



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

**KAMILA BOHNE JAPIASSU**

---

**Biossíntese catalisada por *Beauveria bassiana* ATCC 7159 de um novo flavonóide metilglicosilado potencialmente antioxidante e antifúngico**

---

**Goiânia**  
**2018**

---

**TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR  
VERSÕES ELETRÔNICAS DE TESES E DISSERTAÇÕES  
NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG**

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), regulamentada pela Resolução CEPEC nº 832/2007, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou *download*, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

1. Identificação do material bibliográfico:     Dissertação     Tese

2. Identificação da Tese ou Dissertação:

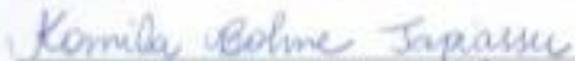
Nome completo do autor: Kamila Bohne Japiassu

Título do trabalho: Biossíntese catalisada por *Beauveria bassiana* ATCC 7159 de um novo flavonóide metilglicosilado potencialmente antioxidante e antifúngico

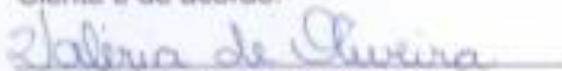
3. Informações de acesso ao documento:

Concorda com a liberação total do documento  SIM     NÃO<sup>1</sup>

Havendo concordância com a disponibilização eletrônica, torna-se imprescindível o envio do(s) arquivo(s) em formato digital PDF da tese ou dissertação.

  
Assinatura do(a) autor(a)<sup>2</sup>

Ciente e de acordo:

  
Assinatura do(a) orientador(a)<sup>2</sup>

Data: 23/05/2018

<sup>1</sup> Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. A extensão deste prazo suscita justificativa junto à coordenação do curso. Os dados do documento não serão

**KAMILA BOHNE JAPIASSU**

---

---

**Biossíntese catalisada por *Beauveria bassiana* ATCC 7159 de um novo flavonóide metilglicosilado potencialmente antioxidante e antifúngico**

---

---

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Goiás para obtenção do Título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador(a): Profa. Dra. Valéria de Oliveira

**Goiânia  
2018**

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UFG.

Japiassu, Kamila Bohne

Biossíntese catalisada por *Beauveria bassiana* ATCC 7159 de um novo flavonóide metilglicosilado potencialmente antioxidante e antifúngico [manuscrito] / Kamila Bohne Japiassu. - 2018.  
114 f.: il.

Orientador: Profa. Dra. Dra Valéria de Oliveira .  
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Goiás, Faculdade Farmácia (FF), Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Goiânia, 2018.

Bibliografia. Anexos.  
Inclui siglas, abreviaturas, símbolos, gráfico, tabelas, lista de figuras, lista de tabelas.

1. Biossíntese. 2. Fungos Filamentosos. 3. Morina. 4. Atividade Antioxidante . 5. Atividade Antifúngica. I. Oliveira , Dra Valéria de , orient. II. Título.

CDU 615.1



**ATA DA SEÇÃO PÚBLICA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO**

**Aluno (a):** Kamila Bohne Japiassu

**Orientador (a):** Profa. Dra. Valéria de Oliveira

**Título da Dissertação:** "Biossíntese catalisada por *Beauveria bassiana* ATCC 7159 de um novo flavonóide metilglicosilado potencialmente antioxidante e antifúngico".

**Data:** 22 de março de 2018

**Horário:** 09:00 horas

**Local:** Auditório da Faculdade de Farmácia

**Sugestões\*:**

\*Obs: sugestão de alteração de título da dissertação deve ser acompanhada de justificativa.

---

---

---

---

---

---

---

**Parecer da Banca Examinadora**

Membro	Aprovado /Reprovado	Assinatura
Prof. Dr. Profa. Dra. Valéria de Oliveira (FF/UFG) - Presidente	Aprovada	Valéria de Oliveira
Profa. Dra. Telma Alves Garcia (FF/UFG)	Aprovada	Telma
Profa. Dra. Lúcia Kioko Hasimoto e Souza (IPTSP/UFG)	Aprovada	Lúcia
Profa. Dra. Mariângela Fontes Santiago (FF/UFG) - Suplente		
Profa. Dra. Eula Maria de Melo Barcelos Costa (FF/UFG)		
<b>Parecer Final</b>	<b>Aprovado/Reprovado</b>	<b>APROVADO</b>



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

**Coordenador do Programa de Pós-Graduação**

Prof. Dr. Luiz Carlos da Cunha

**Vice-Coodenador do Programa de Pós-Graduação**

Prof. Dr. Matheus Lavorentti

**Goiânia-GO**

**2018**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

**BANCA EXAMINADORA**

**Aluno(a): KAMILA BOHNE JAPIASSU**

**Orientador(a): Profa. Dra. Valéria de Oliveira**

**Professora Dra. Valéria de Oliveira / Presidente**

Professor da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Goiás, FF/UFG.

**Professora Dra. Telma Alves Garcia / Membro Titular**

Professor da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Goiás, FF/UFG.

**Professora Dra. Lúcia Kioko Hasimoto e Souza / Membro Titular**

Professor do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública da Universidade Federal de Goiás, IPTSP/UFG.

**Professora Dra. Eula Maria de Melo Barcelos Costa/ Membro Suplente**

Professor da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Goiás, FF/UFG.

**Professora Dra. Mariângela Fontes Santiago/ Membro Suplente**

Professor da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Goiás, FF/UFG.

**Data: 22/03/2018**

*A todos que me incentivaram a chegar até aqui.*

## AGRADECIMENTOS

---

Agradeço a Deus pela força em mim depositada dia após dia sem a qual não teria chegado ao fim de mais essa etapa.

Aos meus pais, João Carlos Nunes Japiassu e Carla Regina de Araújo Bohne, por todo os incentivos, suporte e amor.

À minha irmã, Julia Bohne Japiassu, pelo carinho, companhia, compreensão e cumplicidade.

À minha orientadora, Profa. Dr<sup>a</sup> Valéria de Oliveira, por me inspirar e despertar em mim o desejo de buscar o conhecimento a cada dia, por sua solicitude, confiança e por toda sua contribuição.

Aos queridos Evilanna Arruda, Paula Melo, Pedro Henrique e Kelly Cordeiro que, para mim, são muito mais que apenas bons colegas de trabalho. Agradeço pela parceria, companheirismo e principalmente pela amizade que construímos dentro e fora do LaBiocon; levá-los-ei em meu coração por toda minha vida.

À Fernanda Bellato, secretária do programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, agradeço pela forma carinhosa com que me recebeu todas as vezes.

Agradeço à Universidade Federal de Goiás, Faculdade de Farmácia e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, bem como a todos os Laboratórios Colaboradores que ajudaram na construção desse trabalho, especialmente ao Laboratório de Ressonância Magnética Nuclear (LabRMN-IQ/UFG), Centro Regional para o Desenvolvimento Tecnológico e Inovação (Crti-UFG), Laboratório e Análise Farmacêutica e Ambiental (LAFAM-FF/UFG) e Laboratório de Micologia (IPTSP/UFG).

À CAPES agradeço pelo incentivo financeiro.

E a todos que de alguma forma tenham contribuído direta ou indiretamente para a realização deste trabalho, meu muito obrigada!

---

1. INTRODUÇÃO .....	20
1.1. BIOSÍNTESE.....	20
1.2. <i>Beauveria bassiana</i> .....	22
1.3. FLAVONÓIDES .....	24
1.4. GLICOSILAÇÃO MICROBIANA EM FLAVONOIDES.....	27
1.5. METILGLICOSILAÇÃO .....	30
1.6. MORINA .....	31
1.7. METABOLISMO DA MORINA .....	34
1.8. ATIVIDADE ANTIOXIDANTE .....	36
1.9. ATIVIDADE ANTIFÚNGICA .....	39
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>43</b>
2.1. OBJETIVO GERAL.....	43
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	43
<b>3. METODOLOGIA .....</b>	<b>45</b>
3.1. PRODUTO DE PARTIDA .....	45
3.1.1. Espectrofotometria na Região do UV (UV-Vis) .....	45
3.1.2. Ressonância Magnética Nuclear (RMN) .....	45
3.1.3. Espectrometria de Massas (MS) .....	45
3.2. MICRO-ORGANISMOS.....	46
3.3. MEIO DE CULTURA.....	47
3.4. TRIAGEM DOS MICRO-ORGANISMOS.....	48
3.5. ENSAIO EM ESCALA SEMIPREPARATIVA.....	48
3.5.1. Células Livres.....	48
3.5.2. Células Imobilizadas .....	49
3.6. ESCALONAMENTO DA REAÇÃO .....	49
3.7. EXTRAÇÃO.....	49
3.8. PURIFICAÇÃO DOS DERIVADOS .....	50
3.9. CARACTERIZAÇÃO DOS DERIVADOS.....	51
3.10. ATIVIDADE ANTIOXIDANTE .....	52
3.10.1. Ensaios Eletroquímicos .....	52
3.11. ATIVIDADE ANTIFÚNGICA .....	52

---

3.11.1.	Avaliação das Concentrações Inibitória e Fungicida Mínimas .....	52
3.12.	CITOTOXICIDADE .....	53
3.12.1.	Avaliação da Citotoxicidade em Hemácias .....	53
3.13.	AVALIAÇÃO <i>IN SILICO</i> .....	53
3.13.1.	Metabolismo .....	53
3.13.2.	Potenciais Atividades Biológicas.....	54
<b>4.</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>56</b>
4.1.	PRODUTO DE PARTIDA .....	56
4.1.1.	Espectrofotometria na Região do UV (UV-Vis) .....	56
4.1.2.	Espectrometria de Massas (MS) .....	57
4.1.3.	Ressonância Magnética Nuclear (RMN) .....	57
4.2.	MICRO-ORGANISMOS.....	58
4.3.	TRIAGEM DOS MICRO-ORGANISMOS.....	59
4.4.	ENSAIO EM ESCALA SEMI-PREPARATIVA.....	61
4.4.1.	Células Livres.....	61
4.4.2.	Células Imobilizadas .....	62
4.5.	MEIO DE CULTURA.....	64
4.6.	AVALIAÇÃO DO pH DURANTE A INCUBAÇÃO.....	66
4.7.	ESCALONAMENTO DA REAÇÃO .....	68
4.8.	FILTRAÇÃO E EXTRAÇÃO .....	70
4.8.1.	Células Livres.....	70
4.8.2.	Células Imobilizadas .....	71
4.8.3.	Células Livres em Biorreator .....	72
4.9.	PURIFICAÇÃO DOS DERIVADOS .....	73
4.10.	CARACTERIZAÇÃO DO DERIVADO MAJORITÁRIO.....	74
4.10.1.	Espectrometria na região do UV-Vis.....	75
4.10.2.	Espectrometria de Massas com Ressonância Ciclôtrica de Íons (FTICRMS) .....	76
4.10.3.	Ressonância Magnética Nuclear (RMN <sup>1</sup> H <sup>13</sup> C).....	77
4.11.	ATIVIDADE ANTIOXIDANTE .....	80
4.11.1.	Ensaio Eletroquímico .....	80
4.12.	ATIVIDADE ANTIFÚNGICA .....	84
4.12.1.	Avaliação das concentrações inibitória mínima e fungicida .....	84
4.13.	AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE.....	86

4.14.	ESTUDOS <i>in silico</i> .....	88
4.14.1.	Previsão do Metabolismo.....	88
4.14.2.	Potenciais Atividades Biológicas.....	89
4.14.2.1.	Atividade Antioxidante .....	90
4.14.2.2.	Atividade Antifúngica .....	92
5.	<b>CONCLUSÕES</b> .....	94
6.	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	96
7.	<b>ANEXOS</b> .....	108

## LISTA DE FIGURAS

---

Figura 1: Metilação da quercetina catalisada por <i>S. griseus</i> .....	21
Figura 2: Biotransformação da Quercetina por <i>Beauveria bassiana</i> .....	23
Figura 3: Glicosilação da Narigenina e Quercetina por <i>Beauveria bassiana</i> .....	23
Figura 4: Sulfoxidação do LASSBio-294 catalisada por <i>Beauveria bassiana</i> .....	24
Figura 5: Esqueleto Básico da Classificação dos Flavonóides.....	25
Figura 6: Estratégias para glicosilação de flavonoides.....	27
Figura 7: Estrutura molecular dos compostos morina e quercetina.....	32
Figura 8: Morina-3-O- $\beta$ -D-glucopiranosídeo.....	34
Figura 9: Características estruturais básicas que determinam a funcionalidade antioxidante em polifenóis.....	38
Figura 10: Fluxograma da extração.....	50
Figura 11: Espectrograma na região do UV da Morina, em metanol, na faixa de comprimento de onda de 200,0 a 400,0 nm.....	56
Figura 12: Espectro de Massas da Morina.....	57
Figura 13: Estrutura da Morina com representação numérica.....	58
Figura 14: Cepas utilizadas no screening da reação com o substrato morina.....	59
Figura 15: Crescimento da cepa de <i>Beauveria bassiana</i> ATCC 7159 em meio sólido e em meio líquido de glicose.....	62
Figura 16: Aspecto morfológico das cepas de <i>Cunninghamella echinulata</i> ATCC 9244 imobilizadas em molas de aço inoxidável em contato com o vidro dos frascos de cultivo.....	63
Figura 17: Meios de Cultura utilizados na incubação da morina com <i>B. bassiana</i> ATCC 7159 a 28 °C e 200 rpm.....	64
Figura 18: Cromatoplasmas CCD das incubações de <i>B. bassiana</i> ATCC 7159 e substrato com os diferentes meios de cultura.....	66
Figura 19: Biorreator de Tanque Agitado.....	69
Figura 20: Escalonamento da Reação de Biossíntese em Biorreator de Tanque Agitado utilizando <i>B. bassiana</i> ATCC 7159 como catalisador.....	69
Figura 21: Processo de filtração e extração da incubação da morina com <i>B. bassiana</i> ATCC 7159 em meio líquido de glicose.....	70
Figura 22: Estrutura dos Derivados da Morina Catalisados pela <i>B. bassiana</i> ATCC 7159.....	71
Figura 23: Extrato Bruto da Fração Acetato de Etila após a extração da incubação com biofilme de <i>C. echinulata</i> ATCC 9244.....	72
Figura 24: Extrato Bruto da Fração Acetato de Etila após a extração da incubação de morina com <i>B. bassiana</i> ATCC 7159 em Biorreator de Tanque Agitado.....	72
Figura 25: Metodologias utilizadas na purificação do composto.....	74
Figura 26: Análise por Cromatografia em camada delgada do produto morina e seu derivado.....	74
Figura 27: Espectrograma na região do UV do Labiocon 100, em metanol, na faixa de comprimento de onda de 200,0 a 800,0 nm.....	75

Figura 28: Espectro de massas do Labiocon 100 em modo negativo. ....	76
Figura 29: Espectro MS/MS do Labiocon 100 em modo negativo. ....	76
Figura 30: Sugestão estrutural para o LaBiocon 100 de acordo com os dados obtidos na EM Alta Resolução e sua fragmentação ESI-MS/MS. ....	77
Figura 31: Reação de metilglicosilação da morina utilizando <i>B. bassiana</i> ATCC 7159 como biocatalisador.....	79
Figura 32: Voltamograma de Pulso Diferencial da Morina.....	82
Figura 33: Voltamograma de Pulso Diferencial do Labiocon 100. ....	82
Figura 34: Ensaio de atividade hemolítica realizado com o composto Labiocon 100 em concentrações de 512 µg/mL a 4 µg/mL.....	87
Figura 35: Previsão do metabolismo <i>in silico</i> da morina. ....	88

## GRÁFICOS, QUADROS E TABELAS

---

Gráfico 1: Avaliação dos Meios de Cultura Utilizados na Biossíntese utilizando <i>B. bassiana</i> ATCC 7159 como catalisador. ....	65
Gráfico 2: Avaliação do pH nos diferentes meios de cultura testados. ....	67
Gráfico 3: Teste de Citotoxicidade em Hemácias com a Morina e o Labiocon 100. ....	87
Gráfico 4: Avaliação da Probabilidade de Atividades Biológicas pelo Programa PASS online. ....	91
Gráfico 5: Avaliação da Probabilidade de Atividade Antifúngica pelo Programa PASS online. ....	92
Quadro 1: Análise de CCD da biotransformação da morina após 96 horas de incubação com diferentes micro-organismos em meio de glicose, 28 °C e 200 rpm. ....	60
Quadro 2: Análise de CCD da biossíntese de derivados da morina por <i>Beauveria bassiana</i> ATCC 7159, após 96 horas de incubação em meio de glicose a 28 °C e 200 rpm. ....	61
Tabela 1: Medicamentos antifúngicos aprovados para o tratamento de infecções fúngicas invasivas. ....	40
Tabela 2: Micro-organismos utilizados no rastreamento. ....	46
Tabela 3: Proporção dos solventes utilizados na cromatografia em coluna. ....	51
Tabela 4: Sinais evidenciados no espectro de <sup>1</sup> H e <sup>13</sup> C RMN da Morina ....	58
Tabela 5: Sinais evidenciados no espectro de <sup>1</sup> H e <sup>13</sup> C RMN da Morina e do Labiocon 100. ....	778
Tabela 6: Concentração inibitória e fungicida da Morina em isolados de <i>C. neoformans</i> e <i>C. gattii</i> . ....	85
Tabela 7: Concentração inibitória e fungicida do Labiocon 100 em isolados de <i>C. neoformans</i> e <i>C. gattii</i> . ....	85

## SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS

---

AcOEt	Acetato de Etila
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
B.O.D.	<i>Biochemical Oxygen Demand</i>
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CFM	Concentração Fungicida Mínima
EM	Espectrometria de Massas
ESI	Ionização por Eletrospray
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
FTICR-MS	Espectrometria de massas com ressonância ciclôtrônica de íons
HSQC	<i>Heteronuclear Single-Quantum Correlation</i>
LaBiocon	Laboratório de Bioconversão
MeOH	Metanol
MLG	Meio Líquido de Glicose
NRRL	<i>Northern Regional Research Laboratory</i>
PDSM	Potato Dextrose Sucrose Medium
p.p.m.	Partes por milhão
Rf	Fator de retenção
RMN <sup>1</sup> H	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
RMN <sup>13</sup> C	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono
r.p.m.	Rotações por minuto
TMS	Tetrametilsilano
UV-Vis	Ultravioleta-Visível

---

---

**Biossíntese catalisada por *Beauveria bassiana* ATCC 7159 de um novo flavonóide metilglicosilado potencialmente antioxidante e antifúngico**

**Japiassu, K. B.**<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Laboratório de Bioconversão (LaBiocon), Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Goiás.

**Introdução:** A biossíntese de compostos catalisada por micro-organismos é uma estratégia inovadora na funcionalização de produtos naturais e sintéticos. Esta estratégia é apresentada como uma ferramenta promissora e grande aliada da química verde na produção de novos compostos bioativos. A morina é um flavonóide que possui reconhecidas atividades antioxidante e antifúngica. **Objetivo:** Assim, o objetivo deste estudo é a produção de derivados da morina através de biossíntese, e a avaliação de suas atividades antioxidante, antifúngica e citotóxica em hemácias. **Metodologia:** Para realizar a triagem e a identificação da cepa mais promissora, 18 fungos filamentosos foram empregados; alíquotas de uma suspensão de esporos foram transferidas para Erlenmeyers de 250 mL contendo 100 mL de diferentes meios de cultura líquido (Glicose, PDSM e Czapek). Os micro-organismos foram incubados a 200 rpm e 28 °C durante 65 horas. Após o crescimento, 25 mg/mL de morina foram solubilizados em etanol e adicionados a cada Erlenmeyer. Ao final do período de 96 horas de incubação foi realizada a extração e posterior purificação em coluna cromatográfica preenchida com sílica e cromatografia preparativa. Os produtos foram monitorados por Espectrometria de Massas (EM) e o produto majoritário obtido foi caracterizado por Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio e de Carbono (RMN<sup>1</sup>H<sup>13</sup>C) e Espectrometria de Massas (EM). Além disso, a atividade antioxidante, antifúngica e a citotoxicidade em hemácias da morina e do produto majoritário obtido foram avaliadas. **Resultados e discussões:** Os resultados mostraram que dez cepas foram capazes de catalisar a biossíntese de até três derivados da morina. A *Beauveria bassiana* ATCC 7159 foi selecionada para conduzir o escalonamento da reação em biorreator de tanque agitado, uma vez que essa cepa foi capaz de biocatalisar o maior número de derivados. Foi possível a obtenção de três derivados inéditos do composto de partida, conduzindo ao isolamento e purificação de um produto majoritário metilglicosilado, denominado morina 4'-O-β-D-(4''-O-metil) glucopiranosídeo. A atividade antioxidante avaliada por voltametria cíclica de pulso diferencial apresentou 5 picos de oxidação para o derivado metilglicosilado e 2 picos de oxidação para a morina. Na avaliação da atividade antifúngica, o derivado obtido, quando comparado com a morina, apresentou menor concentração inibitória mínima para cepa L18 de *Cryptococcus sp.* Além disso, o composto obtido apresentou uma baixa citotoxicidade em hemácias (0.6-1.2%). Estudos *in silico* avaliaram as potenciais atividades biológicas para a morina e seus derivados. **Conclusões:** O derivado obtido através de biossíntese catalisada por *B. bassiana* ATCC 7159 é inédito e possui bons perfis antioxidante, antifúngico e baixa citotoxicidade em hemácias.

**Palavras-Chave:** Biossíntese, Fungos Filamentosos, Morina, Atividade Antioxidante e Atividade Antifúngica.

**Agradecimentos:** CAPES.

---

---

**Biosynthesis of a novel antioxidant and antifungal methylglycosylated flavonoid catalyzed by *Beauveria bassiana* ATCC 7159****Japiassu, K. B. <sup>1</sup>**

<sup>1</sup> Laboratório de Bioconversão (LaBiocon), Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Goiás.

**Introduction:** Biosynthesis of compounds catalysed by microorganisms is an innovative strategy in the functionalization of natural and synthetic products. The application of microorganisms in the production of new bioactive compounds is presented as a promising tool and a great ally of green chemistry. Studies indicate that the morin has interesting antioxidant and antifungal activities. **Aim:** Thus, the objective of this study is the production of morin derivatives through biosynthesis, and the evaluation of its antioxidant and antifungal activities. **Methodology:** To screen and identify the most promising strains, 18 filamentous fungi were selected and aliquots of a spore suspension were transferred to 250 ml Erlenmeyers containing 100 ml of a liquid culture medium (20 g of glucose, 0.5 g of yeast extract, 0.5 g of soy peptone, 0.5 g of NaCl, 0.5 g of K<sub>2</sub> HPO<sub>4</sub>). The microorganisms were incubated at 200 rpm and 28 °C for 65 hours. After growth, 25 mg of morin were solubilized in ethanol and added to each Erlenmeyer. After 96 hours of incubation, extraction and subsequent purification were performed on a silica-filled chromatographic column and preparative chromatography. The obtained derivative was characterized by Nuclear Magnetic Resonance of Hydrogen and Carbon (NMR<sup>1</sup>H<sup>13</sup>C) and Mass Spectrometry (MS). In addition, antioxidant, antifungal and cytotoxicity activities were evaluated. **Results and discussion:** The results showed that ten strains were able to catalyze the biosynthesis of up to four morin derivatives. *Beauveria bassiana* ATCC 7159 was selected to conduct the reaction staggering, where it was possible to obtain three ineded derivatives of the starting compound, leading to the isolation and purification of a methylglycosylated major product, termed morin 4'-O-β-D-(4''-O-methyl) glucopyranoside. The results obtained through the evaluation of antioxidant and antifungal activities showed a good performance of the evaluated compounds. In addition, the obtained compost showed a low red blood cell cytotoxicity (0.6-1.2%). *In silico* studies have evaluated potential biological activities for morin and its derivatives. **Conclusions:** The derivative obtained by biosynthesis catalysed by *B. bassiana* ATCC 7159 is unprecedented and has good antioxidant, antifungal and low cytotoxicity profiles in red blood cells.

**Keywords:** Biosynthesis, Filamentous Fungi, Morin, Antioxidant Activity and Antifungal Activity.

**Acknowledgements:** CAPES.

## 1 INTRODUÇÃO

---

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1. BIOSSÍNTESE

A biossíntese de compostos a partir de micro-organismos catalisadores é uma estratégia utilizada na funcionalização de produtos naturais e sintéticos. Esta pode ser definida como a conversão química de um substrato através de biocatalisadores de células inteiras, que contém enzimas necessárias para essa conversão (LERESCHE; MEYER, 2006).

