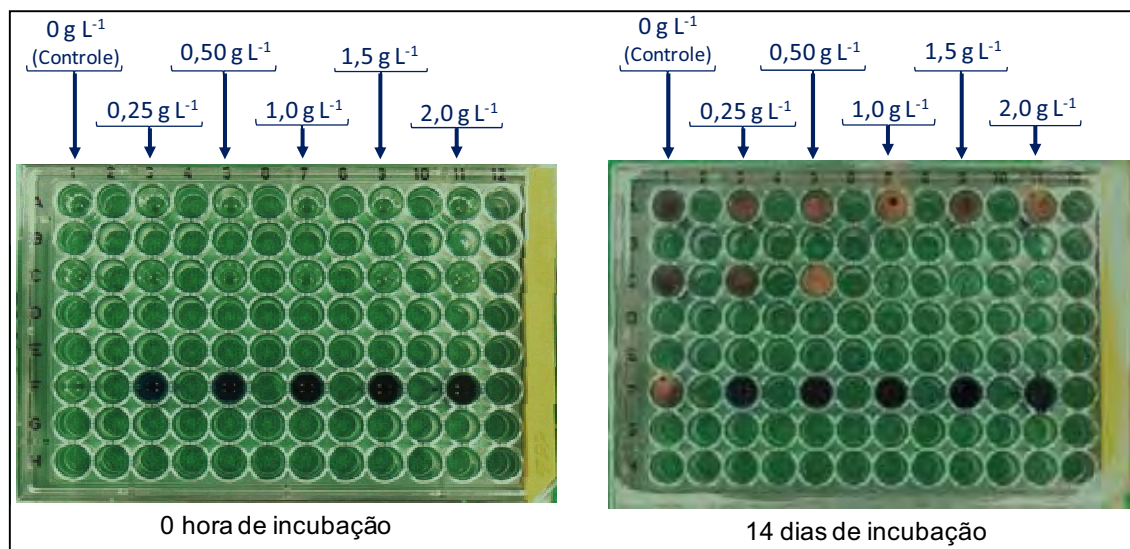
Na presença da cassina, o endófito cresceu apenas nas duas concentrações mais baixas: 0,25 e 0,50 g L<sup>-1</sup>. Quando exposto ao azul de metileno, *Phomopsis* sp. se desenvolveu nas concentrações 0,25; 0,50 e 1,0 g L<sup>-1</sup>, embora o crescimento tenha sido inferior ao observado na ausência do corante (poço F1) (**Figura 12**).



**Figura 12** - Avaliação da tolerância do micro-organismo *Phomopsis* sp. ao ác. gálico, cassina e azul de metileno (linhas A, C e F, respectivamente).

#### 4.1.3. Micro-organismo *Nigrospora sphaerica*

O micro-organismo se desenvolveu normalmente nas 5 concentrações do ácido gálico e apenas nas concentrações 0,25 e 0,50 g L<sup>-1</sup> da cassina (**Figura 13**). Não foi observado micélio fúngico nos poços que continham o corante azul de metileno, indicando que essa substância inibiu completamente o crescimento do micro-organismo.

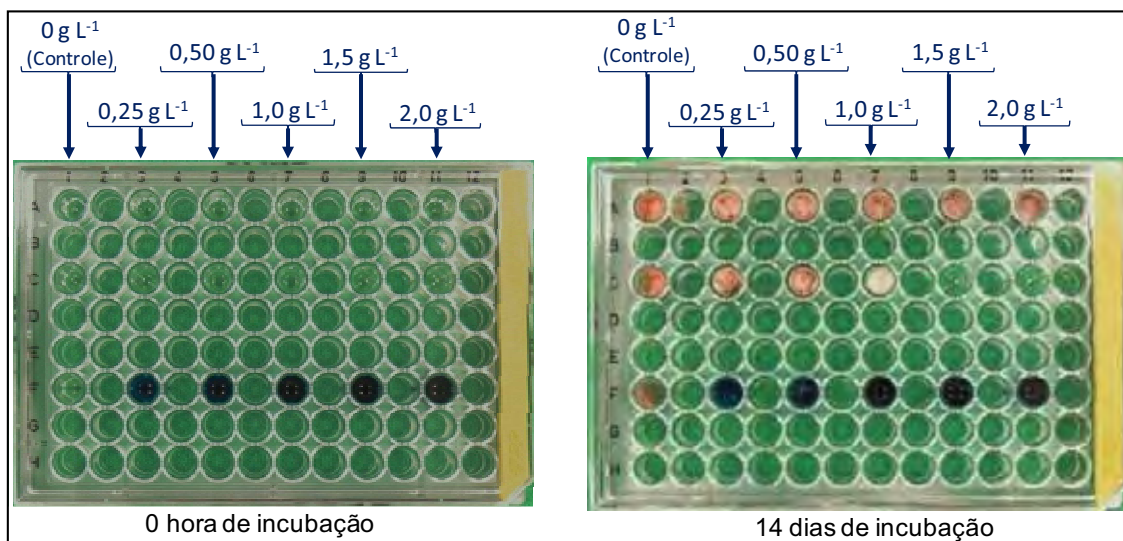


**Figura 13** - Avaliação da tolerância do micro-organismo *N. sphaerica* ao ác. gálico, cassina e azul de metileno (linhas A, C e F, respectivamente).

#### 4.1.4. Micro-organismo *Aspergillus versicolor*

O endófito *Aspergillus versicolor* foi observado em todos os poços que continham ácido gálico e nos poços cuja concentração de cassina era 0,25; 0,50 e 1,0 g L<sup>-1</sup> (**Figura 14**). Esse resultado sugere que *A. versicolor* é mais tolerante à cassina que os 3 micro-organismos anteriores, os quais se desenvolveram apenas até a concentração 0,50 g L<sup>-1</sup> desse substrato.

Na presença do corante, o endófito se desenvolveu precariamente nas concentrações 0,25 e 0,50 g L<sup>-1</sup>, apresentando poucas hifas.



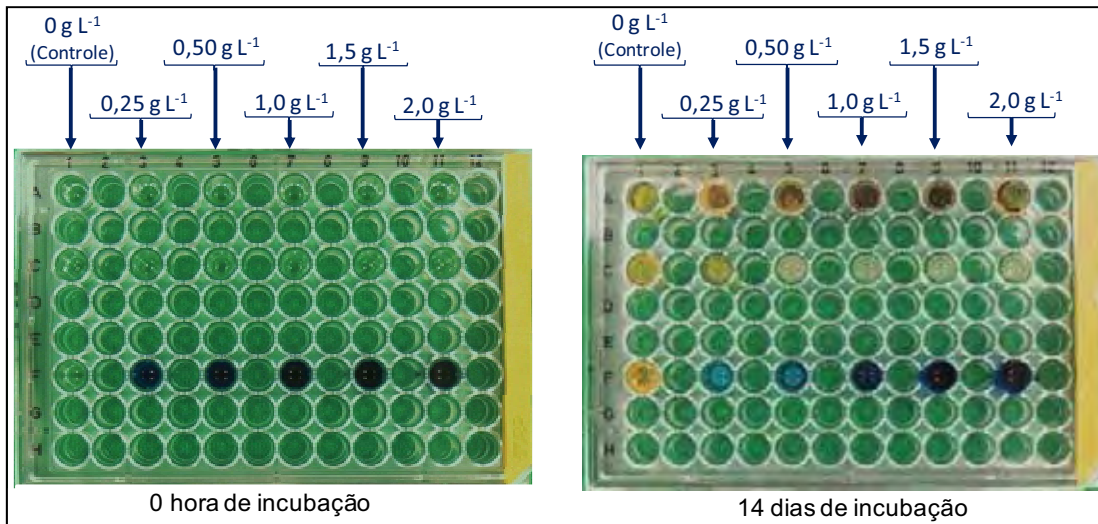
**Figura 14** - Avaliação da tolerância do micro-organismo *A. versicolor* ao ác. gálico, cassina e azul de metileno (linhas A, C e F, respectivamente).

#### 4.1.5. Micro-organismo *Tricoderma viridae*

Conforme é apresentado na **Figura 15**, *Tricoderma viridae* cresceu em todas as concentrações do ácido gálico.

Em relação à cassina, o endófito se desenvolveu normalmente quando a concentração desse substrato era 0,25 g L<sup>-1</sup>. Nas concentrações mais elevadas, o micélio aéreo de cor amarela não foi observado, indicando que o substrato, nestas concentrações, inibiu parcialmente o crescimento do fungo.

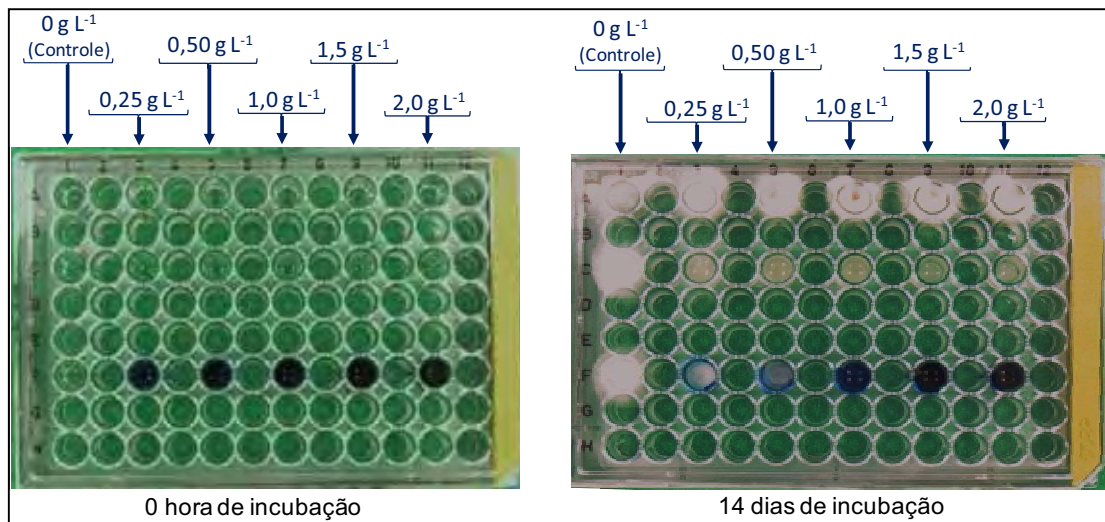
O micélio aéreo do micro-organismo também não foi observado nos poços em que a concentração do corante era 0,25 e 0,50 g L<sup>-1</sup>, contudo as soluções nessas concentrações foram parcialmente descoloridas pelo endófito.



**Figura 15** - Avaliação da tolerância do micro-organismo *T. viridae* ao ác. gálico, cassina e azul de metileno (linhas A, C e F, respectivamente).

#### 4.1.6. Micro-organismo *Xylaria* sp.

O micro-organismo *Xylaria* sp. se desenvolveu em todas as concentrações do ácido gálico e da cassina, contudo na presença deste último substrato o micélio aéreo branco não foi observado (**Figura 16**). Quando exposto ao azul de metileno, o micro-organismo cresceu nas soluções com concentrações 0,25 e 0,50 g L<sup>-1</sup>, descolorindo-as.



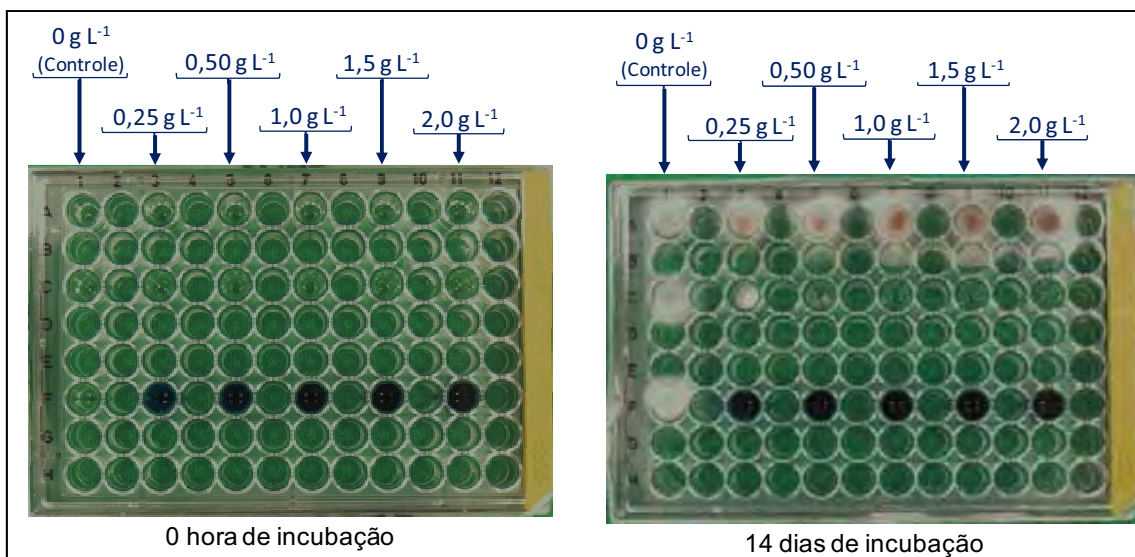
**Figura 16** - Avaliação da tolerância do micro-organismo *Xylaria* sp. ao ác. gálico, cassina e azul de metileno (linhas A, C e F, respectivamente).

#### 4.1.7. Micro-organismo *Schizophyllum commune*

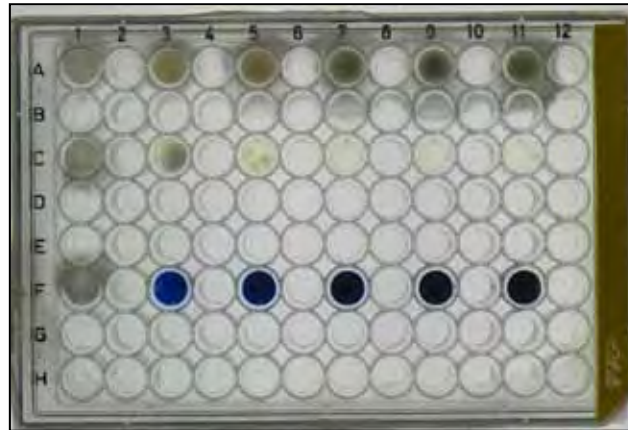
Aparentemente o ácido gálico dificultou o desenvolvimento do endófito *Schizophyllum commune*, pois, conforme a concentração desse substrato aumentou, a quantidade de micélio no interior dos poços diminuiu (**Figura 17**). Observou-se também que, com o aumento da concentração do ácido gálico, o micélio fúngico se desenvolveu nas regiões exteriores dos poços, o que possivelmente foi uma forma do micro-organismo se distanciar do substrato potencialmente tóxico (naquela concentração).

O aumento da concentração de ácido gálico ocasionou o surgimento de uma coloração castanha no interior dos poços (**Figura 17 e Figura 18**). Essa constatação, somada ao fato de que no poço em que não havia ácido gálico (poço A1) essa coloração não foi observada, sugere que a mudança de cor esteja relacionada à formação de produtos de biotransformação do ácido gálico.

O endófito *S. commune* se desenvolveu na presença da cassina nas concentrações 0,25 e 0,50 g L<sup>-1</sup>, sendo que na última concentração poucas hifas são observadas no fundo do respectivo poço (**Figura 17 e Figura 18**). Na presença do corante azul de metileno, o endófito não cresceu.



**Figura 17** - Avaliação da tolerância do micro-organismo *S. commune* ao ác. gálico, cassina e azul de metileno (linhas A, C e F, respectivamente).



**Figura 18** - Avaliação da tolerância do micro-organismo *S. commune* ao ác. gálico, cassina e azul de metileno (linhas A, C e F, respectivamente); Imagem da parte inferior da placa.

Com base nos resultados obtidos na avaliação da tolerância dos micro-organismos aos substratos, o ácido gálico e a cassina foram empregados na etapa de biotransformação/biodegradação nas concentrações 1,0 e 0,50 g L<sup>-1</sup>, respectivamente, pois, os 7 micro-organismos estudados cresceram na presença de ácido gálico na concentração de até 2,0 g L<sup>-1</sup>; e a maioria dos micro-organismos se desenvolveu satisfatoriamente quando a concentração da cassina era 0,50 g L<sup>-1</sup>.

Estudos futuros de biodegradação do azul de metileno poderão ser realizados com esse corante na concentração de até 0,50 g L<sup>-1</sup> quando os micro-organismos forem *T. viridae* e *Xylaria* sp., pois nessa concentração esses micro-organismos cresceram e descoloriram o corante; na concentração igual ou menor que 0,25 g L<sup>-1</sup> quando os endófitos forem *P. stipata* e *Phomopsis* sp., uma vez que nessa concentração estes endófitos se desenvolveram satisfatoriamente; e numa concentração menor que 0,25 g L<sup>-1</sup> quando os micro-organismos forem *N. sphaerica*, *A. versicolor* e *S. commune*, pois estes fungos não cresceram ou pouco cresceram nessa concentração.

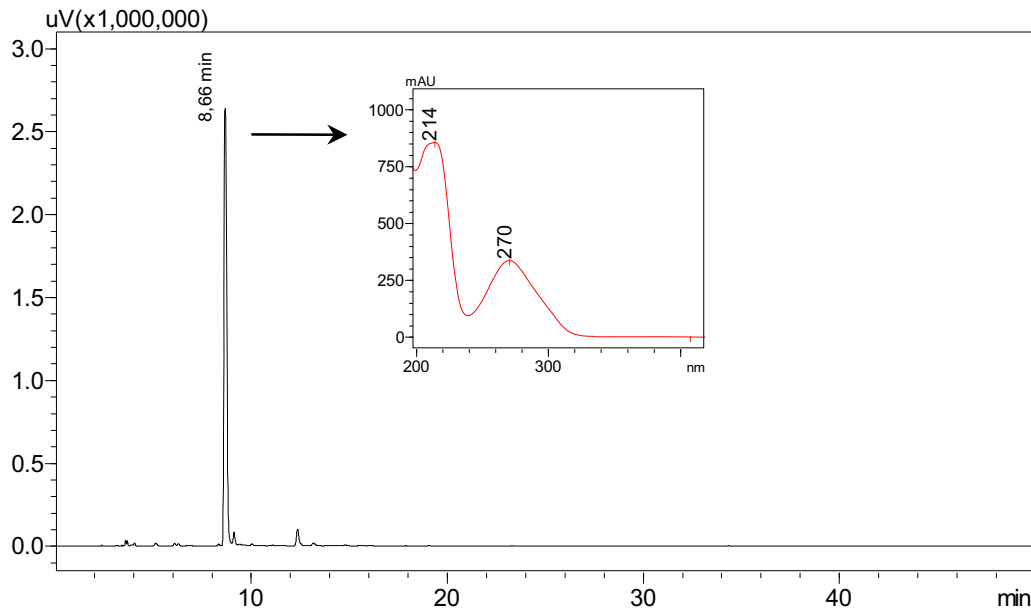
## 4.2. Avaliação do potencial biocatalítico dos fungos endófitos nas reações de biotransformação/biodegradação

### 4.2.1. Substrato ácido gálico

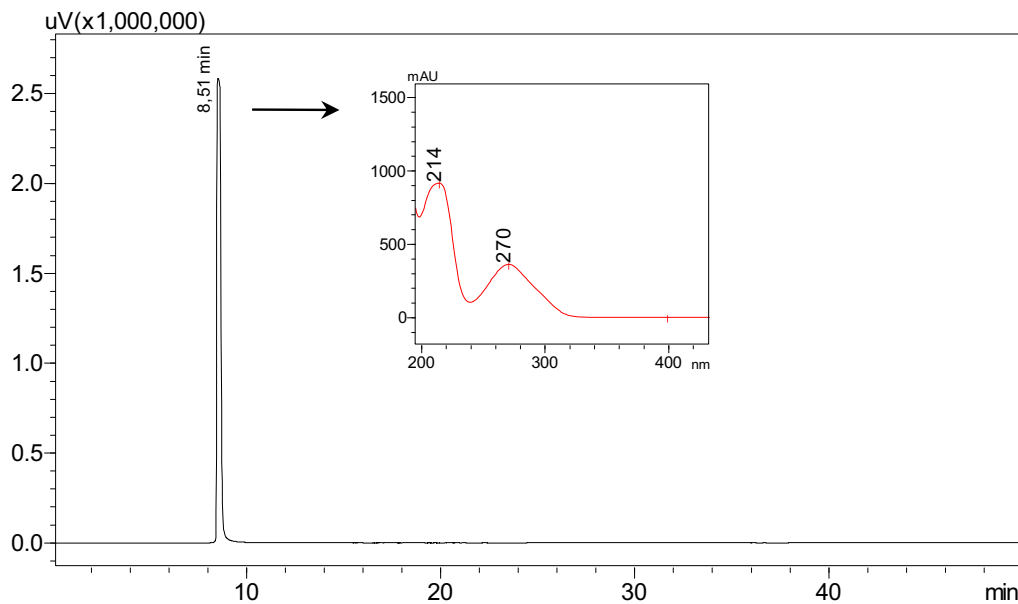
A avaliação das reações de biotransformação/biodegradação do ácido gálico pelos fungos endófitos foi realizada comparando-se os perfis cromatográficos dos extratos das biorreações com os perfis cromatográficos dos extratos dos controles. Dessa forma, pôde-se descartar a possibilidade de compostos oriundos do meio de cultura ou produzidos pelo fungo serem confundidos com produtos biotransformados.

Foi estabelecido o período de 2 semanas como tempo máximo de incubação, de modo que nos casos em que o micro-organismo não metabolizou o substrato nesse intervalo de tempo, o estudo foi interrompido e o micro-organismo considerado incapaz de biotransformar/biodegradar o substrato.

Visando avaliar a estabilidade do ácido gálico nas condições em que o estudo biocatalítico viria a ser desenvolvido, um frasco contendo apenas esse substrato e o meio de cultura MBD foi incubado durante 14 dias, e o extrato obtido foi analisado por CLAE-DAD. O cromatograma apresentou um pico intenso com tempo de retenção ( $t_R$ ) 8,66 min e duas bandas de absorção máxima no UV: 214 e 270 nm (**Figura 19**). Esses dados são muito semelhantes aos obtidos na análise do padrão do ácido gálico (**Figura 20**), evidenciando que esse substrato no estudo biocatalítico não se decompôs e conseqüentemente esteve todo o tempo disponível para ser metabolizado pelos micro-organismos.



**Figura 19** - Cromatograma obtido na avaliação da estabilidade do ác. gálico nas condições em que o estudo biocatalítico foi realizado. Coluna e condições de análise: parte experimental, item 3.7.

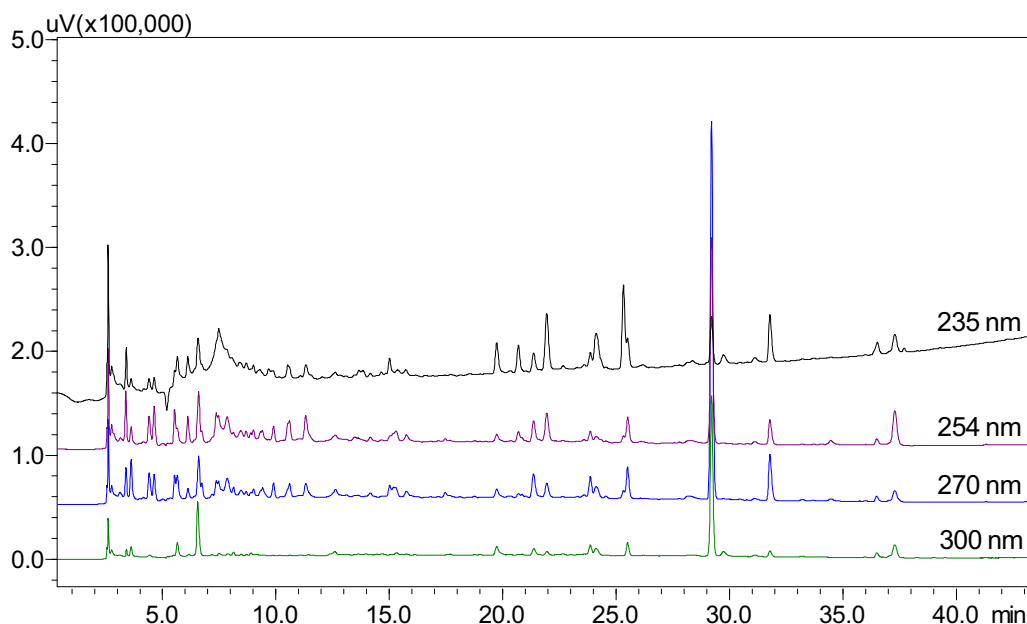


**Figura 20** - Cromatograma e espectro no UV do padrão do ác. gálico. Coluna e condições de análise: parte experimental, item 3.7.

O comprimento de onda ( $\lambda$ ) usado na avaliação da biotransformação/biodegradação do ácido gálico foi selecionado após uma varredura do extrato da biorreação (de cada um dos micro-organismos) na região de 200 a 800 nm. Selecionou-se o  $\lambda$  em que se identificou a maior quantidade de picos no cromatograma.

#### 4.2.1.1. Micro-organismo *Schizophyllum commune*

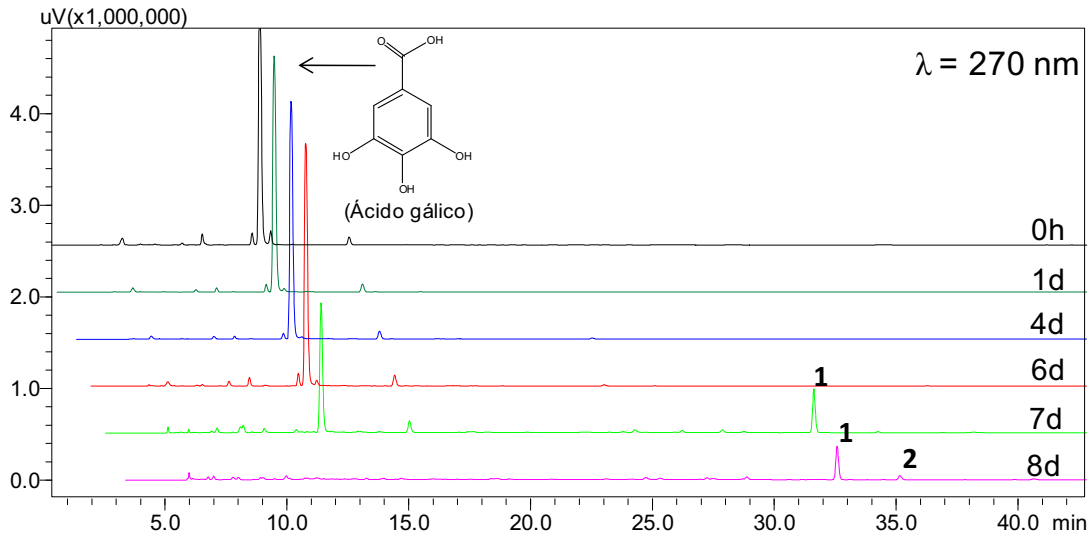
O comprimento de onda selecionado para avaliar a biotransformação/biodegradação do ác. gálico por *S. commune* foi 270 nm (**Figura 21**).



**Figura 21** – Cromatogramas, em diferentes  $\lambda$ , da biotransformação do ác. gálico por *S. commune*.

Os cromatogramas das alíquotas retiradas a cada 24h da biorreação são apresentados na **Figura 22**. Cabe ressaltar que os cromatogramas foram gradativamente deslocados para a direita com o intuito de facilitar a visualização da metabolização do substrato.

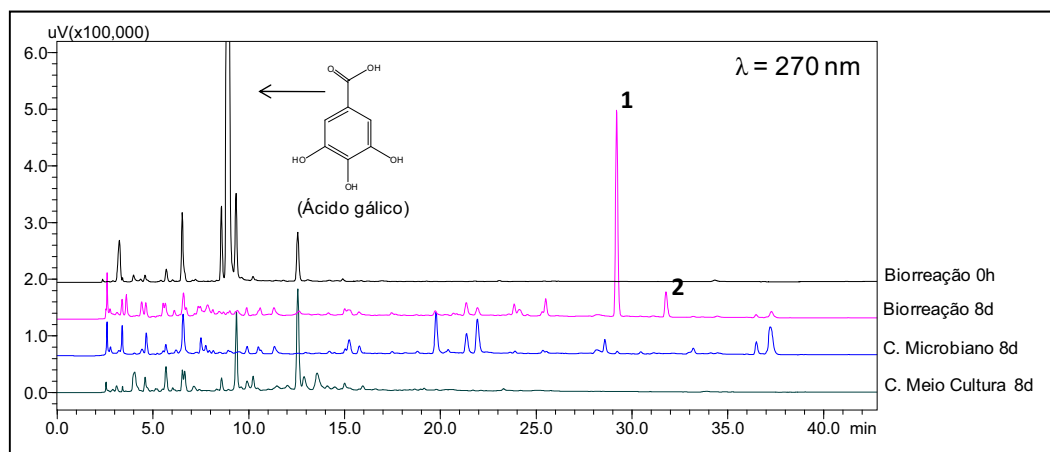
Verifica-se que até o sexto dia de incubação, a intensidade do sinal referente ao ácido gálico era praticamente a mesma. No sétimo dia, a intensidade diminuiu para próximo da metade e surgiu um pico com  $t_R$  29,20 min (**1**). Após oito dias de incubação, o sinal do substrato não foi mais observado, o que indica que foi completamente metabolizado pelo fungo; e surgiu um segundo pico com  $t_R$  31,77 min (**2**), evidenciando a formação de dois novos compostos no meio reacional.



**Figura 22** - Cromatogramas da biotransformação do ác. gálico por *S. commune* em diferentes períodos de incubação. Coluna e condições de análise: parte experimental, item 3.7.

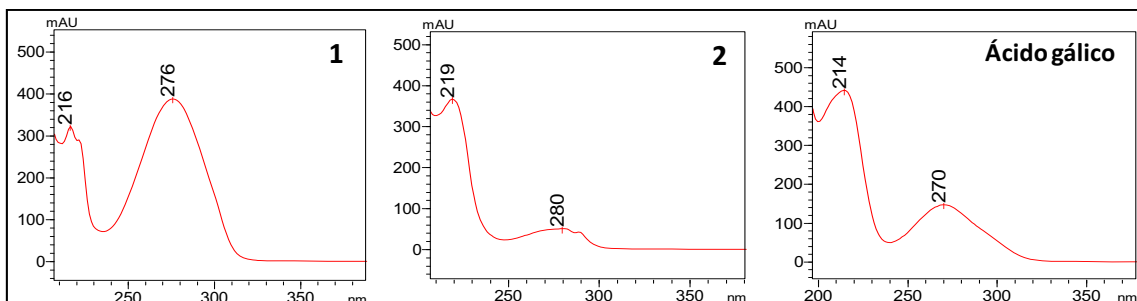
Os cromatogramas da biorreação com 0 e 8 dias de incubação são novamente apresentados na **Figura 23**, e comparados com os cromatogramas do controle microbiano (meio de cultura + micro-organismo) e do controle do meio de cultura.

Constata-se que os compostos formados durante a incubação (**1 e 2**) não se encontravam nos controles, o que sugere que são produtos de biotransformação do ácido gálico, pois, de maneira geral, quando o substrato é consumido e novos compostos são formados, estes são produtos de biotransformação, embora seja possível que novas rotas biossintéticas possam ser induzidas pelo substrato e novos metabólitos fúngicos passem a ser produzidos (GLAZER; NIKALDO, 1995; RODRIGUES; SILVA, 2010).



**Figura 23** - Cromatogramas da biotransformação do ác. gálico por *S. commune* e dos controles microbiano e meio de cultura. Coluna e condições de análise: parte experimental, item 3.7.

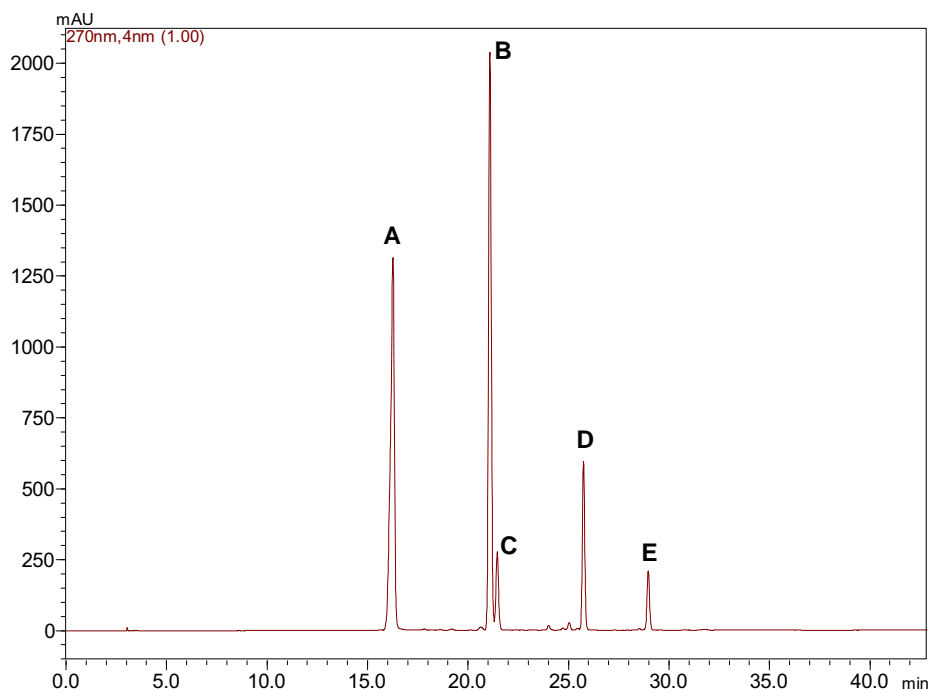
Os possíveis produtos biotransformados **1** e **2** possuem bandas de absorção máxima no UV em 216 e 276 nm, e em 219 e 280 nm, respectivamente (**Figura 24**). Esses valores são próximos dos observados para o ácido gálico (214 e 270nm).



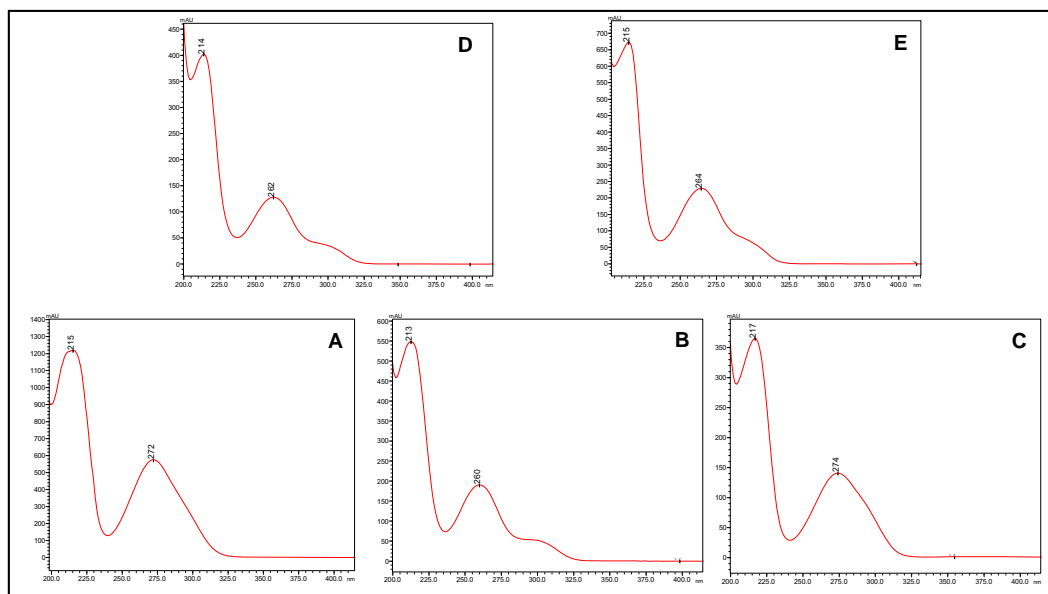
**Figura 24** - Espectros na região do UV dos compostos 1 e 2, e do ác. gálico.

A banda em 270 nm no ácido gálico se deve à conjugação do anel aromático com as hidroxilas fenólicas e a carbonila (PAVIA; LAMPMAN; KRIZ, 2001). Nos compostos **1** e **2** essa banda sofreu deslocamento batocrômico, deslocamento para região de maior comprimento de onda, sugerindo que, se forem produtos de biotransformação, a estrutura básica do ácido gálico foi mantida e a biotransformação realizada pelo micro-organismo aumentou a densidade eletrônica do sistema conjugado, pois quanto maior a densidade eletrônica no sistema aromático, mais estável é o composto, e menor energia (ou seja, radiação com maior comprimento de onda) ele absorve.

Visando estudar a possibilidade do fungo ter biotransformado o ácido gálico em um derivado metilado, em galato de metila por exemplo, solubilizou-se 3 mg do ác. gálico em 5 mL de solução de diazometano em éter, deixou o sistema em repouso sob refrigeração (4°C) por 2 horas, evaporou-se o excesso do solvente (COUTINHO, 2009), ressuspendeu-se a amostra em MeOH e a analisou por CLAE-DAD. O cromatograma apresentou 5 sinais com tempos de retenção 16,18 min (**A**), 21,09 min (**B**), 21,59 min (**C**), 25,89 min (**D**) e 29,22 min (**E**) (**Figura 25**) com bandas de absorção máxima no UV em 215 e 272 nm (**A**), 213, 260 e 300 nm (**B**), 217 e 274 nm (**C**), 214, 262 e 300 nm (**D**) e 215, 264 e 300 nm (**E**) (**Figura 26**).

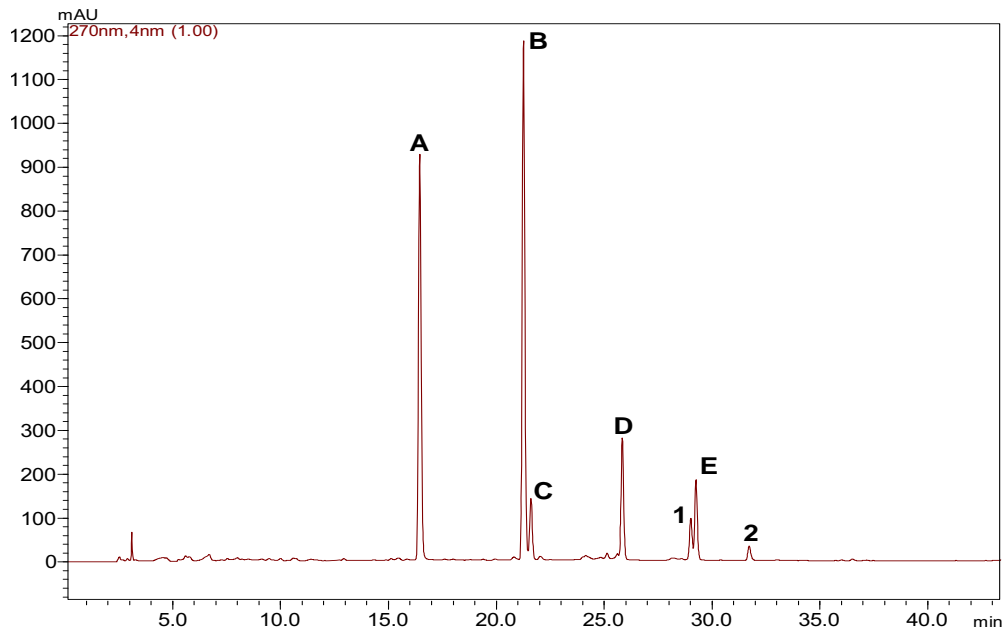


**Figura 25** - Cromatograma da derivação do ác. gálico com diazometano. Coluna e condições de análise: parte experimental, item 3.7.



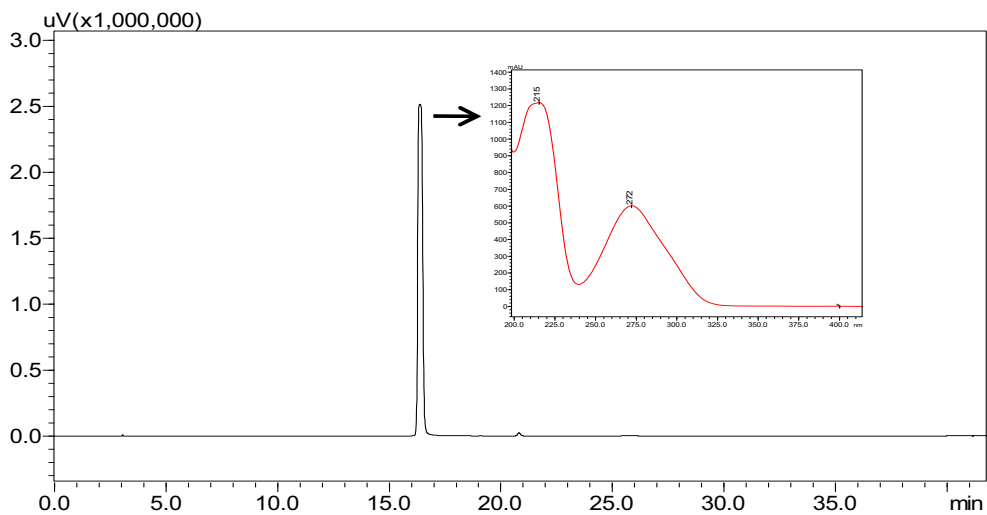
**Figura 26** - Espectros na região do UV dos derivados do ác. gálico pela reação com diazometano.

O  $t_R$  e o perfil no UV do composto **1**, obtido na biorreação, são muito semelhantes aos apresentados pelo pico **E**. Com o intuito de verificar se correspondiam à mesma substância, realizou-se uma co-injeção do extrato da biorreação e da amostra de derivação do ác. gálico, o que permitiu concluir que não eram a mesma substância, conforme é evidenciado na **Figura 27**.



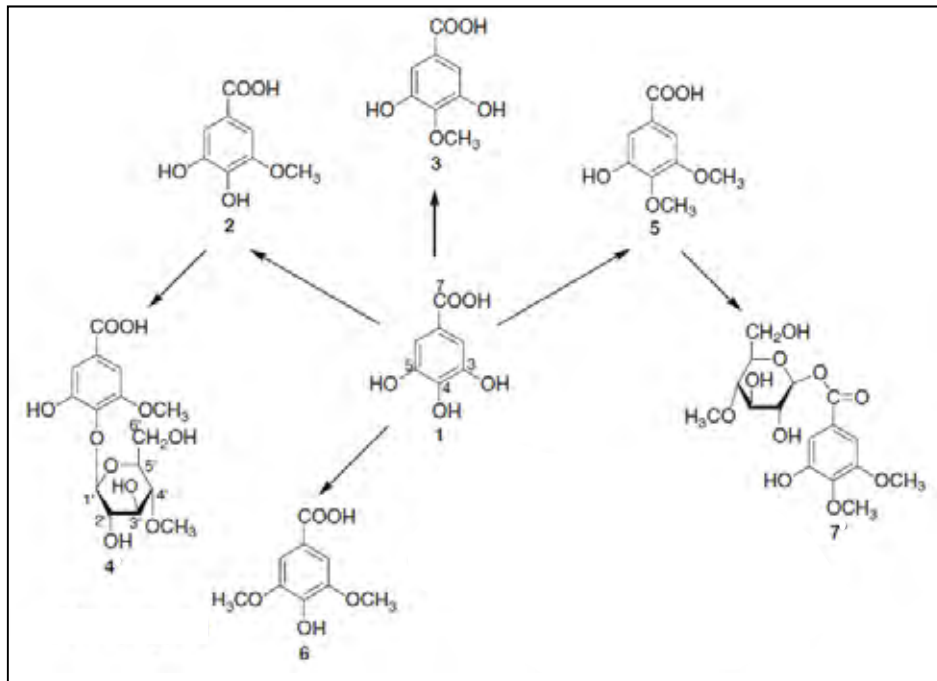
**Figura 27** - Cromatograma obtido na co-injeção da biorreação do ác. gálico por *S. commune* e da amostra de derivação do ác. gálico com diazometano. Coluna e condições de análise: parte experimental, item 3.7.

Os compostos **1** e **2** obtidos na biorreação não se referem ao galato de metila, pois análise do padrão desse éster evidenciou pico com  $T_R$  16,17 min e bandas no UV em 215 e 272 nm (**Figura 28**).



**Figura 28** - Cromatograma e espectro no UV do padrão do galato de metila. Coluna e condições de análise: parte experimental, item 3.7.

Revisão bibliográfica apontou apenas uma publicação sobre biotransformação do ácido gálico por micro-organismos. Trata-se de trabalho recente, no qual HSU e colaboradores (2007) reportaram a biotransformação do ácido gálico pelo fungo *Beauveria sulfurescens* em 3 metabólitos glicosilados e em 4 metabólitos O-metilados (**Figura 29**). Em cinco dos produtos biotransformados (2, 3, 4, 5 e 6) a carboxila permaneceu intacta, sendo que o micro-organismo atuou sobre as hidroxilas fenólicas do ácido gálico, metilando e glicosilando-as regioesletivamente. O grupamento carboxílico foi biotransformado em apenas um caso: na formação do produto biotransformado 7. Os autores não reportaram dados espectroscópicos na região do ultra-violeta dos produtos biotransformados, resultados que poderiam ser comparados com os obtidos nesse trabalho.



**Figura 29** - Produtos de biotransformação do ác. gálico por *B. sulfurescens*. Reportado por HSU et al, 2007.

O pH do meio reacional tanto na biorreação quanto no controle microbiano após os 8 dias de incubação era 4, valor idêntico ao medido no início do experimento para os dois casos. A cor castanha que foi observada na etapa de avaliação da tolerância do fungo *S. commune* ao ácido gálico (item 4.1.7, pág. 47) não foi observada na etapa de biotransformação, descartando-se, portanto, a hipótese proposta no item 4.1.7 de que a coloração estaria relacionada a produtos de biotransformação.

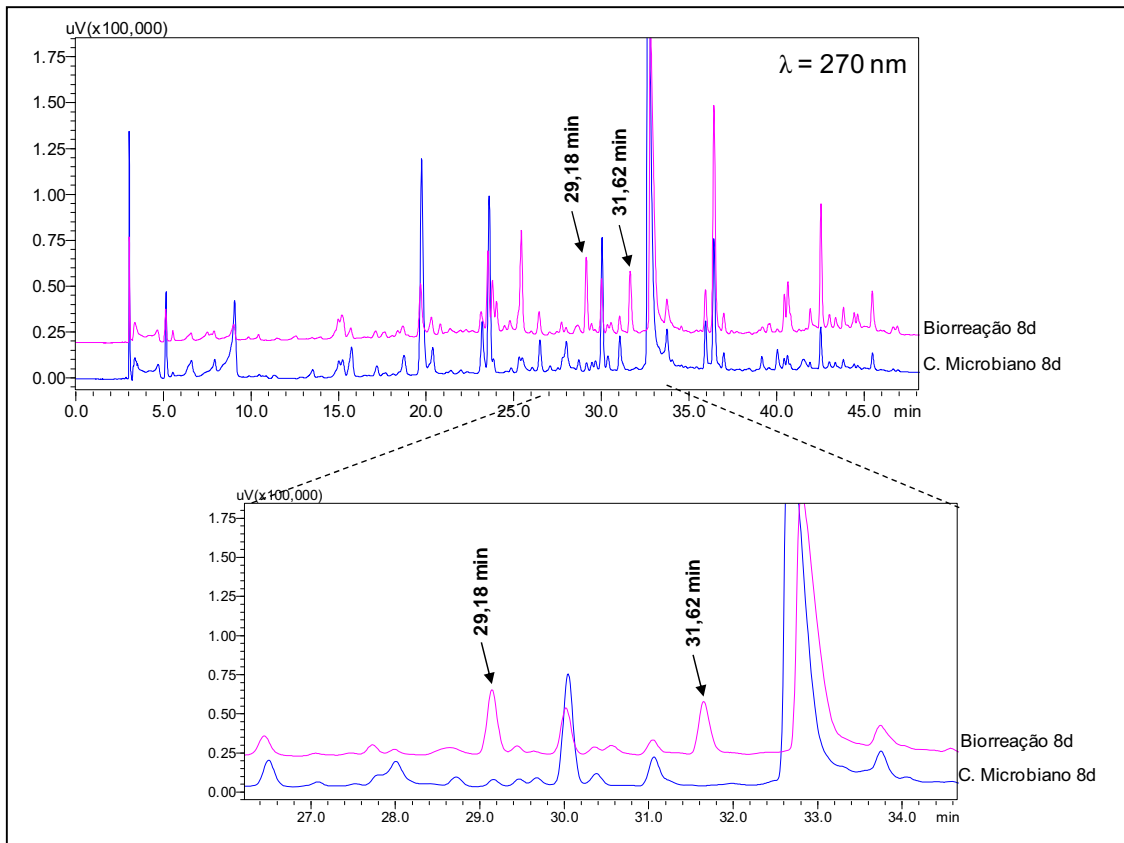
#### 4.2.1.1.1. Análise dos micélios

As massas úmidas dos micélios da biorreação e do controle microbiano, após o período de incubação, foram determinadas e comparadas com as respectivas massas iniciais. Na biorreação, a massa do micélio aumentou 210% e no frasco sem o substrato (controle microbiano) o aumento foi de 250%. Esse resultado pode indicar uma moderada inibição do crescimento fúngico pelo ácido gálico.

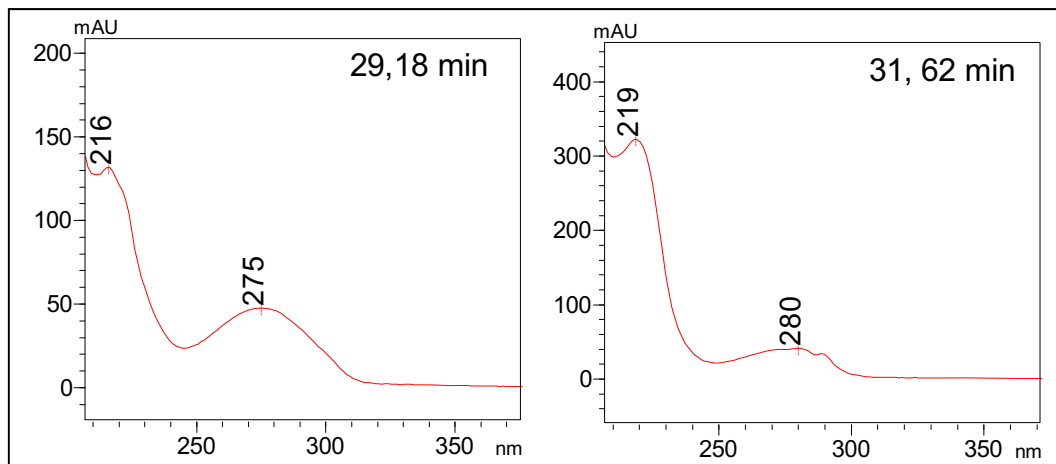
Nas reações de biotransformação com fungos filamentosos há a possibilidade do substrato ou produtos biotransformados ficarem adsorvidos no micélio microbiano (ORTEGA et al., 2011). Visando avaliar essa possibilidade, realizou-se a extração dos micélios da biorreação e do controle microbiano, e os extratos obtidos foram analisados por CLAE-DAD.