A utilização do processo de biossíntese microbiana é um meio eficiente na modificação estrutural de muitos compostos orgânicos e produtos naturais, especialmente aqueles com estruturas complexas (XIN *et al.*, 2015). Esta abordagem possui algumas vantagens sobre a síntese orgânica, tais como alta estereo e régio-seletividade e menor impacto ambiental. Mais importante ainda, ela pode propiciar algumas reações químicas que são geralmente complexas por síntese orgânica clássica, mas que poderiam ser facilmente conseguidas por essa metodologia, como por exemplo, a introdução de grupo funcional tal como um grupo hidroxila (QIAO *et al.*, 2012). Também a esse respeito, têm-se a reação de glicosilação, que na síntese química é obtida através de inúmeras etapas e através de reações microbianas pode ser realizada em uma única etapa e sob condições brandas de reação, uma vez que a seletividade não é realizada através de produtos químicos que podem ser tóxicos (PANDEY *et al.*, 2016).

Reações de biossíntese também podem resultar em metabólitos mais estáveis e com atividades farmacológicas melhoradas. Por isso, a aplicação de micro-organismos na produção de novos compostos bioativos apresenta-se como uma ferramenta promissora e é também grande aliada da química verde, por reduzir o uso de substâncias nocivas (FURA, 2006).

Fungos filamentosos são viáveis devido ao baixo custo de manutenção das cepas, condições reacionais brandas, fácil reprodução e capacidade de exteriorização dos produtos formados e a sua variedade enzimática que propicia uma diversificação estrutural dos compostos a serem biossintetizados (KRULL *et al.*, 2013). Eles se destacam entre os micro-organismos utilizados em reações de biossíntese, pois possibilitam a obtenção de novos produtos régio e estereosseletivos com altos rendimentos (ASHA; VIDYAVATHI, 2009).

Com isso, a biossíntese utilizando fungos filamentosos é uma importante ferramenta no processo de desenvolvimento de potenciais agentes bioativos de valor agregado, sendo extensivamente explorados para a obtenção de produtos com diversidade estrutural (CUSAK

*et al.*; 2013; KRULL *et al.*, 2013). O uso de fungos filamentosos tais como *Beauveria bassiana* ATCC 7159, *Cunninghamella echinulata* ATCC 9244 e *Mortierella isabelina* NRRL 1757 como modelos *in vitro* para a realização de reações de hidroxilação, oxidação, redução, glicosilação, hidrólise, entre outras, tem se mostrado útil para a biossíntese de uma grande variedade de compostos orgânicos (ALEXANDRE *et al.*, 2004; CIRILO *et al.*, 2005).

A obtenção de compostos biologicamente ativos por meio da modificação estrutural ocorre pelo aumento da estabilidade do derivado obtido e a afinidade de ligação ao receptor. Geralmente, a reação de funcionalização ocorre no grupo auxofórico, grupo não farmacofórico, que pode conduzir a uma otimização da ligação da molécula ao receptor e, provavelmente, manter ou aumentar a potência do composto de origem (CAO *et al.*, 2015).

Estudos sugerem que flavonóides O-metilados têm mostrado um maior potencial anticâncer quando comparado com suas formas hidroxiladas, uma vez que eles possuem metabólitos mais estáveis e aumentam o transporte de membrana no intestino e fígado, possuindo assim uma maior biodisponibilidade. A exemplo de produtos modificados através de reações de biossíntese por fungos filamentosos, tem-se a metilação da quercetina por *Streptomyces griseus* (Figura 1).

Figura 1: Metilação da quercetina catalisada por *S. griseus*.

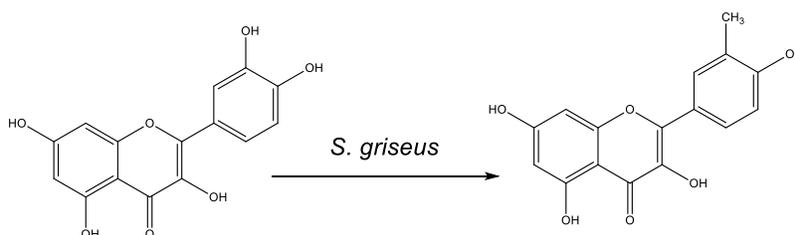


Figura 1: Metilação da quercetina catalisada por *S. griseus*. Fonte: Adaptada de Cao (2015).

Assim, a utilização dos sistemas microbianos para produzir novos derivados potencialmente ativos tem impulsionado a investigação por tecnologias viáveis para a diversificação estrutural realizada por esses micro-organismos (CUSACK, 2013).

Dado o exposto, os fungos filamentosos apresentam um conjunto de enzimas relativamente inexplorado, com potencial para muitas aplicações diferentes. Onde o principal obstáculo na utilização de enzimas fúngicas nas aplicações de biossíntese é a identificação dos genes responsáveis pela produção das muitas moléculas interessantes que são relatadas a partir de

fungos. Embora os custos decrescentes da sequenciação de DNA tenham tornado conhecimento sobre o genoma de alguns fungos mais amplo, o desenvolvimento de ferramentas necessárias para pesquisar genes não explorados ainda se apresenta como um obstáculo, sendo necessários métodos que sejam ampla e convenientemente aplicados a muitos organismos não estudados (LI; VEDERAS, 2009).

## 1.2. *Beauveria bassiana*

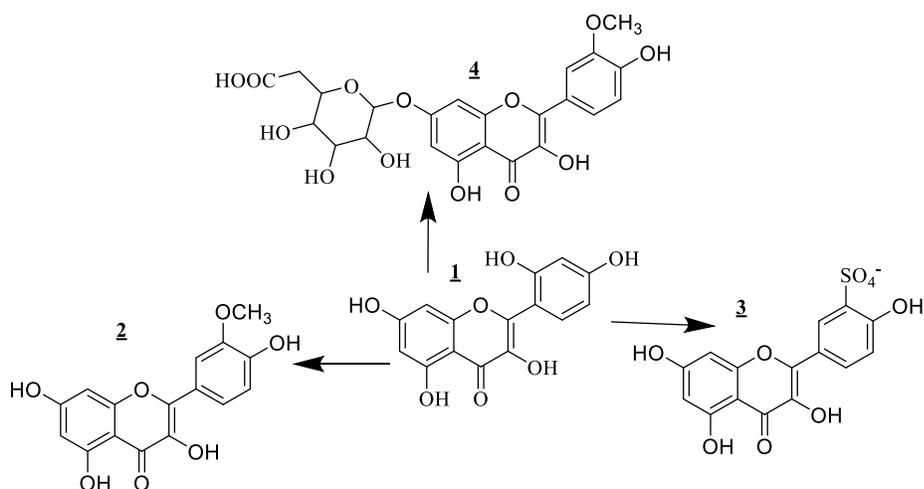
*Beauveria sp* pertencem à família *Moniliaceae* cuja a espécie mais comum é a *Beauveria bassiana*. Essa espécie de fungo filamentosos é considerada entomopatogênica e foi descrita pela primeira vez cerca de 180 anos atrás. Ela foi descoberta por Agostino Bassi em 1835 como a causa da doença muscardina do bicho da seda (BUCHANAN; WILLIAMS; REESE, 2000), e posteriores investigações mostraram o seu potencial uso como agentes bioinseticidas, no controle de insetos causadores de doenças (PURWAR; SACHAN, 2006).

A *B. bassiana* ATCC 7159 está entre os biocatalisadores de células inteiras mais frequentemente conhecidos e utilizados em aplicações químicas e industriais, sendo superada apenas pelo fungo *Aspergillus niger*. Ela possui a capacidade de catalisar reações complexas, além de produzir uma grande variedade de metabolitos secundários biologicamente ativos (XIN *et al.*, 2015).

Dentre as diversas reações que podem ser biocatalisadas por essa espécie estão reações de metilação, redução, hidroxilação, sulfatação e glicosilação. A vasta gama de reações produzidas por essa espécie a transformam numa poderosa ferramenta catalisadora (GROGAN; HOLLAND, 2000).

Tal linhagem produziu derivados sulfatados, metilados e glicosilados da quercetina (Figura 2), um composto que pertence ao grupo dos flavonoides e possui propriedades farmacológicas interessantes tais como antioxidante, anti-inflamatória, antiviral e anti-histamínica (COSTA *et al.*, 2008).

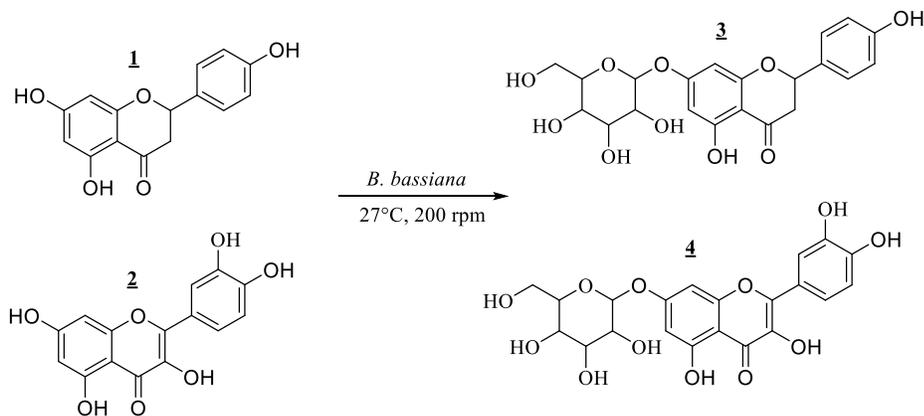
Figura 2: Biotransformação da quercetina por *B. bassiana*.



Legenda: (1) Quercetina; (2) 3'-O-metilquercetina; (3) quercetina-3'-O-sulfato; (4) 3'-O-metilquercetina-7-glucuronide. Fonte: Adaptado de COSTA et al., 2008.

A glicosilação da naringenina e quercetina por *B. bassiana* ATCC 7159 foi demonstrada por Penso e colaboradores em 2014 (Figura 3). A avaliação da citotoxicidade em células leucêmicas HL-60 mostrou que os metabolitos da quercetina e da rutina tiveram um efeito inibitório dependente da concentração, semelhante ao que ocorre com os seus respectivos compostos de partida. Assim, a transformação ocorrida não modificou significativamente o mecanismo de citotoxicidade das moléculas obtidas frente às células leucêmicas, no entanto, a solubilidade foi aumentada em ambas as moléculas derivadas.

Figura 2: Glicosilação da naringenina e quercetina por *B. bassiana*.

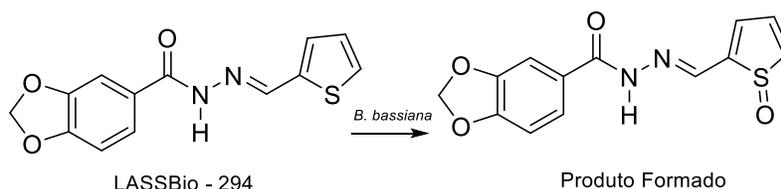


Legenda: (1) Naringenina; (2) Quercetina; (3) naringenina-7-β-O-glicopiranosídeo; (4) quercetina-7-β-O-glicopiranosídeo. Fonte: Adaptado de PENSO, 2014.

Estudos mostram que a glicosilação de flavonóis por fungos filamentosos geralmente ocorre na hidroxila *orto* do anel A (C-7) e na posição C-4' do anel B. Estes microrganismos também hidroxilam flavonóis na posição C-8 e flavanonas nas posições C-5, C-6 e C-4'. Ainda no que tange a esse assunto, foram observadas a ocorrência de reações de O-metilação em flavonóis nas posições C-7, C-3' e C-4'' e em flavonas na posição C-6, comprovando assim, a regioseletividade que esses organismos possuem em suas reações (PANDEY *et al*, 2016).

Carneiro e colaboradores (2010) também utilizaram a cepa de *B. bassiana* ATCC 7159 para promover a sulfoxidação do 3,4-metilenodioxibenzoil-2-tienilhidrazona (LASSBio-294), um protótipo de fármaco cardioativo (Figura 4).

Figura 3: Sulfoxidação do LASSBio-294 catalisada por *B. bassiana*.



Fonte: Adaptado de Carneiro *et al.*, 2010.

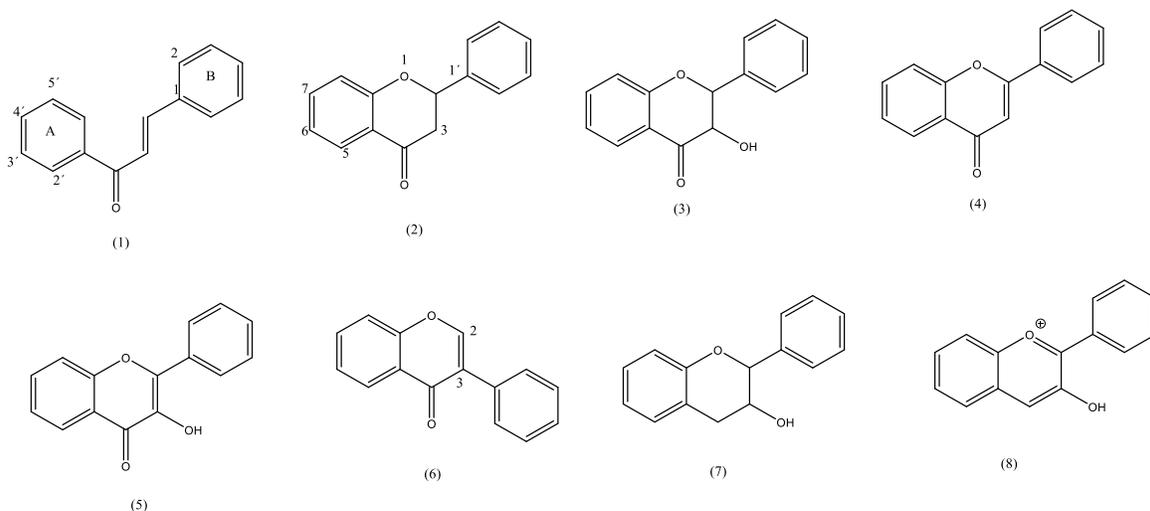
Tal cepa tem sido utilizada como modelo para transformação de diferentes substratos. Evidências bioquímicas mostraram que as reações são frequentemente mediadas por enzimas do metabolismo do citocromo P450 sendo principalmente reações de fase II. O processo de biocatalisação por *B. bassiana* ATCC 7159 possui um potencial considerável e, com uma seleção cuidadosa do padrão de substituição do substrato e dos derivados do grupo funcional, podem fazer contribuições significativas (GROGAN; HOLLAND, 2000).

### 1.3. FLAVONÓIDES

Flavonóides são compostos polifenólicos presentes em relativa abundância entre os metabólitos secundários das plantas. São encontrados em frutas, vegetais, grãos, sementes, nozes, flores e chás. Estes são parte integrante da nossa dieta diária e constituem um grupo de produtos naturais utilizados em alguns países como medicamentos e/ou como alimentos funcionais (COSTA, 2008).

Mais de 8.000 compostos de estrutura flavonóide foram identificados, sendo este grande número originado das diferenças em seu arranjo de grupos laterais hidroxila, metoxila e glicosídico e na conjugação entre anéis A e B. Uma variação no anel C fornece divisão de subclasses que, de acordo com a sua estrutura molecular, são divididas em oito, sendo elas: Chalcona (1), Flavanona (2), Diidroflavonol (3), Flavona (4), Flavonol (5), Isoflavona (6), Flavan-3-ol (7) e Antocianina (8) (Figura 5) (BEHLING *et al.*, 2004).

Figura 4: Esqueleto básico da classificação dos flavonóides.



Fonte: Autor.

Os flavonóides foram descobertos na década de 1930 por Albert Szent-Gyorgyi, Prêmio Nobel, como compostos com atividade antioxidante pronunciada, que são importantes para a prevenção de doenças associadas a danos oxidativos de membranas, proteínas e DNA. Assim, sugere-se que esses compostos sejam utilizados como nutracêuticos preventivos, sendo considerados de interesse científico e terapêutico (PENSO *et al.*, 2014).

Estudos mostram que os flavonóides podem interferir no metabolismo celular das plantas e atuam juntamente com hormônios regulando o seu crescimento (JIANG *et al.*, 1999). A estes compostos tem sido atribuída uma vasta gama de efeitos benéficos na saúde humana e na prevenção de doenças crônicas e degenerativas como, por exemplo, Parkinson e Alzheimer (O'BRIEN, 2002).

Além disso, têm-se atribuído a eles propriedades anti-inflamatória, antitrombótica, antimicrobiana, antiviral, antialérgica, antitumoral, hepatoprotetora e antiasmática (TRUEBA; SÁNCHEZ, 2001; TUEBA 2003). Simultaneamente, eles possuem a capacidade de modular

várias enzimas específicas, receptores celulares e estimular alguns hormônios e neurotransmissores, como foi demonstrado em muitos estudos *in vitro* e *in vivo* (HOU *et al.*, 2003; ORHAN; KHAN, 2014).

Contudo, as propriedades biológicas de maior interesse são os seus efeitos antioxidantes. Doses farmacológicas de antioxidantes tais como vitaminas (C e E) são comumente recomendadas nas dietas em todo o mundo e muitas vezes estas não produzem os efeitos desejados ou tornam-se prejudiciais devido à quantidade de ingestão. Assim, produtos de origem natural têm atraído grande interesse da indústria farmacêutica, principalmente devido às suas várias propriedades biológicas benéficas (AGOSTINI *et al.*, 2004).

A atividade antioxidante dos flavonoides advém dos grupos hidroxila ligados à sua estrutura fenólica e resulta em uma excelente capacidade de quelar ferro, além de propriedades sequestrantes de radicais livres assim como inibição das oxidases (lipoxigenase, ciclooxigenase, xantina oxidase, etc.). Outros mecanismos podem incluir a inibição das enzimas envolvidas indiretamente nos processos oxidativos (fosfolipases) e estimulação de outras com reconhecidas propriedades antioxidantes tais como catalase e superóxido dismutase. Assim, flavonóides não podem apenas interferir nas reações de propagação de radicais livres, mas também na formação desses radicais em si (TRUEBA; SÁNCHEZ, 2001).

As monoxigenases de citocromo P450 (CYPs) são oxidases de função mista contendo heme, desempenhando um papel chave no metabolismo de substratos endógenos hidrofóbicos (esteróis, prostaglandinas, ácidos graxos) e compostos xenobióticos (por exemplo, drogas, carcinógenos, componentes alimentares, poluentes). Embora os CYPs geralmente convertam os xenobióticos em produtos menos tóxicos, as reações envolvem frequentemente a formação de intermediários reativos ou permitem a fuga de radicais livres capazes de causar toxicidade. Essas proteínas estão envolvidas nas interações com flavonoides de pelo menos três formas: (i) flavonóides induzem a biossíntese de vários CYPs; (ii) as atividades enzimáticas dos CYPs são moduladas (inibidas ou estimuladas) por estes compostos e (iii) os flavonoides são metabolizados por vários CYPs (HODEK; TRFILL; STIBOROVA, 2002).

Contudo, a baixa solubilidade das agliconas de flavonóides em água, o tempo de permanência dos flavonóides no intestino e o seu baixo coeficiente de absorção podem reduzir significativamente sua atuação no organismo (KUMAR *et al.*, 2011).

#### 1.4. GLICOSILAÇÃO MICROBIANA EM FLAVONOIDES

Embora os flavonóides sejam benéficos para a saúde humana, a sua aplicação é limitada pela sua baixa biodisponibilidade e baixa solubilidade em água. Por conseguinte, recentemente tem havido um interesse particular nas formas glicosiladas de flavonoides, que normalmente são mais solúveis, mais estáveis e funcionais em comparação com as suas agliconas (PLAZA *et al.*, 2014).

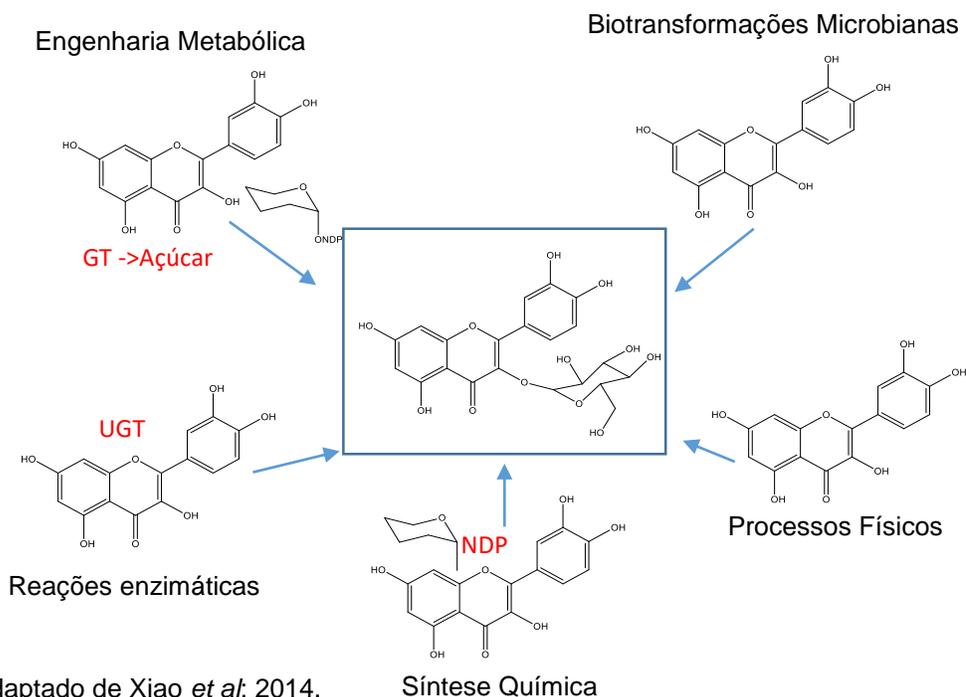
Determinantes muito importantes que afetam uma melhor solubilidade em água dos flavonóides são a presença de grupos hidroxila bem como porções de açúcar. É bem conhecido o fato de que, nas mesmas condições (temperatura e valor de pH abaixo de 7), os glicosídeos de flavonóides são melhor solúveis em água do que suas agliconas. A solubilidade da naringenina a 20 °C é de 4,38 mg/L, enquanto que para a sua forma glicosilada é de 500 mg/L (aproximadamente 114 vezes maior). A mesma tendência é observada no caso de rutina e quercetina, onde a solubilidade da rutina (quercetina 3-O-rutinosídeo) em água é de 125 mg/L, enquanto que para sua forma aglicona é de 0,512 mg/L (CAO *et al.*, 2015).

Outro estudo mostrou que os glicosídeos da quercetina apresentam maior biodisponibilidade que em sua forma aglicona. Verificou-se também que o tipo de unidade de açúcar anexado tem um grande impacto na absorção da quercetina *in vivo*. Os glicosídeos de quercetina foram absorvidos 10 vezes mais rápido que os rutinosídeos em humanos. Além disso, a absorção do 3-O-glicosídeo da quercetina foi 184% maior em comparação com a quercetina em ratos (HODEK *et al.*, 2002).

As principais estratégias utilizadas para alcançar a glicosilação de flavonoides são engenharia metabólica, reações enzimáticas, processos físicos, síntese química e biotransformação microbiana (Figura 6). Dentre elas destaca-se a última, uma vez que essa permite a formação de compostos com alta estereo-regiosseletividade e sob condições brandas de reação. Outrossim, uma das principais vantagens da glicosilação utilizando células inteiras é a possibilidade de eliminar a necessidade de isolar, purificar e estabilizar enzimas.

Em particular, a aplicação de cepas de fungos (*B. bassiana* AM 278, *Absidia glauca* AM 177 e *Absidia coerulea* AM 93) para a modificação de flavonóides (daidzeína, genisteína, xantohumol) levaram à formação de vários novos compostos úteis por meio de reações de glicosilação (XIAO *et al.*, 2014).

Figura 6: Estratégias para glicosilação de flavonóides.



Fonte: Adaptado de Xiao *et al.*, 2014.

A transformação de flavonóides agliconas em glicosídeos desempenha um papel crucial na biossíntese desses compostos; elas dependem de processos semelhantes aos do metabolismo de mamíferos *in vivo*, como oxidação e redução (ambos envolvidos no metabolismo da fase I) e conjugação (usado no metabolismo da fase II). A transformação microbiana de flavonóides naturais pode ser uma forma atrativa de conceber os seus derivados glicosilados em quantidades suficientes. Dessa forma podem ser aplicados na investigação sobre o efeito do grupo glicosídeo nas propriedades do composto e para posterior aplicação destes compostos como ingredientes de suplementos dietéticos e produtos farmacêuticos. A maioria dos flavonóides com aplicações clínicas são os glicosídeos, como rutina, que é administrada em cápsulas e puerarina (8-C-glicosídeo da daidzeína) administrado por injeção (SORDON *et al.*, 2016).

As glicosiltransferases (GTs) têm atraído atenção devido ao seu potencial para diversificar produtos naturais, conjugando diversos tipos de açúcar e alterando as propriedades físico-químicas e biológicas tais como absorção, distribuição, metabolismo e excreção de moléculas. Por exemplo, quando o açúcar de micosamina foi substituído por perosamina na anfotericina B, as atividades antifúngicas foram melhoradas no novo derivado que possui concentração mínima de atividade inibitória (CIM) de 1.9 µg/mL em comparação com 2,1 µg/mL de anfotericina B (PANDEY; SOHNG, 2016).