Considerando que o sinal do ácido gálico (pico com  $t_R$  próximo de 9 min e bandas de absorção no UV em 214 e 270 nm) não foi observado no extrato do micélio da biorreação (**Figura 30**), concluiu-se que esse substrato não foi adsorvido pelo fungo.

Os compostos com  $t_R$  29,18 e 31,62 min, presentes no extrato da biorreação e ausentes no do controle microbiano (**Figura 30**), apresentam bandas no UV em 216, 275 nm e 219, 280 nm, respectivamente (**Figura 31**). Esses compostos se referem aos possíveis produtos biotransformados **1** e **2** que já tinham sido identificados na fase aquosa (pois, os tempos de retenção e espectros no UV são praticamente os mesmos), e que foram adsorvidos pelo micélio fúngico.



**Figura 30** - Cromatogramas dos extratos dos micélios da biotransformação do ác. gálico por *S. commune* e do controle microbiano. Coluna e condições de análise: parte experimental, item 3.7.

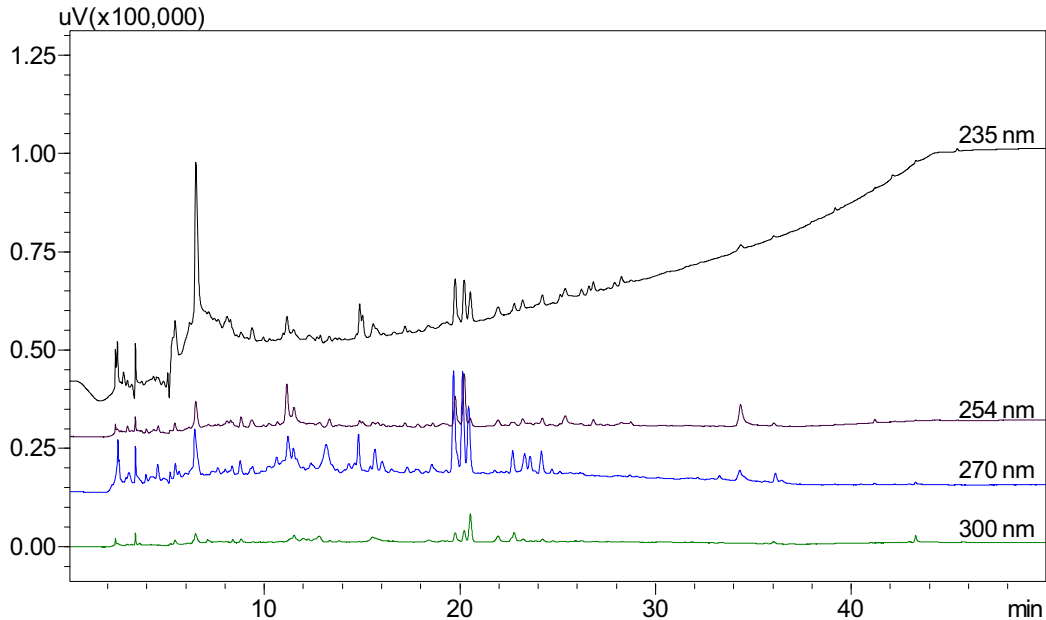


**Figura 31** - Espectros na região do UV dos compostos presentes no micélio do endófito *S. commune*.

Com base nos dados apresentados, concluiu-se que o fungo endófito *S. commune* pode ter biotransformado o ácido gálico em dois novos compostos, os quais foram encontrados tanto na fase aquosa, quanto no micélio microbiano.

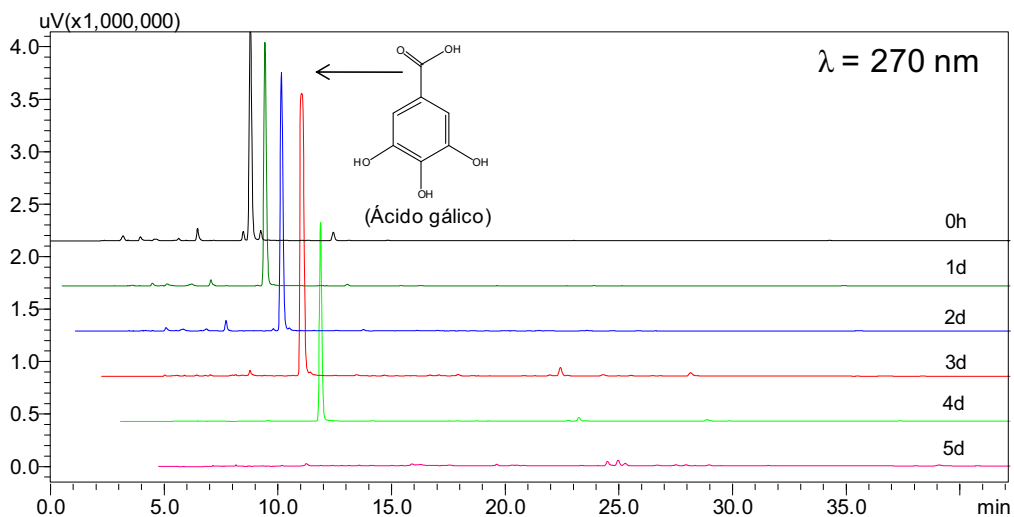
#### 4.2.1.2. Micro-organismo *Phomopsis stipata*

O comprimento de onda selecionado para avaliar a ação do micro-organismo *P. stipata* sobre o ácido gálico foi 270 nm (**Figura 32**).



**Figura 32** - Cromatogramas, em diferentes  $\lambda$ , da biotransformação do ác. gálico por *P. stipata*.

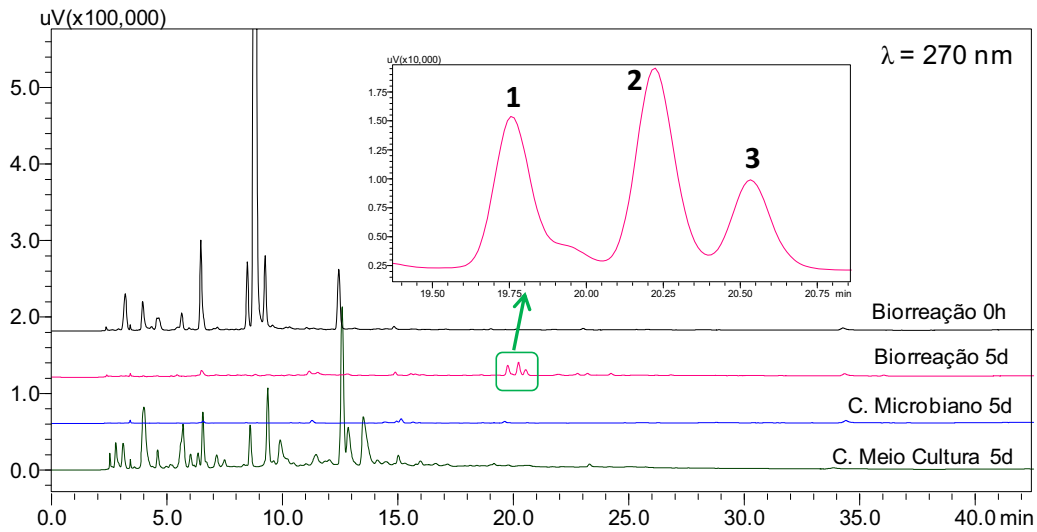
O micro-organismo metabolizou o ácido gálico a partir do quarto dia de incubação, sendo que no quinto dia o sinal desse substrato não foi mais observado (**Figura 33**).



**Figura 33** - Cromatogramas do extrato da biotransformação do ác. gálico por *P. stipata* em diferentes períodos de incubação. Coluna e condições de análise: parte experimental, item 3.7.

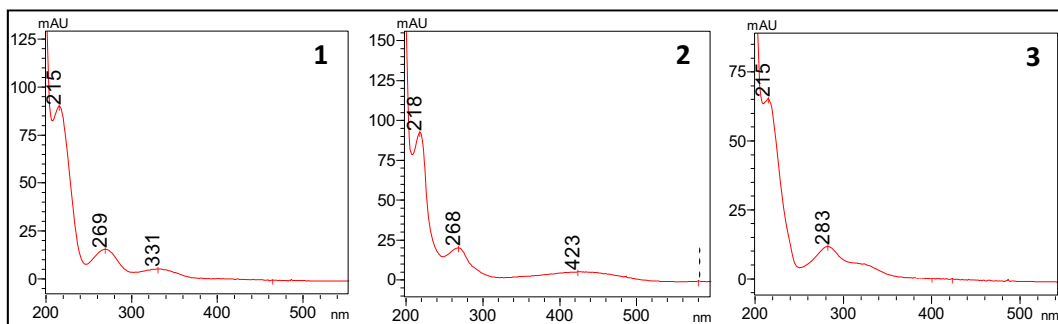
Comparando-se os cromatogramas da biotransformação (de 0 e 5 dias de incubação) com os cromatogramas dos controles microbiano e meio de

cultura, verifica-se que enquanto o ácido gálico foi totalmente metabolizado surgiram três compostos que não se encontravam nos controles (**Figura 34**).



**Figura 34** - Cromatogramas dos extratos da biotransformação do ác. gálico por *P. stipata* e dos controles microbiano e meio de cultura. Coluna e condições de análise: parte experimental, item 3.7.

Os três compostos formados apresentam espectros no UV semelhantes, conforme apresentado na **Figura 35**. Os compostos **1** e **2** apresentam bandas na região de 215 e 270 nm (assim como o ácido gálico) além de uma banda em 331 e 423 nm, respectivamente. O composto **3** apresenta bandas em 215, 280 e em aproximadamente 330 nm.



**Figura 35** - Espectros na região do UV dos compostos 1, 2 e 3 formados após 5 dias de incubação.

Os valores de pH da biorreação e do controle microbiano não variaram durante o período de incubação. Na biorreação o pH permaneceu em 4 e no controle microbiano em 5.

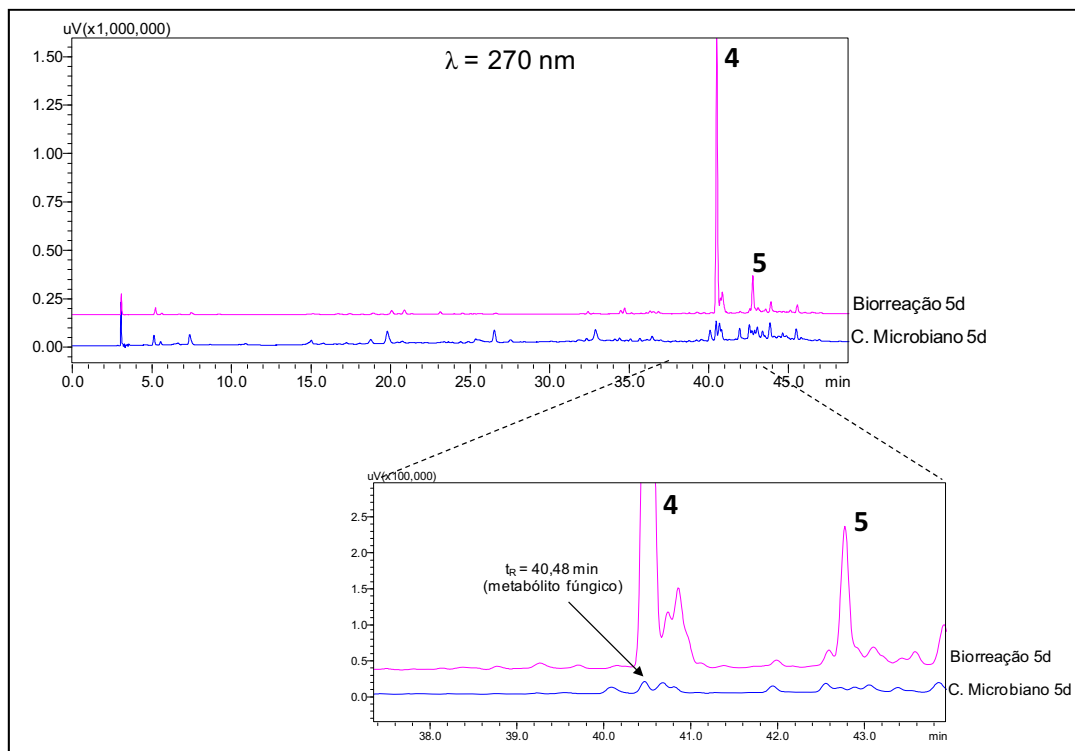
#### 4.2.1.2.1. Análise do micélio

O aumento da massa do micélio na biorreação foi de 170% enquanto que no controle microbiano foi de 195%, o que pode indicar que o endófito se desenvolveu melhor na ausência do ácido gálico.

A **Figura 36** mostra que duas substâncias (**4** e **5**) foram formadas na biorreação e não no controle microbiano, sendo, portanto, possíveis produtos de biotransformação do ácido gálico que foram adsorvidos pelo micélio.

Considerando que os produtos **4** e **5** apresentam tempos de retenção (40,50 e 42,76 min, respectivamente) muito maiores que o do ácido gálico (8,93 min), conclui-se que este substrato possivelmente foi biotransformado em dois produtos acentuadamente mais apolares. É importante salientar que o sinal de baixa intensidade com  $t_R$  40,48 min, no cromatograma do controle microbiano, não corresponde ao produto biotransformado **4**, pois seus espectros no UV diferem bastante (**Figura 37**).

Os produtos **4** e **5** apresentam banda de absorção no UV em 277 e 278 nm, respectivamente, o que indica deslocamento batocrômico da banda em 270 nm do ácido gálico (**Figura 37**).



**Figura 36** - Cromatogramas dos extratos dos micélios da biotransformação do ác. gálico por *P. stipata* e do controle microbiano. Coluna e condições de análise: parte experimental, item 3.7.

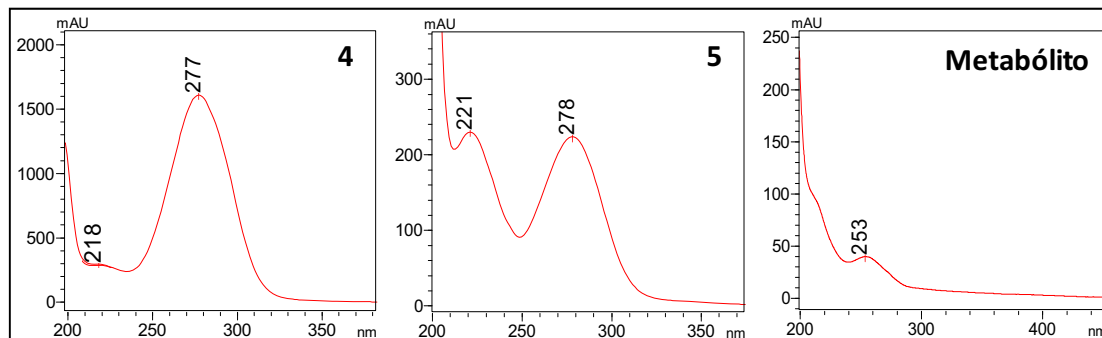


Figura 37 - Espectros na região do UV dos compostos presentes no micélio do endófito *P. stipata*.

#### 4.2.1.3. Micro-organismo *Tricoderma viridae*

A avaliação biocatalítica desse micro-organismo foi realizada no  $\lambda$  254 nm (Figura 38).

A intensidade do sinal do ácido gálico diminuiu com o tempo de incubação, sendo que no quinto dia era aproximadamente um quarto da inicial e no sexto dia esse sinal deixou de ser observado (Figura 39). A partir do quinto dia de incubação surgiram dois compostos no meio reacional:  $t_R$  28,55 e 29,64 min (1 e 2, respectivamente).

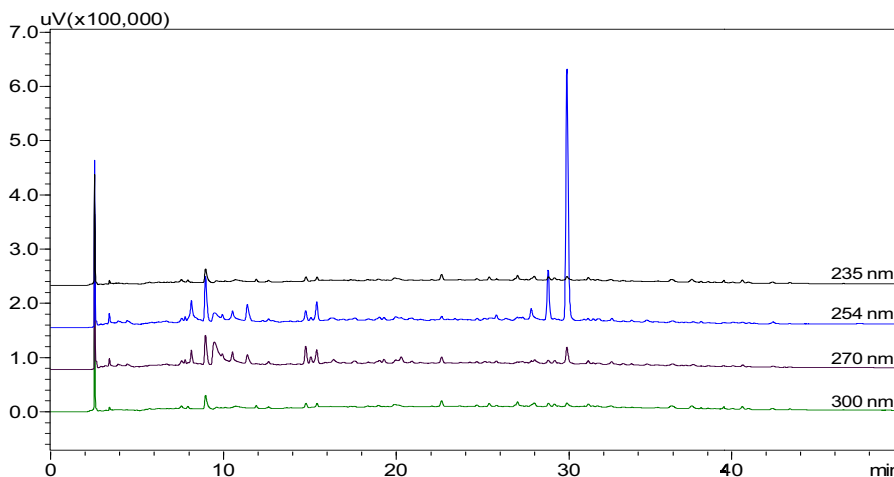
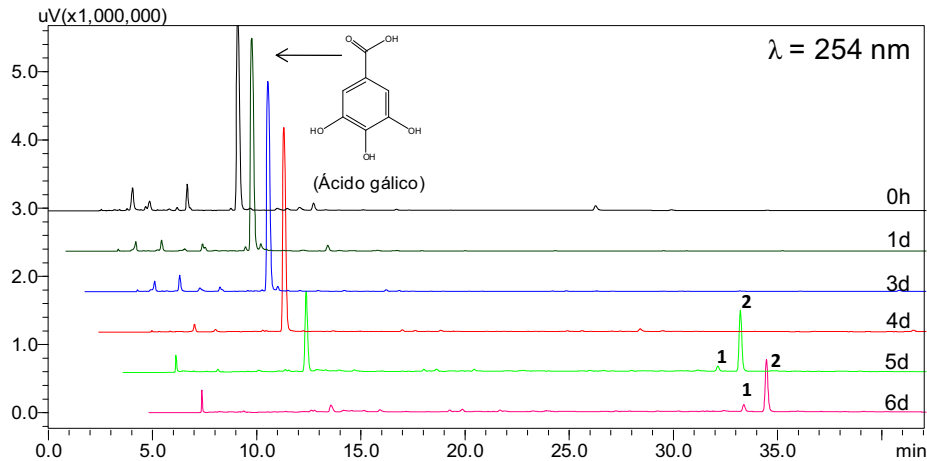


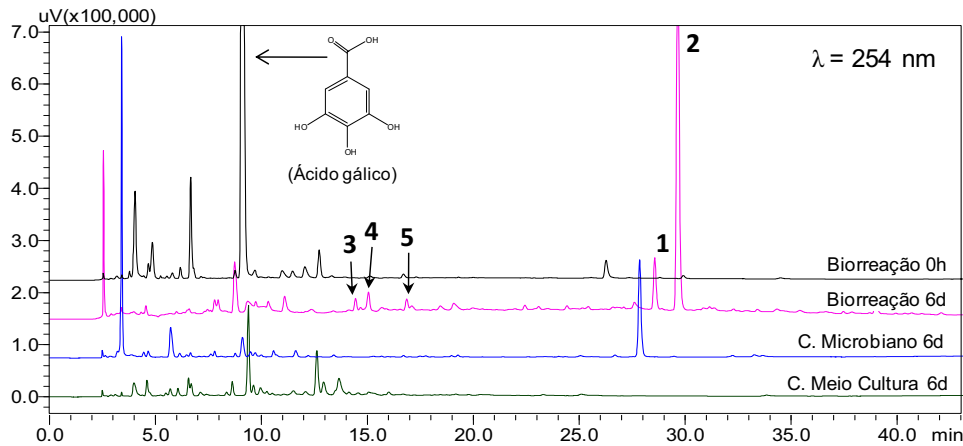
Figura 38 - Cromatogramas, em diferentes  $\lambda$ , da biotransformação do ác. gálico por *T. viridade*.



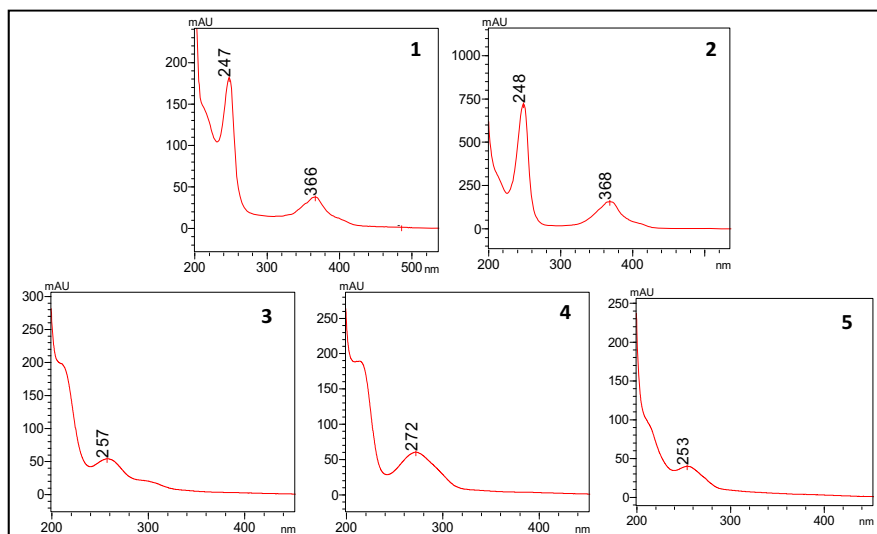
**Figura 39** - Cromatogramas do extrato da biotransformação do ác. gálico por *T. viridae* em diferentes períodos de incubação. Coluna e condições de análise: parte experimental, item 3.7.

O sinal com  $t_R$  próximo ao do ácido gálico no cromatograma do sexto dia de incubação (**Figura 39**) se refere a um metabólito produzido pelo fungo, pois esse sinal também é observado (com pequeno deslocamento) no cromatograma do controle microbiano, conforme é apresentado na **Figura 40**.

Comparando-se os cromatogramas da biorreação com os cromatogramas dos controles microbiano e meio de cultura (**Figura 40**), verifica-se que os compostos **1**, **2**, **3**, **4** e **5** não foram formados nos controles, indicando que podem ser produtos de biotransformação. Os compostos **1** e **2** apresentam duas bandas de absorção no UV por volta de 247 e 366 nm (**Figura 41**), dados semelhantes aos apresentados pelos flavonoides (MABRY; MARKHAM; THOMAS, 1970). Os compostos **3** e **4** apresentam bandas no UV em 212 e 257 nm e em 212 e 272 nm, respectivamente. E a substância **5** possui apenas uma banda em 253 nm. Com base nesses dados, estima-se que com exceção do composto **4**, as demais substâncias apresentam estruturas significativamente diferentes da do ácido gálico.



**Figura 40** - Cromatogramas dos extratos da biotransformação do ác. gálico por *T. viridae* e dos controles microbiano e meio de cultura. Coluna e condições de análise: parte experimental, item 3.7.



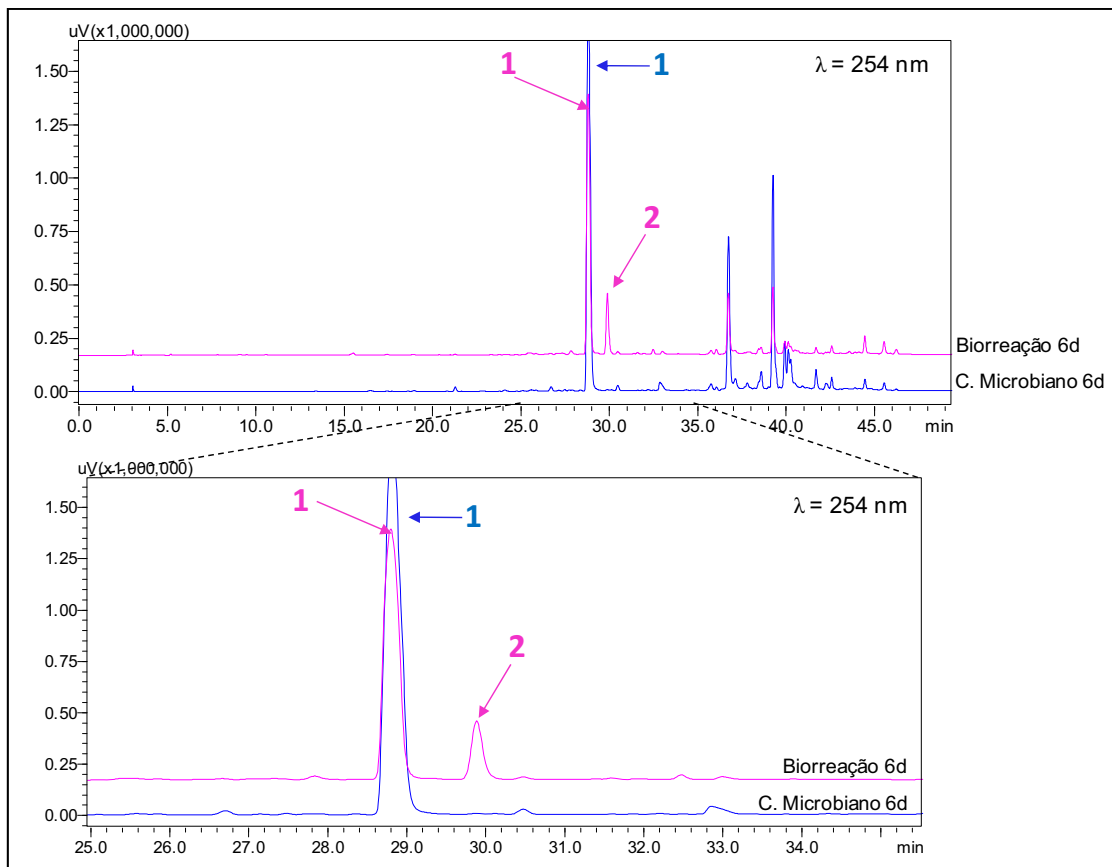
**Figura 41** - Espectros na região do UV dos compostos formados após 5 dias de incubação.