Tais enzimas catalisam a formação de ligações glicosídicas através da transferência de um sacarídeo (geralmente monossacarídeo) de um substrato de doador para uma molécula receptora de glicosil nucleofílico, como proteínas, lipídios, esteróides, flavonóides ou outras moléculas pequenas. Essas enzimas possuem um vasto repertório de substratos doadores e aceptores, o que reflete na diversidade estrutural dos glicosídeos produzidos (SEEBERGER *et al.*, 2009).

As reações catalisadas por GTs são estereosseletivas e regioseletivas. A transferência de um grupo glicosil pode prosseguir com retenção ou inversão de configuração no átomo de carbono anomérico do substrato (doador) envolvido na nova ligação glicosídica. As GTs foram classificadas por homologia de sequência de aminoácidos, especificidade de substrato e estereoquímica de ligação de glicosídeos em 96 famílias. Uma delas é GT1 que compreende UDP-glicosiltransferases (UGTs) e que foram encontrados em plantas, animais, fungos e bactérias. Essas enzimas usam a unidade de açúcar ativada por UDP como doador de sacarídeos e moléculas tais como flavonóides, alcalóides, antibióticos e hormônios das plantas como os aceptores. O UDP-glicose e o ácido UDP-glucurônico são os doadores mais comuns utilizados pelo GT1 e com menor frequência estão UDP-ramnose, UDP-xilose e UDP-galactose (KREN; THIEM, 2015).

Em contraste com os glicosídeos de plantas, as moléculas glicosiladas originadas por micro-organismos contêm açúcares modificados com diferentes grupos funcionais como amino, nitro, ceto, metil e sulfo nas suas estruturas. Essas porções de açúcares modificados desempenham um papel crucial na execução de funções biológicas para os metabólitos microbianos, como doxorubicina, vancomicina, anfotericina B e eritromicina (DE BRUYN, 2015).

Conquanto, a abordagem química para a síntese de produtos naturais glicosilados é demorada, requer proteção e desproteção dos grupos funcionais e utiliza catalisadores na maioria das vezes tóxicos. Uma vez que existe uma grande possibilidade de formação de subprodutos, a purificação de moléculas é difícil, o que, em última instância, diminui o rendimento de produção da molécula alvo. Assim, a abordagem microbiana da conjugação de açúcares diversos em agliconas é mais simples, menos onerosa e pode ser ampliada facilmente ao nível industrial (PANDEY; SOHNG, 2016; RINI; ESKO; VARKI, 2009).

### 1.5. METILGLICOSILAÇÃO

Estudos têm trazido reações de metilglicosilação como alternativa para aumentar a solubilidade em água de vários compostos, especialmente em situações em que derivados mais polares são requeridos (ZHAN, GUNATILAKA, 2006; KITTELMANN *et al.*, 1999).

A metilglicosilação é tipicamente preparada pela reação de álcool de um monossacarídeo (por exemplo, glicose) ou um polissacarídeo (por exemplo, amido) com metanol, na presença de uma quantidade catalítica de ácido p-tolueno sulfônico ou ácido sulfúrico a temperatura e pressão elevadas, em um lento processo. A reação de alcoolize produz uma mistura de produtos que inclui  $\alpha$  e  $\beta$ -metilglicosídeos como anômeros predominantes. O metanol pode ser evaporado para obter uma solução escura que pode ser descolorida com um agente de branqueamento (carvão ativado). Ambos isômeros possuem diferentes temperaturas de cristalização. A  $\alpha$ -metilglicose ( $\alpha$ -MeG) pura é obtida por recristalização a partir da mistura dos anômeros com metanol. A solubilidade de  $\alpha$ -MeG em metanol a diferentes temperaturas é de suma importância para a otimização do processo de isolamento de cristalização sólida e líquida (YANG *et al.*, 2016).

Portanto, a via química de síntese destes compostos envolve extremos de temperatura, pressão, uso de catalisadores tóxicos e múltiplas etapas de proteção e desproteção. Além disso, a separação do produto sintetizado de uma mistura complexa de anômeros continua a ser outra grande dificuldade. A principal vantagem de usar biocatalisadores é que eles operam a pH neutro, temperatura ambiente, pressão atmosférica e catalisam reações régio-estéreo e enantioespecíficas. Com isso, à luz da busca de desenvolvimentos de “processos verdes” pelas indústrias química e farmacêutica, a rota de biossíntese é, portanto, altamente desejável (HORACIO *et al.*, 2003; RICHEL *et al.*, 2011).

Diversos autores têm mostrado que cepas de *B. bassiana* funcionam como um sistema catalítico de metilglicosilação em uma única etapa, sendo assim, bastante eficiente (ZHI-QI *et al.*, 2008, XIAO *et al.*, 2014). Em estudos anteriores, Zhan e Gunatilaka (2006) utilizaram a cepa de *B. bassiana* ATCC 7159 na biotransformação da curvularina, o que levou à produção de três novos metabólitos resultantes da glicosilação e 4'-O-metilglicosilação do substrato, envolvendo todas as enzimas constitutivas. Esses mesmos autores identificaram que o principal produto da biotransformação de quercetina com *B. bassiana* ATCC 7159 foi quercetina-4'-O-metil-7-O- $\beta$ -D-glucopiranosídeo, sugerindo que a reação de biotransformação é altamente seletiva entre diferentes grupos hidroxilo na mesma molécula.

Dado o exposto, o eficiente processo de metilglicosilação catalisado por *B. bassiana* indica que tal cepa pode ser utilizada como biocatalisador de reações de O-metilglicosilação de compostos fenólicos para estudos de bioatividade.

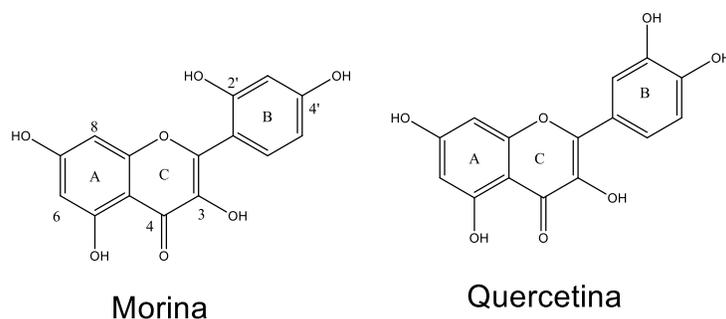
## 1.6. MORINA

A morina (3,5,7,2',4'-pentahidroxi-flavona) (Figura 7) é um flavonóide pertencente à classe dos flavonóis e presente em maior frequência em plantas da família *Moraceae*. Esse composto de cor amarelada pode ser encontrado amplamente distribuído em plantas e alimentos de origem vegetal como cascas de amêndoas, folhas de goiaba (*Psidium guajava* L.), cebola, maçã e em várias bebidas como chá, vinho tinto, algas marinhas, café e grãos de cereais. Além disso, representa um dos constituintes de vários medicamentos tradicionais à base de plantas. Estudos *in vitro* e *in vivo* demonstraram que a morina exibe níveis de toxicidade muito baixos e sua administração crônica é bem tolerada (YOSHIE *et al.*, 2003; CASELLI *et al.*, 2016).

Com base no estudo *in vitro*, tem sido relatado suas várias atividades biológicas benéficas (FANG *et al.*; 2003). A mesma possui reconhecida atividade antioxidante, antidiabética, inibidora da proliferação de células, indutora de apoptose, inibidora da tirosinase, anti-inflamatória, anti-hipertensiva, antibacteriana e neuroprotetora, modulando a atividade de muitas enzimas protetoras cardiotônica (JUNG *et al.*, 2010; VANITHA *et al.*, 2014; LEE; BAEK; NAM, 2015; MIYAZAKI *et al.*, 2018). Também foi mostrado em estudo a sua ação neuroprotetora na doença de Parkinson (ZHANG *et al.*, 2010).

A estrutura da morina representa uma forma isomérica de quercetina (Figura 7), ambas possuem grupamento hidroxila ligados na posição 3, uma fração de resorcinol no anel A e um grupo carbonilo na posição 4; a única diferença entre elas é o padrão de hidroxilação no anel B, que é *meta* na morina e *orto* na quercetina.

Figura 6: Fórmula estrutural dos compostos morina e quercetina.



Fonte: Autor.

Embora a quercetina seja considerada como um dos flavonóides com maior potencial antioxidante, em alguns processos oxidativos foi demonstrada uma maior eficácia da morina. Ela é caracterizada principalmente por suas propriedades antioxidantes, atuando na qualidade de limpadora de oxirradicais (inibe a peroxidação lipídica), desativadora de enzimas geradoras de radicais livres (por exemplo, xantina oxidase) e quelante de alguns íons metálicos (ferro e cobre) na formação de oxirradicais (WU *et al.*, 1995). Além disso, ela pode modular atividades de algumas enzimas metabólicas incluindo citocromo P450 (HODEK; TREFIL; STIBOROVA, 2002) e também atua como agente quimiopreventivo contra carcinogênese *in vitro* e *in vivo* (KAWABATA; TANAKA; HONJO, 1999; BROWN; O'PRAY; MARRISON, 2003).

Estudos apontam que a morina é um dos antioxidantes que podem proteger várias células humanas, tais como os miócitos, células endoteliais e hepatócitos contra oxirradicais gerados *in situ* (RICE-EVANS *et al.*, 1996). Em suas pesquisas, Jovanovic e colaboradores (1996) demonstraram que em pacientes com câncer a morina pode proteger tecidos cardiovasculares contra danos por radicais livres gerados, quando doxorubicina ou mitomicina C são usados na quimioterapia (CASELLI *et al.*, 2016).

Yang e colaboradores (2013) relataram que esse flavonóide aumentou a biodisponibilidade de tamoxifeno, nicardipina, metotrexato e talinolol em ratos através da

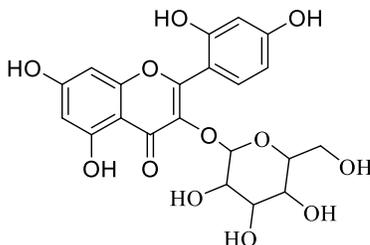
inibição de P-glicoproteína. Esses achados sugerem que a morina pode ser usada sozinha ou em combinação com outros fármacos para prevenir muitas patologias humanas.

Tem sido demonstrado que a morina é mais ativa na sua forma hidratada em comparação à sua forma não hidratada, o que a torna mais toxicologicamente segura aos animais experimentais, mesmo em altas dosagens e em prolongados períodos de administração (HOU; CHAO, 2003). Adicionalmente, estudos *in vitro* e *in vivo* demonstraram que tal composto exhibe níveis de toxicidade muito baixos e a sua administração crônica é bem tolerada. Tudo isso tem gerado um grande interesse para a sua utilização como antioxidante na indústria alimentar ou como agente farmacológico, para o tratamento de doenças nas quais radicais livres estão envolvidos (WILSON; ORTEGA; QUINTANA, 2011).

No entanto, testes com ratos Wistar confirmaram que a concentração plasmática de morina não excede 1%, mesmo após administração oral em doses elevadas (superiores a 200 mg/Kg). A fraca biodisponibilidade desse composto deve-se principalmente à atividade da proteína associada à resistência a múltiplos fármacos (MRP1/ABCC1), uma proteína transportadora amplamente presente na membrana plasmática das células intestinais e responsável pela extrusão de morina. A inibição da MRP1/ABCC1 por fármacos específicos aumenta significativamente a concentração de morina, confirmando assim o papel deste transportador na regulação da sua absorção intestinal. Uma vez absorvida, enzimas específicas convertem morina em seus metabólitos que, então, atingem a corrente sanguínea (LI *et al.*, 2007).

Miyakoshi e colaboradores (2010) mostraram em seu trabalho o isolamento e a caracterização do 3-O-β-D-glucopiranosídeo de morina (Figura 8), obtido através da reação com o fungo filamentosso *Cunninghamella echinulata* CBS 596.68, onde o rendimento foi de 20,0%. Em outro estudo, Hussain e colaboradores (2014) isolaram da planta *Acridocarpus orientalis* o composto morina-3-O-β-D-glucopiranosídeo e testaram as atividades antioxidante, antifúngica e antitumoral. Os resultados de peroxidação anti-lipídico mostraram uma atividade muito significativa do composto isolado, em comparação com a morina.

Figura 7: Fórmula estrutural do composto morina-3-O-β-D-glucopiranosídeo.



Fonte: Autor.

### 1.7. METABOLISMO DA MORINA

A maioria dos flavonoides são metabolizados rapidamente em seus derivados metilados, glucuronidados ou sulfatados nas partes jejunais e ileais do intestino delgado. Após o metabolismo no intestino, eles são ainda metabolizados no fígado para produzir várias formas conjugadas. A conjugação é essencialmente um processo de desintoxicação no qual os compostos formados têm seu caráter hidrofílico aumentado, para então serem eliminados por via biliar e urinária. Não obstante, para alguns autores, a formação de glicosídeos catalisada por fungos filamentosos é equivalente à formação de glucuronídeos no organismo humano (HUSZCZA, 2005).

Os compostos morina e quercetina são isômeros com uma estreita semelhança e possuem atividade biológica comparável. No entanto, saber como a diferença no padrão de hidroxilação do anel B desses compostos afeta a farmacocinética é de grande interesse (ZHAN, et al.; 2006). Segundo Lia e colaboradores (2007), após a administração oral desses compostos em ratos foi possível observar que os glucuronídeos e sulfatos de quercetina existiram exclusivamente na circulação, enquanto a morina coexistiu com seus glucuronídeos e sulfatos. Com isso, tem-se que a quercetina exibiu farmacocinética metabólica linear para as doses estudadas, diferentemente da morina (HOU *et al.*, 2002).

Todavia, o rápido aparecimento de glucuronídeos e sulfatos de morina e quercetina após administração oral indicaram que ambos os compostos são absorvidos e transformados em metabólitos conjugados, realizados no intestino e/ou no fígado. Um aumento significativo de morina no sangue pode ser detectado após administração de doses orais elevadas (>100 mg/Kg), sugerindo que as atividades das enzimas intestinais de glucuronil-transferase/sulfo-

transferase são facilmente saturadas. Além disso, demonstrou-se que as enzimas hepáticas, como a glucuronil-transferase/sulfo-transferase, ou o citocromo P450 não-hepático participam do metabolismo de morina (CASELI, 2016).

Os efeitos da morina e seus metabólitos, sulfatos e glucuronídeos, na produção de óxido nítrico (NO) e citocinas de macrófagos ativados por lipopolissacarídeo (LPS) foram individualmente investigados e comparados. Esses estudos *in vitro* demonstraram que os metabólitos foram mais ativos que o composto de partida para inibir as funções dos macrófagos. A administração oral de morina durante dois meses também reduziu significativamente a atividade fagocitária no sangue e, além disso, verificou-se que tal composto administrado oralmente poderia diminuir a incidência de choque séptico induzido por LPS, implicando assim na sua promissora atividade anti-inflamatória (FANG *et al.*, 2003).

Sabe-se geralmente que os flavonóides com grupos hidroxilo livres inibem as reações dependentes de CYP450, enquanto que os flavonóides sem grupos hidroxilo estimulam a atividade de CYP450. Estudos anteriores relataram que a morina poderia modular as atividades das enzimas metabólicas, incluindo o citocromo P-450. Além disso, outro estudo demonstrou que a morina poderia ser um inibidor P-gp bastante potente; apresentando-se, portanto, como um inibidor duplo contra CYPs e P-gp (HODEK *et al.*, 2002).

Com base na ampla sobreposição nas especificidades do substrato bem como a localização no intestino delgado, o local primário de absorção de fármacos administrados por via oral, CYP3A4 e P-gp foram reconhecidos como uma barreira na absorção de fármacos. Com isso, inibidores duais tanto contra CYP3A4 como contra P-gp devem ter um grande impacto na biodisponibilidade de muitos compostos, onde o metabolismo da CYP3A4 bem como o efluxo mediado por P-gp é a principal barreira para a disponibilidade sistêmica (ZI *et al.*, 2011).

Em seu trabalho, Choi e colaboradores (2005) demonstraram que a coadministração da morina em doses de 1,5 a 7,5 mg/kg aumentou significativamente a exposição oral do diltiazem. Dado que a baixa biodisponibilidade do diltiazem deve-se principalmente ao metabolismo pré-sistêmico e ao efluxo mediado por P-gp durante a absorção intestinal, a morina pode proporcionar um benefício terapêutico para melhorar a farmacocinética desse fármaco na terapia combinada.

## 1.8. ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

A oxidação é uma reação química que transfere elétrons ou hidrogênio de uma substância para um agente oxidante. Tais reações podem produzir radicais livres e, por sua vez, estes radicais podem iniciar reações em cadeia que, quando ocorrem em células, podem danificá-las ou causar a sua morte (MASISI *et al.*, 2016).

Os radicais livres podem ser definidos como sendo moléculas orgânicas e inorgânicas ou átomos que contêm um ou mais elétrons não pareados com existência independente (HALLIWELL, 1994). Essa configuração faz desses compostos moléculas altamente instáveis, com meia-vida curtíssima e muito reativa quimicamente (BIANCHI; ANTUNES, 1999).

A formação de radicais livres *in vivo* ocorre via ação catalítica de enzimas, durante os processos de transferência de elétrons que ocorrem no metabolismo celular e pela exposição a fatores exógenos. O desequilíbrio entre moléculas oxidantes e antioxidantes que resulta na indução de danos celulares pelos radicais livres tem sido chamado de estresse oxidativo (RAJIC; RISTIC, 2015).

Radicais livres são responsáveis por causar um grande número de doenças incluindo câncer, doenças cardiovasculares, distúrbios neurais, doenças neurodegenerativas como Alzheimer e Parkinson, além de colite ulcerativa, aterosclerose e envelhecimento. Evidências substanciais indicam que a proteção contra radicais livres pode ser melhorada pela ingestão de alimentos que contenham substâncias antioxidantes, o que ajuda na prevenção de diversas doenças (ALAM; RAFIQUZZAMAN, 2013).

Com isso, moléculas antioxidantes podem ser caracterizadas pela sua capacidade de retardar ou impedir o dano oxidativo, sendo sua principal função o bloqueio das reações de oxidação, oferecendo assim proteção às membranas e outras partes das células (JOVANOVIC, 1996).

Os antioxidantes são capazes de interceptar os radicais livres gerados pelo metabolismo celular ou por fontes exógenas, impedindo o ataque sobre os lipídeos, os aminoácidos das proteínas, a dupla ligação dos ácidos graxos poli-insaturados e as bases do DNA, evitando a formação de lesões e perda da integridade celular. Compostos antioxidantes tais como as vitaminas C, E e A, os flavonóides e carotenoides, também podem ser obtidos na

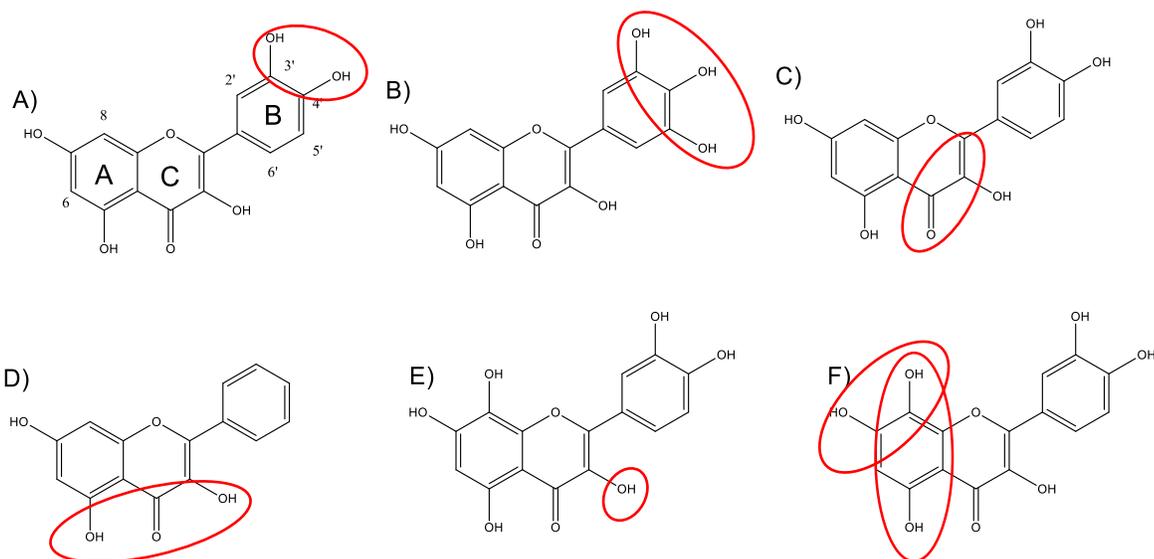
dieta alimentar e são extremamente importantes na intercepção dos radicais livres (POMPELLA, 1997).

Experimentos *in vitro* mostraram que o número de substituintes hidroxila e suas posições são importantes para a alta capacidade antioxidante dos flavonóides. Os grupos hidroxila ligados ao anel B são importantes para a capacidade de doação de hidrogênio, sendo o grupo catecol proporcionador de maior estabilidade à estrutura radical e participando do deslocamento de elétrons (Figura 9A). Além disso, um grupo de pirogalol (grupos hidroxila nas posições 3', 4' e 5' no anel B) aumenta a capacidade antioxidante em comparação com flavonóides com grupos hidroxilo simples no anel B (Figura 9B) (PLAZA *et al.*, 2014, CAO *et al.*, 2015).

Somando-se a isso, o deslocamento de elétrons do anel B é promovido por uma ligação dupla C-2, C-3 combinado a carbonila no anel C, o que também contribui para a capacidade antioxidante (Figura 9C). Já os grupos 3- e 5-OH (nos anéis A e C, respectivamente) (Figura 9D) também promovem alta capacidade antioxidante. A presença de um 3-OH livre grupo (Figura 9E) parece importante como modificação adicional (por exemplo, 3-glicosilação) leva à redução da capacidade antioxidante (CAO *et al.*, 2015).

No que tange ao anel A dos flavonóides, as substituições de hidroxila em pares envolvendo a posição 5 ou 7 promovem alta capacidade antioxidante. Isto é verdade tanto para a 5,7 como para a 7,8-hidroxilação (Figura 9F). Uma única hidroxila ligada à posição 7 do anel A também teve pouco efeito, enquanto que um grupo 5-hidroxila aumentou a capacidade antioxidante dos compostos (BORS *et al.*, 2002).

Figura 8: Características estruturais básicas que determinam a funcionalidade antioxidante em polifenóis.



Legenda: Áreas circundadas são críticas para uma eficiente função antioxidante. As letras A, B e C indicam as estruturas do anel da fração flavonóide. Fonte: Adaptado de Plaza *et al.*, (2014).

Portanto, a capacidade antioxidante dos flavonóides está relacionada a uma combinação desses elementos químicos e estruturais. Geralmente, quanto maior o grau de grupos hidroxila presentes nos anéis dos compostos flavonóides, mais forte será a eliminação de radicais livres. Também é evidente que os grupos hidroxila de flavonóides são frequentemente locais de modificação adicional, modulando a capacidade antioxidante através de glicosilação, metilação e, mais raramente, acilação ou sulfatação (PLAZA *et al.*, 2014).

O uso de antioxidantes na farmacologia vem sendo estudado de forma intensiva e diversos fatores influenciam a demanda por compostos de origem natural (EMBUSCADO, 2015). A morina pode ser útil para prevenir efeitos negativos da peroxidação lipídica, contribuindo para a prevenção de diversas doenças. Ademais, estudos mostraram que esse composto obteve resultado mais eficaz do que os compostos antioxidantes clássicos como Trolox (um análogo da vitamina E), manitol e ascorbato (CASELLI *et al.*, 2016).

Vários métodos são utilizados para investigar a atividade antioxidante. Dentre os mais conhecidos estão o método de captura do radical orgânico (2,2-difenil-1-picril-hidrazila -DPPH e ATS), método de redução do ferro (FRAP) oxidação do  $\beta$ -caroteno (ácido linoleico) (ALAM; RAFIQUZZAMAN, 2013).

Técnicas eletroanalíticas também são passíveis de utilização para determinar a atividade antioxidante de substâncias de ampla distribuição em vegetais tais como ácidos ascórbico, resveratrol, flavonoides, taninos, antocianinas e derivados dos ácidos benzoico e cinâmico (ALVES *et al.*, 2010). Tais métodos apresentam vantagens por serem simples, baratos, rápidos e com alta sensibilidade (SÁ, 2013).

As técnicas voltamétricas podem correlacionar potenciais de oxidação, intensidade de corrente e/ou outros parâmetros eletroquímicos com a capacidade antioxidante, portanto podem se mostrar mais seletivas e sensíveis que os demais métodos espectrométricos. Entre as técnicas mais difundidas destacam-se a voltametria cíclica (CV), voltametria de onda quadrada (SWV) e a voltametria de pulso diferencial (DPV) (ALVES *et al.*, 2010).

### 1.9. ATIVIDADE ANTIFÚNGICA

As infecções por fungos são um problema de saúde global que afeta milhões de pacientes por ano. Alguns estudos trazem a estimativa de que atualmente existem descritas cerca de 72.000 espécies de fungos, das quais aproximadamente 300 espécies foram identificadas como patógenos de homens e animais. Estes fungos podem causar desde infecções localizadas cutâneas, subcutâneas ou em mucosas a infecções sistêmicas e potencialmente fatais (DROUHET, 2010).

Além disso, cerca de aproximadamente 1,5 milhões são infecções fúngicas disseminadas ou invasivas (IFIs), que requerem tratamento avançado e hospitalização. Infelizmente, estas últimas infecções estão associadas a altas taxas de mortalidade, com algumas próximas de 90%-95% (PEREA *et al.*, 2001; PIANALTO; ALSPAUGH, 2016).

Muitas das categorias de medicamentos antifúngicos são altamente efetivas nos contextos apropriados. No entanto, esses fármacos, como com qualquer terapia, têm limitações e ressalvas. Por exemplo, a toxicidade associada a alguns agentes antifúngicos podem tornar proibitivas seu uso ou serem aceitas para efetivamente tratar o paciente. Existem poucos agentes antifúngicos aprovados para o tratamento das IFI's, classificados em apenas quatro classes (Tabela 1).

Tabela 1: Medicamentos antifúngicos aprovados para o tratamento de infecções fúngicas invasivas.

Classes	Representantes	Mecanismo de Ação
<b>Polienos</b>	Anfotericina B	Ligação ao ergosterol da membrana plasmática, produzindo poros e alterando a integridade da membrana
<b>Azóis</b>	Fluconazol, Intraconazol...	Inibição da 14a-demetilase (citocromo P450 51 ou CYP51), que catalisa o passo final na biossíntese de ergosterol
<b>Equinocandina</b>	Caspofungina, Micafungina...	Afetam a biossíntese da parede celular através da inibição competitiva da $\beta$ -1,3-glucansintase
<b>Anti-metabólitos</b>	Flucitosina	Redução da síntese do ergosterol, através da inibição das enzimas fúngicas do citocromo P450

Fonte: Adaptado de PIANALTO; ALSPAUGH, 2016.

A limitação adicional é o pequeno número de alvos sobre os quais esses fármacos atuam, devido ao alto nível de similaridade gênica entre os patógenos e os hospedeiros humanos. Por outro lado, das quatro classes de fármacos antifúngicas aprovadas para o tratamento de infecções fúngicas invasivas, duas delas, polienos e azóis, visam o mesmo componente da membrana celular fúngica. Este pequeno número de alvos celulares aumenta as oportunidades de fungos para desenvolver resistência a um ou mais dos antifúngicos disponíveis (PIANALTO; ALSPAUGH, 2016).

Ademais, o problema da resistência antifúngica está em ascensão e até a data, existe resistência a todas as classes disponíveis de agente antifúngico. As espécies de *Candida* têm uma alta prevalência de resistência azóis, em grande parte atribuída à natureza citostática desses fármacos (SANGUINETTI *et al.*, 2005). Do mesmo modo, cepas de *Aspergillus* e *Cryptococcus* também demonstraram resistência (TELLES *et al.*, 2017).

Com isso, faz-se crescente a demanda pela pesquisa e desenvolvimento de novas classes de antifúngicos (LOBO *et al.*, 2013). Flavonóides, alcaloides e taninos são exemplos de metabólitos vegetais ativos cujas propriedades antifúngicas têm sido relatadas e seus potenciais avaliados *in vitro* (ARIF *et al.*, 2011).

Estudos apontam a capacidade que flavonóides possuem de inibir não só a germinação de esporos patogênicos em plantas como também atuar no combate das infecções fúngicas em humanos. Tal atividade deve-se provavelmente à capacidade destes compostos em formar complexos com proteínas solúveis presentes nas paredes das células fúngicas e a sua natureza lipofílica, que ajuda na ruptura das membranas desses patógenos (FLAMBÓ, 2013; ARIF *et al.*, 2011).

Nos últimos anos tem crescido o interesse em avaliar a suscetibilidade antifúngica, contribuindo para o aprimoramento de métodos, principalmente na determinação da resistência a antifúngicos. Com isso, o Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) tem desenvolvido e padronizado testes para determinação da suscetibilidade *in vitro* de leveduras, como os métodos de diluição em caldo (MD) e a difusão em disco (DD) (Demitto *et al.*, 2012).

Não obstante, também é sabido que existe uma carência de publicações sobre testes de suscetibilidade de *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii*, o que faz interessante o avanço nas pesquisas desse gênero (MORALES, 2009).

## 2 OBJETIVOS

---

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. OBJETIVO GERAL

Produzir derivados da morina através da biossíntese *in vitro* utilizando fungos filamentosos como catalisadores, purificar, caracterizar estruturalmente e avaliar as atividades antioxidante e antifúngica.

### 2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Selecionar as cepas da coleção do LaBiocon para catalisar a biossíntese e produção *in vitro* de novos derivados;
2. Selecionar a cepa mais promissora e avaliar os diferentes parâmetros envolvidos no processo;
3. Escalonar da reação com células livres e imobilizadas
4. Desenvolver e aplicar metodologias de monitoramento das cinéticas reacionais e processos de purificação dos derivados de interesse;
5. Caracterizar estruturalmente os derivados obtidos;
6. Realizar testes das atividades antioxidante, antifúngica e citotoxicidade celular em hemácias para morina e derivado.
7. Avaliar *in silico* as atividades antioxidante e antifúngica da morina e de seus derivados.
8. Predizer *in silico* o metabolismo da morina.

### **3 METODOLOGIA**

---

### 3. METODOLOGIA

#### 3.1. PRODUTO DE PARTIDA

A Morina (2',3,4',5,7-Pentahidroxi flavona dihidratada) foi adquirida através da empresa Sigma Aldrich, apresenta uma pureza de 95% e fórmula molecular  $C_{15}H_{10}O_7$ . Sua massa molar é de 302.2357 g/mol e possui densidade de 1,799 g/mL. Como características físico-químicas apresenta ponto de fusão de 300 °C e ponto de ebulição 645,5 °C a 760 mmHg. Antes dos experimentos serem iniciados, foi realizada a caracterização desse composto através de Espectrofotometria na região do UV, Ressonância Magnética Nuclear e Espectrometria de Massas.

##### 3.1.1. Espectrofotometria na Região do UV (UV-Vis)

Para a determinação do comprimento de onda de máxima absorção foi utilizado o Espectrofotômetro Cintra® 10e UV-visível Spectrometer de 200 a 400 nm. O substrato e o derivados foram solubilizados em metanol e a análise ocorreu no LaBiocon, situado na Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Goiás.

##### 3.1.2. Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

As análises de RMN foram realizadas no Laboratório de RMN do Instituto de Química da Universidade Federal de Goiás. O aparelho utilizado foi o espectrômetro Bruker Avance III 500 de 11,75 T (500,13 MHz para  $^1H$  e 75,46 MHz para  $^{13}C$ ), equipado com sonda HR-MAS de 4 mm. Para o envio das amostras para análise, foi utilizado Metanol Deuterado (CIL – Cambridge Isotope Laboratories) com tetrametilsilano (TMS) como padrão interno.

##### 3.1.3. Espectrometria de Massas (MS)

A caracterização da morina foi realizada em Espectrômetro de massas Q Exactive, Thermo Scientific, com fonte H-ESI, operando em modo negativo, *full-scan*, resolução de 70000, utilizando voltagem do spray 4000 V, sheath gás 12 unidades arbitrárias, auxiliar gás 0 unidades arbitrárias, temperatura do capilar 300 °C, S-lens 55. Utilizou-se o programa Xcalibur para a análise qualitativa dos dados. Os dados também foram adquiridos

em modo positivo, resolução de 70000, utilizando voltagem do spray 3000 V, sheath gás 10 unidades arbitrárias, auxiliar gás 0 unidades arbitrárias, temperatura do capilar 300 °C, S-lens 55. A amostra foi diluída em metanol grau HPLC e adicionada de 0,1% de ácido fórmico.

### 3.2. MICRO-ORGANISMOS

Os dezoito micro-organismos selecionados para os experimentos foram provenientes de três coleções, sendo elas American Type Culture Collection (ATCC), Northern Utilisations Research and Development Division (NRRL) e cepas de fungos filamentosos isolados do Cerrado brasileiro. Todas as cepas estão listadas na tabela 2.

Tabela 2: Micro-organismos utilizados na triagem.

<b>Micro-organismos</b>	<b>Coleção</b>
<i>Aspergillus ochraceus</i>	ATCC 1009
<i>Beauveria bassiana</i>	ATCC 7159
<i>Cunninghamella echinulata</i>	ATCC 9244
<i>Cunninghamella echinulata</i>	ATCC 9245
<i>Cunninghamella elegans</i>	ATCC 26169
<i>Cunninghamella elegans</i>	ATCC 36112
<i>Cylindrocarpus radícíola</i>	ATCC 11011
<i>Fusarium roseum</i>	ATCC 14717
<i>Mucor plumbeus</i>	ATCC 4740
<i>Pycnoporus sanguineus</i>	-
<i>Rodotorula mucilagínosa</i>	-

<i>Rhizopus arrizus</i>	ATCC 11145
<i>Absidia blakesleana</i>	ATCC 10148b
<i>Mortierella isabelina</i>	NRRL 1757
IP 94	Cerrado
IP 127	Cerrado
IP 147	Cerrado
IP1 53	Cerrado

Os micro-organismos foram mantidos em ágar batata inclinados entre 2-4 °C. A cada experimento as cepas foram repicadas e mantidas em câmara germinativa do tipo *Biochemical oxygen demand* (B.O.D.) (Modelo TE 401 Tecnal<sup>®</sup>) a 27 °C, por 7 dias para crescimento. Após esse período, a morfologia e coloração das cepas foram avaliadas macroscopicamente e então utilizadas nos experimentos.

### 3.3. MEIO DE CULTURA

Foi realizada uma triagem utilizando três tipos de meios diferentes: Glicose, PDSM (Potato dextrose soy médium) e Czapek. Cada 1000 mL de meio de cultura de glicose é composto por 20 g de glicose anidra (Synth<sup>®</sup>), 5 g de extrato de levedura (Biolog<sup>®</sup>), 5 g de peptona de soja (Biolog<sup>®</sup>), 5g lecitina de soja (Biolog<sup>®</sup>), 5 g NaCl (Dinâmica<sup>®</sup>) e 5 g de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (Neon<sup>®</sup>), q.s. água destilada. O meio PDSM possui 5 g de peptona bacteriológica (Biolog<sup>®</sup>), 5 g de lecitina de soja (Biolog<sup>®</sup>), 5 g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (Neon<sup>®</sup>), 5 g de NaCl (Dinâmica<sup>®</sup>), 20 g de glicose anidra (Synth<sup>®</sup>) e 3 g de extrato de levedura (Biolog<sup>®</sup>). Já o meio Czapek é composto de 30 g de sacarose, 2 g de NaNO<sub>3</sub>, 1 g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,01 g de FeSO<sub>4</sub>, 0,5 g de KCl e 0,5 g de MgSO<sub>4</sub>.

Os meios preparados foram transferidos 100 mL do meio para Erlenmeyers de vidro de boca larga de 250 mL. O processo de esterilização foi feito através de calor úmido, utilizando-se autoclave, que foi aquecida a 121 °C por 15 minutos.

### 3.4. TRIAGEM DOS MICRO-ORGANISMOS

A triagem foi realizada para verificar dentre os dezoito micro-organismos utilizados quais seriam capazes de consumir e biotransformar o substrato (morina).

Com o auxílio de uma pipeta de Pasteur de vidro, os esporos foram ressuspensos em glicerol 25% e uma gota dessa suspensão de esporos, numa concentração de  $7 \times 10^4$  foi transferida para Erlenmeyers contendo 100 mL do meio líquido de glicose. Os Erlenmeyers foram identificados quanto ao micro-organismo que cada um continha e foram incubados em incubador rotativo (TE 420 Tecnal<sup>®</sup>) a 200 rpm, 28 °C durante 65 horas para que os micro-organismos pudessem crescer. Após esse período, o substrato foi solubilizado em etanol (Qhemis) e então adicionado nos Erlenmeyeres numa concentração de 25 mg do substrato em 100 mL de meio de cultura.

Em seguida, os Erlenmeyers foram novamente incubados a 200 rpm, 28 °C e alíquotas de 1 mL dos meios de incubação foram retiradas nos tempos de 24 horas, 48 horas, 72 horas e 96 horas e transferidas para Eppendorfs. Para análises por cromatografia em camada delgada (CCD), as alíquotas foram saturadas com cloreto de sódio, extraído com acetato de etila (Neon<sup>®</sup>) e aplicado em cromatofolhas de alumínio com sílica gel 60 F<sub>254</sub>. Para que a influência de componentes do meio de cultura, dos micro-organismos ou de uma possível degradação do substrato ao longo do tempo de incubação pudesse ser avaliada, dois diferentes experimentos de branco foram realizados. O primeiro branco contendo meio de cultura e micro-organismo, e o segundo branco contendo meio de cultura e substrato.

### 3.5. ENSAIO EM ESCALA SEMIPREPARATIVA

#### 3.5.1. Células Livres

Após as análises em cromatografia em camada delgada (CCD) dos sobrenadantes de incubação, a cepa *Beauveria bassiana* ATCC 7159 foi escolhida para a realização do *scale up*, incubação em escala semipreparativa, com a morina. Foram utilizados 10 Erlenmeyers de 250 mL de boca larga com 100 mL de meio líquido de glicose, com o substrato numa concentração de 25 mg/100mL.

### 3.5.2. Células Imobilizadas

Depois de cultivadas em meio sólido de ágar batata, as cepas de *Cunninghamella echinulata* ATCC 9244 foram semeadas em 50 mL meio de cultura líquido de glicose em Erlenmeyers de boca larga com capacidade de 250 mL com molas de aço inoxidável em contato com o vidro dos frascos de cultivo e acomodadas firmemente no fundo dos frascos. Aos Erlenmeyers foi adicionado o substrato numa concentração de 25 mg/100 mL, e estes mantidos em incubadora rotativa (Tecnal<sup>®</sup> Model TE 420), a 28 ° C, 150 rpm, por 96 horas. Durante esse período, foram observados a formação do biofilme pela extensão da mola de aço inoxidável, seu aspecto morfológico, agitação e temperatura de incubação.

### 3.6. ESCALONAMENTO DA REAÇÃO

Um biorreator (Tecnal<sup>®</sup>) com capacidade para 7,5 L, equipado com medidor de pH, aeração, controle de temperatura e agitação foi utilizado para os ensaios em larga escala. Para isso, 1,5 mL de suspensão de esporos de *B. bassiana* ATCC 7159 em solução de glicerol a 25 % foram transferidos para o biorreator contendo 2 L de meio de cultura líquido de glicose. O substrato, diluído em metanol, foi adicionado após 65 h de crescimento da cepa de *Beauveria bassiana* ATCC 7159 no biorreator na concentração de 25 mg/ 100 mL. A reação ocorreu durante 96 horas, sendo mantidos os parâmetros de temperatura a 28 °C, rotação de 200-250 rpm, taxa de oxigênio acima de 80% e pH 6.0.

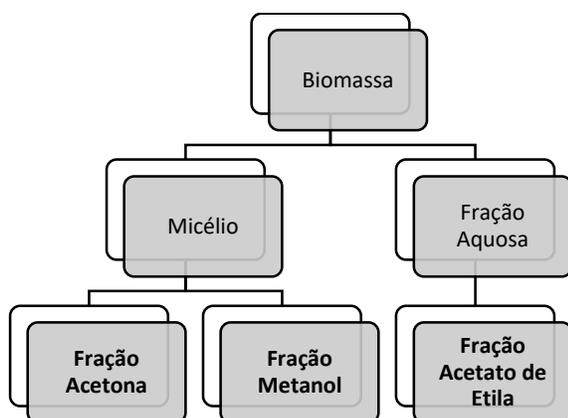
### 3.7. EXTRAÇÃO

Após um período de 96 horas de incubação o conteúdo dos 10 Erlenmeyers foi reunido e a biomassa foi filtrada em funil de Büchner com gaze sob vácuo. A solução filtrada foi saturada com cloreto de sódio (Dinâmica<sup>®</sup>) e posteriormente filtrada em funil de Büchner contendo Celite-545 (Tedia<sup>®</sup>) também sob vácuo. O filtrado do sobrenadante da incubação foi então denominado “Fração Aquosa” e transferido para uma ampola de separação, onde foi extraído com três porções de 100 mL de acetato de etila. Após a extração da fração aquosa, esta foi descartada restando assim a fração acetato de etila. Então, adicionou-se sulfato de

magnésio anidro à esta fração e ela foi filtrada em papel de filtro. O filtrado foi então evaporado em evaporador rotativo Tecnal® modelo TE-211, acoplado a bomba de vácuo Tecnal® TE-058 resultando em um extrato bruto seco para então prosseguir para a etapa de purificação.

O micélio separado na filtração foi extraído primeiramente com acetona (Neon®) (200 mL) em agitador magnético por 15 minutos e depois de filtrado em papel de filtro, e depois foi extraído com metanol (Synth®) (200 mL), também em agitador magnético por 15 minutos e filtrada novamente. Assim, foram obtidas a fração metanol e a fração acetona. As frações foram evaporadas em evaporador rotativo originando dois extratos brutos secos para posterior purificação. A figura 10 mostra o fluxograma da extração.

Figura 9: Fluxograma da extração.



Fonte: Autor.

### 3.8. PURIFICAÇÃO DOS DERIVADOS

Para o processo de purificação, foram utilizadas duas técnicas. A primeira técnica foi realizada por cromatografia de adsorção em coluna, utilizando uma coluna de vidro com 30 cm de comprimento e 1,5 cm de diâmetro, preenchida com fase estacionária sílica gel 60 Å, (Silicycle®). O primeiro extrato seco purificado foi o da fração acetato de etila. Após a solubilização em metanol, foi adicionado sílica gel 60 Å (Silicycle®), para a formação da pastilha, que foi transferida para a coluna de vidro previamente compactada com fase estacionária. Gradientes de solventes foram eluídos na coluna sendo as fases móveis partindo de acetato de etila e aumentando a força de eluição com metanol nas proporções listadas na tabela 3.

Tabela 3: Proporção dos solventes utilizados na cromatografia em coluna.

<b>Fase Móvel (%)</b>	
<b>Acetato de Etila</b>	<b>Metanol</b>
100	0
95	5
90	10
70	30
50	50
0	100

Fonte: Autor.

O monitoramento foi realizado através de Cromatografia em Camada Delgada, onde foi utilizada a fase móvel AcOEt:MeOH (95:5) como eluente e luz UV (254 nm) para revelação.

Os produtos purificados tiveram seus solventes evaporados e foram mantidos em dessecador para posterior pesagem. O procedimento foi repetido para o extrato seco da fração metanol e acetona.

Já a segunda técnica utilizada para a purificação do derivado foi através de cromatografia preparativa no qual o equipamento automatizado IsoleraOne (Biotage®). Nessa metodologia também foi utilizada sílica como fase estacionária e uma fase móvel gradiente partindo de acetato de etila e finalizando com metanol.

### 3.9. CARACTERIZAÇÃO DOS DERIVADOS

O derivado purificado foi identificado e caracterizado através de análises de Espectrofotometria na Região do UV-Vis, Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio e Carbono (RMN  $^1\text{H}$   $^{13}\text{C}$ ) e Espectrometria de Massas (MS), utilizando as metodologias descritas em 3.1.1, 3.1.2 e 3.1.3.

### 3.10. ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

#### 3.10.1. Ensaios Eletroquímicos

A voltametria foi realizada com um potenciostato/galvanostato Autolab III integrado ao software GPES 4,9, Eco-Chemie, Utrecht, Países Baixos. As medições eletroquímicas foram realizadas utilizando uma célula de 5,0 mL, com um sistema de três eletrodos constituído por uma pasta de carbono (preparada tal como um suporte de pistão-driven contendo 75% de pó de grafite e 25% de Nujol,  $\varnothing = 2$  mm), e um fio de Pt/Ag/AgCl/KCl, representando o eletrodo de trabalho, eletrodo de controle e o eletrodo de referência, respectivamente. A pasta de carbono foi renovada mecanicamente antes de cada experiência, a fim de assegurar reprodutibilidade dos resultados. As condições experimentais para voltametria de pulso diferencial (DPV) foram: amplitude de pulso 50 mV, largura de pulso 0,5 s e velocidade de varredura 5 mV s<sup>-1</sup>. Todos os dados foram analisados e tratados com o Software Origin 8. Todas as experiências foram realizadas à temperatura ambiente ( $25 \pm 1$  °C) em triplicata (n = 3) e o principal eletrólito utilizado foi 0.1 M de solução de tampão fosfato (PBS), pH 5,0.

### 3.11. ATIVIDADE ANTIFÚNGICA

#### 3.11.1. Avaliação das Concentrações Inibitória e Fungicida Mínimas

O composto foi previamente solubilizado em dimetilsulfoxido (DMSO) e diluído em caldo RPMI 1640 (Sigma Chemical Co) com L- glutamina e sem bicarbonato de sódio, tamponado a pH 7,0 com ácido morfolinopropanossulfônico (MOPS; Sigma Chemical Co), de maneira que as concentrações variaram 512 a 1 µg/mL.

A triagem foi realizada com dois isolados de *Cryptococcus neoformans* e uma cepa de *Cryptococcus gattii* ATCC 24065 através do método de susceptibilidade *in vitro* sendo utilizada a técnica de microdiluição em caldo, segundo o documento M27-A3 do Clinical Laboratory Standard Institute (CLSI 2008, 2012), que permite determinar a menor concentração do composto capaz de inibir espécies testadas (CIM). Subsequentemente foi realizada a concentração fungicida mínima (CFM), sendo esta a menor concentração do composto capaz de matar o fungo. Os teste foram realizados em duplicata.

## 3.12. CITOTOXICIDADE

### 3.12.1. Avaliação da Citotoxicidade em Hemácias

O composto foi avaliado quanto a sua capacidade citotóxica em hemácias sendo determinada através do ensaio de atividade hemolítica de acordo com He e colaboradores (2007).

Foram centrifugados 5 mL de sangue de carneiro desfibrinado (Newprov), e lavado uma vez com tampão fosfato salino (PBS) pH 7,4. As hemácias foram diluídas em 20 mL do mesmo tampão (diluição 1:5). Os compostos foram diluídos em tampão PBS pH 7,4 em concentrações de 512 a 4 µg/mL e armazenados em tubos eppendorff. Foram adicionados 50 µL da solução de hemácias a 50µL de cada concentração do composto. A suspensão foi incubada a 37 °C sob agitação durante 30 minutos, centrifugada a 3000 rpm por 5 minutos e, 80µL do sobrenadante de cada suspensão foi colocado em placa de microtitulação de 96 poços. O experimento foi realizado em duplicata, e como controle positivo da hemólise foi utilizado Triton x-100 a 1% e a solução de hemácias com PBS pH 7,4 como controle negativo. O aparelho Multiskan Thermo Labsystems® foi utilizado para realização da leitura a 450 nm para determinação da absorbância de cada amostra. A porcentagem de hemólise foi calculada pela seguinte equação:

$$\text{Hemólise\%} = \frac{\text{Abs composto} - \text{CN}}{\text{Abs CP} - \text{Abs CN}} \times 100$$

Onde: CN= controle negativo; CP= controle positivo e Abs= absorbância.

## 3.13. AVALIAÇÃO *IN SILICO*

### 3.13.1. Metabolismo

O MetaPrint2D é um algoritmo melhorado para a predição do sitio do metabolismo e que prevê as mudanças que podem ocorrer nos compostos através da busca de dados e

análise estatística das transformações metabólicas conhecidas relatadas na literatura científica (SOUSA *et al.*, 2013). O método usa um banco de dados de ambientes atômicos encontrados em moléculas conhecidas por serem submetidas a transformação metabólica. O software foi usado na plataforma web (<http://www-metaprint2d.ch.cam.ac.uk/>) carregando o fio SMILES do substrato e dos compostos obtidos. MetaPrint2D-React pode fazer previsões sobre uma gama ampla de reações das fases I e II; é capaz de prever os tipos de transformações que podem ocorrer facilmente no local do metabolismo.

### 3.13.2. Potenciais Atividades Biológicas

As atividades biológicas *in silico* dos compostos caracterizados foram preditas utilizando a base de dados do PASS (<http://www.pharmaexpert.ru/passonline>). Essa base de dados leva em consideração informações da literatura de experimentos realizados *in vitro* e *in vivo* para sugerir possíveis atividades biológicas. Os resultados do software PASS são mostrados como um valor de probabilidade de ser ativo (Pa) e inativo (Pi). Para validar a atividade biológica dos compostos encontrados na amostra, escolhemos apenas os valores de Pa acima de 0,700 (PARASURAMAN, 2011).