#### 4.2.1.3.1. Análise do micélio

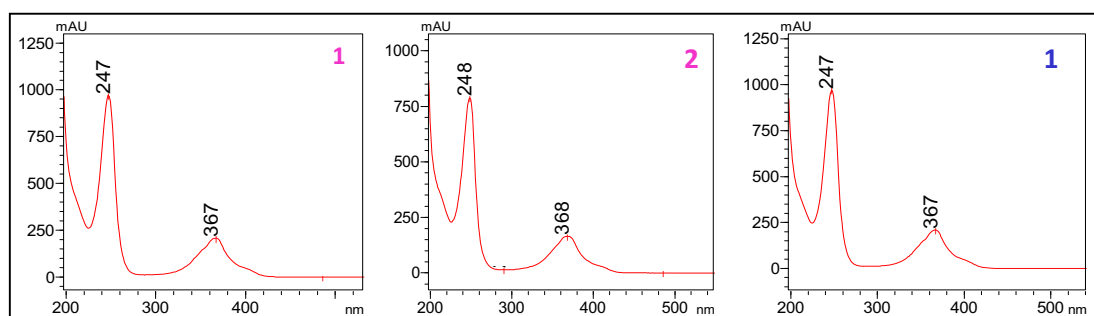
O aumento da massa micelial na biorreação foi de 55% e no controle microbiano 70%, indicando que o micro-organismo se desenvolveu melhor na ausência do ácido gálico.

Os compostos **1** e **2** que haviam sido identificados na fase aquosa, também foram encontrados adsorvidos no micélio fúngico (**Figura 42** e **Figura 43**). Contudo, diferentemente do que foi observado na fase aquosa, o composto **1** foi identificado também no controle microbiano. Isso significa que esse composto não é um produto de biotransformação, e sim um metabólito fúngico.

Considerando que o composto **2** apresenta tempo de retenção e perfil no UV muito semelhantes aos do metabólito fúngico **1**, é possível que o ácido gálico tenha induzido uma nova rota biossintética no micro-organismo, de forma que um novo metabólito, o composto **2**, passou a ser produzido.



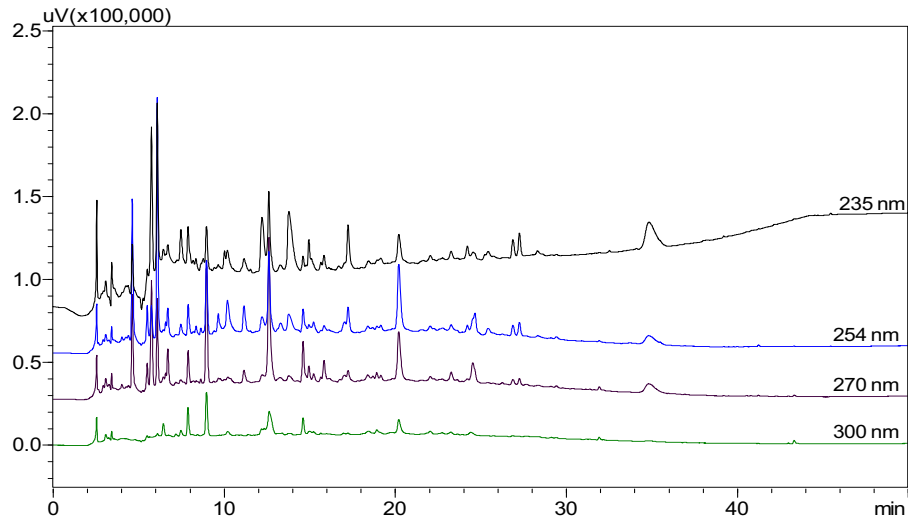
**Figura 42** - Cromatogramas dos extratos dos micélios da biotransformação do ác. gálico por *T. viridae* e do controle microbiano. Coluna e condições de análise: parte experimental, item 3.7.



**Figura 43** - Espectros na região do UV dos compostos presentes nos micélios do endófito *T. viridae*: **1** e **2**: compostos da biorreação; **1**: composto presente no controle microbiano.

#### 4.2.1.4. Micro-organismo *Phomopsis* sp.

O comprimento de onda selecionado para a avaliação biocatalítica desse micro-organismo foi 254 nm (**Figura 44**).



**Figura 44** - Cromatogramas, em diferentes  $\lambda$ , da biotransformação do ác. gálico por *Phomopsis* sp.

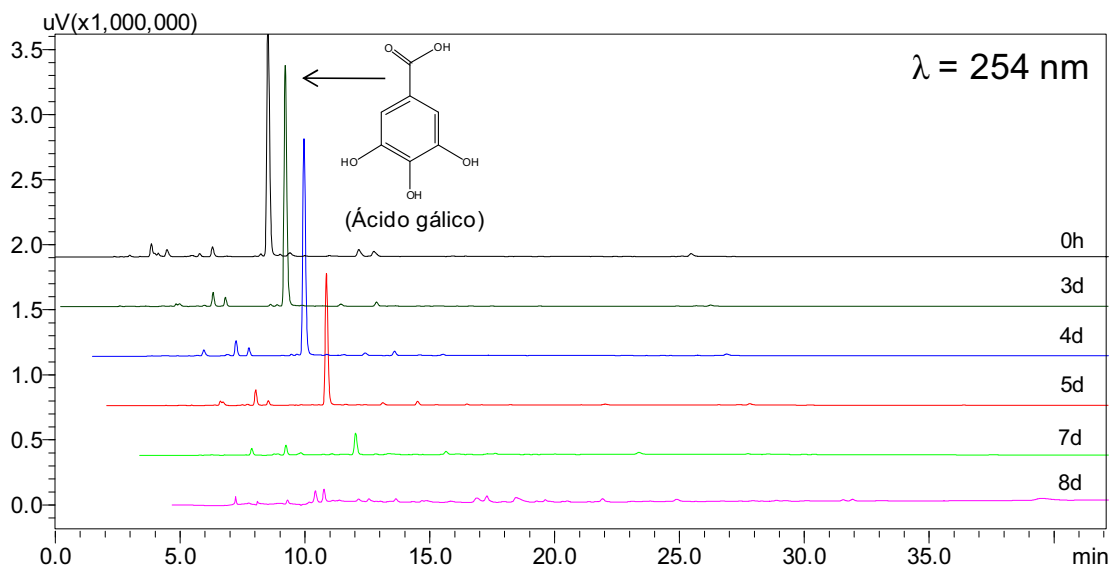
Três dias após ter iniciado da avaliação biocatalítica, observou-se que o meio reacional da biorreação adquiriu coloração âmbar, resultado que não foi observado no frasco do controle microbiano (**Figura 45**). Essa alteração de cor pode estar relacionada à formação de produtos biotransformados.



**Figura 45** - Aspecto do meio reacional da biorreação (frasco à direita) e do controle microbiano (frasco à esquerda).

O pH tanto da biorreação quanto do controle microbiano após o período de incubação não foi alterado, permaneceu em 4.

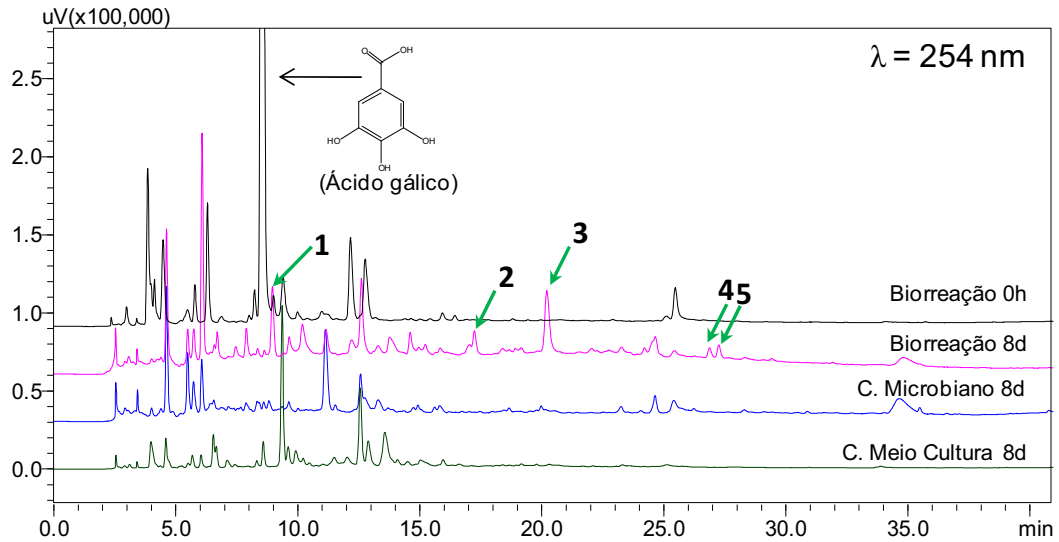
A **Figura 46** mostra que a intensidade do sinal do ácido gálico diminuiu conforme aumentou o tempo de incubação, de modo que após 8 dias esse substrato foi completamente metabolizado pelo fungo.



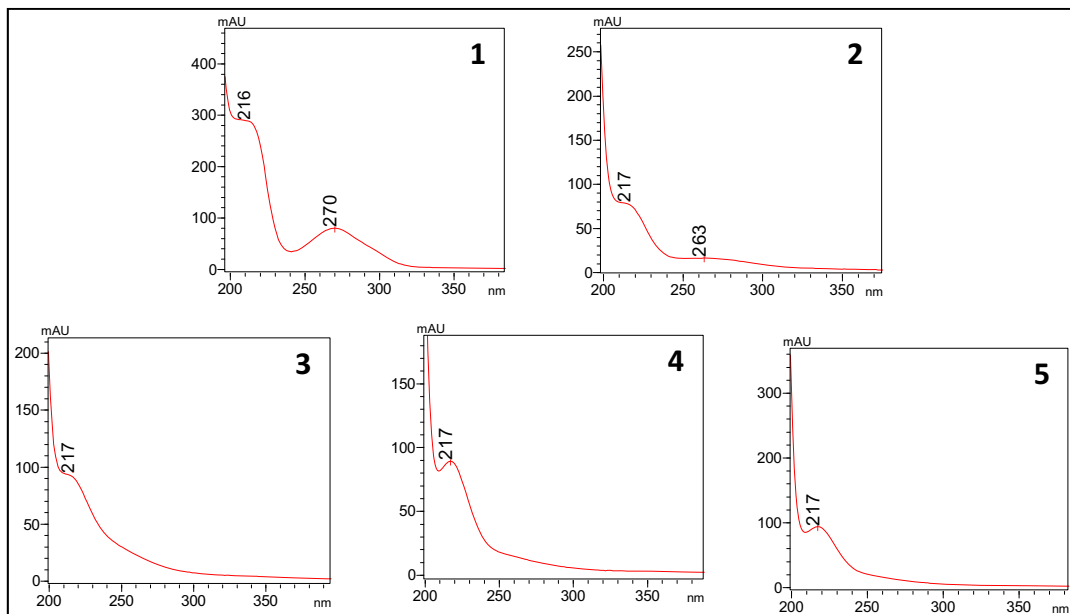
**Figura 46** - Cromatogramas do extrato da biotransformação do ác. gálico por *Phomopsis* sp. em diferentes períodos de incubação. Coluna e condições de análise: parte experimental, item 3.7.

Verifica-se na **Figura 47** que foram formados 5 compostos na biorreação, os quais não foram observados nos extratos dos controles, e conseqüentemente podem ser produtos de biotransformação. Os produtos **1** e **2** apresentam bandas no UV próximas de 215 e 270 nm (**Figura 48**), assim como o ácido gálico, o que sugere que as estruturas básicas desses compostos são a mesma do substrato ácido gálico.

Os produtos **3**, **4** e **5** possuem uma única banda em 217 nm (**Figura 48**), evidenciando, que nesse caso, o micro-organismo possivelmente biotransformou o ácido gálico rompendo a sua aromaticidade, pois tanto a banda próxima de 270 nm, característica do anel aromático conjugado com as hidroxilas e a carbonila, quanto uma banda em 255 nm, característica do anel aromático não conjugado, não são observadas.



**Figura 47** - Cromatogramas dos extratos da biotransformação do ác. gálico por *Phomopsis* sp. e dos controles microbiano e meio de cultura. Coluna e condições de análise: parte experimental, item 3.7.



**Figura 48** - Espectros na região do UV dos compostos 1, 2, 3, 4 e 5 formados após 8 dias de incubação.

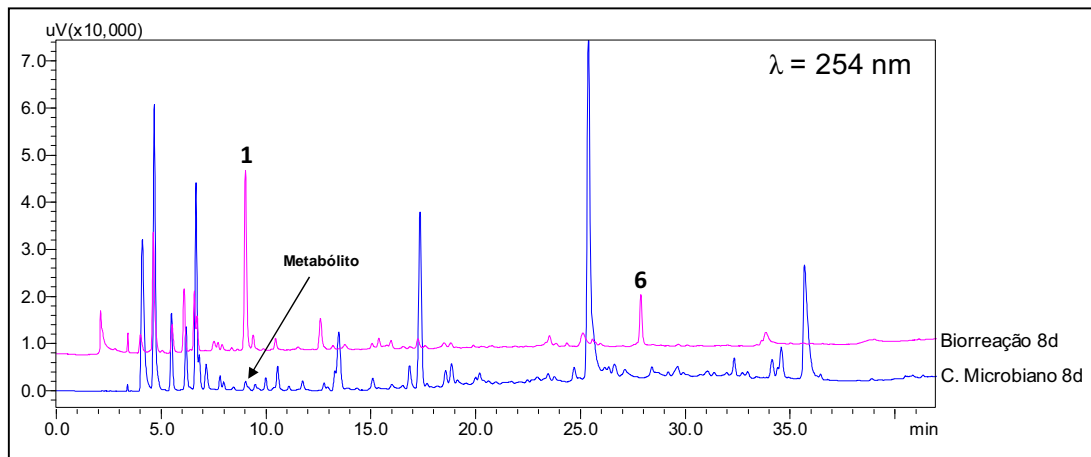
#### 4.2.1.4.1. Análise do micélio

O aumento da massa do micélio na biorreação foi de 110%, enquanto que no controle microbiano constatou-se aumento de 130%. Conforme já mostrado na **Figura 45**, o micélio no frasco da biorreação adquiriu coloração escura.

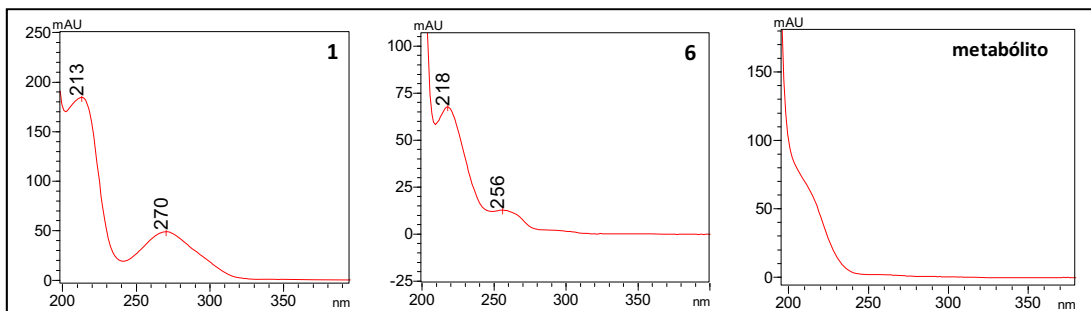
Constata-se na **Figura 49** que o possível produto biotransformado **1**, encontrado na fase aquosa, estava também adsorvido ao micélio. Além deste, foi encontrado outro produto biotransformado:  $t_R$  27,87 min (**6**). No

cromatograma do controle microbiano observa-se um sinal de baixa intensidade com mesmo tempo de retenção que o produto **1**, contudo os espectros no UV (**Figura 50**) mostram que são substâncias diferentes.

Considerando que tanto a fase aquosa quanto o micélio tinham coloração escura e apresentavam o possível produto biotransformado **1**, é provável que haja uma relação de causa e efeito entre o composto **1** e a cor.



**Figura 49** - Cromatogramas dos extratos dos micélios da biotransformação do ácido gálico por *Phomopsis* sp. e do controle microbiano. Coluna e condições de análise: parte experimental, item 3.7.

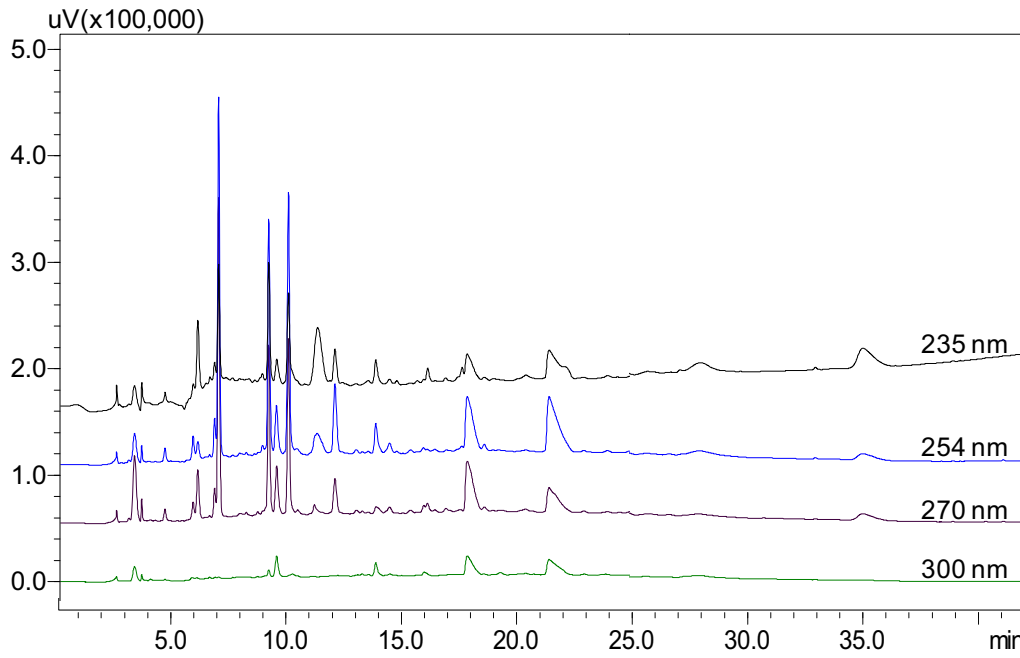


**Figura 50** - Espectros na região do UV dos compostos presentes nos micélios do endófito *Phomopsis* sp.

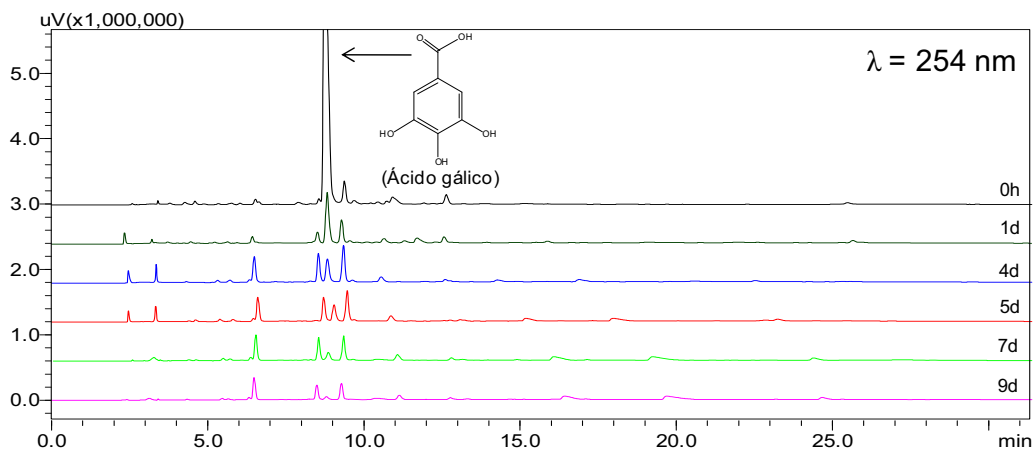
#### 4.2.1.5. Micro-organismo *Nigrospora sphaerica*

A avaliação biocatalítica do micro-organismo *N. sphaerica* foi realizada em 254 nm (**Figura 51**).

O fungo *N. sphaerica* metabolizou a maior parte do ácido gálico após 24h de incubação (**Figura 52**). Depois desse período surgiu uma coloração castanha no meio reacional que aumentou com o tempo, de forma que após 9 dias o aspecto da biorreação era bem diferente do controle microbiano (**Figura 53**).



**Figura 51** - Cromatogramas, em diferentes  $\lambda$ , da biotransformação do ác. gálico por *N. sphaerica*.



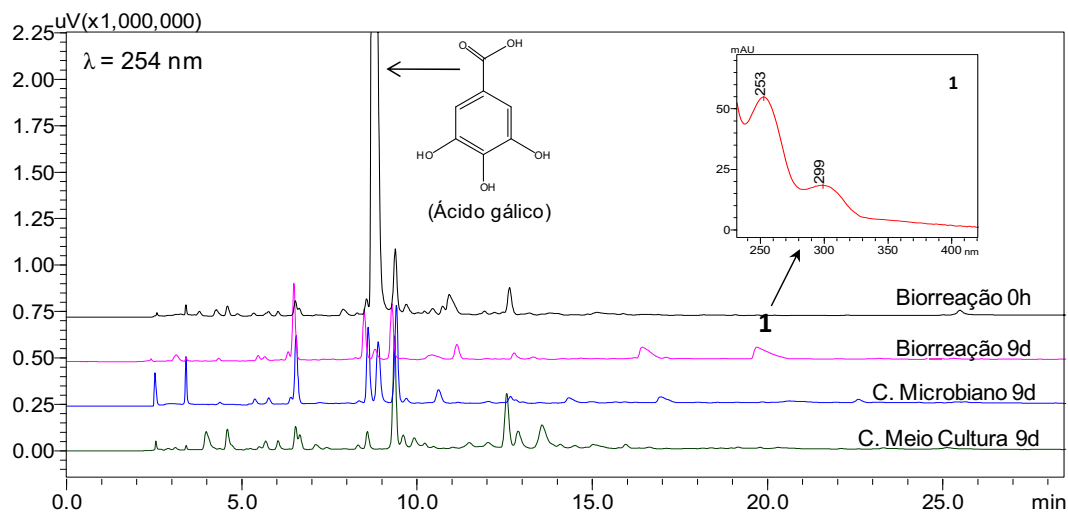
**Figura 52** - Cromatogramas do extrato da biotransformação do ác. gálico por *N. sphaerica* em diferentes períodos de incubação. Coluna e condições de análise: parte experimental, item 3.7.



**Figura 53** - Aspecto do meio reacional da biorreação (frasco à direita) e do controle microbiano (frasco à esquerda).

Comparando-se os cromatogramas da biorreação com os cromatogramas dos controles verifica-se que apenas um possível produto biotransformado com  $t_R$  19,70 min (**1**), e bandas de absorção no UV em 253 e 299 nm, foi encontrado na fase aquosa (**Figura 54**). Não houve alteração no pH do meio reacional na biorreação e no controle microbiano, o valor medido no início e no final do estudo foi pH=4 para os dois casos.

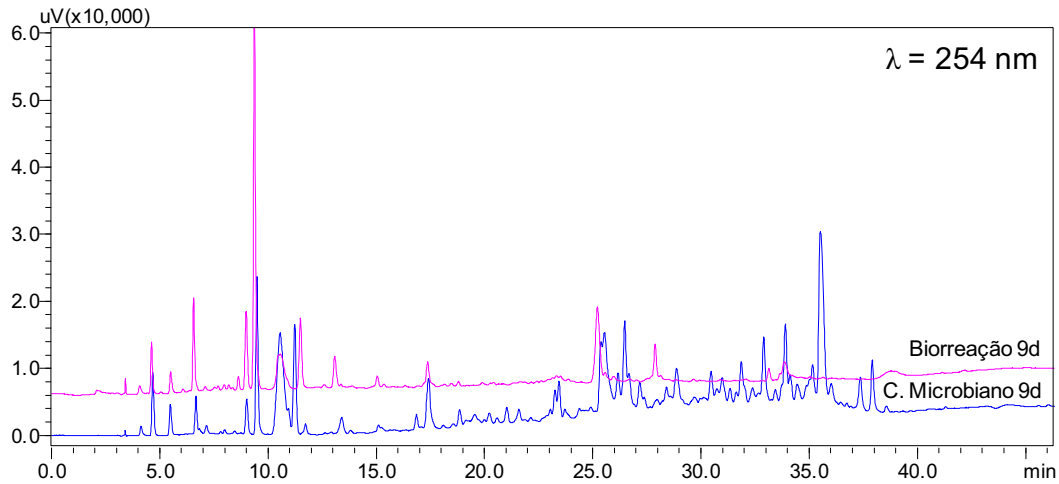
Considerando que foi formado apenas um novo produto (**1**), supõe-se que a cor castanha intensa que surgiu no meio reacional esteja relacionada a esse composto.



**Figura 54** - Cromatogramas da biotransformação do ác. gálico por *N. sphaerica* e dos controles microbiano e meio de cultura. Espectro no UV do composto 1. Coluna e condições de análise: parte experimental, item 3.7.

#### 4.2.1.5.1. Análise do micélio

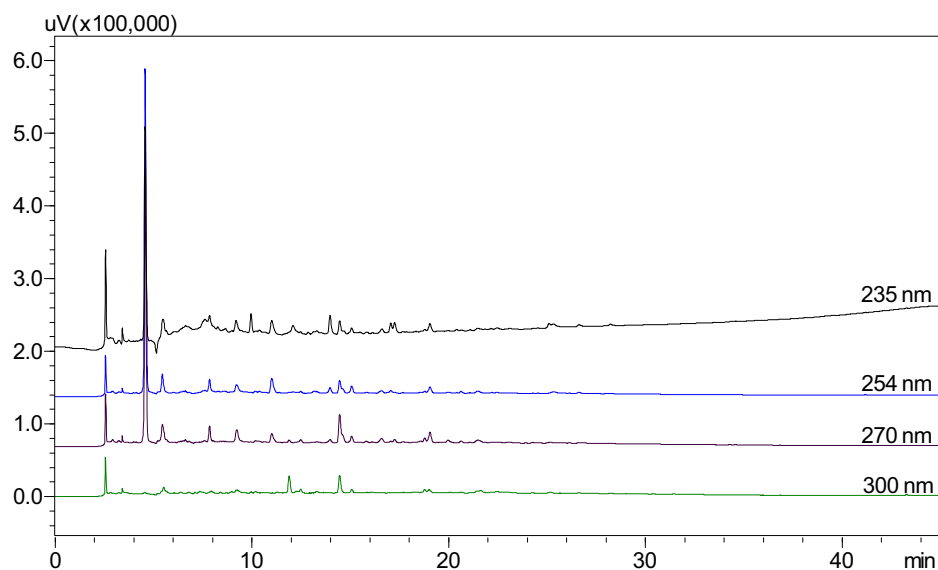
O aumento da massa micelial na biorreação foi de 211% e no controle microbiano 242%. Considerando que todos os picos presentes no cromatograma da biorreação também estão no cromatograma do controle microbiano (**Figura 55**), pode-se inferir que não havia produto biotransformado adsorvido ao micélio fúngico.



**Figura 55** - Cromatogramas dos extratos dos micélios da biotransformação do ác. gálico por *N. sphaerica* e do controle microbiano. Coluna e condições de análise: parte experimental, item 3.7.

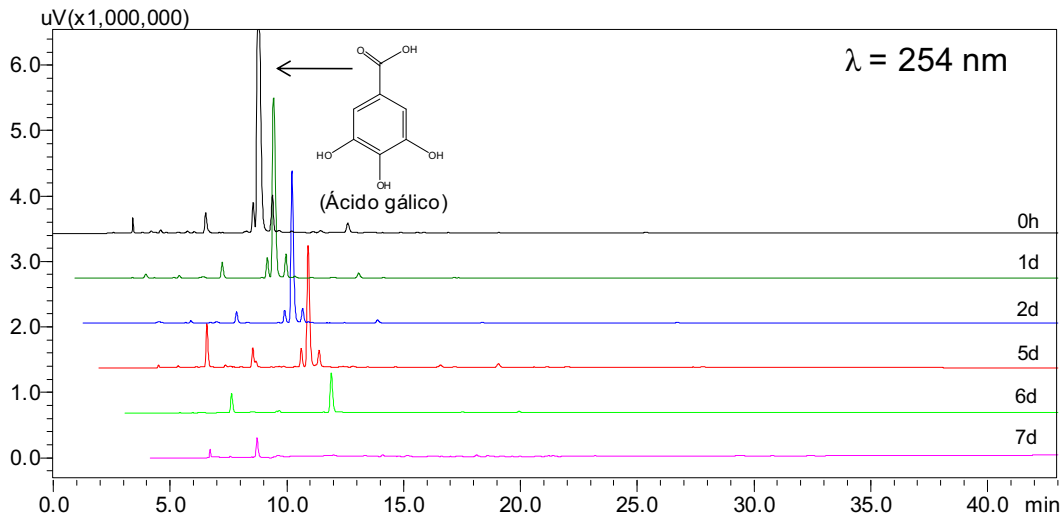
#### 4.2.1.6. Micro-organismo Xylaria sp.

O comprimento de onda usado na avaliação do potencial biocatalítico do micro-organismo *Xylaria sp.* foi 254 nm (**Figura 56**).



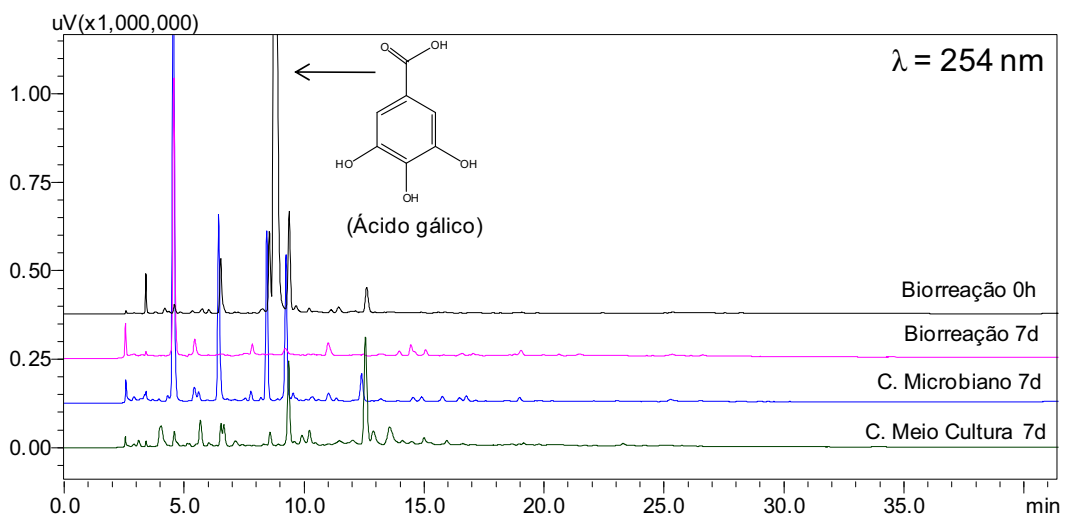
**Figura 56** - Cromatogramas, em diferentes  $\lambda$ , da biotransformação do ác. gálico por *Xylaria sp.*

A intensidade do sinal do ácido gálico diminuiu com o tempo, sendo que após 1 semana não foi mais observado (**Figura 57**). Esse resultado sugere a completa metabolização do substrato pelo endófito. O pH da biorreação alterou de 4 para 7 durante o período de incubação, enquanto que o pH do controle microbiano permaneceu em 4. Esse resultado indica que a metabolização do ácido gálico diminuiu a concentração hidrogeniônica do meio reacional.



**Figura 57** - Cromatogramas do extrato da biotransformação do ác. gálico por *Xylaria* sp. em diferentes períodos de incubação. Coluna e condições de análise: parte experimental, item 3.7.

Comparando-se os cromatogramas da biorreação com os dos controles microbiano e meio de cultura conclui-se que não havia produtos de biotransformação na fase aquosa (**Figura 58**).

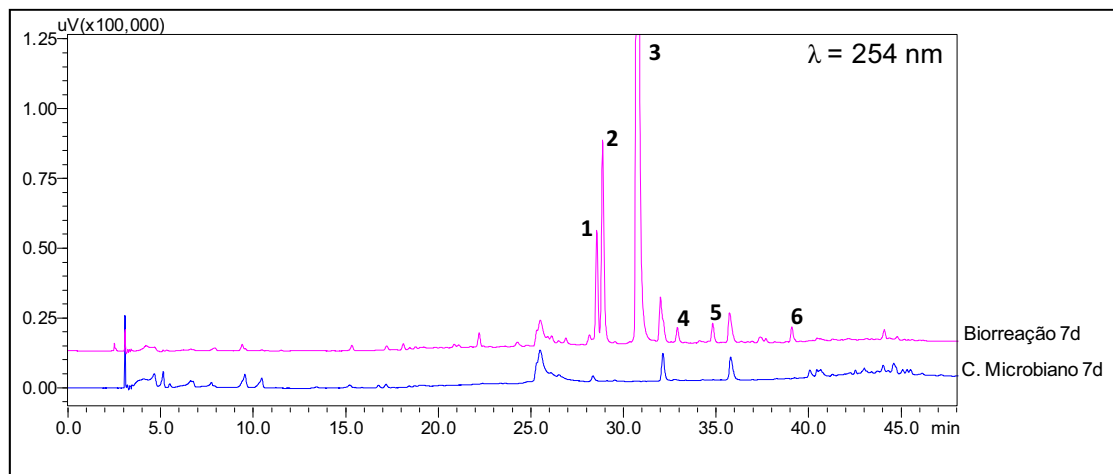


**Figura 58** - Cromatogramas dos extratos da biotransformação do ác. gálico por *Xylaria* sp. e dos controles microbiano e meio de cultura. Coluna e condições de análise: parte experimental, item 3.7.

## 4.2.1.6.1. Análise do micélio

O aumento da massa micelial na biorreação foi de 75% enquanto que no controle microbiano foi de 110%, indicando que esse micro-organismo também se desenvolveu melhor na ausência do ácido gálico.

Foram encontrados 6 possíveis produtos de biotransformação adsorvidos ao micélio (**Figura 59**), todos mais apolares que o substrato, uma vez que possuem maior tempo de retenção. Os produtos **1**, **2** e **3** apresentam pelo menos duas bandas de absorção entre 212 e 330 nm, diferente dos compostos **4**, **5** e **6**, que possuem uma única banda em 219 nm (**Figura 60**). Supondo que estes últimos compostos sejam de fato produtos de biotransformação e considerando que não apresentam a banda próxima de 270 nm, característica do anel aromático conjugado com as hidroxilas e a carbonila, nem a banda em 255 nm, característica do anel aromático não conjugado, e que se verificou diminuição da concentração hidrogeniônica no meio reacional, conforme discutido na página anterior, é possível que enzimas oxirredutases estejam presentes no fungo *Xylaria* sp. e tenham reduzido o anel aromático do ácido gálico utilizando os prótons presentes na solução.



**Figura 59** - Cromatogramas dos extratos dos micélios da biotransformação do ác. gálico por *Xylaria* sp. e do controle microbiano. Coluna e condições de análise: parte experimental, item 3.7.

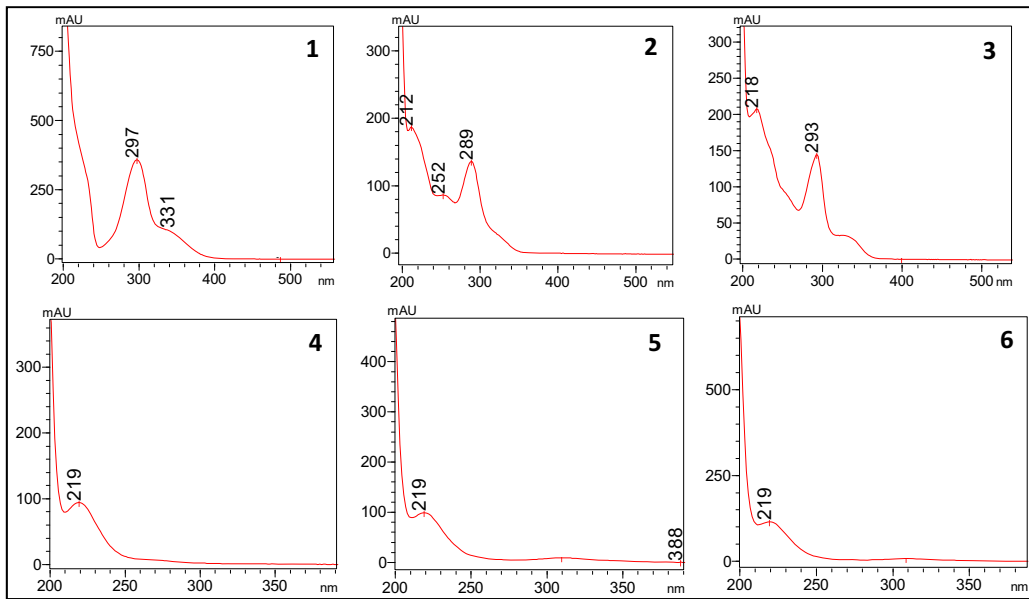


Figura 60 - Espectros na região do UV dos compostos presentes no micélio do endófito *Xylaria* sp.

#### 4.2.1.7. Micro-organismo *Aspergillus versicolor*

O comprimento de onda selecionado para realizar a avaliação biocatalítica do micro-organismo *A. versicolor* foi 254 nm (Figura 61).

O sinal do ácido gálico deixou de ser observado após 9 dias de incubação (Figura 62).

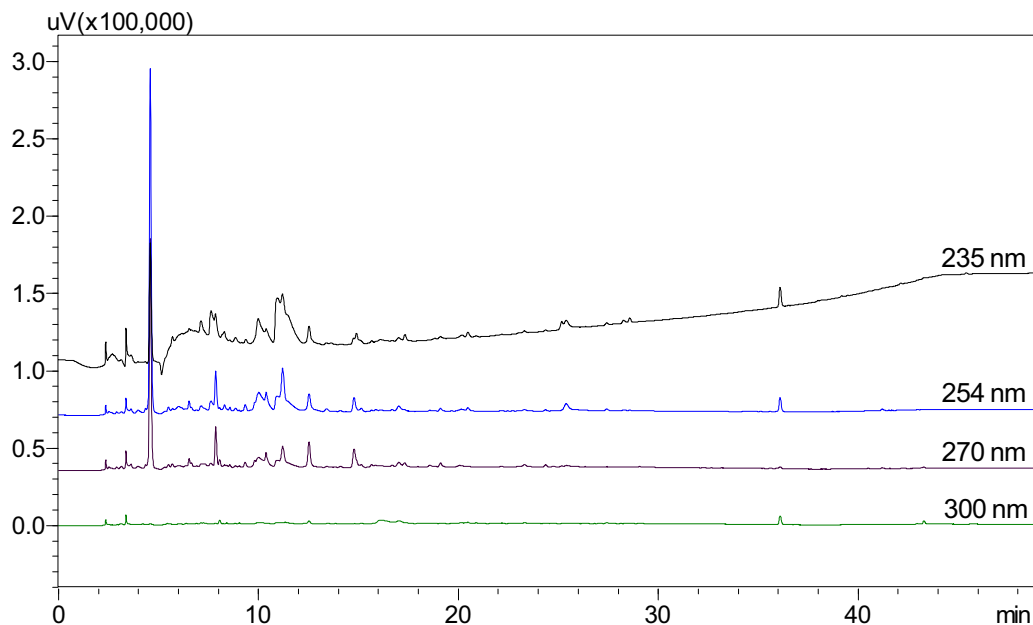
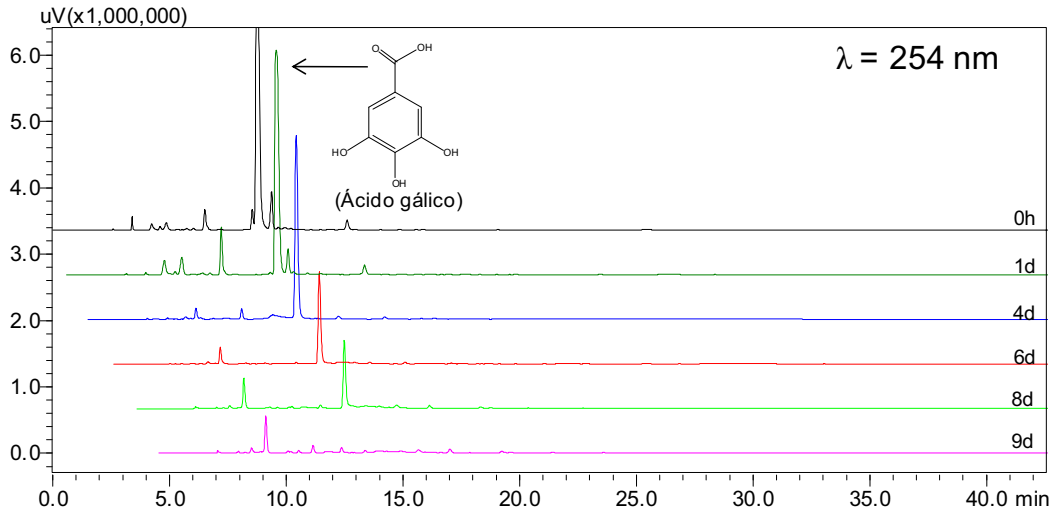
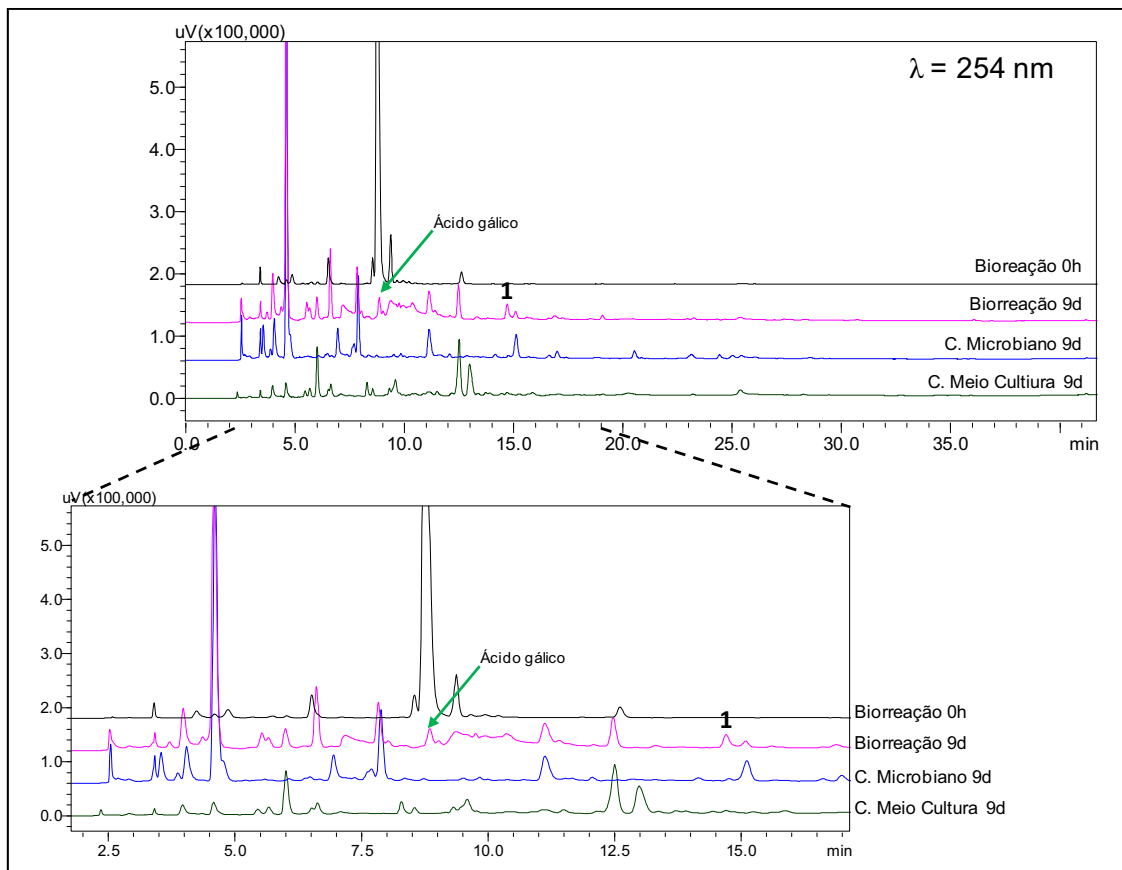


Figura 61 - Cromatogramas, em diferentes  $\lambda$ , da biotransformação do ác. gálico por *A. versicolor*.



**Figura 62** - Cromatogramas do extrato da biotransformação do ác. gálico por *A. versicolor* em diferentes períodos de incubação. Coluna e condições de análise: parte experimental, item 3.7.

Analisando-se os cromatogramas apresentados na **Figura 63** constatou-se que mesmo após 9 dias de incubação havia uma pequena quantidade do substrato ácido gálico no meio reacional. Constatou-se também que apenas um possível produto biotransformado (1) com  $t_R$  14, 69 min e banda no UV em 266 nm foi encontrado na fase aquosa.

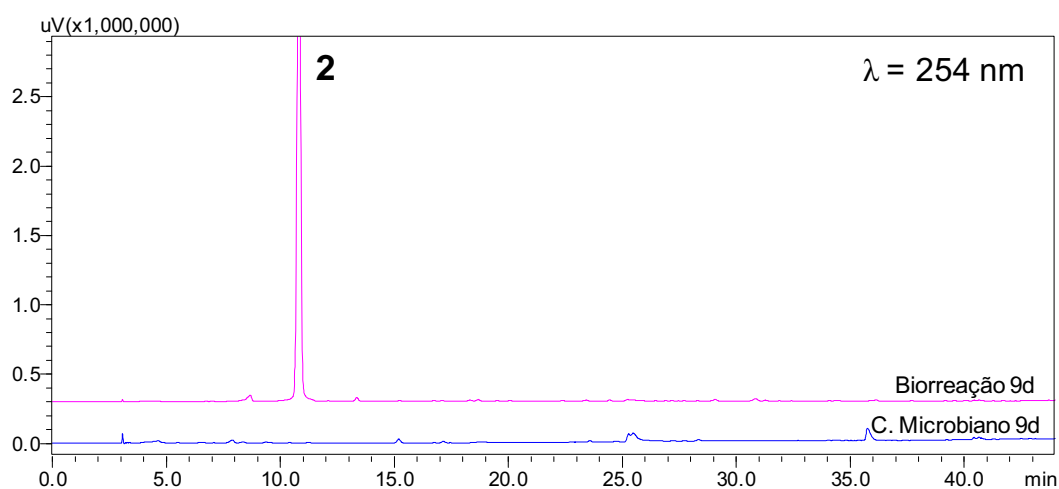


**Figura 63** - Cromatogramas da biotransformação do ác. gálico por *A. versicolor* e dos controles microbiano e meio de cultura. Coluna e condições de análise: parte experimental, item 3.7.

## 4.2.1.7.1. Análise do micélio

A exemplo do que foi observado para os seis fungos anteriores, o aumento da massa micelial na biorreação foi menor (190%) que no controle microbiano (225%). Dessa forma, estima-se que o substrato ácido gálico dificultou o desenvolvimento dos sete fungos endófitos estudados.

A **Figura 64** evidencia a presença de um único possível produto biotransformado (**2**) adsorvido ao micélio fúngico. Essa substância apresenta  $t_R$  10,81 min e banda no UV em 275 nm, indicando que se trata de substância ligeiramente mais apolar que o ácido gálico.



**Figura 64** - Cromatogramas dos extratos dos micélios da biotransformação do ác. gálico por *A. versicolor* e do controle microbiano. Coluna e condições de análise: parte experimental, item 3.7.

A **Tabela 1** apresenta o resumo dos resultados obtidos na biotransformação do ácido gálico. Os 7 fungos endófitos metabolizaram o ácido gálico em 26 novos produtos, em poucos dias de incubação. Os possíveis produtos biotransformados são mais apolares que o ácido gálico e foram encontrados na fase aquosa e/ou no micélio. A diferença nos tempos de retenção e absorção no UV dos possíveis metabólitos biotransformados evidencia que os complexos enzimáticos dos micro-organismos são variados, de modo que podem ter biotransformado o mesmo substrato em diferentes compostos. Os possíveis produtos biotransformados terão suas estruturas determinadas em trabalhos futuros, e a partir destes dados poderemos inferir as reações que os fungos são realmente capazes de realizar, e consequentemente sugerir as classes de enzimas presentes nesses micro-organismos.

Considerando que as biotransformações podem ter potencializado as atividades biológicas do ácido gálico, estudos futuros sobre o tema poderão complementar as pesquisas desenvolvidas pelo NuBBE na área de síntese e avaliação das bioatividades de derivados dessa substância.