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

---

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

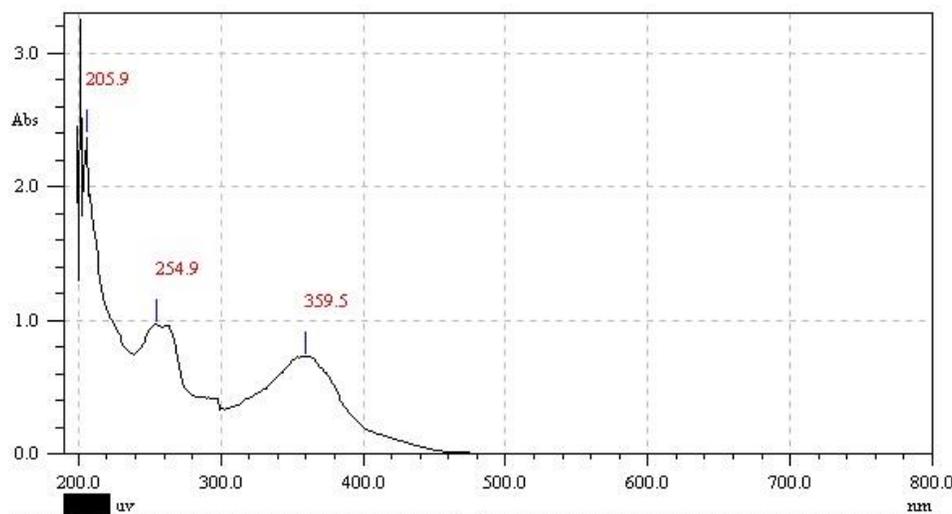
### 4.1. PRODUTO DE PARTIDA

Para dar início aos experimentos, a morina foi analisada através de metodologias de Espectrofotometria na Região do UV (UV-Vis), Espectrometria de Massas (EM) e Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio e Carbono (RMN  $^1\text{H}^{13}\text{C}$ ) a fim de se avaliar a pureza do produto.

#### 4.1.1. Espectrofotometria na Região do UV (UV-Vis)

Foi realizada a varredura de comprimento de onda na região do UV do substrato em Espectrofotômetro Cintra 10<sup>e</sup> UV-visible Spectrometer, onde foram observadas as absorções em 254.9 nm e 359.1, como demonstrado na figura abaixo.

Figura 10: Espectrograma na região do UV da Morina, em metanol, na faixa de comprimento de onda de 200,0 a 400,0 nm.



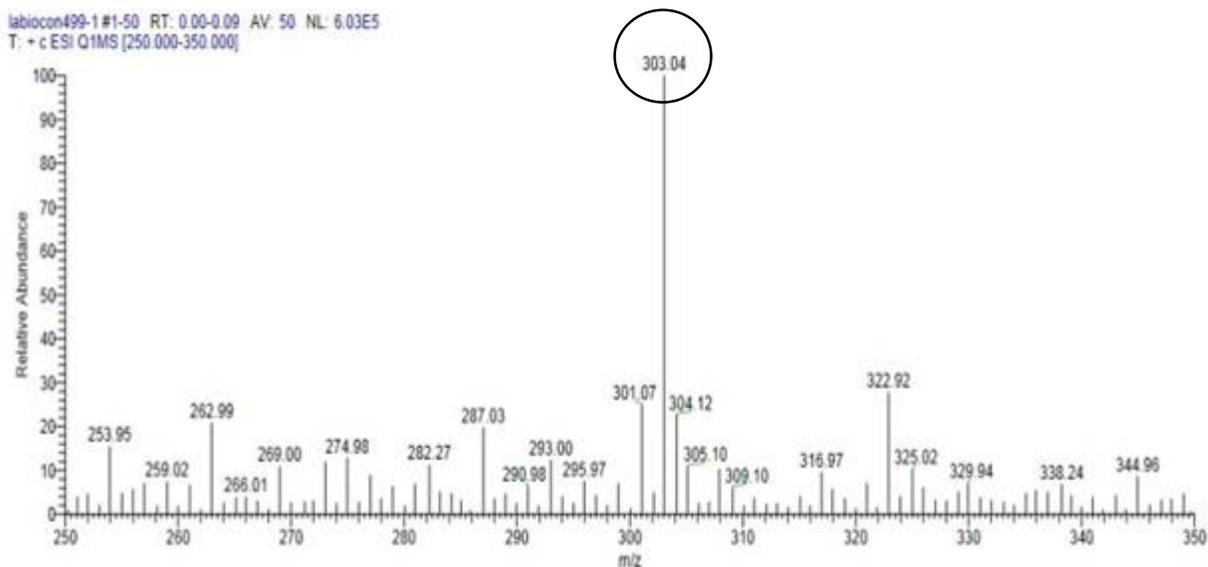
Legenda: Análise realizada em espectrofotômetro Cintra 10<sup>e</sup> UV-visible Spectrometer  
Fonte: Autor.

Os espectros em metanol dos flavonóis apresentam duas bandas de maior absorção na região de 200 a 450 nm. Esses dois picos são referidos comumente como banda I, que tem absorção normalmente em 300 a 385 nm e está associada com a absorção dos anéis (B+C) e a banda II, que possui absorção normalmente entre 240 a 280 nm e está principalmente associada com a conjugação dos anéis (A+C) (MABRY *et al.*, 1970)

#### 4.1.2. Espectrometria de Massas (MS)

A figura 12 apresenta o espectro de massas (FTICR-MS) da morina, no qual se observa o pico  $m/z = 303.04$ , referente à  $[M + H]^+$ , com erro  $< 1$  ppm para a fórmula  $C_{15}H_{10}O_7$ .

Figura 11: Espectro de Massas da Morina.



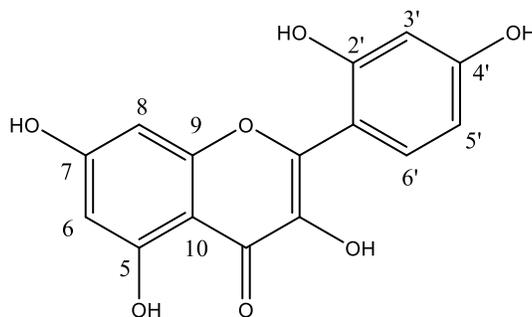
Legenda: Espectro de massas da morina, *full scan*

Fonte: Autor.

#### 4.1.3. Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

As análises de RMN de  $^1H$  e de  $^{13}C$  HMBC do substrato foram realizadas em espectrômetro Bruker Avance III 500 de 11,75 T (500,13 MHz para o  $^1H$  e 75,46 MHz para o  $^{13}C$ ). Os espectros foram registrados em  $CD_3OD$ , com TMS como padrão interno e apresentaram deslocamentos na faixa de  $\delta H$  6,19-7,43 para os hidrogênios dos carbonos 6, 8, 3', 5' e 6' e os espectros de carbono mostraram correlação dos mesmos carbonos nos deslocamentos de  $\delta^{13}C$  97,7-130,7. A tabela 4 mostra as atribuições dos deslocamentos químicos obtidos do espectro de RMN de  $^1H$  e de  $^{13}C$  da morina (Figura 13).

Figura 12: Estrutura da Morina com representação numérica



Fonte: Autor.

Tabela 4: Sinais evidenciados no espectro de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  RMN da Morina

Posição	Morina	
	$\delta$ $^1\text{H}$ (mult., J Hz)	$\delta$ $^{13}\text{C}$
6	6,19 (d; 2,01)	97,70
8	6,34 (d; 2,01)	93,00
3'	6,45 (d; 2,37)	103,30
5'	6,50 (dd; 2,37; 8,58)	108,0
6'	7,43 (d; 8,58)	130,7

Legenda:  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  RMN baseados em  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HMBC. Dados obtidos em  $\text{CD}_3\text{OD}$  em 500 MHz e 125 MHz. Multiplicidades: duplete (*d*), duplo duplete (*dd*).

Fonte: Autor.

## 4.2. MICRO-ORGANISMOS

A morfologia das cepas utilizadas foi verificada antes, durante e depois do experimento. Elas apresentaram crescimento satisfatório após o período de incubação de 7 dias em meio sólido de ágar batata inclinado, onde foi possível observar aspecto algodinoso ou coriáceo com uma variação entre as cores branco, cinza e marrom para as diferentes espécies de fungos filamentosos (Figura 14). Os esporos das cepas selecionadas para a triagem foram então ressuspensos em uma solução de glicerol a 25% e inoculados no meio de cultura líquido de glicose. Durante essa incubação, foi observado o crescimento das cepas nos

Erlenmeyeres variando entre micélios dispersos no meio de cultura (massa amorfa) e a formação de *pellets* de biomassa agregada, dependendo da espécie da cepa utilizada.

Figura 13: Cepas de fungos filamentosos utilizadas na triagem para avaliar a capacidade de consumir e biotransformar o substrato morina.



Fonte: Autor.

Em seu trabalho, Nunes (2001) apontou a importância do oxigênio para o crescimento fúngico de maneira exponencial e demonstrou que o efeito inibitório decorrente da limitação de oxigênio pode ser minimizado através da agitação da cultura (fungo + meio líquido), o que também favorece a difusão de nutrientes no meio. Ainda sobre esse assunto, foi demonstrado que o experimento utilizando Shaker (incubador rotativo) possuía uma melhor capacidade de suprir a cultura fúngica com maior aeração e difusão de nutrientes que os experimentos em B.O.D. que foram conduzidos de forma estática.

Além disso, presença do halo de crescimento também foi observada durante toda a incubação indicando que a viabilidade dos micro-organismos foi mantida mesmo após a adição do substrato.

#### 4.3. TRIAGEM DOS MICRO-ORGANISMOS

Os fungos foram descobertos há milhares de anos. No entanto, o estudo sistemático desse grupo de micro-organismos apresenta apenas cerca de 270 e traz inúmeros benefícios não só no âmbito da medicina, mas também para o avanço dos processos biotecnológicos. Eles possuem papéis importantes e podem afetar de forma positiva através de

biotransformações, produção de metabólitos úteis, atividade enzimática, produção de biomassa, controle biológico e entre outros (PEREIRA, 2002).

Foi realizada uma triagem dos micro-organismos utilizando 18 (dezoito) cepas de fungos filamentosos da coleção do Laboratório de Bioconversão (LaBiocon) a fim de se avaliar a capacidade catalisadora destes frente a morina (Quadro 1).

Para a triagem das cepas capazes de modificar a morina, as análises foram realizadas através de alíquotas do meio de incubação retiradas a cada 24 horas, aplicadas em cromatografia em camada delgada e eluídas utilizando a fase móvel: acetato de etila: metanol (AcOEt:MeOH), 90:10.

Quadro 1: Resultado da análise de CCD da biotransformação da morina após 96 horas de incubação com diferentes micro-organismos em meio de glicose, 28 °C e 200 rpm.

MICRO-ORGANISMOS	PRODUTOS			
	Derivado 1 (Rf: 0,33)	Derivado 2 (Rf: 0,53)	Derivado 3 (Rf: 0,87)	Morina (Rf: 0,84)
<i>Absidia blaklesleana</i> ATCC 10148b	-	+	-	+
<i>Aspergillus ochraceus</i> ATCC 1009	-	-	-	-
<i>Beauveria bassiana</i> ATCC 7159	+	+	+	-
<i>Cunninghamella echinulata</i> ATCC 9244	-	+	+	+
<i>Cunninghamella echinulata</i> ATCC 9245	-	+	-	+
<i>Cunninghamella ellegans</i> ATCC 26169	-	+	-	+
<i>Cunninghamella ellegans</i> ATCC 36112	-	+	-	+
<i>Cylindrocarpus radicolata</i> ATCC 11011	-	-	-	-
<i>Fusarium roseum</i> ATCC 14717	-	+	-	+
IP 94	-	-	-	+
IP 127	-	-	-	-
IP 147	-	-	-	+
IP 153	-	-	-	+
<i>Mortierella isabelina</i> NRRL 1757	-	-	+	+
<i>Mucor plumbeus</i> ATCC 4740	-	-	-	-
<i>Pycnoporus sanguineus</i>	-	+	-	+
<i>Rodotorula mucilaginoso</i>	-	-	-	-
<i>Rhizopus arrizus</i> ATCC 11145	-	+	-	+

Legenda: O símbolo (-) indica ausência e (+) presença dos metabólitos da morina em meio de glicose. Fase móvel: AcOEt:MeOH (90:10), fase estacionária sílica gel 60 F<sub>254</sub> com 0,25 cm de espessura e visualização por UV 254 nm. Fonte: Autor.

Através do quadro é possível observar que dentre as 18 (dezoito) cepas de fungos filamentosos avaliados na reação de biossíntese, 10 (dez) cepas (listadas no quadro 1) foram

capazes de catalisar a modificação estrutural da morina, produzindo até 3 (três) derivados do substrato, dependendo da cepa.

As 8 cepas que não foram capazes de formar derivados foram *Aspergillus ochraceus*, *Cylindrocarpus radicol*, *Rodotorula mucilaginoso*, *Mucor plumbeus* e mais 4 (quatro) cepas isoladas do Cerrado Goiano (IP 94, IP 127, IP 147 e IP 153). Destas, a maioria (5 cepas) foi capaz de consumir toda a morina adicionada ao meio de cultura, mas não conseguiram exteriorizar os possíveis produtos formados. Já as 3 cepas restantes, todas IP's (IP 94, IP 147 e IP 153), não internalizaram o substrato adicionado ao meio de cultura líquido.

Também foi possível observar que após 96 horas da adição do substrato o mesmo ainda estava presente na maioria dos Erlenmeyers, sendo apenas 6 cepas capazes de consumir a morina em sua totalidade.

#### 4.4. ENSAIO EM ESCALA SEMI-PREPARATIVA

##### 4.4.1. Células Livres

O micro-organismo selecionado para catalisar a reação de biossíntese utilizando células livres em escala semi-preparativa foi a *B. bassiana* ATCC 7159, pois esta cepa foi capaz de consumir todo o substrato adicionado ao meio de cultura após o período de incubação e produziu, após o período de 96 horas de incubação, uma maior quantidade de derivados (3), sendo dois mais polares que o produto de partida e um mais apolar (Quadro 2).

Quadro 2: Resultado da análise de CCD da biossíntese de derivados da morina por *B. bassiana* ATCC 7159, após 96 horas de incubação em meio de glicose a 28 °C e 200 rpm.

MICRO-ORGANISMO	PRODUTOS			
	Derivado 1	Derivado 2	Derivado 3	Morina
	(Rf: 0,33)	(Rf: 0,53)	(Rf: 0,87)	(Rf: 0,84)
<i>Beauveria bassiana</i> ATCC 7159	+	+	+	-

Legenda: O símbolo (-) indica ausência e (+) presença dos metabólitos da morina em meio de glicose. Fase móvel: AcOEt:MeOH (90:10), fase estacionária sílica gel 60 F<sub>254</sub> com 0,25 cm de espessura e visualização por UV 254 nm. Fonte: Autor.

Durante o período de incubação foram observados pH, temperatura, agitação, aspecto e crescimento da cepa. Ao final de sete dias de incubação em B.O.D., a cepa utilizada

apresentou aspecto coriáceo e coloração branca quando incubada em meio sólido (ágar batata). Já após 96 horas de cultivo livre no meio de cultura líquido de glicose, a 28 °C e 200 rpm, o micélio apresentou-se disperso, configurando-se em um aspecto amorfo. A mesma manteve-se com o halo de crescimento durante toda a incubação, o que permitiu constatar viabilidade celular (Figura 15).

Figura 14: Característica de crescimento da cepa de *B. bassiana* ATCC 7159 em meio sólido e em meio líquido de glicose.



Fonte: Autor.

Os metabólitos formados através de reações microbianas são geralmente mais polares e quimicamente distintos das substâncias que os originam. Estudos mostram que o uso de fungos filamentosos como *Beauveria bassiana* ATCC 7159 em modelos *in vitro* tem-se mostrado útil na biossíntese de uma grande variedade de compostos orgânicos. Isso acontece principalmente pela capacidade que esse micro-organismo possui de realizar reações de fase I e II tais como oxidação, redução, conjugação e entre outras (ALEXANDRE, 2004; CIRILO, 2005).

#### 4.4.2. Células Imobilizadas

O interesse em cultivo de células imobilizadas vem se destacando desde a década de 70 devido à sua aplicação como alternativa ao isolamento e purificação de enzimas. A utilização de células fúngicas na imobilização celular para biossíntese tem levado a obtenção de derivados vantajosos (AMADIO, CASEY *et al.*, 2013).

Para o ensaio em escala semi-preparativa utilizando células imobilizadas, foi utilizada a cepa *Cunninghamella echinulata* ATCC 9244 cujos produtos obtidos foram semelhantes aos obtidos com a cepa de *Beauveria bassiana* ATCC 7159 e cujo desempenho no crescimento do biofilme foi mais satisfatório (Figura 16).

Figura 15: Aspecto morfológico das cepas de *Cunninghamella echinulata* ATCC 9244 imobilizadas em molas de aço inoxidável em contato com o vidro dos frascos de cultivo.



Legenda: Erlenmeyer com crescimento do biofilme de *C. echinulata* ATCC 9244. Fonte: Autor.

O meio de cultura líquido de glicose utilizado na incubação mostrou-se viável para o crescimento e formação dos biofilmes de *C. echinulata* ATCC 9244. No cultivo das células imobilizadas, o meio de cultura líquido deve garantir crescimento homogêneo e uniforme ao longo da matriz imobilizadora, molas de aço inoxidável (utilizadas nesse experimento), o que está aliado a maiores taxas de biossíntese. Meios de cultura compostos por glicose podem estimular o crescimento celular do biofilme. Em contrapartida, a escassez de fontes de carbono e nitrogênio ou a carência de outros nutrientes podem levar à deformação do biofilme (PAKULA; FREEMAN, 1996).

A agitação é um outro parâmetro importante na formação do biofilme, uma vez que a sua intensidade afeta não só a morfologia fúngica como também a transferência de massa. Amadio e colaboradores (2013) observaram que nas incubações conduzidas sem agitação, o crescimento celular deu-se apenas sob a forma de hifas aéreas, sem formação de biofilme. Na maioria das reações de biossíntese utilizando fungos filamentosos, seja em células livres ou imobilizadas, é requerida uma alta taxa de agitação, a fim de viabilizar a homogeneização do meio e a transferência de massa. Sendo assim, a melhor velocidade de agitação é proposta para evitar danos aos micélios e rompimento do biofilme (WANG, RIDGWAY *et al.*, 2005).

Os parâmetros de escolha da matriz imobilizadora e agitação (150 rpm), estabelecidos nesse trabalho, foram baseados nos estudos de Souza (2015).

#### 4.5. MEIO DE CULTURA

Foram avaliados três tipos de meio de cultura diferentes quanto à capacidade de crescimento do fungo e a produção de novos derivados da morina após 96 horas de reação, sendo eles Czapek, PDSM (Potato Dextrose Sucrose Medium) e Glicose (Figura 17).

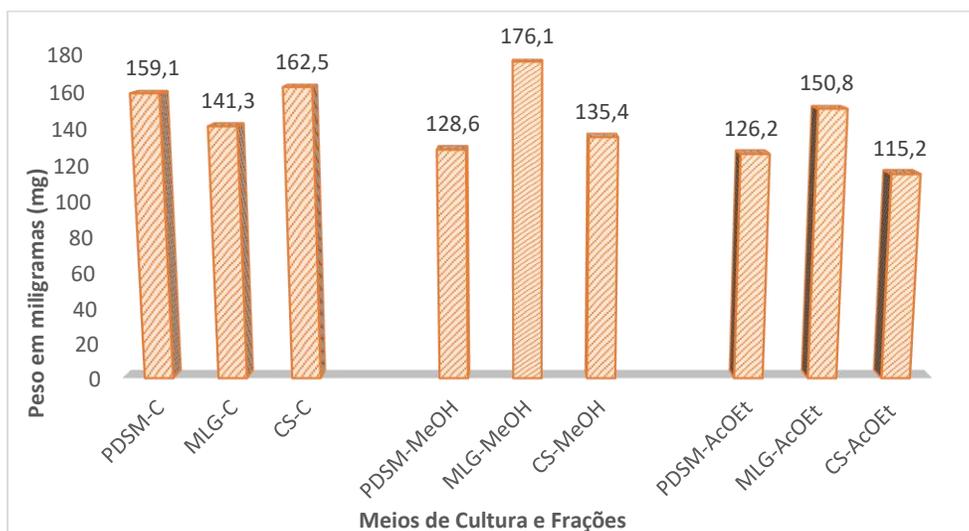
Figura 16: Meios de cultura utilizados na incubação da morina com *B. bassiana* ATCC 7159 a 28 °C e 200 rpm.



Legenda: 1-Meio Czapek; 2-Meio PDSM; 3-Meio de Glicose. Fonte: Autor.

O meio de cultura líquido de glicose foi o meio escolhido para realizar a reação de biossíntese em maior escala, uma vez que propiciou o crescimento do fungo de forma satisfatória e viabilizou a produção de derivados do substrato adicionado a ele. Além disso, tal meio proporcionou a obtenção de uma maior quantidade de extrato bruto após a sua extração (Gráfico 1).

Gráfico 1: Avaliação dos meios de cultura utilizados na biossíntese utilizando *B. bassiana* ATCC 7159 como catalisador.



Legenda: Colunas 1-3: Fração Cetônica dos meios PDSM, Glicose e Czapek; Colunas 4-6: Fração Metanólica dos meios PDSM, Glicose e Czapek; Colunas 7-9: Fração Acetato de Etila dos meios PDSM, Glicos e Czapek. Fonte: Autor.

A composição do meio de cultura está diretamente relacionada com a morfologia dos fungos que, por sua vez, afeta diretamente os rendimentos de metabólitos em processos biocatalíticos (PAPAGIANI, 2004). A maioria dos meios de cultivo líquido contém uma fonte de carbono (glicose, sacarose, etc), fonte de nitrogênio divididas em orgânicas (extrato de levedura, peptona, ureia) e/ou inorgânicas (nitrato de potássio, sulfato de amônio), sais minerais (sulfato de potássio, sulfato de magnésio) e outros elementos como ferro, zinco e cobre (SCHMIDELL; FACCIOTTI, 2001; MALAJOVICH, 2012).

Meios de cultura ricos em nutrientes como carbono e nitrogênio são necessários para o crescimento do fungo. Lopez e colaboradores (2003) após avaliarem a produção de lovastatina por *Aspergillus terreus* constataram que o crescimento do micro-organismo foi menor pela limitação de nitrogênio e, ainda, que o rendimento era melhorado quando o carbono não era limitante no meio.

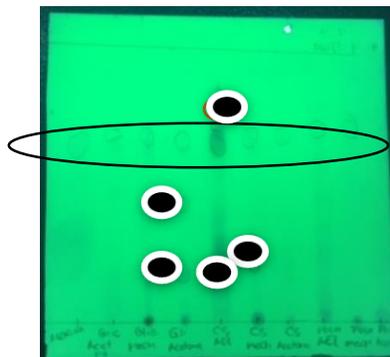
Os açúcares são a fonte de carbono mais facilmente metabolizada pelos micro-organismos. Fungos filamentosos são capazes de aproveitar uma ampla variedade de fontes de carbono por meio do uso de diferentes enzimas de seu metabolismo, entre elas glicosiltransferases e glicosidases. Já as de nitrogênio são importantes para a síntese de

componentes celulares como proteínas, ácido nucleicos, parede celular, assim como no metabolismo primário e secundário do microrganismo (MASUREKAR, 2008).

Em seu trabalho, Park e colaboradores (2001) concluíram que o equilíbrio entre carbono e nitrogênio no meio de cultura pode influenciar não só na morfologia fúngica como também na taxa metabólica de alguns fungos. Segundo eles, o tamanho micelial e a morfologia do micro-organismo *Mortierella alpina* foram afetados quando este foi cultivado em meios de cultura com diferentes proporções de carbono e nitrogênio e, quando submetidos a uma razão de consumo de carbono/nitrogênio de 20 vezes, houve a pequena formação micelial e uma biossíntese de lipídeos mais ativa.

A figura 18 apresenta a placa de CCD onde é possível visualizar os derivados obtidos após 96 horas de incubação da morina com os diferentes meios de cultura Glicose, Czapek e PDSM. Nela podemos observar que o meio de glicose proporcionou a formação de uma maior quantidade de derivados mais polares que o produto de partida.

Figura 17: Cromatoplasmas CCD das incubações de *B. bassiana* ATCC 7159 e morina com os diferentes meios de cultura.



Legenda: Spots: 1- Morina; 2- Glicose Acetato de Etila; 3- Glicose MeOH; 4- Glicose Acetona; 5- Czapek Acetato de Etila; 6- Czapek MeOH; 7- Czapek Acetona; 8- PDSM Acetato de Etila; 9-PDSM MeOH; 10- PDSM Acetona.  
Fonte: Autor.