**Tabela 1** - Tabela que resume os resultados obtidos no estudo de biotransformação do ác. gálico.

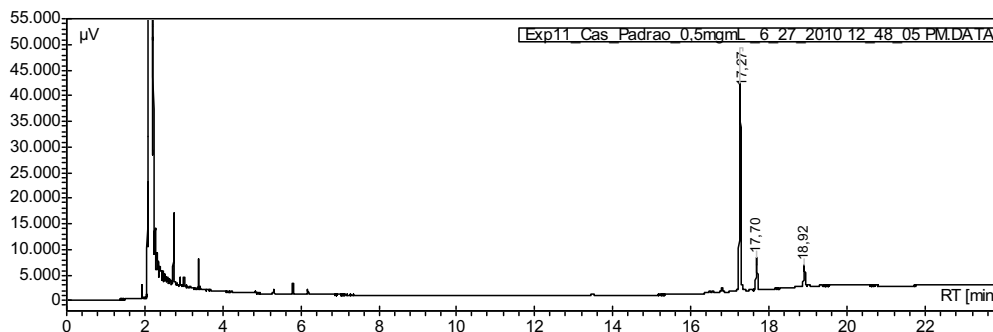
Fungo endofítico	Período de incubação (dias)	Quantidade de produtos biotransformados	Origem dos produtos biotransformados	
			Fase aquosa	Micélio
<i>Nigrospora sphaerica</i>	9	1	1	----
<i>Schizophyllum commune</i>	8	2	2	2 (os mesmos da f. aquosa)
<i>Phomopsis</i> sp.	8	6	5	2 (1 estava presente também na f. aquosa)
<i>Tricoderma viridae</i>	6	4	4	1 (presente também na f. aquosa)
<i>Aspergillus versicolor</i>	9	2	1	1
<i>Xylaria</i> sp.	7	6	----	6
<i>Phomopsis stipata</i>	5	5	3	2

#### 4.2.2. Substrato Cassina

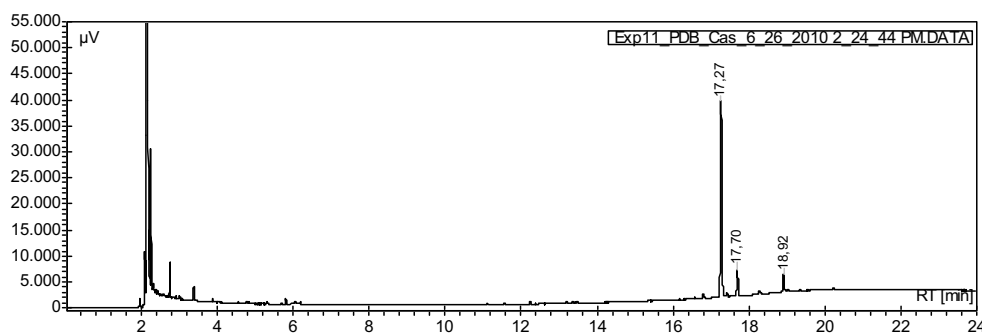
A cassina usada neste trabalho foi isolada em mistura, com dois outros compostos, das flores da espécie vegetal *Senna spectabilis* (Leguminosae, Caesalpinioideae) pela Dra. Luciana de Ávila Santos, utilizando metodologia reportada por VIEGAS et al, 2009.

Verifica-se que o cromatograma de uma amostra da cassina (**Figura 65**) apresenta pico intenso com  $t_R$  17,27 min, referente à cassina, e outros dois picos de menor intensidade e tempos de retenção 17,70 e 18,92 min, que se referem a um isômero da cassina e à espectralina (substância homóloga à cassina, possuindo duas unidades metilênicas a mais), respectivamente. Portanto, a cassina empregada no presente trabalho estava na presença de duas outras substâncias minoritárias.

Assim como foi realizado para o ácido gálico, avaliou-se a estabilidade da cassina nas condições em que o estudo biocatalítico foi desenvolvido. Um frasco contendo apenas meio de cultura MBD e a cassina foi incubado por 14 dias, e o extrato resultante foi analisado por CG. O cromatograma obtido evidenciou a estabilidade desse substrato (**Figura 66**).



**Figura 65** - Cromatograma da amostra da cassina na concentração  $0,5 \text{ g L}^{-1}$ . Coluna: SPB-5; condições de análise: parte experimental, item 3.7.



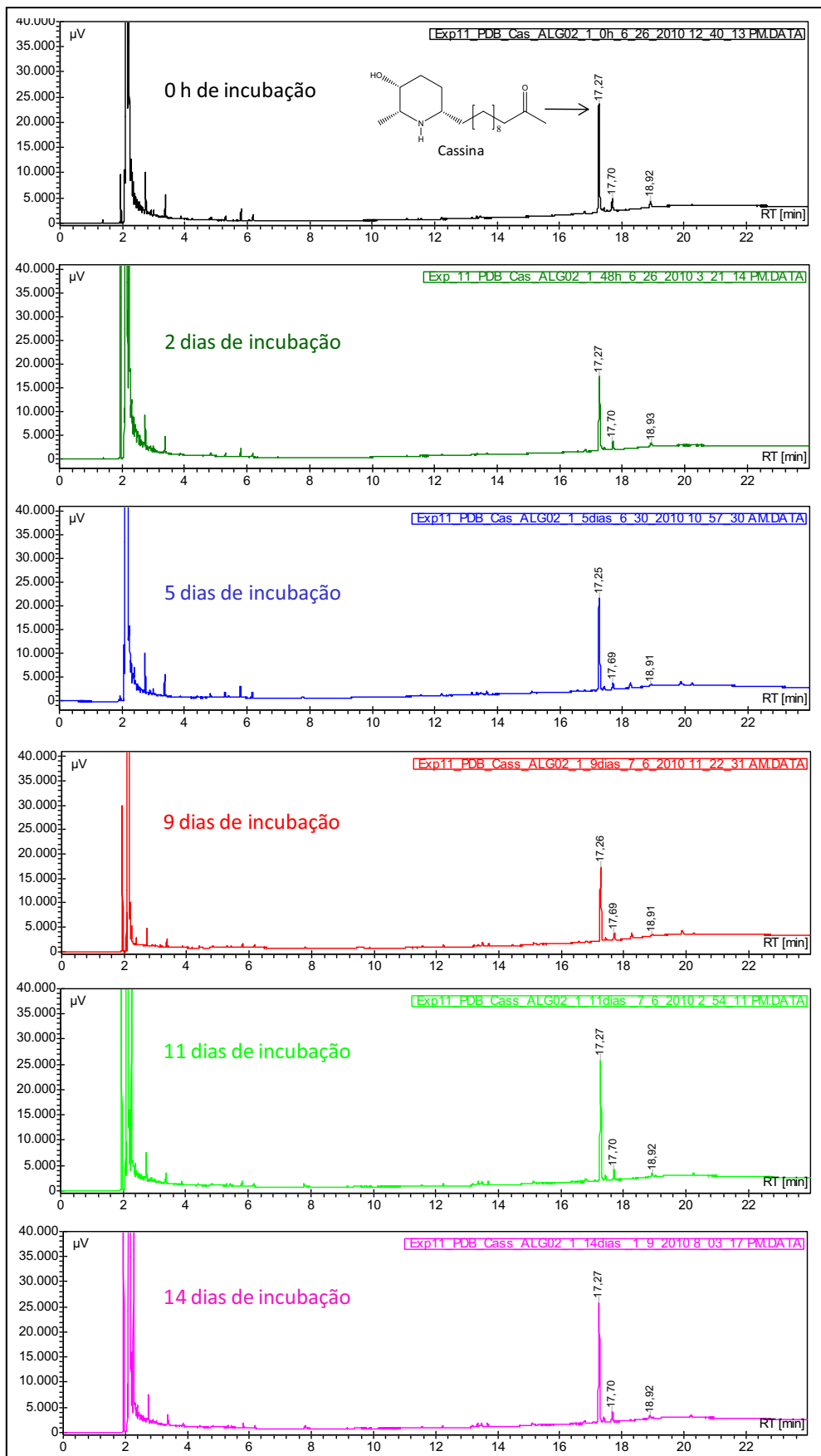
**Figura 66** - Cromatograma obtido na avaliação da estabilidade da cassina nas condições em que a avaliação biocatalítica foi desenvolvida. Coluna: SPB-5; condições de análise: item 3.7.

#### 4.2.2.1. Micro-organismo *Schizophyllum commune*

O micro-organismo *S. commune* não metabolizou a cassina, mesmo após 14 dias de incubação, conforme é evidenciado na **Figura 67 (pág. 81)**.

Esse fungo se desenvolveu de maneira diferente na presença da cassina, de forma que no frasco da biorreação o micélio cresceu mais lentamente e na forma de pequenos flóculos (**Figura 68, pág. 82**).

Após as 2 semanas de incubação, os micélios foram separados da fase líquida e tiveram suas massas comparadas com as iniciais, o que possibilitou a avaliação do crescimento fúngico. A massa do micélio na biorreação aumentou apenas 200%, enquanto que no frasco sem a cassina (controle microbiano) aumentou 350%, indicando que o desenvolvimento do endófito foi inibido pelo substrato.



**Figura 67** - Cromatogramas da biorreação (em diferentes períodos de incubação) obtidos no estudo de biotransformação/biodegradação da cassina por *S. commune*. Coluna: SPB-5; condições de análise: parte experimental, item 3.7.



**Figura 68** - Aspecto do micélio fúngico no estudo de biotransformação/biodegradação da cassina por *S. commune* (após 2 semanas de incubação): **a)** Controle microbiano; **b)** Biorreação.

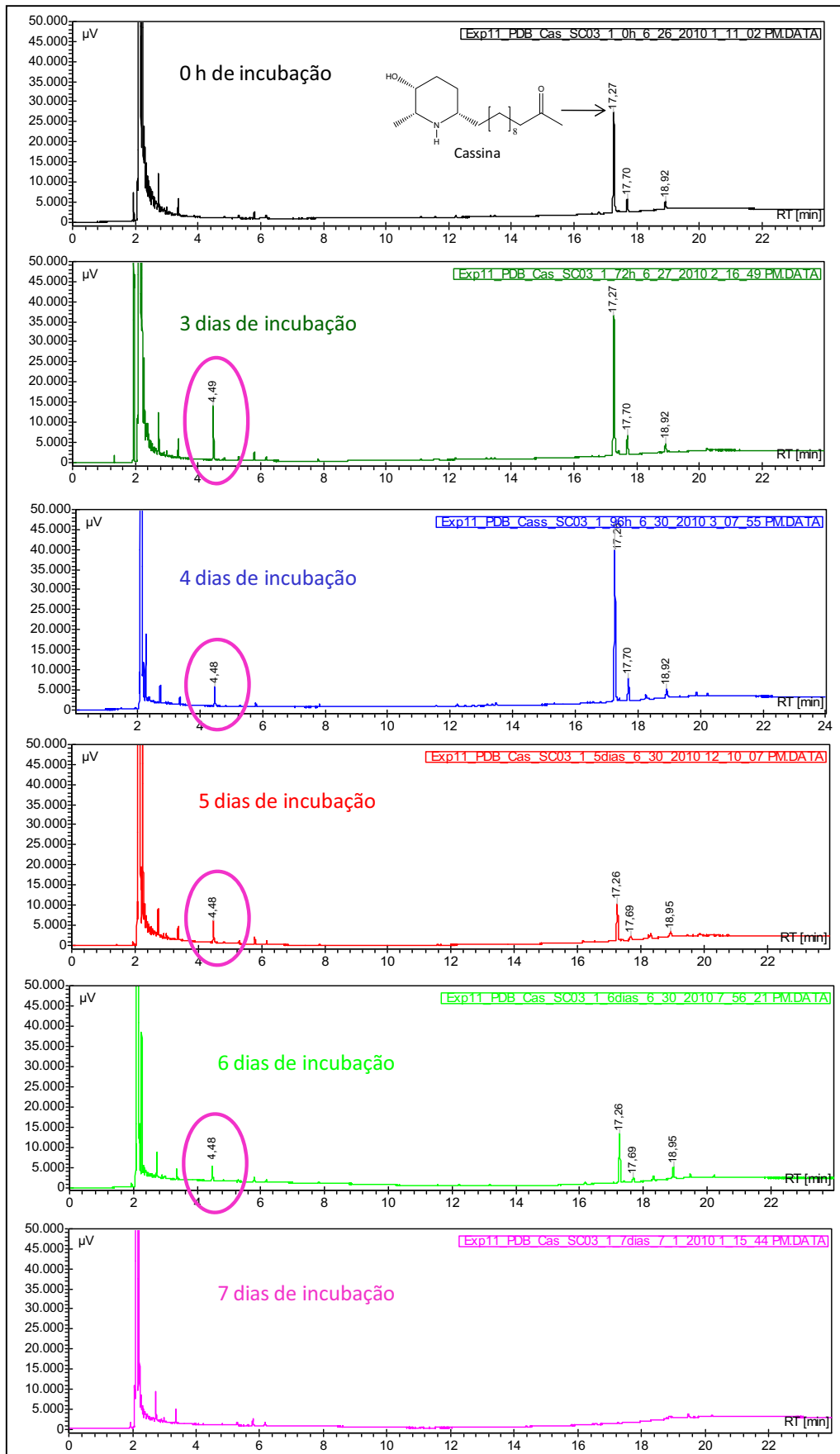
É provável que *S. commune* não tenha metabolizado a cassina devido a esta substância ser potencialmente tóxica na concentração em que foi empregada. Estima-se que se esse estudo biocatalítico tivesse sido realizado com a cassina na concentração  $0,25 \text{ g L}^{-1}$ , concentração em que o endófito se desenvolveu satisfatoriamente na etapa de avaliação da tolerância do micro-organismo ao substrato (**Figura 17, pág. 47**), este substrato teria sido biotransformado ou biodegradado.

#### 4.2.2.2. Micro-organismo *Phomopsis stipata*

No estudo de biotransformação/biodegradação da cassina pelo micro-organismo *P. stipata*, observou-se que no quinto dia de incubação surgiu uma coloração escura, que não foi observada no controle microbiano (**Figura 69**). Após 7 dias de incubação, o sinal referente à cassina deixou de ser observado (**Figura 70**).

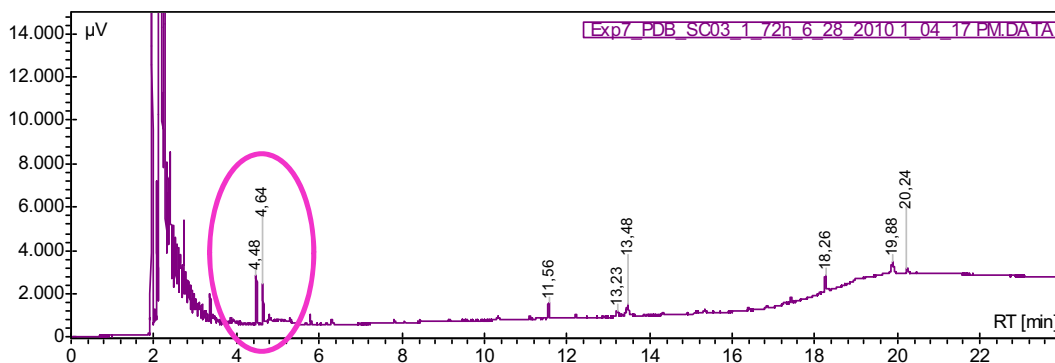


**Figura 69** - Aspecto dos meios reacionais no estudo de biotransformação/biodegradação da cassina por *P. stipata*, no quinto dia de incubação **a)** Controles microbianos; **b)** Biorreações.



**Figura 70** - Cromatogramas da bioreação (em diferentes períodos de incubação) obtidos no estudo de biotransformação/biodegradação da cassina por *P. stipitata*. Coluna: SPB-5; condições de análise: parte experimental, item 3.7.

A partir do terceiro dia de incubação surgiu um pico com  $t_R$  4,49 min, cuja intensidade diminuiu com o tempo e deixou de ser observado no sétimo dia. Descartou-se a possibilidade desse pico ser um produto de biotransformação, que teria sido formado e depois consumido pelo micro-organismo, ao analisar o controle microbiano. O cromatograma do controle microbiano (após 3 dias de incubação) apresentou um pico com mesmo tempo de retenção (**Figura 71**), o que se conclui que o pico com  $t_R$  4,49 min na biorreação se refere a um metabólito microbiano.



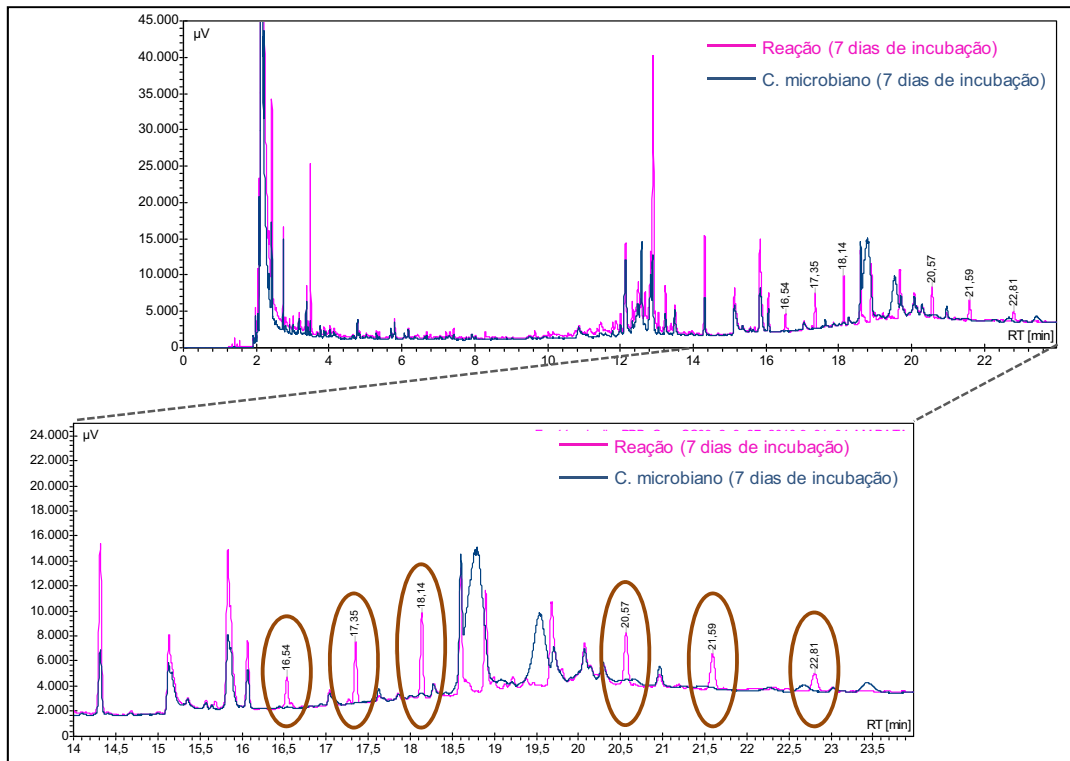
**Figura 71** - Cromatograma do controle microbiano obtido no estudo de biotransformação/biodegradação da cassina por *P. stipata* após 3 dias de incubação. Coluna: SPB-5; condições de análise: parte experimental, item 3.7.

#### 4.2.2.2.1. Análise do micélio

O aumento da massa do micélio na biorreação foi maior (290%) que no controle microbiano (79%), sugerindo que a cassina contribuiu para o desenvolvimento do micro-organismo.

A **Figura 72** mostra a presença de 6 substâncias no micélio da biorreação que não foram identificados no micélio do controle microbiano, sendo, portanto, candidatos a produtos de biotransformação. É possível que essas substâncias sejam a causa da coloração escura que surgiu no meio reacional durante a incubação.

Dessa forma, estima-se que o endófito *P. stipata* biotransformou a cassina em 6 novos compostos, os quais foram encontrados apenas no micélio microbiano.

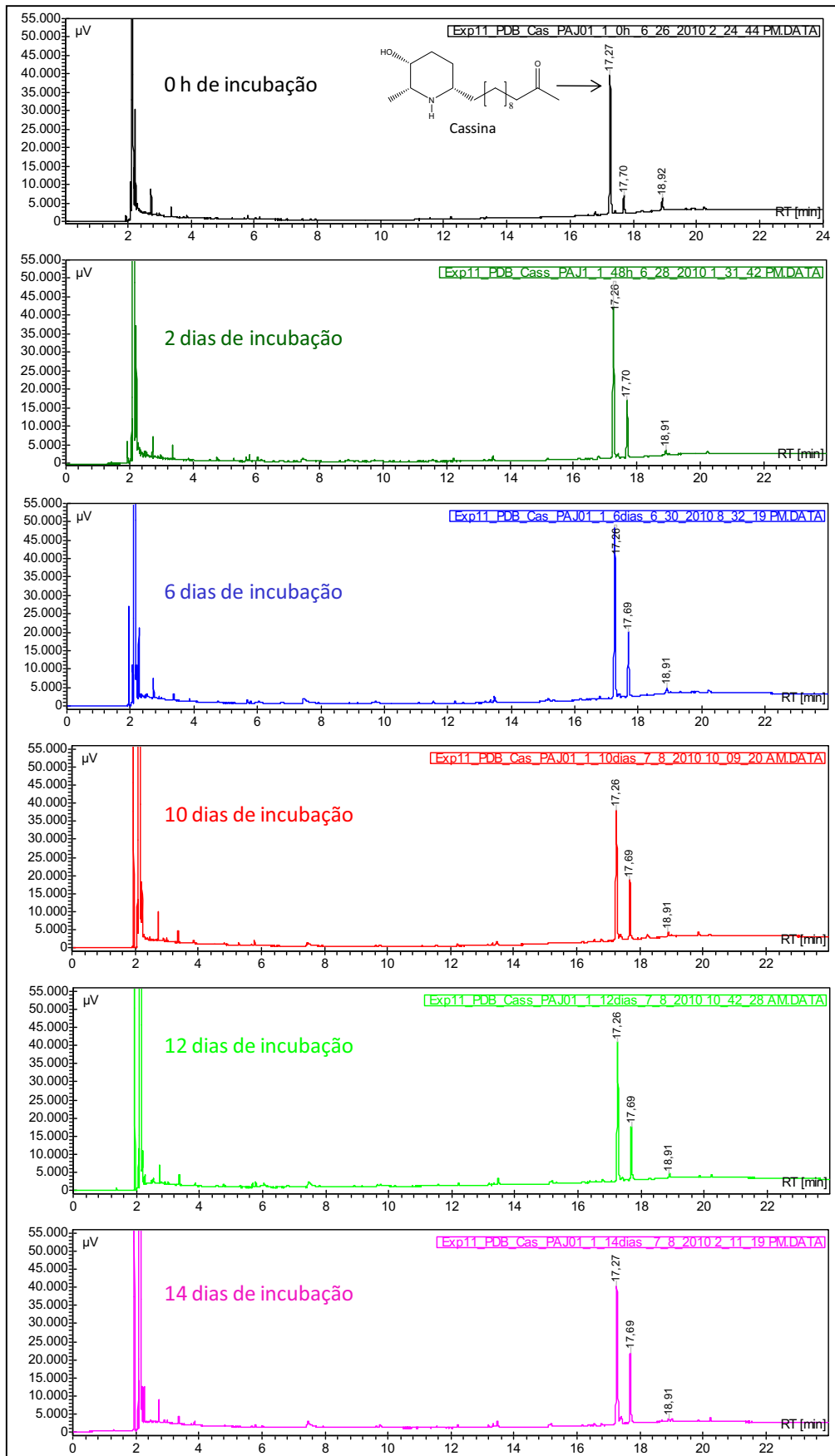


**Figura 72** - Cromatogramas dos micélios do controle microbiano e da biorreação obtidos no estudo de biotransformação/biodegradação da cassina por *P. stipata*. Coluna: SPB-5; condições de análise: parte experimental, item 3.7.

#### 4.2.2.3. Micro-organismo *Tricoderma viridae*

O endófito *T. viridae* não metabolizou a cassina, pois o pico desse composto foi identificado com a mesma intensidade após duas semanas de incubação (**Figura 73**).

O aumento da massa úmida do micélio na biorreação foi ligeiramente menor (20%) que no controle microbiano (30%), o que pode indicar uma pequena inibição de crescimento do micro-organismo pela cassina. Esse resultado está de acordo com o obtido na etapa de avaliação da tolerância do endófito ao substrato (**Figura 15, pág. 46**), onde o micélio aéreo não se desenvolveu na presença da cassina.

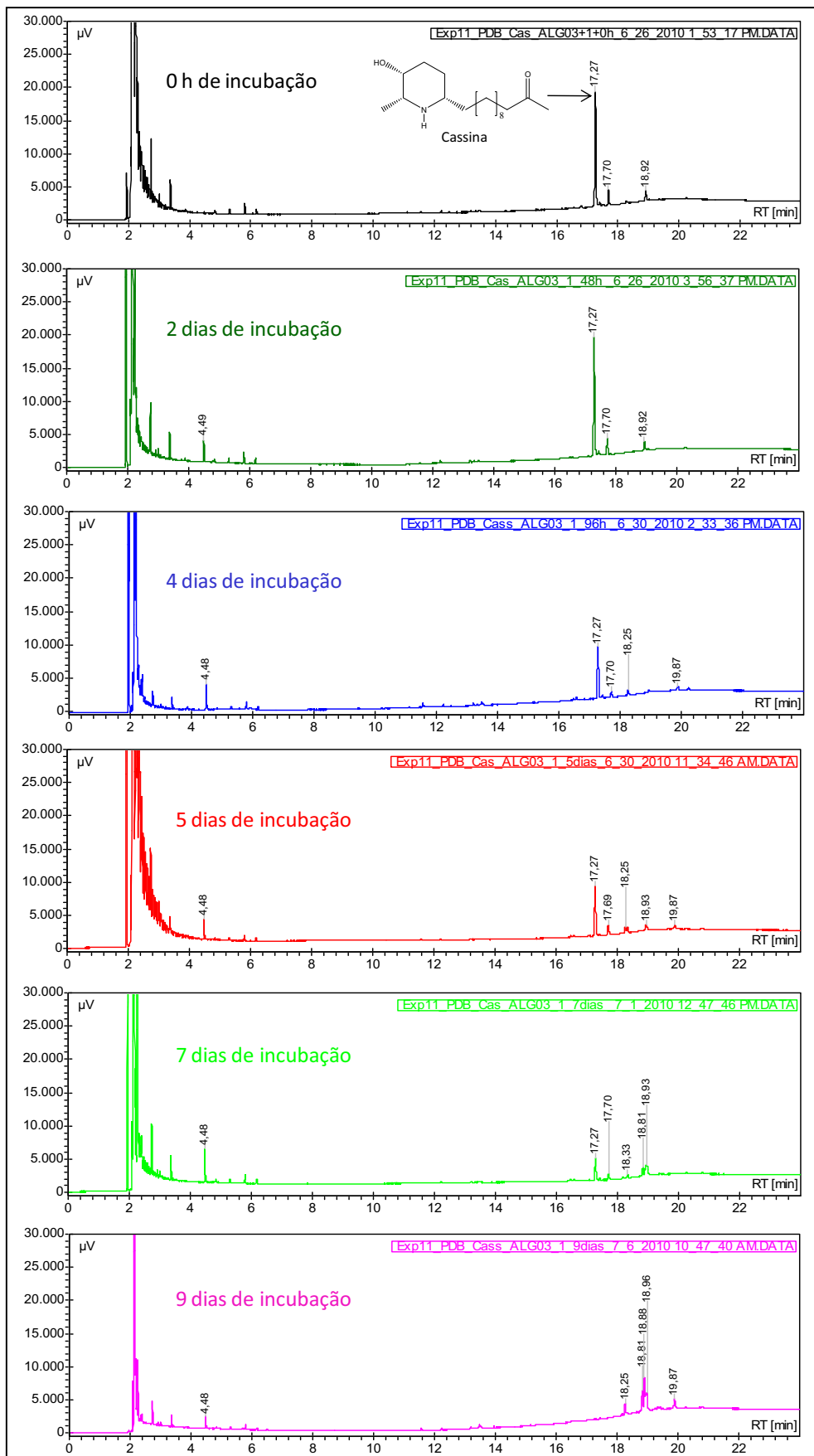


**Figura 73** - Cromatogramas da biorreação (em diferentes períodos de incubação) obtidos no estudo de biotransformação/biodegradação da cassina por *T. viridae*. Coluna: SPB-5; condições de análise: parte experimental, item 3.7.

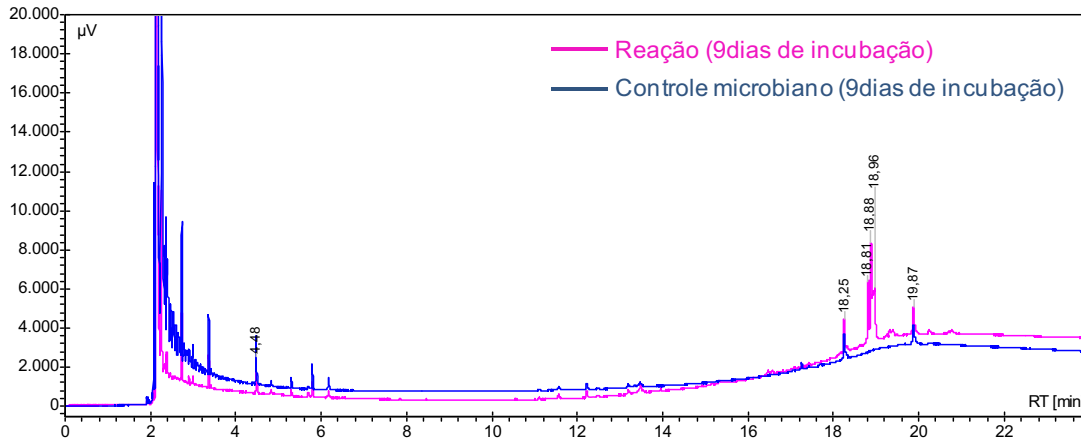
#### 4.2.2.4. Micro-organismo *Phomopsis* sp.

A intensidade do pico da cassina diminuiu com o tempo de incubação, de forma que após 9 dias desapareceu completamente, sugerindo a metabolização dessa substância pelo endófito (**Figura 74, pág. 88**). Surgiram seis novos picos com tempos de retenção 4,48; 18,25; 18,81; 18,88; 18,96 e 19,87 min.

Comparando-se o cromatograma da biorreação com o do controle microbiano (**Figura 75, pág. 89**), constatou-se que apenas os picos com  $t_R$  18,81; 18,88 e 18,96 min podem se referir a produtos biotransformados. Os demais, por estarem presentes no controle microbiano, são metabólitos produzidos pelo micro-organismo.



**Figura 74** - Cromatogramas da biorreação (em diferentes períodos de incubação) obtidos no estudo de biotransformação/biodegradação da cassina por *Phomopsis* sp. Coluna: SPB-5; condições de análise: parte experimental, item 3.7.

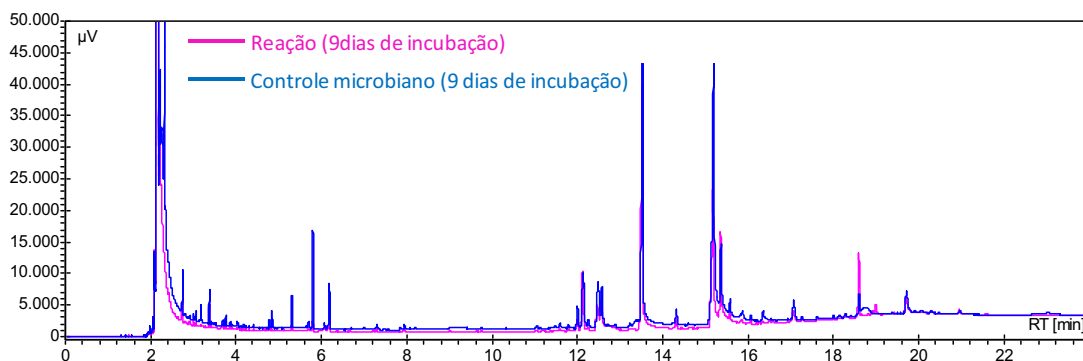


**Figura 75** - Cromatogramas da biorreação e do controle microbiano obtidos no estudo de biotransformação/biodegradação da cassina por *Phomopsis* sp. após 9 dias de incubação. Coluna: SPB-5; condições de análise: parte experimental, item 3.7.

#### 4.2.2.4.1. Análise do micélio

O aumento da massa micelial na biorreação foi de 210% e no controle microbiano 270%. A **Figura 76** mostra que todos os picos presentes na biorreação também foram encontrados no controle microbiano, o que indica que não havia produtos biotransformados no micélio.

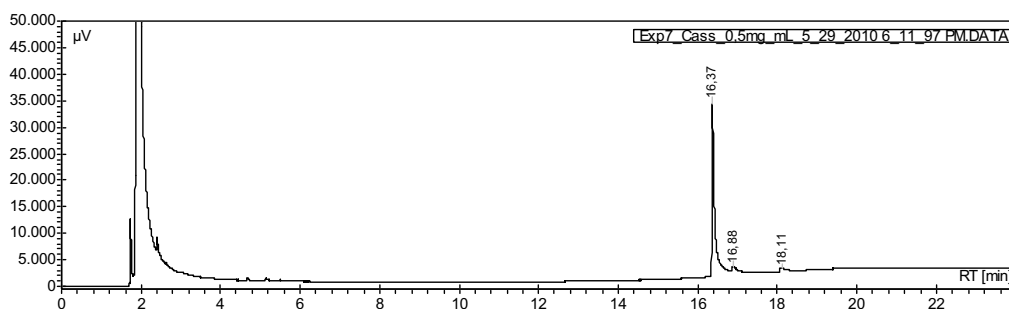
Com base nos resultados obtidos conclui-se que o endófito *Phomopsis* sp. pode ter biotransformado a cassina em 3 novas substâncias, as quais foram encontradas apenas no meio aquoso. A outra possibilidade é que uma nova rota biossintética tenha sido induzida no fungo pela metabolização da cassina, de modo que as 3 substâncias formadas no meio reacional sejam novos metabólitos fúngicos.



**Figura 76** - Cromatogramas dos micélios do controle microbiano e da biorreação obtidos no estudo de biotransformação/biodegradação da cassina por *Phomopsis* sp. Coluna: SPB-5; condições de análise: parte experimental, item 3.7.

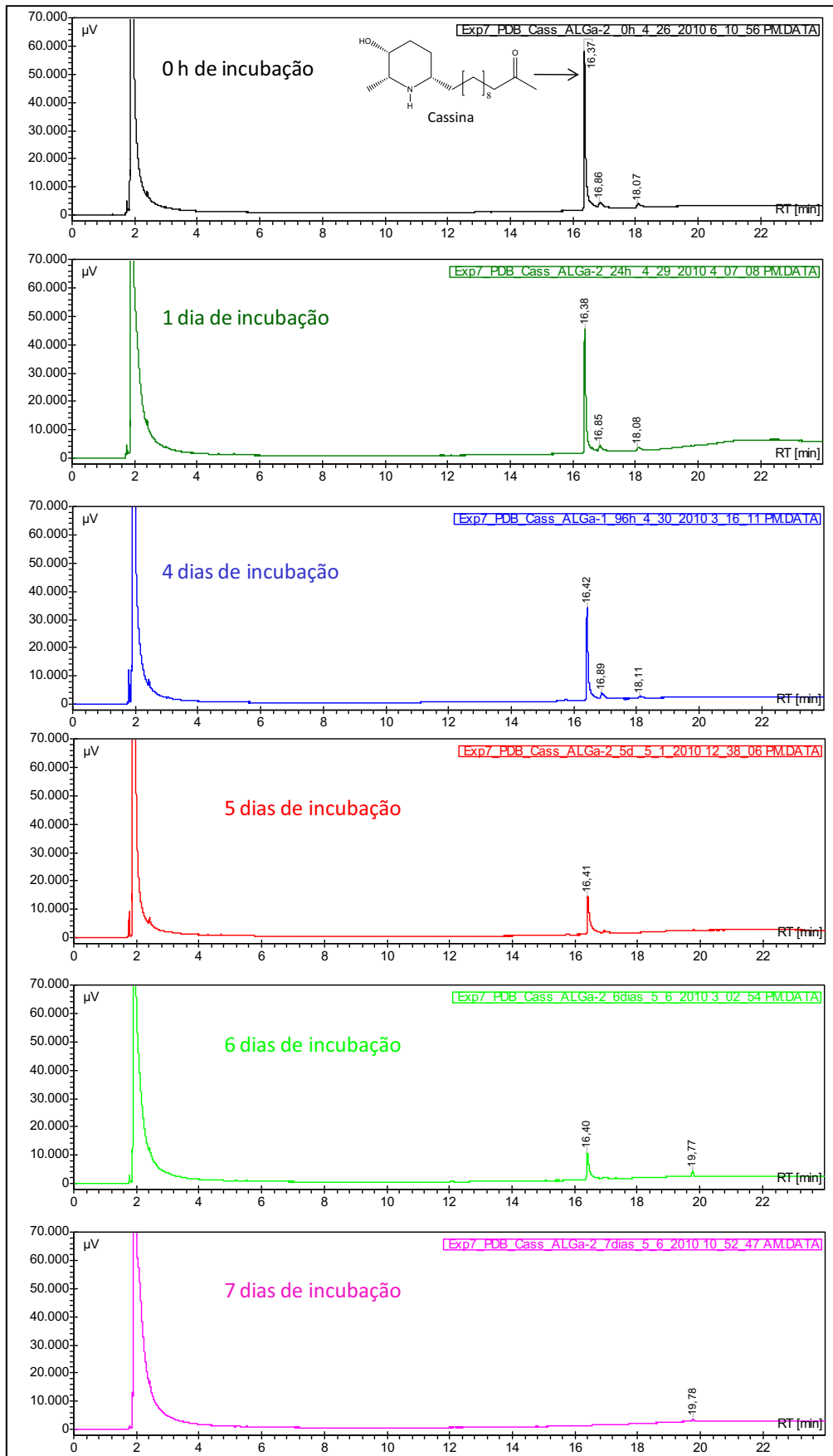
#### 4.2.2.5. Micro-organismo *Nigrospora sphaerica*

A coluna da marca Phenomenex, utilizada nas análises anteriores, foi trocada por uma coluna do mesmo tipo (5% fenil – 95% dimetilpolisiloxano), mas de marca diferente: Supelco. Devido a isso o  $t_R$  da cassina passou a ser 16,37 min (**Figura 77**).

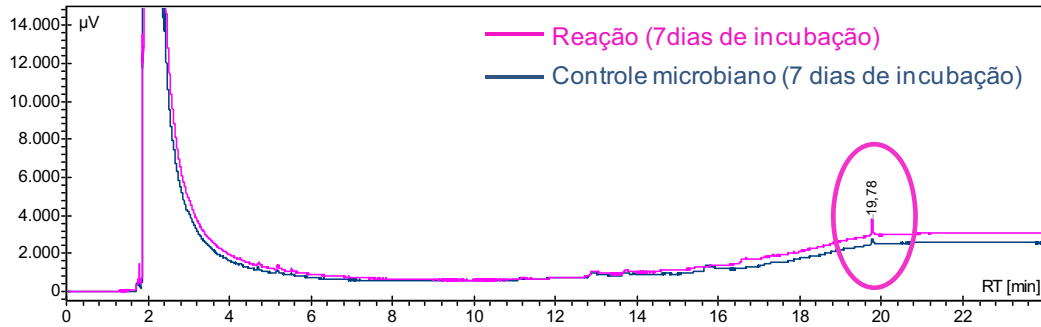


**Figura 77** - Cromatograma da amostra da cassina (concentração  $0,5 \text{ g L}^{-1}$ ) que evidencia a alteração no  $t_R$  dessa substância devido a troca de coluna. Coluna: ZB-5; condições de análise: item 3.7.

O endófito *N. sphaerica* foi capaz de metabolizar a cassina após 7 dias de incubação (**Figura 78, pág. 91**). No sexto dia, surgiu um novo composto com  $t_R$  19,77 min, o qual é um metabólito fúngico, pois também foi identificado no controle microbiano (**Figura 79, pág. 92**).



**Figura 78** - Cromatogramas da biorreação (em diferentes períodos de incubação) obtidos no estudo de biotransformação/biodegradação da cassina por *N. sphaerica*. Coluna e condições de análise: parte experimental, item 3.7.



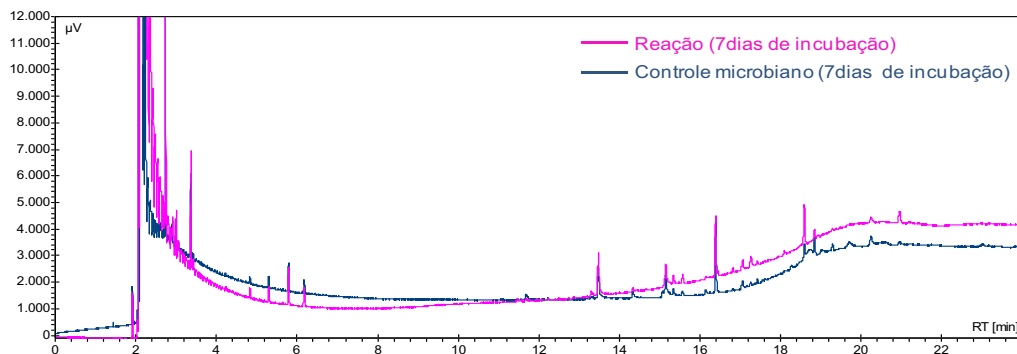
**Figura 79** - Cromatogramas da biorreação e do controle microbiano obtidos no estudo de biotransformação/biodegradação da cassina por *N. sphaerica* após 7 dias de incubação. Coluna: ZB-5; condições de análise: parte experimental, item 3.7.

#### 4.2.2.5.1. Análise do micélio

O aumento da massa micelial na biorreação foi de 160% e no controle microbiano apenas 53%, o que pode indicar que o micro-organismo se desenvolveu melhor na presença da cassina.

Não foram identificados produtos biotransformados no micélio fúngico, pois todos os picos presentes no cromatograma da biorreação estavam no cromatograma do controle microbiano (**Figura 80**).

Considerando que o pico da cassina deixou de ser observado e novos picos não surgiram nos cromatogramas do meio aquoso e do micélio, estima-se que o endófito *N. sphaerica* tenha biodegradado a cassina.



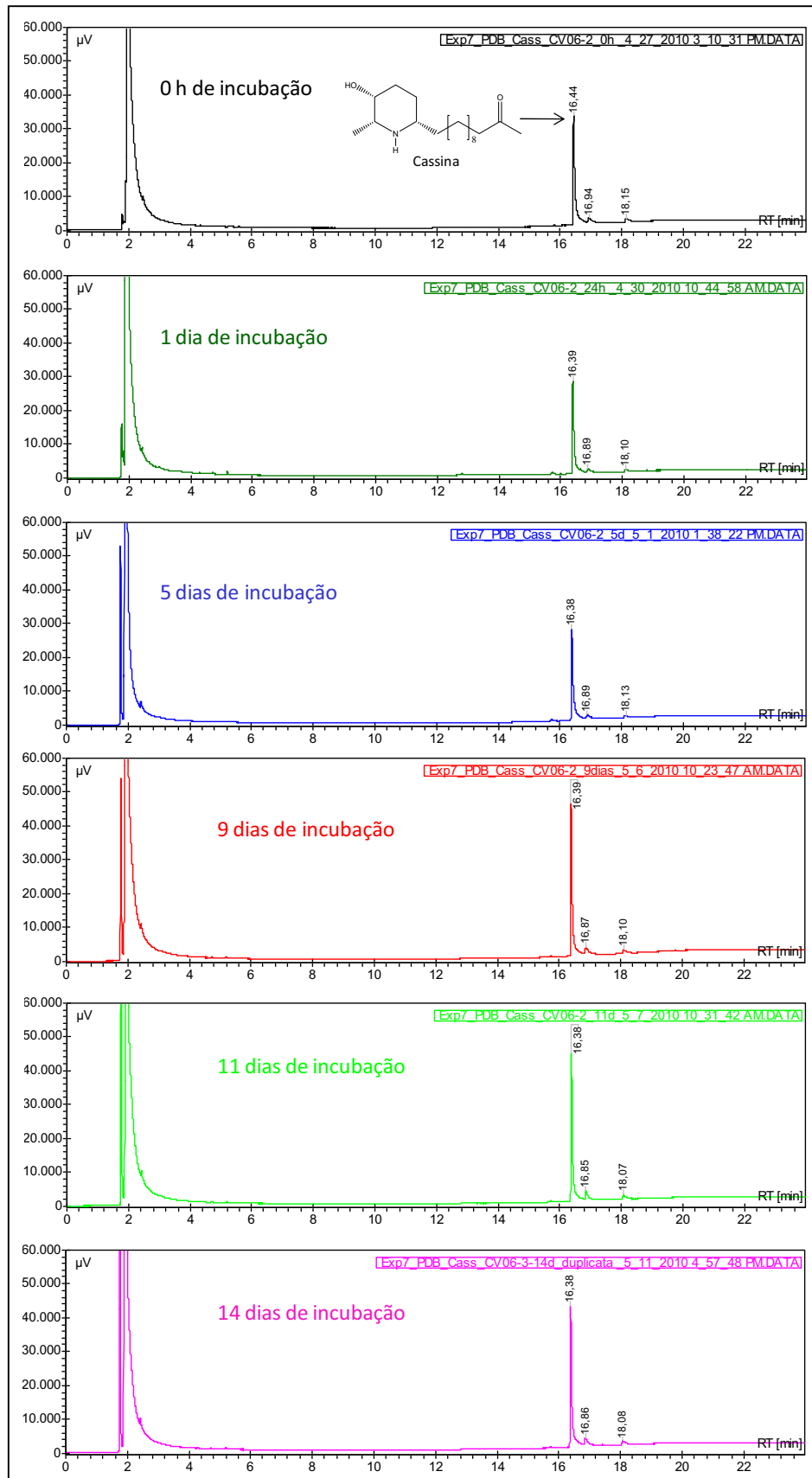
**Figura 80** - Cromatogramas dos micélios do controle microbiano e da biorreação obtidos no estudo de biotransformação/biodegradação da cassina por *N. sphaerica*. Coluna: ZB-5; condições de análise: parte experimental, item 3.7.

4.2.2.6. Micro-organismo *Xylaria* sp.

A **Figura 81 (pág. 94)** evidencia que o micro-organismo *Xylaria* sp. não metabolizou a cassina, pois, mesmo após duas semanas de incubação, o pico referente a este substrato foi observado no meio reacional e não surgiram novos picos.

O aumento da massa do micélio na biorreação foi menor (50%) que no controle microbiano (80%), sugerindo inibição do crescimento do micro-organismo pela cassina.

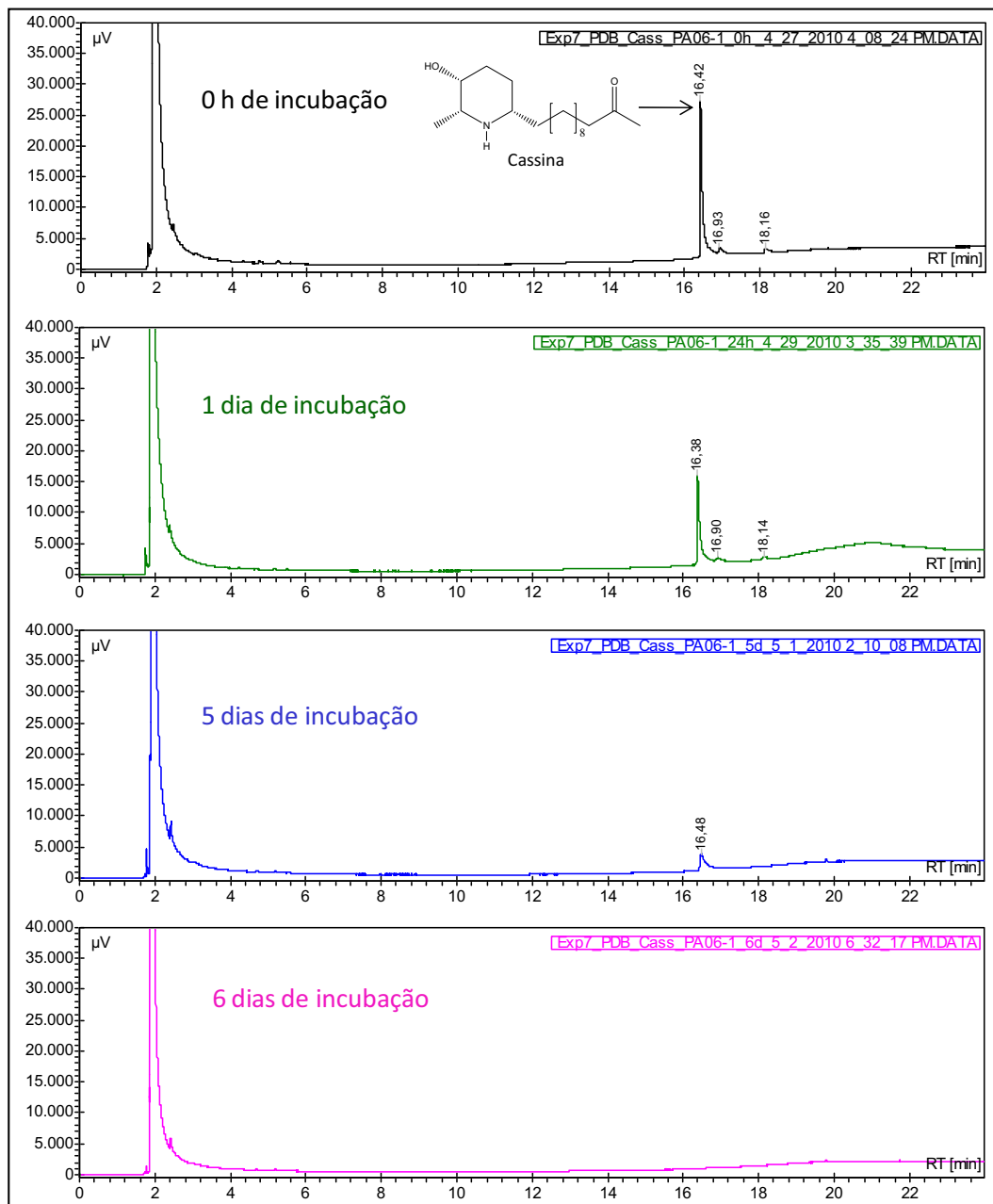
O micélio deste micro-organismo não foi submetido à extração devido a cassina não ter sido biotransformada nem biodegradada.



**Figura 81** - Cromatogramas da biorreação (em diferentes períodos de incubação) obtidos no estudo de biotransformação/biodegradação da cassina por *Xylaria* sp. Coluna: ZB-5; condições de análise: parte experimental, item 3.7.

4.2.2.7. *Micro-organismo Aspergillus versicolor*

O pico da cassina diminuiu conforme aumentou o tempo de incubação, sendo que no sexto dia não foi mais observado. Não houve o surgimento de novos picos, sugerindo a biodegradação da cassina (**Figura 82**).