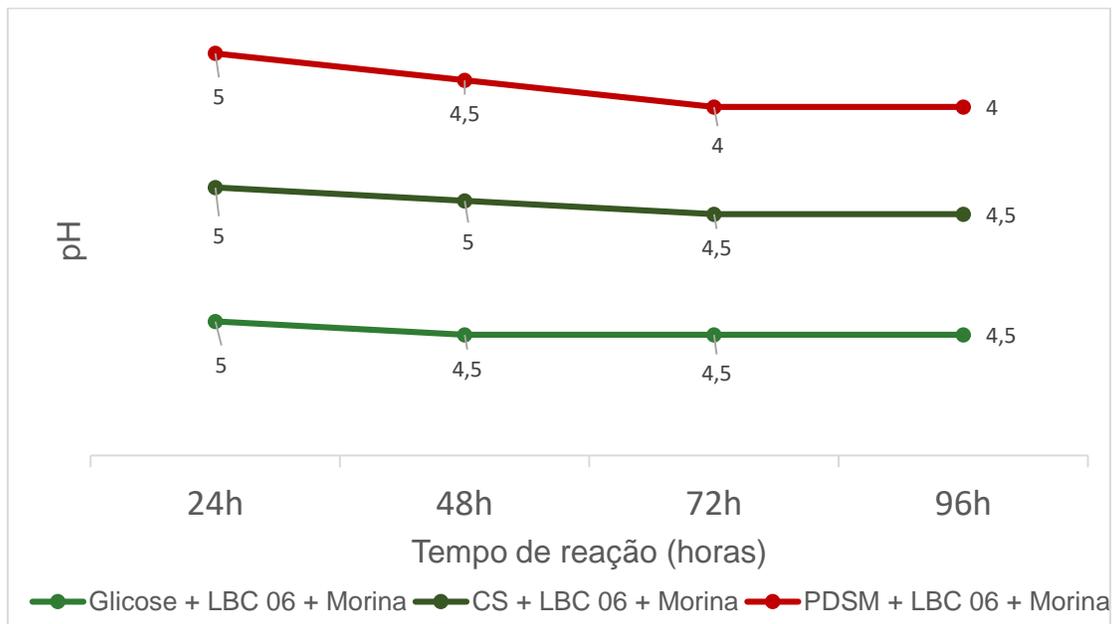
#### 4.6. AVALIAÇÃO DO pH DURANTE A INCUBAÇÃO

Os fungos são capazes de crescer em uma larga faixa de pH, tendo preferência por ambientes com valores de pH no intervalo ácido. A influência do pH no crescimento fúngico está relacionada, principalmente, ao transporte e solubilidade dos nutrientes, reações enzimáticas e fenômenos de superfície (PAPAGIANNI, 2004).

O efeito do pH sobre a produção de derivados ocorre devido seu efeito sobre a permeabilidade na membrana celular e a disponibilidade de certos nutrientes, como magnésio, fósforo, ferro, cálcio e zinco (MOREIRA NETO *et al.*, 2009).

O gráfico abaixo apresenta a variação de pH, a cada 24 horas da reação de biossíntese com a cepa de *B. bassiana* ATCC 7159, nos diferentes meios de cultura (Glicose, Czapek e PDSM) avaliados na incubação.

Gráfico 2: Avaliação do pH nos diferentes meios de cultura testados.



Legenda: Eixo x = pH; Eixo y = Tempo de incubação, em horas, após a adição do substrato.

LBC 06 = *B. bassiana* ATCC 7159. Fonte: Autor.

É possível observar o leve decaimento do pH, para todos os meios testados, com o passar dos dias de incubação. O meio PDSM apresentou maior variação do pH, caindo de 5 para 4 após 72 horas de reação e permanecendo assim até o final das 96 horas. Já os meios líquidos de Glicose e Czapek obtiveram uma acidificação mais leve, quando comparados com o meio PDSM. Não obstante, foi observado crescimento fúngico satisfatório nos três meios diferentes.

Os meios com pH entre 4 a 6 com elevadas concentrações de açúcar favorecem o desenvolvimento dos fungos nas porções em contato com o ar. Ao se afastarem da faixa que favorece seu crescimento, o mesmo pode ser restringido, como foi demonstrado no trabalho de Ribeiro e colaboradores (2010), que comparou o crescimento da biomassa fúngica numa

ampla faixa de pH concluindo que em pH menor que 4 e maior que 6 houve a menor produção de biomassa fúngica.

#### 4.7. ESCALONAMENTO DA REAÇÃO

O surgimento dos antibióticos, nos anos 1940, levou várias empresas farmacêuticas a buscarem o aumento da comercialização de tais produtos. Naquela época a produção da penicilina era realizada em garrafas de leite com a capacidade para armazenamento de 1 litro. No entanto, esse meio de produção demonstrou-se ineficiente devido às constantes quebras de garrafas nos processos de lavagem e esterilização. Assim, surgiu a necessidade de novas metodologias e, por conseguinte, os primeiros trabalhos de cultura submersa. A partir de então, o uso de frascos de agitação e de biorreatores com agitação mecânica aerados começaram a ser utilizados na fabricação de antibióticos (HUMPHREY, 1998).

Reatores onde ocorrem reações químicas catalisadas por biocatalisadores, que podem ser enzimas ou células vivas (microbianas, animais ou vegetais), são chamados de biorreatores cujo principal papel é proporcionar um ambiente controlado com adequada concentração de nutrientes (SCHMIDELL; FACCIOTTI, 2001; GARCIA-OCHOA *et al.*, 2010).

Vários fatores como temperatura de incubação, composição do meio de cultura, pH, agitação e aeração podem contribuir para diferentes morfologias dos fungos filamentosos (PAPAGIANNI, 2004). A alta complexidade dos tipos morfológicos e a interação direta entre morfologia e condições reacionais exigem que tais parâmetros sejam bem determinados (KRULL, WUCHERPFENNIG *et al.*, 2013).

Para realizar a biossíntese em maior escala, foi utilizado um biorreator de tanque agitado (Figura 19). Alguns parâmetros como temperatura (28 °C), agitação (200-250 rpm), vazão de oxigênio constante (acima de 80%) e pH (6,0) foram controlados. Os parâmetros avaliados propiciaram condições satisfatórias de reação, podendo o substrato ser modificado em maior quantidade.

Figura 18: Biorreator de Tanque Agitado.



Legenda: Biorreator de Tanque agitado Tecnal®. Fonte: *site Tecnal®*.

No experimento delineado em biorreator de tanque agitado, o crescimento da cepa de *B. bassiana* ATCC 7159 permaneceu como o visualizado na incubação com células livres nos Erlenmeyers, micélio disperso e forma amorfa. Também foi possível observar a formação e permanência do halo de crescimento, indicando a viabilidade da cepa durante toda a incubação (Figura 20).

Figura 19: Escalonamento da reação de biossíntese em biorreator de tanque agitado utilizando *B. bassiana* ATCC 7159 como catalisador.



Legenda: Escalonamento da reação de biossíntese utilizando meio de cultura líquido de glicose e *B. bassiana* ATCC 7159 como catalisador. Fonte: Autor.

## 4.8. FILTRAÇÃO E EXTRAÇÃO

### 4.8.1. Células Livres

Após a incubação do substrato por 96 horas, os Erlenmeyers com as células livres de *B. bassiana* ATCC 7159 foram filtrados e extraídos de acordo com a metodologia descrita no subitem 3.7 (Figura 21).

Figura 20: Processo de filtragem e extração da incubação da morina com *B. bassiana* ATCC 7159 em meio líquido de glicose.



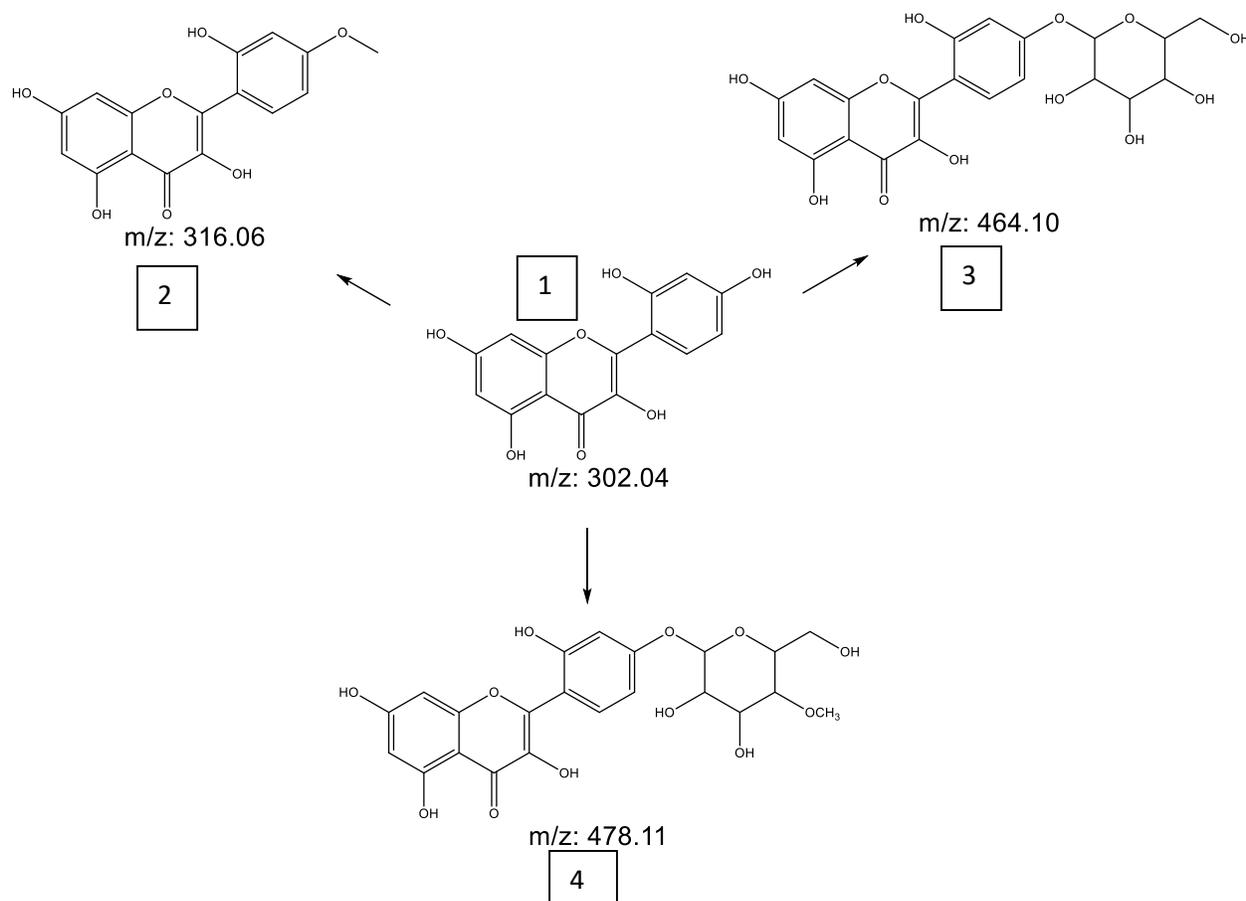
Legenda: (1) Separação do micélio e meio aquoso; (2) extração da fração aquosa. Fonte: Autor.

A extração deu origem a três frações, sendo elas metanólica, cetônica e acetato de etila, com as massas de 176,1 mg, 141,3 mg e 150,8 mg, respectivamente.

As análises por CCD das frações mostraram 2 (dois) produtos mais polares e 1 (um) produto mais apolar que o composto de partida os quais foram identificados através da técnica de Espectrometria de Massas (EM), anteriormente descrita no item 3.1.3.

Foi possível a obtenção de picos estáveis referentes aos íons  $[M + H]^+$ , todos com erro  $< 5$  ppm, nos valores de  $m/z = 317.06058$  ( $C_{16}H_{12}O_7$ ),  $m/z = 465.10287$  ( $C_{21}H_{20}O_{12}$ ) e  $m/z = 479.11948$  ( $C_{22}H_{22}O_{12}$ ), representando os derivados da morina metilado, glicosilado e metilglicosilado, respectivamente (Figura 22).

Figura 21: Estrutura dos derivados da morina catalisados pela *B. bassiana* ATCC 7159.



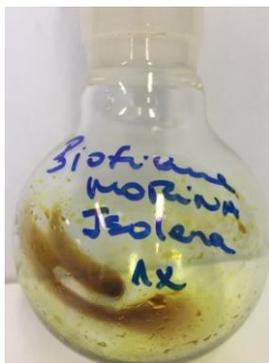
Legenda: (1) Morina; (2) Derivado Metilado; (3) Derivado Glicosilado; (4) Derivado Metilglicosilado.

Fonte: Autor.

#### 4.8.2. Células Imobilizadas

Testes realizados anteriormente no LaBiocon definiram que a extração das incubações realizadas com células imobilizadas de *C. echinulata* ATCC 9244 era melhor sucedida quando se utilizava apenas acetato de etila em sua metodologia. Portanto, ao final das 96 horas de incubação com as células imobilizadas, tanto o biofilme quanto a fração aquosa da incubação foram extraídos e após serem concentrados em evaporador rotativo deram origem a 187 mg de extrato bruto da fração acetato de etila (Figura 23).

Figura 22: Extrato bruto da fração acetato de etila após a extração da incubação com biofilme de *C. echinulata* ATCC 9244.

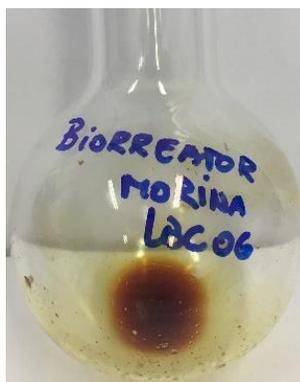


Fonte: Autor.

#### 4.8.3. Células Livres em Biorreator

Após o período de 96 horas de incubação da morina com a cepa de *B. bassiana* ATCC 7159 em biorreator, a fração aquosa do meio foi saturada com cloreto de sódio, em seguida filtrada em celite-545 sob vácuo e extraída 3 (três) vezes em funil de separação com acetato de etila. O extrato bruto obtido, denominado fração acetato de etila, foi seco com sulfato de sódio, filtrado em papel de filtro e concentrado em evaporador rotativo, dando origem à 760 mg (Figura 24).

Figura 23: Extrato bruto da fração acetato de etila após a extração da incubação de morina com *B. bassiana* ATCC 7159 em biorreator de tanque agitado.



Fonte: Autor.

#### 4.9. PURIFICAÇÃO DOS DERIVADOS

As frações acetato de etila e cetônica e foram submetidas primeiramente à cromatografia em colunas cromatográficas, com colunas de vidro de 30 cm de comprimento e 1,5 cm de diâmetro, ambas preenchidas com sílica gel 60 Å, e eluída com um gradiente de fase móvel partindo de 100% AceOEt, seguidos de ACeOET:MeOH nas proporções 95:5, 90:10, 70:30, 50:50, até a finalização com 100% de MeOH.

As alíquotas coletadas na purificação foram monitoradas por CCD, a fim de que a troca da proporção de solventes fosse realizada de acordo com a eluição dos derivados pela coluna. Assim, ao final da purificação os tubos com produtos com o mesmo  $R_f$  foram reunidos em um mesmo frasco, concentrados em evaporador rotativo e colocados em dessecador para posterior pesagem e caracterização.

Após a secagem das frações reunidas em frascos específicos, foi realizada uma nova CCD para verificar a pureza dos compostos purificados. Nela foi possível observar a obtenção de um produto advindo das frações 66-88 da purificação da fração acetato de etila, que, no entanto, não estava totalmente puro. Por isso, uma nova técnica para a purificação de compostos foi empregada.

A cromatografia preparativa através do equipamento Isolera One (Biotage®) foi nova metodologia utilizada para a purificação do composto. Nesse equipamento a amostra é colocada em um cartucho preenchido com sílica esférica Biotageatrav HP-Sphere™, são informados o(s) comprimento(s) de onda e  $R_{f(s)}$  de interesse e então, através do fluxo dos mesmos solventes utilizados na cromatografia em coluna tradicional, aliados a uma pressão exercida pelo equipamento, a purificação é realizada com mais agilidade. Portanto, tem-se a diminuição do tempo de purificação, aliados ao aumento da eficiência e conseqüentemente a redução de custos.

Figura 24: Processos de purificação utilizados.



Legenda: Coluna cromatográfica preenchida com sílica (1); Sistema de purificação flash (2). Fonte: Autor.

Com a utilização dessas metodologias, foi possível a obtenção de 20 mg de um produto mais polar que o substrato, denominado Labiocon 100. A figura 26 mostra a placa de CCD da morina e do produto obtido após purificação. O produto purificado seguiu para caracterização em Espectrometria na região do UV, RMN  $^1\text{H}$   $^{13}\text{C}$  e Espectrometria de Massas Alta Resolução.

Figura 25: Análise por cromatografia em camada delgada do produto morina e seu derivado.



Legenda: Spot 1: Morina; Spot 2: Labiocon 100. Fonte: Autor.

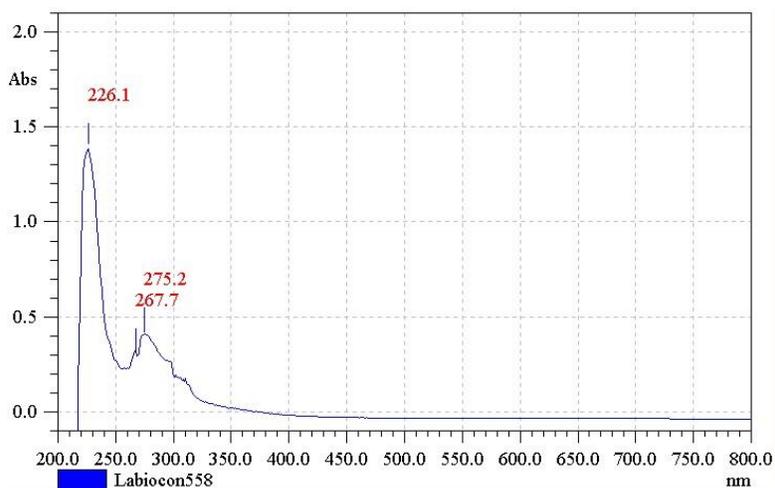
#### 4.10. CARACTERIZAÇÃO DO DERIVADO MAJORITÁRIO

O derivado majoritário obtido após purificação foi submetido a análises em Espectrometria na região do UV, Espectrometria de Massas Alta Resolução e Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio e Carbono (RMN $^1\text{H}$  $^{13}\text{C}$ ) cujos seus resultados podem ser observados a seguir.

#### 4.10.1. Espectrometria na região do UV-Vis

Foi realizada a varredura num intervalo de 200 a 800 nm de comprimento de onda na região do UV-Vis para o derivado obtido através da incubação com *B. bassiana* ATCC 5179 e purificado em cromatografia em coluna e em cromatografia preparativa, onde foi possível observar duas absorções máximas em 267.7 nm e 275.2 nm do derivado (LaBiocon 100) (Figura 27).

Figura 26: Espectrograma na região do UV do Labiocon 100, em metanol, na faixa de comprimento de onda de 200,0 a 800,0 nm.



Legenda: Análise realizada em espectrofotômetro Cintra 10<sup>e</sup> UV-visible Spectrometer  
Fonte: Autor.

A comparação entre os dois espectros de UV-Vis (Morina e LaBiocon 100) nos mostra a permanência da banda II (referente ao anel A), e um deslocamento hipsocrômico (de 359.5 para 275.2) da banda I, referente ao anel B da molécula.

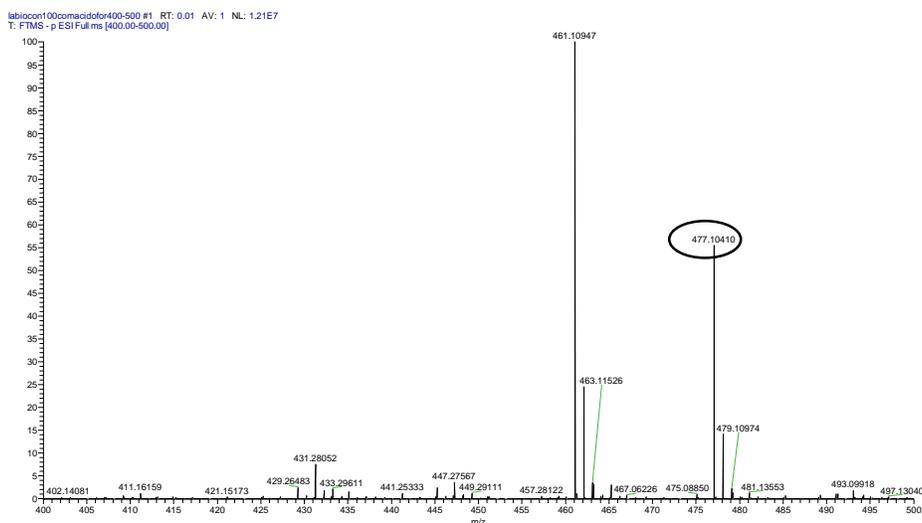
De acordo com Sousa e colaboradores (2007) a posição da banda I nos dá informação sobre o tipo de flavonoide e também sobre o grau de oxidação. Flavonoides que possuem oxigênio no anel A, mas não no B, tendem a ter a banda II mais pronunciada que a I.

A absorção máxima de açúcares, como a glicose, encontra-se geralmente nos comprimentos de onda 260-280 nm (LIM; HARNLY, 2007). Portanto, o deslocamento hipsocrômico da banda II, aliado ao comprimento máximo de absorção em 275.2, pode indicar mudanças estruturais no anel B da molécula de morina.

#### 4.10.2. Espectrometria de Massas com Ressonância Ciclotrônica de Íons (FTICRMS)

A Figura 28 mostra o espectro de massas (FTICR-MS) do derivado purificado (LaBiocon 100) no qual se observa a presença de um pico estável de  $m/z = 477,10410$ , relativo a  $[M-H]^-$ , com erro  $< 3\text{ppm}$  e fórmula molecular  $C_{22}H_{21}O_{12}$ .

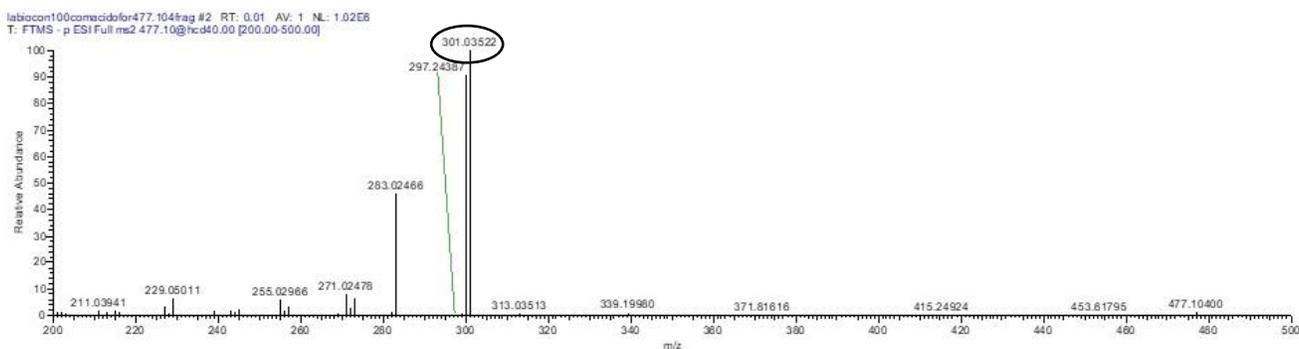
Figura 27: Espectro de massas do Labiocon 100 em modo negativo.



Legenda: Espectro de massas do Labiocon 100, *full scan*. Fonte: Autor.

O experimento MS/MS apresentou o padrão de fragmentação de massa do íon molecular, onde o pico mais abundante foi o de  $m/z = 301.03522$ , relativo à  $[M-H]^-$  e fórmula molecular  $C_{15}H_{10}O_7$  (Figura 29).

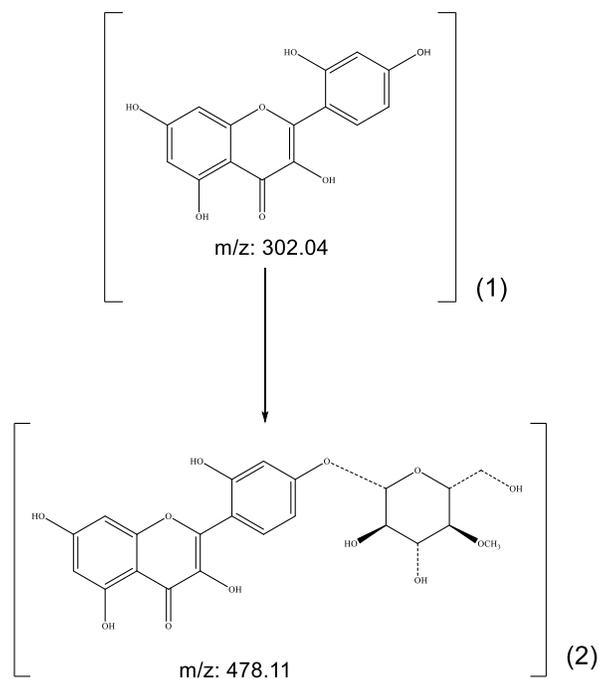
Figura 28: Espectro MS/MS do Labiocon 100 em modo negativo.