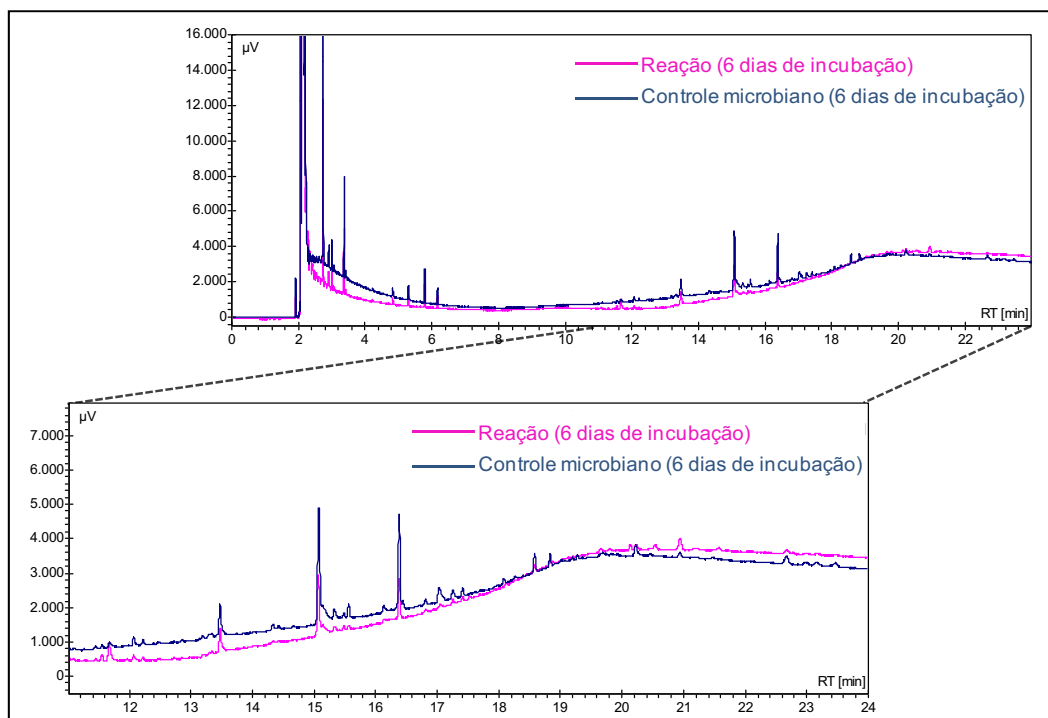
**Figura 82** - Cromatogramas da biorreação (em diferentes períodos de incubação) obtidos no estudo de biotransformação/biodegradação da cassina por *A. versicolor*. Coluna: ZB-5; condições de análise: parte experimental, item 3.7.

## 4.2.2.7.1. Análise do micélio

O aumento da massa do micélio na biorreação e no controle microbiano foi o mesmo, 50%.

Todas as substâncias presentes no micélio da biorreação também foram encontradas no micélio do controle microbiano (**Figura 83**), o que evidenciou a ausência de produtos biotransformados adsorvidos ao micélio.

Os resultados obtidos sugerem que a cassina foi biodegradada pelo endófito *A. versicolor*, pois esse substrato deixou de ser identificado e não surgiram novas substâncias no meio reacional.



**Figura 83** - Cromatogramas dos micélios do controle microbiano e da biorreação obtidos no estudo de biotransformação/biodegradação da cassina por *A. versicolor*. Coluna: ZB-5; condições de análise: parte experimental, item 3.7.

A **Tabela 2** apresenta o resumo dos resultados obtidos no estudo de biotransformação/biodegradação da cassina. Esse substrato não foi metabolizado por três micro-organismos; foi biodegradado por dois micro-organismos e possivelmente biotransformado por outros dois, de forma que os possíveis produtos de biotransformação foram encontrados na fase aquosa ou no micélio.

**Tabela 2** - Tabela que resume os resultados obtidos no estudo de biotransformação/biodegradação da cassina.

Fungo endofítico	Ação do fungo	Período de incubação (dias)	Origem dos produtos biotransformados	
			Fase aquosa	Micélio
<i>Nigrospora sphaerica</i>	Biodegradação	7	----	----
<i>Schizophyllum commune</i>	Não metabolizou	14	----	----
<i>Phomopsis sp.</i>	Biotransformação	9	3	0
<i>Tricoderma viridae</i>	Não metabolizou	14	----	----
<i>Aspergillus versicolor</i>	Biodegradação	6	----	----
<i>Xylaria sp.</i>	Não metabolizou	14	----	----
<i>Phomopsis stipata</i>	Biotransformação	6	0	6

## 5. CONCLUSÕES

Esse trabalho ampliou o enfoque dos estudos desenvolvidos pelo NuBBE na área de fungos endófitos isolados de espécies do bioma Cerrado, contribuindo com avaliação do potencial biocatalítico de 7 micro-organismos.

Os resultados obtidos evidenciaram que os micro-organismos estudados são biocatalisadores promissores. Atuaram sobre duas classes de substâncias, uma mais hidrofílica, o ácido gálico, e outra mais hidrofóbica, a cassina, realizando biotransformações e biodegradações. Três dos micro-organismos também atuaram sobre o corante azul de metileno, descolorindo-o.

Todos os fungos se mostraram capazes de metabolizar o ácido gálico em poucos dias de incubação. Ao todo, constatou-se a formação de 26 possíveis produtos biotransformados, os quais são mais apolares que o composto de partida e foram encontrados na fase aquosa ou adsorvidos ao micélio.

Dos sete micro-organismos estudados, três (*S. commune*, *T. viridae* e *Xylaria* sp.) não metabolizaram a cassina, possivelmente devido a esta substância ser potencialmente tóxica na concentração em que foi empregada. Os fungos *N. sphaerica* e *A. versicolor* biodegradaram esse substrato e *P. stipata* e *Phomopsis* sp. possivelmente o biotransformaram. Os possíveis produtos de biotransformação foram encontrados na fase aquosa ou adsorvidos ao micélio. Esse resultado reforça a necessidade, em estudos que avaliam a biotransformação/biodegradação de um determinado composto, de analisar tanto a fase líquida do meio reacional, quanto o micélio microbiano.

A capacidade dos micro-organismos possivelmente biotransformar o ácido gálico em diferentes substâncias e atuar sobre a cassina biotransformando e biodegradando-a, sugere que os complexos enzimáticos destes endófitos são variados.

Os possíveis produtos de biotransformação do ácido gálico e da cassina terão suas estruturas determinadas em trabalhos futuros, e a partir desses dados poderemos inferir as reações que os fungos são realmente capazes de realizar, e conseqüentemente sugerir as classes de enzimas presentes nesses micro-organismos.

## REFERÊNCIAS

AGUSTA, A.; MAEHARA, S.; OHASHI, K.; SIMANJUNTAK, P.; SHIBUYA, H. Stereoselective oxidation at C-4 of flavons by the endophytic fungus *Diaporthe* sp. Isolated from a tea plant. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, v. 53, n. 12, p. 1565-1569, 2005.

AMARAL, L. S.; MURGU, M.; RODRIGUES, E. F.; SOUZA, Q. L.; SARQUIS, M. I. M. A saponin tolerant and glycoside producer xylariaceous fungus. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 24, n. 8, p.1341-1348, 2008.

ANDREWS, J. H.; HIRANO, S. S. **Microbial ecology of leaves** springer. New York: Springer-Verlag, 1991. 499 p.

ARAUJO, A. R.; LEPTOKARYDIS, I. H.; YOUNG, M. C. M.; NASSER, M. L.; SILVA, D. H. S.; SILVA, G. H. Two new bioactive metabolites produced by *Colletotrichum gloeosporioides* an endophytic fungus of *Michelia champaca* L. **Planta Medica**, v. 74, p. 1057-1058, 2008.

AZEVEDO, J. L. Biodiversidade microbiana e potencial biotecnológico. In: MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. **Ecologia microbiana**. Jaguariúna: Embrapa-CNPMA, 1998. v. 1, cap. 3, p.116-137.

BACON, C. W.; GLEN, A. E.; HILTON, D. M.; YATES, I. E. Detoxification of corn antimicrobial compounds as the basis for isolating *fusarium verticillioides* and some other *Fusarium* species from Corn. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, n. 7, p. 2973-2981, 2001.

BALAN, D. S. L.; MONTEIRO, R. T. R. Decolorization of textile ingigo dye by lignolytic fungi. **Journal of Biotechnology**, v. 89, p.141-145, 2001.

BORGES, K. B.; BORGES, W. D.; PUPO, M. T.; BONATO, P. S. Stereoselective analysis of thioridazine-2-sulfoxide and thioridazine-5-sulfoxide: an investigation of rac-thioridazine biotransformation by some endophytic fungi. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 46, p. 945-952, 2008.

BORGES, K. B.; BORGES, W. D.; PUPO, M. T.; BONATO, P. S. Endofitic fungi as models for the stereoselective biotransformation of thioridazine. **Applied Microbial and Cell Physiology**, v. 77, p. 669-674, 2007.

CAFÊU, M. C. **Estudo químico e avaliação biológica dos fungos endofíticos *Xylaria* sp. e *Colletotrichum crassipes* isolados de *Casearia sylvestris* (Flacourtiaceae)**. 2007. 255 f. Tese (Doutorado em Química Orgânica) – Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2007.

CALVO, T. R. **Uso sustentável da biodiversidade brasileira - prospecção químico- farmacológica em plantas superiores: *Alchornea glandulosa*, *Alchornea triplinervia* (Euphorbiaceae), *Indigofera truxillensis* e *Indigofera suffruticosa* (Fabaceae)**. 2007. 216 f. Tese (Doutorado em Química Orgânica) – Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2007.

CARVALHO, G. A.; OLIVEIRA, C. M.; TELES, H. L.; CASTROGAMBOA, I.; SILVA, D. H. S.; BOLZANI, V. S.; YOUNG, M. C. M.; COSTA NETO, C. M.; PFENNING, H. L. H.; BERLINCK, R. G. S.; ARAUJO, A. R. Sesquiterpenes from *Xylaria* sp., an endophytic fungus associated with *Piper aduncum* (Piperaceae). **Phytochemistry Letters**, v. 3, p. 164-167, 2010.

CHEQUER, F. M. D.; ANGELI, J. P. F.; FERRAZ, E. R. A.; TSUBOY, M. S.; MARCARINI, J. C.; MANTOVANI, M. S.; OLIVEIRA, D. P. The azo dyes disperse red 1 and disperse orange 1 increase the micronuclei frequencies in lymphocytes and in hepG2 cells. **Mutation Research**, v. 676, p. 83-86, 2009.

COLLADO, I. Z.; ALEU, J. Biotransformations by botrytis species. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 13, p. 77-93, 2001.

CONTI, R.; RODRIGUES, J. A.; MORAN, P. J. S. Biocatálise: avanços recentes. **Química Nova**, v. 24, n. 5, p. 672-674, 2001.

COUTINHO, E. M. O. **Estudo fitoquímico e de atividade biológica de espécies de *Solanum* (Solanaceae)**. 2009. 172 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2009.

CZARNIK, A. W. Special issue on combinatorial chemistry. **Accounts of Chemical Research**, v. 29, n. 3, p. 112-113, 1996.

DAI, C.; TIAN, C.; ZHAO, Y.; CHEN, Y.; XIE, Y. Degradation of phenanthrene by the endophytic fungus *Ceratobasidium stevensii* found in *Bischofia polycarpa*. **Biodegradation**, v. 21, p. 245-255, 2010.

DOUBLE, M.; KRUTHIVENTI, A. K.; GAIKAR, V. G. **Biotransformation and bioprocesses**. New York: Marcel Dekker, 2004. 371 p. (Biotechnology and bioprocessing).

DREYFUSS, M. M.; CHAPELA, I. H. Potential of fungi in the discovery of novel low-molecular weight pharmaceuticals. In: GULLO, V. P. **The discovery of natural products with therapeutic potential**. Boston: Butterworth-Heinemann, 1994. Cap. 3, p. 49-80.

FABER, K. **Biotransformations in organic chemistry: a textbook**. 5th ed. Berlin: Springer, 2004. 454 p.

FURTADO, N. A. J. C. **Estudo sobre as condições de produção e as atividades antibiótica e antichagásica de substâncias isoladas de *Aspergillus fumigatus***. 2004. 293 f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2004.

GIRI, A.; DHINGRA, V.; GIRI, C. C.; SINGH, A.; OWEN, P. W.; NARASU, M. L. Biotransformations using plant cells, organ cultures and enzyme systems: current trends and future prospects. **Biotechnology Advances**, v. 19, p. 175-199, 2001.

GLAZER, A. N.; NIKALDO, H. **Microbial technology: fundamentals of applied microbiology**. 2nd ed. Nova York: W. H. Freeman, 1995. 662 p.

GLENN, A. E.; MEREDITH, F. I.; MORRISON, W. H.; BACON, C. W. Identification of intermediate and branch metabolites resulting from biotransformation of 2-benzoxazolinone by *Fusarium verticillioides*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, n. 6, p. 3165-3169, 2003.

GUNATILAKA, A. A. L. Natural products from plant-associated microorganisms: distribution, structural diversity, bioactivity, and implications of their occurrence. **Journal of Natural Products**, v. 69, n. 3, p. 509-526, 2006.

HANSON, J. R. **An introduction to biotransformations in organic chemistry**. Oxford: W. H. Freeman, 1995. 92 p. (Chemical & medicinal chemistry series).

- HAWKSWORTH, D. L. The fungal dimension of biodiversity - magnitude, significance, and conservation. **Mycological Research**, v. 95, p. 641-655, 1991.
- HAWKSWORTH, D. L. The magnitude of fungal diversity: the 1.5 million species estimate revisited. **Mycology Research**, v. 105, n. 12, p. 1422-1432, 2001.
- HSU, F. L.; YANG, L. M.; CHANG, S. F.; WANG, L. H.; HSU, C. Y.; LIN, S. J. Biotransformation of gallic acid by *Beauveria sulferescens* ATCC 7159. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 74, n. 3, p. 659-666, 2007.
- INTERNATIONAL UNION OF PURE AND APPLIED CHEMISTRY. **IUPAC compendium of chemical terminology**. 2nd ed. Oxford, 1997. Disponível em: <<http://www.iupac.org/publications/compendium/index.html>>. Acesso em: 30 set. 2010.
- KAMIDA, H. M.; DURRANT, L. R.; MONTEIRO, R. R.; ARMAS, E. D. Biodegradação de efluente têxtil por *Pleurotus sajor-caju*. **Química Nova**, v. 28, n. 4, p. 629-632, 2005.
- LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. **Biotecnologia: tecnologia das fermentações**. São Paulo: Edgard Blücher, 1975. v.1, 286 p.
- MABRY, T. J.; MARKHAN, K. R.; THOMAS, M. B. **The systematic identification of flavonoids**. New York: Springer-Verlag, 1970. 354 p.
- MACHADO, K. M. G.; COMPART, L. C. A.; MORAIS, R. O.; ROSA, L. H.; SANTOS, M. H. Biodegradation of reactive textile dyes by basidiomycetous fungi from brazilian ecosystems. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 37, n. 4, p. 481-487, 2006.
- MAGANO, J. Synthetic approaches to the neuraminidase inhibitors zanamivir (relenza) and oseltamivir phosphate (tamiflu) for the treatment of influenza. **Chemical Reviews**, v. 109, n. 9, p. 4398-4438, 2009.
- MARÓSTICA JUNIOR, M. R.; PASTORE, G. M. Biotransformação de limoneno: uma revisão das principais rotas metabólicas. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 382-387, 2007.

MARTINS, S. R. **Agricultura, ambiente e sustentabilidade**: seus limites para a América Latina. Pelotas: Emater, 2001. 1 CD-ROM.

MAYOR, F. As biotecnologias no início dos anos noventa: êxitos, perspectivas e desafios. **Estudos Avançados**, v. 6, n. 16, p. 7-28, 1992.

MEYER, H.; LERESCHE, J. E. Chemocatalysis and biocatalysis (biotransformation) some thoughts of a chemist and a biotechnologist. **Organic Process Research & Development**, v. 10, n. 6, p. 572-580, 2006.

MIYAZAWA, M.; HASHIMOTO, Y. Microbial resolution of racemic 2-endo-acetoxy-1,8-cineole by *Glomerella cingulata*. **Tetrahedron: Asymmetry**, v. 12, p. 3185-3187, 2001.

MORAIS, M. C. C.; LUQMAN, S.; KONDRATYUK, T. P.; PETRÔNIO, M. S.; REGASINI, L. O.; SILVA, D. H. S.; BOLZANI, V. S.; SOARES, C. P.; PEZZUTO, J. M. Suppression of TNF - a induced NFB activity by gallic acid and its semi-synthetic esters: possible role in cancer chemoprevention. **Natural Product Research**, v. 24, n. 18, p. 1758-1765, 2010.

OLIVEIRA, B. H.; STRAPASSON, R. A. Biotransformation of the monoterpene, limonene, by *Fusarium verticillioides*. **Archives of Biology and Technology**, v. 43, n. 1, p. 11-14, 2000.

OLIVEIRA, C. M.; ARAUJO, A. R.; EVANGELISTA, A. H.; YOUNG, M. C. M.; SILVA, G. H.; ZANARDI, L. M.; BOLZANI, V. S.; REGASINI, L. O. Bioactive metabolites produced by *Penicillium* sp.1 and sp.2, two endophytes associated with *Alibertia macrophylla* (Rubiaceae). **Journal of Biosciences**, v. 64c, p. 824-830, 2009.

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

ORTEGA, S. N.; NITSCHKE, M.; MOUAD, A. M.; LANDGRAF, M. D.; REZENDE, M. O. O.; SELEGHIM, M. H. R.; SETTE, L. D.; PORTO, A. L. M. Isolation of Brazilian marine fungi capable of growing on DDD pesticide. **Biodegradation**, v. 22, p. 43-50, 2011.

PANKE, S.; WUBBOLTS, M. Advances in biocatalytic synthesis of pharmaceutical intermediates. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 9, p. 188-194, 2005.

- PARSHIKOV, I. A.; FREEMAN, J. P.; WILLIAMS, A. J.; MOODY, J. D.; SUTHERLAND, J. B. Biotransformation of N-acetylphenothiazine by fungi. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 52, p. 553-557, 1999.
- PAVIA, D.; LAMPMAN, G.; KRIZ, G. **Introduction to spectroscopy**. 3rd ed. South Melbourne: Brooks/Cole, 2001. 579 p.
- PEDRINI, P.; GIOVANNINI, P. P.; MANTOVANI, M.; ANDREOTTI, E.; COLALONGO, C. Reduction screening with endophytic fungi: synthesis of homochiral secondary alcohols. **Journal Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 60, p. 145-150, 2009.
- PHILLIPS, A.; GERMIDA, J.; FARREL, R.; GREER, C. Hydrocarbon degradation potential and activity of endophytic bacteria associated with prairie plants. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 40, p. 3054-3064, 2008.
- PINEDO-RIVILLA, C.; CAFÊU, M. C.; CASATEJADA, J. A.; ARAUJO, R. A.; COLLADO, I. G. Asymmetric microbial reduction of ketones: absolute configuration of trans-4-ethyl-1-(1S-hydroxyethyl)cyclohexanol. **Tetrahedron: Asymmetry**, v. 20, p. 2666-2672, 2009.
- RODRIGUES, E. F.; SILVA, B. F. Biotransformação utilizando micro-organismos endofíticos: uma abordagem quimio-ecológica. In: MARSOLI, A. J.; PORTO, A. L. M. **Biocatálise e biotransformação: fundamentos e aplicações**. Salto: Schoba, 2010. v. 1, cap. 6, p. 195-249.
- SAID, S.; PIETRO, R. C. L. R. Enzimas termoestáveis industrialmente importantes. In: \_\_\_\_\_. **Enzimas como agentes biotecnológicos**. Ribeirão Preto: Legis Summa, 2004. v. 1, cap. 2, p. 9-20.
- SCHULZ, B.; BOYLE, C. The endophytic continuum. **Mycological Research**, v. 109, n. 6, p. 661-686, 2005.
- SEXTON, A. C.; SARIKAYA, E.; COZIENSEN, A. J.; PEDRAS, M. S. C.; HOWLETT, B. J. Cloning, purification and characterization of brassinoglucoyltransferase, a phytoalexin-detoxifying enzyme from the plant pathogen *Sclerotinia sclerotiorum*. **Fungal Genetics and Biology**, v. 46, p. 201-209, 2009.

SHIBUYA, H.; KITAMURA, C.; MAEHARA, S.; NAGAHATA, M.; WINARNO, H.; SIMANJUNTAK, P.; KIM, H.; WATAYA, Y.; OHASHI, K. Transformation of Cinchona alkaloids into 1-N-oxide derivatives by endophytic *Xylaria* sp. Isolated from *Cinchona pubescens*. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, v. 51, n. 1, p. 71-74, 2003.

SHUMACHER, K.; HEINE, E.; HOCKER, H. Extremozymes for improving wool properties. **Journal of Biotechnology**, v. 89, p. 281-288, 2001.

SILVA, B. F. **Estudo do potencial enzimático de microorganismos endofíticos para a biotransformação de produtos naturais e análogos sintéticos**. 2009. 188 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Centro de Ciências Exatas e Tecnologia, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2009.

SILVA, H. G. **Substâncias bioativas isoladas dos fungos endofíticos *Xylaria* sp, *Phomopsis cassiae* e *Acremonium* sp associados a espécies vegetais do Cerrado**. 2005. 306 f. Tese (Doutorado em Química Orgânica) – Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2005.

SILVA, D. H. S.; VIEGAS, C. V.; SANTOS, L. A. S.; CASTRO-GAMBOA, I.; CAVALHEIRO, A. J.; BOLZANI, V. S.; CASTRO, N. G.; PIVATTO, M.; YOUNG, M. C. M.; ROCHA, M. S.; FRAGA, M. C. A.; BARREIRO, E. J. Espectralina, cassina e análogos semissintéticos como potenciais candidatos a fármacos para o tratamento da doença de Alzheimer. **Revista Virtual de Química**, v. 2, n. 1, p. 38-46, 2010.

SOLOMONS, T. W. G.; CRAIG, B. F. **Química Orgânica**. 9. ed. Rio de Janeiro: TLC, 2009. v. 1, 675 p.

SOUZA, D. D. **Biohidroxilação de substratos orgânicos utilizando o fungo endofítico *Curvularia* sp**. 2008. 72 f. Tese (Mestrado em Química)- Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2008.

STEPHENSON, G. R.; FERRIS, I. G.; HOLLAND, P. T.; NORDBERG, M. Glossary of terms relating to pesticides. **Pure and Applied Chemistry**, v. 78, n. 11, p. 2075-2154, 2006.

STIERLE, A.; STROBEL, G.; STIERLE, D. Taxol and taxane production by *Taxomyces andreanae*, an endophytic fungus of pacific yew. **Science**, v. 260, p. 214-216, 1993.

- STRAATHOF, A. J. J.; PANKE, S.; SCHMID, A. The production of fine chemicals by biotransformations. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 13, p. 548-556, 2002.
- STROBEL, G.; DAISY, B. Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 67, n. 4, p. 491-502, 2003.
- STROBEL, G.; DAISY, B.; CASTILLO, U.; HARPER, J. Natural products from endophytic microorganisms. **Journal of Natural Products**, v. 67, n. 2, p. 257-268, 2004.
- VEIGAS JUNIOR, C.; NICASTRO, P. C.; FOSSALUZZA, P. C.; GOMES, C. P.; SANTOS, L. A.; BOLZANI, V. S.; PIVATO, M.; SILVA, D. J. C.; MELO, G. M. A.; SILVA, Y. K. C.; ALEXANDRE-MOREIRA, M. S.; COSTA, R. S.; AREAS, T. F. M.; CASTRO, N. G. Modificações estruturais na (-)-cassina e LASSBio-767: estratégias para descoberta e otimização de novos candidatos a fármacos. **Revista Virtual de Química**, v. 1, n. 2, p. 117-127, 2009.
- WERNER, C.; PETRINI, O.; HESSE, M. Degradation of the polyamine alkaloid aphelandrine by endophytic fungi isolated from *Aphelandra tetragona*. **Microbiology Letters**, v. 155, p. 147-153, 1997.
- XIMENES, V. F.; LOPES, M. G.; PETRÔNIO, M. S.; REGASINI, L. O.; SILVA, D. H. S.; FONSECA, L. M. Inhibitory effect of gallic acid and its esters on 2,2'-azobis(2-amidinopropane)hydrochloride (AAPH)-induced hemolysis and depletion of intracellular glutathione in erythrocytes. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, p. 5355-5362, 2010.
- YUE, Q.; BACON, C. W.; RICHARDSON, D. M. Biotransformation of 2-benzoxazoline and 6-methoxy-benzoxazoline by *Fusarium moliniforme*. **Phytochemistry**, v. 48, n. 3, p. 451-454, 1998.
- ZIKMUNDOVÁ, M.; DRANDAROV, K.; BIGLER, L.; HESSE, M.; WERNER, C. Biotransformation of 2-benzoxazolinone and 2-hydroxy-1,4-benzoxazin-3-one by endophytic fungi isolated from *Aphelandra tetragona*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, n. 10, p. 4863-4870, 2002.
- ZHANG, J.; ZHANG, L.; WANG, X.; QIU, D.; SUN, D.; GU, J.; FANG, Q. Microbial transformation of 10-deacetyl-7-epitaxol and 1 $\beta$ -Hydroxybaccatin I by fungi from the inner bark of *Taxus yunnanensis*. **Journal of Natural Products**, v. 61, p. 497-500, 1998.