Legenda: Espectro ESI-MS/MS do Labiocon 100. Fonte: Autor.

O aumento de 176 na massa sugere a adição de uma metilglicose à molécula de morina. De acordo com os dados obtidos através dos espectros, é possível traçar a modificação estrutural que ocorreu na molécula do substrato após 96 horas de incubação com *B. bassiana* ATCC 7159, seguidas de extração e purificação (Figura 30).

Figura 29: Sugestão estrutural para o LaBiocon 100 de acordo com os dados obtidos na EM Alta Resolução e sua fragmentação ESI-MS/MS.



Legenda: (1): Sugestão de estrutura para o LaBiocon 100; (2): ESI-MS/MS apresentando o produto de partida.  
Fonte: Autor.

#### 4.10.3. Ressonância Magnética Nuclear (RMN $^1\text{H}$ $^{13}\text{C}$ )

Para confirmar a estrutura do composto, foi realizada a ressonância magnética nuclear de hidrogênio e carbono (RMN  $^1\text{H}$   $^{13}\text{C}$ ). O espectro desse produto foi analisado tendo como base o espectro do produto de partida (morina). As análises foram realizadas em espectrômetro Bruker Avance III 500 de 11,75 T (500,13 MHz para o  $^1\text{H}$  e 75,46 MHz para o  $^{13}\text{C}$ ). Os espectros foram registrados em  $\text{CD}_3\text{OD}$ , com TMS como padrão interno. A tabela 5 mostra as atribuições dos deslocamentos químicos obtidos do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$  da morina e do LaBiocon 100.

Tabela 5: Sinais evidenciados no espectro de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  RMN da Morina e do Labiocon 100.

Posição	Morina		Labiocon 100	
	$\delta$ $^1\text{H}$ (mult., J Hz)	$\delta$ $^{13}\text{C}$	$\delta$ $^1\text{H}$ (mult., J Hz)	$\delta$ $^{13}\text{C}$
6	6,18 (d; 2,01)	97,27	6,45 (d; 2,06)	97,94
8	6,33 (d; 2,01)	93,11	6,75 (d; 2,06)	93,44
3'	6,44 (d; 2,37)	103,21	6,71 (d; 8,66)	113,87
5'	6,49 (dd; 2,37;8,58)	108,32	6,90 (d; 9,07)	115,07
6'	7,42 (d; 8,58)	130,56	7,08 (d; 8,66)	129,09
1''	-	-	5,04 (d; 7,79)	99,84
2''- 6''	-	-	3,1-4,2 (m)	61-79
4'' (O-CH <sub>3</sub> )	-	-	3,58 (s)	59,0

Legenda:  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  RMN baseados em  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HMBC. Dados obtidos em  $\text{CD}_3\text{OD}$  em 500 MHz e 125 MHz. Multiplicidades: simpleto (s), duplete (d), duplo duplete (dd). Fonte: Autor.

A presença de sete novos sinais no espectro de  $\text{RMN}^{13}\text{C}$  entre  $\delta\text{C}$  59,0-99,8, sendo esses um  $\delta^{13}\text{C}$  60 para grupo  $\text{CH}_2$ , cinco para grupamentos  $\text{CH}$  ( $\delta^{13}\text{C}$  73-99,74) e um  $\text{OCH}_3$  ( $\delta^{13}\text{C}$  59), incluindo um duplete no deslocamento  $\delta\text{H}$  5,04 ( $J = 7,79$  Hz) correlacionando-se ao  $\delta\text{C}$  99,8, indicaram valores típicos de adição química de uma unidade de *O*-metilglicose, na conformação  $\beta$ , na molécula do substrato.

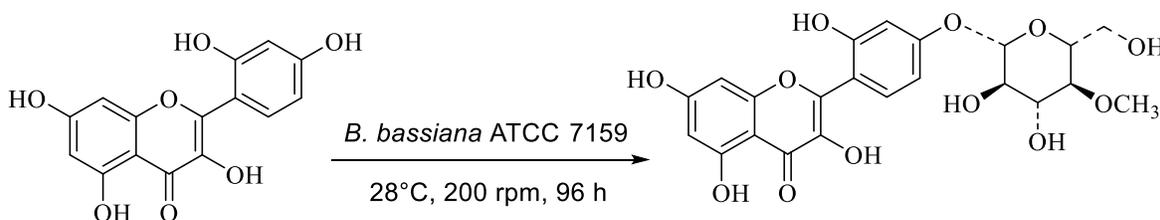
Já espectro de  $\text{RMN}^1\text{H}$  do Labiocon 100 apresentou um simpleto com o deslocamento em  $\delta^1\text{H}$  3,58 representativo do sinal metoxila, um sinal devido a um próton em um carbono anomérico em  $\delta^1\text{H}$  5,04, bem como multipletos referentes a cinco sinais em  $\delta^1\text{H}$  3,1-4,2 representando os hidrogênios dos carbonos 2'' a 6''. Ainda, o valor de mudança química do sinal C-4 (C-4'') da molécula de glicose foi anormal. Este sinal está normalmente presente na região que varia de  $\delta\text{C}$  70,0-71,5 ppm e, no caso dos novos espectros, observou-se em  $\delta\text{C}$

79,0 ppm. Com isso, a evidência relatada confirmou que houve a adição da fração 4''-O-metilglicose no composto de partida.

Portanto, os valores de mudança química dos sete átomos de carbono adicionais que apareceram no espectro de RMN<sup>13</sup>C do LaBiocon 100 foram característicos para a 4''-O-metilglucopiranosose. Este açúcar é muitas vezes condensado com moléculas de substrato em reações de glicosilação catalisadas por *B. bassiana* ATCC 7159, como mostrado por diversos autores (ZHAN; GUNATILAKA, 2005; ZHAN; GUNATILAKA, 2006; HUSZCZA *et al.*, 2008; CAO *et al.*, 2015). As correlações entre prótons e átomos de carbono apresentados no espectro HSQC do derivado nos permitiram atribuir posições precisas de cada sinal de próton da molécula de 4''-O-metilglucopiranosose. As mudanças dos sinais H-3' e H-5' para um campo magnético ( $\delta$ H 6,44  $\rightarrow$  6,71 ppm e  $\delta$ H 6,49  $\rightarrow$  6,90 ppm, respectivamente), bem como o deslocamento dos sinais de C-3' e C-5' para ( $\delta$ C 103,2  $\rightarrow$  113,8 ppm e  $\delta$ C 108,3  $\rightarrow$  115,0 ppm, respectivamente) inferem que a porção de açúcar foi condensada ao grupo hidroxila ligado ao C-4'. O restante dos sinais de RMN de <sup>1</sup>H e de <sup>13</sup>C foram muito semelhantes aos da morina, sugerindo que a porção de açúcar foi introduzida no anel B da molécula.

Sendo assim, o novo composto obtido através da transformação microbiana da molécula de morina catalisada em uma única etapa e com ação de duas enzimas (CYP450 e Glicosiltransferases) pela cepa de *B. bassiana* ATCC 7159, foi identificado como morina 4'-O- $\beta$ -D-(4''-O-metil)glucopiranosídeo (Figura 31).

Figura 30: Reação de metilglicosilação da morina utilizando *B. bassiana* ATCC 7159 como biocatalisador.



Fonte: Autor.

Estudos sobre a regioseletividade da glicosilação catalisada por cepas de *B. bassiana* indicaram que esta cepa é capaz de introduzir seletivamente uma porção 4''-O-metilglicose em apenas uma posição mesmo em compostos que possuem múltiplos grupos hidroxila

(ZHAN; GUNATILAKA, 2005). Além disso, Zhan e Gunatilaka (2006) mostram em seu trabalho a obtenção do composto quercetina-4''-O-metil-7-O-β-D-glucopiranosídeo após a transformação da quercetina por *B. bassiana* ATCC 7159. Esse derivado apresenta uma metilglicosilação no C-7 do anel A (resorcinol) da quercetina. Morina e quercetina são isômeros cuja diferença entre esses compostos está no padrão de hidroxilação do anel B, que é *orto* em quercetina (catecol) e *meta* para a morina (resorcinol). Com isso, devido a conformação das hidroxilas no anel resorcinol apresentarem menor impedimento estérico, quando comparadas com o anel catecol, aquele pode proporcionar um ambiente mais favorável à ocorrência de reações.

Vale ressaltar que reações seletivas de 4''-O-metilglicosilação promovidas eficientemente pela estirpe de *B. bassiana* ATCC 7159 leva-nos a sugerir tal cepa pode ser utilizada como biocatalisador de O-metilglicosilação de compostos fenólicos para estudos de bioatividade, especialmente em situações em que mais derivados polares solúveis em água são requeridos.

#### 4.11. ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

##### 4.11.1. Ensaio Eletroquímico

Do ponto de vista biológico, a capacidade de doador de elétrons dos flavonóides é uma das suas propriedades químicas mais relevantes. De fato, pelo processo de transferência de átomos de hidrogênio ou de elétrons, esses compostos podem eliminar radicais, terminando as reações em cadeia e depois exercendo suas ações biológicas (GIL; COUTO, 2013).

Os métodos eletroanalíticos se valem das propriedades elétricas dos analitos presentes em uma determinada amostra e podem fornecer dados qualitativos ou quantitativos, não sendo necessária a geração prévia ou uso de espécies oxidadas. Eles são utilizados pois podem demonstrar o potencial em que os flavonóides são capazes de transferir elétrons, representando assim uma alternativa na determinação da atividade antioxidante em diferentes tipos de amostras. Tal metodologia possui boas sensibilidade (baixo limite de detecção) e seletividade, além de rapidez e simplicidade nas análises. Sendo assim, é considerada de baixo custo e “limpa”, pois consome pouca quantidade de reagentes, o que implica em um menor impacto ambiental (OLIVEIRA *et al.*, 2012).

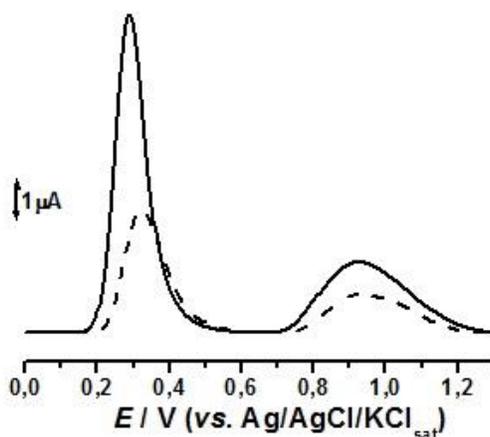
Dentre as técnicas eletroanalíticas, a voltametria pode ser utilizada na determinação da atividade antioxidante de compostos orgânicos. Esta técnica fornece informações acerca da transferência de elétrons que ocorre na interface do eletrodo de trabalho e solução e se baseia em três parâmetros que ocorrem durante a eletrólise: corrente elétrica, voltagem e tempo (JOVANOVIC *et al.*, 1996).

A voltametria de pulso diferencial é uma técnica voltamétrica bastante útil para a realização de análises eletroanalíticas e avaliação do potencial oxidante e/ou redutor. Ela apresenta algumas vantagens sobre outras metodologias voltamétricas principalmente por possuir uma maior sensibilidade quando comparada à voltametria cíclica, aliada a uma melhor resolução de picos quando comparada a outras técnicas eletroanalíticas (MASEK *et al.*, 2014).

A comparação entre voltamogramas de espécies puras e amostras complexas também permite que sejam feitas presunções acerca da natureza dos antioxidantes presentes na amostra (REIS *et al.*, 2009). O primeiro passo na voltametria é representado pela aplicação de um potencial a uma célula eletroquímica, composta por três eletrodos, o de referência, o de trabalho e o auxiliar. O potencial é aplicado na forma de varredura, ou seja, a velocidade dele varia de forma constante em função do tempo decorrido. A aplicação do potencial promove a ocorrência de reações de oxirredução (reações faradaicas) na superfície do eletrodo de trabalho, o que gera uma corrente elétrica. A medida dessa corrente em função do tempo dá origem uma curva chamada de voltamograma. A intensidade da corrente gerada está relacionada com a quantidade de antioxidantes ou espécies eletroativas presentes na amostra (SÁ, 2013).

O voltamograma de pulso diferencial da morina e do LaBiocon 100 estão representados a seguir nas figuras 32 e 33, respectivamente.

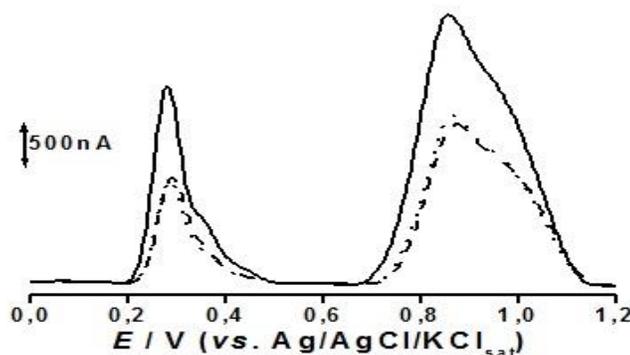
Figura 31: Voltamograma de pulso diferencial da morina.



Legenda: Voltamogramas de Pulso Diferencial da morina obtido em 1 mL de solução de tampão fosfato 0,1 M (pH 6,0) para 150 mL de solução da amostra, primeira varredura (linha reta), segunda varredura (linha pontilhada), terceira varredura (linha tracejada): amplitude de pulso de 50 mV, largura de pulso de 0,4 s, e velocidade de varredura de 5 mV/s.

Fonte: Autor.

Figura 32: Voltamograma de pulso diferencial do LaBiocon 100.



Legenda: Voltamogramas de Pulso Diferencial do Labiocon 100 obtido em 1 mL de solução de tampão fosfato 0,1 M (pH 6,0) para 150 mL de solução da amostra, primeira varredura (linha reta), segunda varredura (linha pontilhada), terceira varredura (linha tracejada): amplitude de pulso de 50 mV, largura de pulso de 0,4 s, e velocidade de varredura de 5 mV/s.

Fonte: Autor

A partir dos voltamogramas de pulso diferencial obtidos em solução tampão fosfato 0,1 M, pH 6,0 é possível observar dois picos de oxidação no composto morina, sendo o pico 1 em  $E_{p1a} \cong + 0,30$  V e o pico 2 em  $E_{p2a} \cong + 0,92$  V. No voltamograma da morina, corrente de pico 1 é mais elevada quando comparada com a corrente de pico 2, o que está de acordo com a maior atividade de eliminação de radicais associada com a oxidação da porção de anel B. A atividade antioxidante dos flavonóides é principalmente determinado pelos sítios mais reativos,

isto é, aqueles associados com o anel B (PIEROZYNSKI; ZIELINSKA, 2010; GIL; COUTO, 2013).

Já a amostra Labiocon 100 apresentou picos em  $E_{p1a} \cong + 0,27V$ ,  $E_{p2a} \cong + 0,45V$ ,  $E_{p3a} \cong + 0,70 V$ ,  $E_{p4a} \cong + 0,82 V$  e  $E_{p5a} \cong + 0,97 V$ . De acordo com Enache (2011), a eficiência dos compostos antioxidantes é avaliada através do potencial em que ocorre a oxidação, ou seja, compostos cujos picos de corrente que ocorrem em potenciais baixos ( $< 0,7 V$ ) possuem uma maior capacidade doadora de elétrons, tornando-se, conseqüentemente, bons eliminadores de radicais livres.

O grande número de picos é indicativo não apenas da presença de polifenóis, mas também de que esses polifenóis podem apresentar um padrão diferente de substituição. De fato, a eletroatividade dos flavonóides diz respeito aos anéis B e A, nos quais os grupos fenólicos determinam o perfil eletroquímico. No entanto, outros tipos de substituintes como metoxilo, acetilésteres, glicosídeos e ceto possuem influência secundária no comportamento redox e na formação de produtos de oxidação (ARRIBAS, 2012).

Como o comportamento redox está diretamente relacionado ao padrão do fenol, o efeito de outros substituintes não pode ser negligenciado. A influência do substituinte não eletroativo em potenciais de pico e reações gerais de eletrodos é expressa por efeitos eletrônicos e estéricos, o que também pode ter um efeito substancial sobre as propriedades de solubilidade e difusão. Por sua vez, tais propriedades não só podem alterar o comportamento redox, mas também a atividade antioxidante em condições fisiológicas (PIEROZYNSKI; ZIELINSKA, 2010).

Grupos volumosos podem prejudicar estericamente as reações dos eletrodos. Por exemplo, as antocianidinas apresentaram maior atividade antioxidante e potenciais de pico ligeiramente mais baixos que as antocianinas, o que concorda com o efeito de impedimento estérico das porções de açúcar. Por outro lado, o efeito de impedimento estérico na transferência de elétrons também é expresso pela queda das correntes máximas em experimentos realizados em concentrações equimolares. Como exemplo, os voltamogramas obtidos para a quercetina apresentaram correntes de pico mais altas que o seu glicosídeo derivado (rutina). Assim, embora em tais casos o número de elétrons transferidos seja o mesmo, a taxa de reação dos eletrodos pode não ser (GIL; COUTO, 2013; MASEK *et al.*, 2014).

## 4.12. ATIVIDADE ANTIFÚNGICA

### 4.1.1. Avaliação das concentrações inibitória mínima e fungicida

O fungo *Cryptococcus neoformans* é predominantemente oportunista e cosmopolita. Ele é o principal agente etiológico da criptococose, doença que possui alta taxa de mortalidade entre os pacientes, especialmente em países com desenvolvimento socioeconômicos limitados (SRICHATRAPIMUK; SUNGKANUPARPH, 2016). Dentre os principais fatores de risco para o desenvolvimento da gravidade da doença estão: vírus da imunodeficiência humana, linfomas, gravidez, transplante de órgãos sólidos, câncer, doenças autoimunes, diabetes e tuberculose (LAZÉRA *et al.* 2005)

A criptococose evoluiu para uma importante doença fúngica invasiva durante o último século. No entanto, seu arsenal terapêutico é em grande parte limitado a três antifúngicos usados isoladamente ou em combinação, anfotericina B, 5-fluocitosina e fluconazol. Não obstante, o uso destes desses fármacos deve ser cauteloso, uma vez que podem causar severos efeitos hepatotóxicos e nefrotóxicos gerando grande prejuízo aos pacientes (PERFECT; BICANIC, 2015).

As leveduras pertencentes ao complexo *C. neoformans* são comumente encontradas em excretas de pombos, solo e madeira em decomposição. A infecção pode ser adquirida após a inalação de propágulos infectantes, basidiósporos ou leveduras desidratadas presentes no meio ambiente. Ao alcançarem os alvéolos pulmonares inicia-se a infecção primária, que através da disseminação hematogênica podem causar lesões cutâneas ou sistêmicas. A meningite criptocócica é a mais frequente forma clínica da doença relatada entre pacientes com o vírus da imunodeficiência humana, acometendo cerca de 80% desses pacientes (HUNG *et al.*, 2007, JARVIS *et al.*, 2014)

Relatos recentes têm descrito o aumento, na última década, da concentração inibitória mínima (CIM) dos isolados de *C. neoformans* tanto para o fluconazol, quanto, em menor grau, para a anfotericina B (CHEN *et al.*, 2014; SMITH *et al.*, 2015).

Apesar da escassez de novas classes de antifúngicos que chegaram ao mercado nos últimos anos, abordagens inovadoras para a descoberta de fármacos vêm impulsionado investigações sobre estratégias terapêuticas alternativas. A este respeito, flavonoides têm

ganhado interesse por sua notável e diversificada ação biológica (ABED *et al.*, 2015; FILHO *et al.*, 2016).

Foram avaliadas as concentrações inibitória mínima (CIM) e fungicida mínima (CFM) do flavonóide morina e do seu derivado, LaBiocon 100, frente a dois isolados do gênero *C. neoformans* provenientes do líquido céfalo-raquidiano de pacientes com Síndrome da Imunodeficiência Adquirida, obtidos através de coletas no Hospital de Doenças Tropicais do Estado de Goiás (HDT) e uma cepa padrão de *C. gattii* ATCC 24065, cujos resultados encontram-se representados nas tabelas 6 e 7, respectivamente.

Tabela 6: Resultados das concentrações inibitória e fungicida mínimas da morina em isolados do complexo *Cryptococcus*.

<b>Morina</b>		
<b>Isolados</b>	<b>CIM (µg/mL)</b>	<b>CFM (µg/mL)</b>
L4	16	>32
L18	256	>512
ATCC 24065	23	>128

Legenda: Avaliação da CIM e CFM do composto morina para dois isolados de *C. neoformans* e uma cepa de *C. gattii* ATCC 24065.

Tabela 7: Resultados das concentrações inibitória e fungicida mínimas do LaBiocon 100 em isolados do complexo *Cryptococcus*

<b>Composto Labiocon 100</b>		
<b>Isolados</b>	<b>CIM (µg/mL)</b>	<b>CFM (µg/mL)</b>
L4	64	>256
L18	128	>512
ATCC 24065	64	>256

Legenda: Avaliação da CIM e CFM do composto LaBiocon 100 para dois isolados de *C. neoformans* e uma cepa de *C. gattii* ATCC 24065.

Os resultados de suscetibilidade *in vitro* aos compostos bioativos morina e LaBiocon 100 mostraram que estes exerceram atividade antifúngica ao inibir o crescimento das amostras de leveduras do complexo *C. neoformans* em concentrações de 16 a 256 µg/mL para o flavonoide morina e de 64 a 128 µg/mL para o seu derivado.

Através da comparação entre as CIM dos compostos frente as cepas testadas, é possível observar que para o isolado de *C. neoformans* (L18) o composto LaBiocon 100 obteve uma melhor performance, uma vez que sua CIM foi menor.

De acordo com a classificação de Holetz e colaboradores (2002), extratos, frações ou compostos que possuem  $CIM \leq 100 \mu\text{g/mL}$ , são considerados com bom potencial inibitório, já CIM's que variam de 100 a 500  $\mu\text{g/mL}$  possuem uma atividade inibitória moderada, CIM's de 500 a 1000  $\mu\text{g/mL}$  possuem atividade fraca e  $CIM \geq 1000 \mu\text{g/mL}$  o composto é considerado inativo. Sendo assim, de acordo com os isolados testados, os resultados mostraram que ambos os compostos apresentam bom perfil antifúngico e possuem grande potencial em pesquisas de novas substâncias a serem utilizadas no tratamento de criptococose.

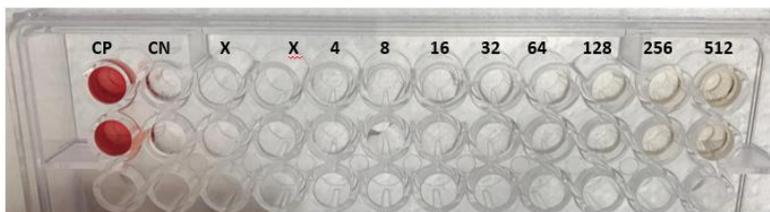
A CFM pode ser definida como a menor concentração dos fármacos capaz de inibir o crescimento total do fungo ou no máximo até o crescimento de duas colônias em agar. As CFM's encontradas neste estudo foram pelo menos três vezes o valor das CIM's tanto para a morina quanto para o LaBiocon 100, sugerindo um caráter fungistático por parte dos compostos (BARCHIESI *et al.*, 1995).

#### 4.13. AVALIAÇÃO PRELIMINAR DA CITOTOXICIDADE

Ensaio hemolítico são importantes ferramentas utilizadas na avaliação da citotoxicidade de composto naturais. Estes são empregados pois compostos que possuem potente atividade biológica podem não ser úteis em preparações farmacológicas se possuírem efeito hemolítico. Os testes com eritrócitos são amplamente utilizados uma vez que apresentam indicação direta de toxicidade de compostos frente à membrana celular. Outra vantagem desse ensaio é a facilidade no isolamento das células e a semelhança da membrana com outras membranas celulares (ZOHRA; FAWZIA, 2014).

Os compostos Morina e Labiocon 100 foram diluídos em diferentes concentrações e avaliados quanto a sua capacidade citotóxica em eritrócitos de carneiro (Figura 34).

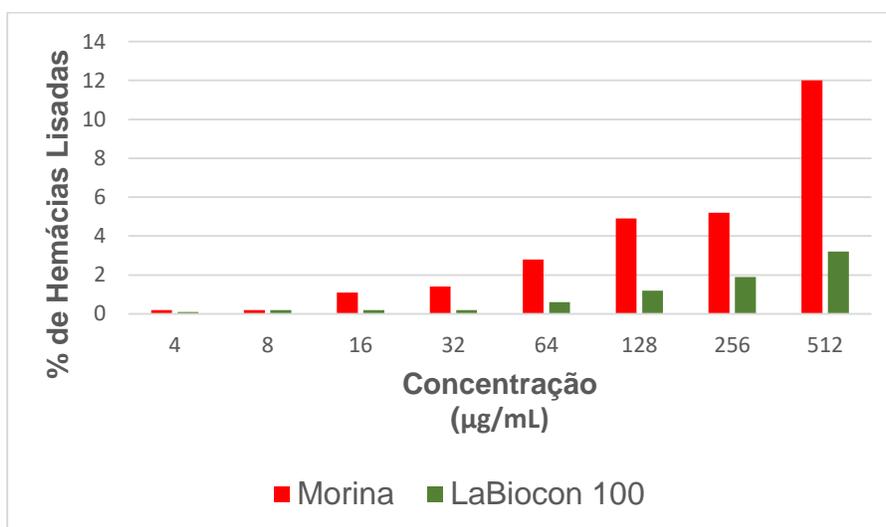
Figura 33: Ensaio de atividade hemolítica realizado com o composto Labiocon 100 em concentrações de 512 µg/mL a 4 µg/mL



Legenda: (CN) controle negativo: sangue em tampão PBS e (CP) Controle positivo: Triton X-100 a 1%.

Após a realização dos cálculos obtidos com os resultados da análise de absorvância, foi possível traçar o gráfico 3, no qual este apresenta a porcentagem de hemácias lisadas quando tratadas com a morina e quanto tratadas com o derivado LaBiocon 100.

Gráfico 3: Teste de citotoxicidade em hemácias com a morina e o Labiocon 100.



Legenda: Gráfico do resultado da citotoxicidade em hemácias dos compostos morina (vermelho) e LaBiocon 100 (verde).

Os ensaios de toxicidade realizados demonstraram que as porcentagens de hemólise para a morina nas concentrações de 4 a 512 µg/mL foram de 0,2 a 12%. Já o LaBiocon 100 obteve porcentagens de lise entre 0,2 a 3,2%, apresentando assim, uma menor porcentagem de hemácias lisadas quando comparado nas mesmas concentrações da morina.

Os resultados mostraram que o composto LaBiocon 100 apresentou baixo potencial citotóxico, causando 3,2% de hemólise em sua maior concentração testada, o que o torna um composto promissor.

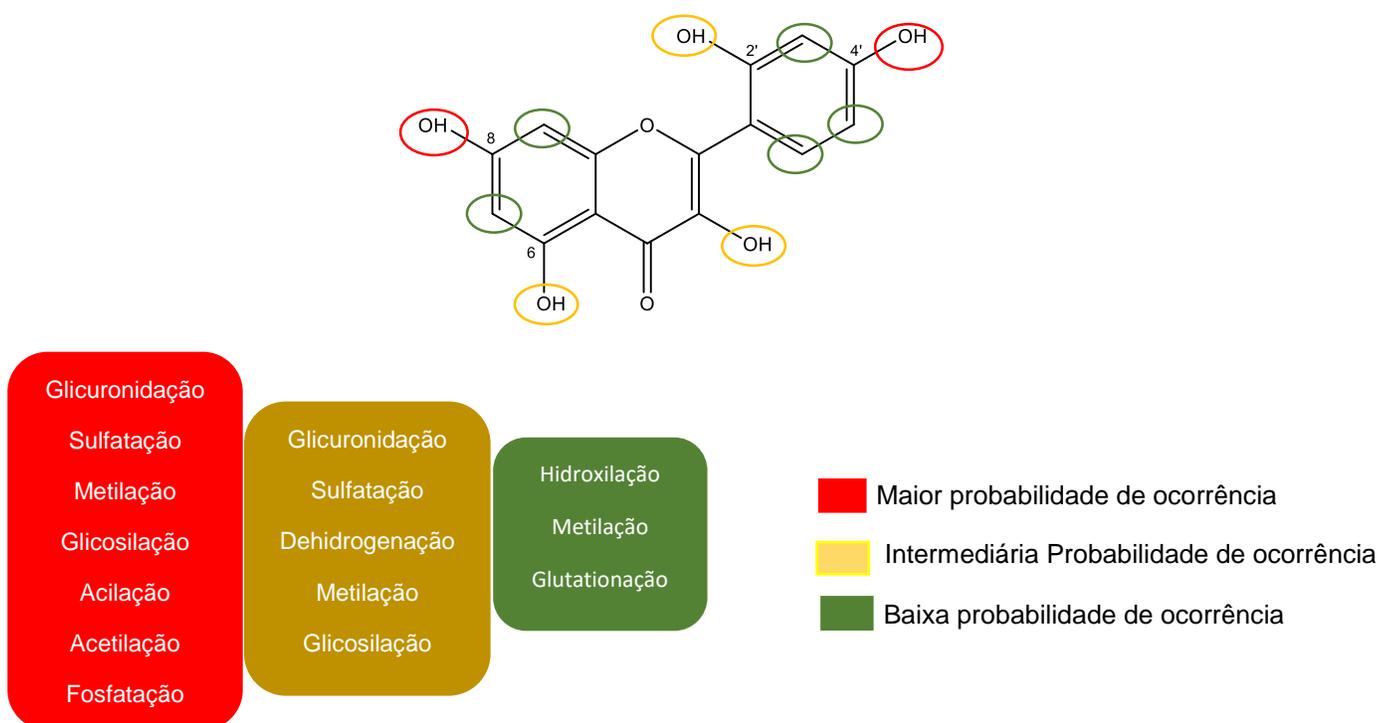
## 4.14. ESTUDOS *in silico*

### 4.14.1. Previsão do Metabolismo

Foi realizada através do software MetaPrint2D-React a previsão *in silico* dos prováveis metabólitos sugeridos à molécula da morina. Essa plataforma *online* permite o desenho de estruturas e a consulta das regiões de maior predisposição metabólica, utilizando análise estatística de transformações conhecidas e já relatadas na literatura científica (PIECHOTA *et al.*, 2013).

Os átomos de um composto em que as transformações metabólicas são centradas são chamados de sítios de metabolismo (SOUSA *et al.*, 2013). Os locais de maior probabilidade de ocorrência de reações na molécula de morina e que foram apresentados pelo programa estão demonstrados na figura 35, onde as cores vermelha, amarela e verde indicam maior, intermediária e menor probabilidade de ocorrência, respectivamente.

Figura 34: Previsão do metabolismo *in silico* da morina.



Além disso, o MetaPrint2D-React pode fazer previsões sobre uma grande variedade de reações, é capaz de prever os tipos de transformação que pode ocorrer no local do metabolismo e o provável metabolito formado. É possível notar que, para a morina, as posições 8 e 4' são as regiões de maior probabilidade metabólica e cujas principais reações previstas estão reações de glicuronidação, sulfatação, metilação, glicosilação, acilação, acetilação e fosfatação. Isso culmina com os resultados obtidos, uma vez que os produtos formados, que foram caracterizados, sofreram reações de metilação e glicosilação, na posição 4' da molécula de morina.

A reação metabólica de um xenobiótico consiste em uma série de processos, incluindo a ligação do substrato à enzima, reação catalítica de um substrato pela enzima e liberação de um metabolito da enzima. Forçar técnicas de ancoragem baseadas em campo podem imitar este processo de formação complexa e os movimentos dinâmicos do complexo substrato-enzima. A orientação do substrato dentro do sítio ativo de um CYP é um fator crucial para metabolismo mediado pelo CYP. Portanto, os estudos de encaixe podem ser particularmente úteis para obter seletividade e informações sobre compostos potenciais e podem ser usados para prever os sítios de metabolismo e possíveis metabolitos tóxicos de compostos potenciais (SOUSA *et al.*, 2013).

#### 4.14.2. Potenciais Atividades Biológicas

A IUPAC (*International Union of Pure and Applied Chemistry*) define a modelagem molecular como a investigação das estruturas e das propriedades moleculares por meio do uso de química computacional e técnicas de visualização gráfica com o objetivo de fornecer uma representação tridimensional, sob um dado conjunto de circunstâncias (SANT'ANNA, 2002).

O grande número de alvos biológicos para o planejamento de fármacos requer o emprego de estratégias de elevado desempenho que sejam capazes de reduzir custos e tempo na identificação de novos compostos ativos.

Técnicas de triagem virtual (VS - *virtual screening*) tem se destacado como estratégia para identificação de compostos. Por meio de ferramentas de predição de atividades biológicas

é possível investigar as prováveis funções ativas que um novo composto pode ter no organismo.

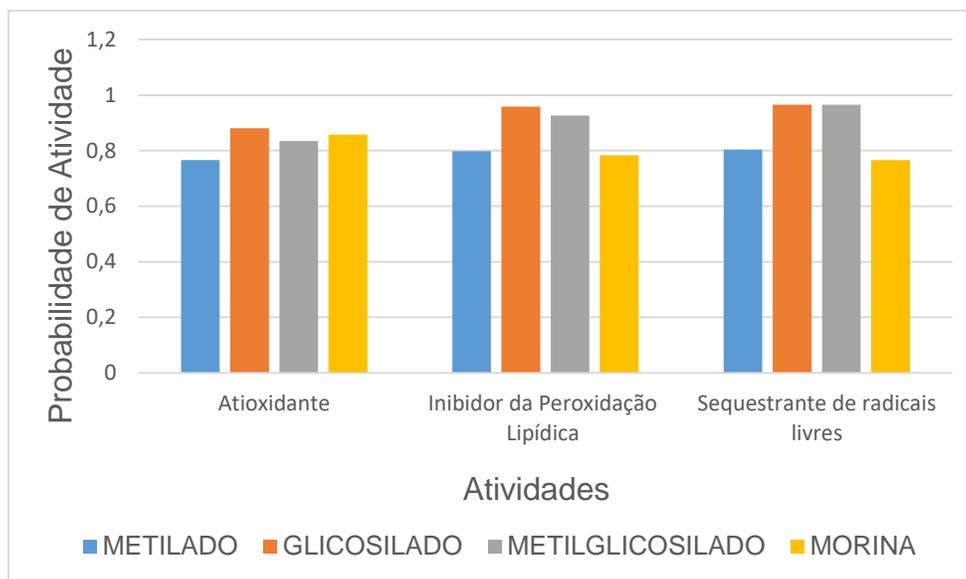
O software PASS (*Prediction of activity spectra for substances*) é um aplicativo que prevê o espectro de atividade biológica de um composto relacionado com a sua estrutura. Seguindo o princípio de que a atividade biológica de um composto equivale à sua estrutura as ferramentas de previsão PASS são construídas usando 20.000 compostos principais do banco de dados MDDR (produzido pela *Accelrys e Prous Science*). O banco de dados contém mais de 18.0000 compostos biologicamente relevantes e é constantemente atualizado (PARASURAMAN, 2011).

A versão 10.1 do PASS é capaz de prever 4.130 tipos de atividades biológicas com uma acurácia na previsão de cerca de 95%. Atualmente, a lista de atividades previsíveis inclui 501 efeitos farmacoterapêuticos, 3.295 mecanismos de ação, 57 efeitos adversos e tóxicos, 199 mecanismos metabólicos, 29 atividades relacionadas a expressão gênica. Os resultados da predição PASS são dados como uma lista de atividades biológicas, para as quais a diferença entre probabilidades de ser ativa ( $P_a$ ) e ser inativa ( $P_i$ ) é calculada (LAGUNIN *et al.*, 2011).

#### 4.14.2.1. Atividade Antioxidante

A ferramenta PASS *online* forneceu as possíveis atividades biológicas da morina e de seus derivados obtidos através da reação utilizando a cepa de *B. bassiana* ATCC 7159 como catalisadora. A previsão das atividades biológicas antioxidante, inibidora da peroxidação lipídica e sequestrante de radicais livres apresentaram probabilidade de atividade (PA) maior que 0,700 para os três derivados (metilado, glicosilado e metilglicosilado) cujos resultados obtidos estão expressos no gráfico 4.

Gráfico 4: Avaliação da probabilidade de atividades biológicas pelo programa PASS.



Fonte: Autor.

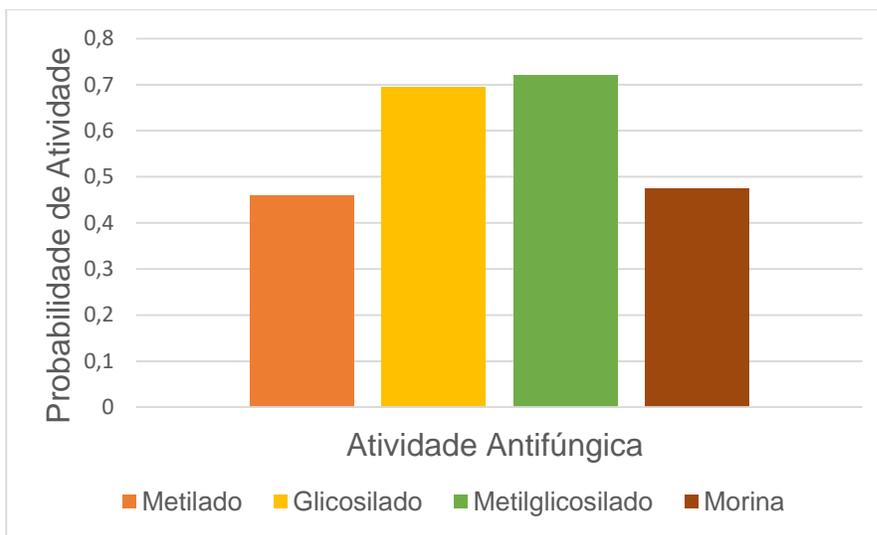
Através do gráfico é possível observar que para a atividade antioxidante o derivado glicosilado ( $P_a = 0,881$ ) apresenta um melhor desempenho quando comparado com os outros derivados e com a própria morina ( $P_a = 0,858$ ), os derivados metilado e metilglicosilado também apresentaram bons resultados com  $P_a = 0,766$  e  $0,835$ , respectivamente.

A peroxidação lipídica é o processo pelo qual as espécies reativas de oxigênio atacam os ácidos graxos poli-insaturados dos fosfolípidos das membranas das células, desintegrando-as e permitindo a entrada dessas espécies nas estruturas intracelulares. A fosfolipase ativada pelas espécies tóxicas desintegra os fosfolípidos e libera os ácidos graxos não saturados, isso resulta nas seguintes ações deletérias dos peróxidos lipídicos: (i) ruptura das membranas celulares, (ii) mutações do DNA, (iii) oxidação dos lipídeos insaturados, (iv) formação de resíduos químicos e etc. Com isso existe um grande interesse no estudo dos antioxidantes devido, principalmente, às descobertas sobre o efeito dos radicais livres no organismo. Os resultados dos derivados obtidos foram promissores tanto para o mecanismo de inibição da peroxidação lipídica quanto para o sequestro de radicais livres, apresentando valores melhores que o produto de partida (morina) e demonstrando assim o potencial dos novos produtos.

#### 4.14.2.2. Atividade Antifúngica

A probabilidade de atividade antifúngica para a morina e os seus derivados foi avaliada no programa PASS onde foi possível obter os dados reportados no gráfico 5.

Gráfico 5: Avaliação da probabilidade de atividade antifúngica pelo programa PASS.



Fonte: Autor.

De acordo com o gráfico 5 é possível observar que o derivado majoritário purificado e caracterizado como derivado metilglicosilado da morina possuiu uma maior probabilidade de atividade ( $P_a=0,720$ ) quando o mesmo foi comparado com a morina ( $P_a = 0,474$ ) e os outros derivados metilado ( $P_a = 0,459$ ) e glicosilado ( $P_a = 0,695$ ).

O resultado encontrado através de estudos *in silico* quando culminado com os obtidos na avaliação do efeito do derivado frente a cepas de *Cryptococcus* resistentes a fluconazol, inferem que a modificação estrutural ocorrida no composto pode influenciar no mecanismo de ação do mesmo.

## **5 CONCLUSÃO**

---

## 5. CONCLUSÕES

Com base nos resultados apresentados, pode-se concluir que:

1. Dentre as 18 (dezoito) cepas avaliadas na triagem utilizando a morina como produto de partida, 10 (dez) cepas foram capazes de catalisar a reação de formação de novos derivados.
2. A *Beauveria bassiana* ATCC 7159 foi o micro-organismo selecionado para o ensaio em escala semi-preparativa uma vez que ao final do período de incubação havia consumido toda a morina e obtido uma maior quimiodiversidade, produzindo 3 derivados.
3. Após avaliação, o tempo estabelecido para as reações foi de 96 horas numa concentração de 0,25 mg/mL de substrato e no meio de glicose.
4. Foi possível a identificação através de Espectrometria de Massas dos derivados glicosilado, metilado e metilglicosilado da morina.
4. O produto majoritário foi um derivado inédito, metilglicosilado, o qual foi obtido através da ação de duas enzimas em uma única etapa reacional.
5. O produto majoritário foi purificado, caracterizado através de Espectrofotometria na região do UV, RMN de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$  e Espectrometria de Massas e teve suas atividades antioxidante, antifúngica e citotoxicidade em hemácias avaliadas.
6. Ensaio eletroquímico mostraram uma boa atividade antioxidante para a morina e para o produto metilglicosilado uma vez que possuíam inúmeros grupos doadores de elétrons.
7. O produto metilglicosilado apresentou boa atividade antifúngica frente a cepa L18 de *C. neoformans*.
8. A citotoxicidade em hemácias do produto obtido (metilglicosilado) apresentou um melhor resultado, uma vez que esse lisou 3,2% de hemácias enquanto que a morina lisou 12% das hemácias nas mesmas concentrações (512  $\mu\text{g/mL}$ ).
9. O produto majoritário caracterizado morina 4'-O- $\beta$ -D-(4''-O-metil) glucopiranosídeo confirmou o local de reação fornecido previamente pela *in silico*.

## **6 REFERÊNCIAS**

---

## 6. REFERÊNCIAS

- ABEGG, M. A.; CELLA, F. L.; FAGANELLO, J.; VALENTE, P.; SCHRANK, A. ; VAINSTEIN, M. H. *Cryptococcus neoformans and Cryptococcus gattii* isolated from the excreta of psittaciformes in a southern Brazilian zoological garden. **Mycopathologia**, n. 161, p. 83-91, 2006.
- AGOSTINI, L. R. et al. Determinación de la capacidad antioxidante de flavonoides en frutas y verduras frescas y tratadas termicamente. **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**, v 54, n. 1, 2004.
- ALAM, M. N.; RAFIQUZZAMAN, N. J. Review on in vivo and in vitro methods evaluation of antioxidant activity. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 21, p. 143-152, 2013.
- ALEXANDRE, V. et al. Microbial models for drug metabolism. **Journal of Molecular Catalysis B: enzymatic**, v. 29, p. 173-179, 2004.
- ALVES, C. Q. *et al.* Métodos para determinação de atividade antioxidante *in vitro* em substratos orgânicos. **Química Nova**, v. 33, n. 10, p. 2202-2210, 2010.
- AMADIO, J.; CASEY, E.; MURPHY, C. D. Filamentous fungal biofilm for production of human drug metabolites. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 97, n. 13, p. 5955-63, 2013.
- ARIF, T; MANDAL, T. K.; DABUR, R. Natural products: Anti-fungal agents derived from plants. **Natural Products in Medicinal Chemistry**, n. 37, v. 2, p. 283-311, 2011.
- ARRIBAS, A. S. et al. The role of electroanalytical techniques in analysis of polyphenols in wine. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 34, p. 78 – 96, 2012.
- ASHA, S.; VIDYAVATHI, M. *Cunninghamella* - a microbial model for drug metabolism studies - a review. **Biotechnology Advances**, v. 27, n. 1, p. 16-29, 2009.
- AZERAD, R. Microbial models dor drug metabolismo. Advances in Biochemical Engineering and Biotechnology. **Biotransformation**, ed. K. Faber, T. Scheper, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, v.63, p.169-218, 1999.
- BARCHIESI, F.; FALCONI DI FRANCESCO, L.; COMPAGNUCCI, P.; ARZENI, D.; CIRIONI, O.; SCALISE, G. Genotypic identification of sequential *Candida albicans* isolates from AIDS patients by polymerase chain reaction techniques. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 16, p. 601-605, 1997.

BEHLING, E. B. et al. Flavonóide quercetina: aspectos gerais e ações biológicas. **Alimentos e Nutrição**, v. 15, n. 3, p. 285-292, 2004.

BIANCHI, M. L. P.; ANTUNES, L. M. G. Free radicals and the main dietary antioxidants. **Revista Nutrição**, v. 12, n. 2, p. 123-130, 1999.

BORS, W.; MICHEL, C.; STETTMALER, K. Electron paramagnetic resonance studies of radical species of proanthocyanidins and gallate esters. **Arch. Biochem. Biophys**, v.374, n.2, p.347-355, 2000.

BROWN, J.; O'PREY, J.; HARRISON, P. R. Enhanced sensitivity of human oral tumours to the flavonol, morin, during cancer progression: involvement of the Akt and stress kinase pathways. **Carcinogenesis**, n. 24, v.2, p. 171-177, 2003

BUCHANAN G. O.; WILLIAMS, L. A.; REESE, P. B. Biotransformation of cadinane sesquiterpenes by *Beauveria bassiana* ATCC 7159. **Phytochemistry**, v. 54, n. 1, p. 39-45, 2000.

CAO, H. ; CHEN, J. ; JASSBI, A. R. ; XIAO, J. Microbial biotransformation of bioactive flavonoids. **Biotechnology Advances**, n. 33, p. 214-223, 2015.

CARNEIRO, E. O. et al. Structure-based prediction and biosynthesis of the major mammalian metabolite of the cardioactive prototype LASSBio-294. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 20, n. 12, p. 3734-6, 2010.

CASELLI, A.; CIRRI, P.; SANTI, A. *et al.* Morin: A Promising Natural Drug. **Current Medicinal Chemistry**. v. 23, n. 8, p.774-91, 2016.

CHOI, J. S. ; HAN, H. K. Pharmacokinetic interaction between diltiazem and morin, a flavonoid, in rats. **Pharmacological Research**, n. 52, p. 386–391, 2005.

CIRILO, H. et al. Bioconversão de 2-(1,3-benzodioxol-5-iloxi)-n- [(1e,z)-fenilmetileno]-acetoidrazona (Lassbio 939), um potencial agente antiinflamatório sintetizado a partir do safrol. **Revista Eletrônica da Faculdade de Farmácia**, v. 2, p. 48-51, 2005.

COSTA, E. M. M. B.; OLIVEIRA, V . Selection of Filamentous Fungi of the *Beauveria* Genus able to metabolize Quercetin Like Mammalian Cells. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 39, p. 405-408, 2008.

CUSACK, K. P. et al. Emerging technologies for metabolite generation and structural diversification. **Bioorganic Medicinal Chemistry Letters**, v. 23, n. 20, p. 5471-83, 2013.

DE BRUYN, F.; MAERTENS, J.; BEAUPREZ, J.; SOETAERT, W.; DE MEY, M. Biotechnological advances in UDP-sugar based glycosylation of small molecules. **Biotechnology Advances**, n. 33, p. 288–302, 2015.

DEMITTO, F. O; *et al.* Antifungal susceptibility of *Candida spp. in vitro* among patients from Regional University Hospital of Maringá-PR. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 48, n. 5, 2012.

DROUHET, E. Historical Introduction: Evolution of Knowledge of the Fungi and Mycoses from Hippocrates to the Twenty-First Century. **Topley and Wilson's Microbiology and Microbial Infections**, v. 1, 2010.

EMBUSCADO, M. E. Spices and herbs: Natural sources of antioxidants – a mini review. **Journal of Functional Foods**, v. 18, p. 811-819, 2015.

FABRI, G. et al. Automotive Fuels. **Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry**, v. 4, n. 6, p. 453, 2007.

FANG, S. H.; HOU, Y. C.; CHANG, W. C. *et al.* Morin sulfates/glucuronides exert anti-inflammatory activity on activated macrophages and decreased the incidence of septic shock. **Life Sciences**, n. 74, p.743 – 756, 2003.

FLAMBÓ, D. F. A. L. P. Atividades Biológicas dos Flavonoides: Atividade Antimicrobiana. Universidade Fernando Pessoa, Faculdade de Ciências da Saúde, Porto, 2013.

FURA, A. Role of pharmacologically active metabolites in drug discovery and development. **Drug Discovery**, v. 11, n. 3-4, p. 133-42, 2006.

GARCIA-OCHOA, F.; GOMEZ, E. Bioreactor scale-up and oxygen transfer rate in microbial processes: An overview. **Biotechnology Advances**, v. 27, n. 2, p. 153-176, 2010.

GRIFFITHS, D. A. et al. Biotransformation of warfarin by the fungus *Beauveria basiana*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, n. 37, p. 169-175, 1992.

GROGAN, G. J.; HOLLAND, H. L. The biocatalytic reactions of *Beauveria spp.* **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 9, p. 1-32, 2000.

GIL, E. S.; COUTO, R. O. Flavonoid electrochemistry: a review on the electroanalytical applications. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, n. 23, v. 3, p. 542-558, 2013.

HAIDAR, G.; SINGH, N. Cryptococcus: Shedding New Light on an Inveterate Yeast. **Journal Fungi**, v. 1, p. 115-129, 2015.

HALLIWELL, B. et al. The characterization on antioxidants. **Food and Chemical Toxicology**, v. 33, n. 7, p. 601-617, 1995.

HARRASI. Isolation and bioactivities of the flavonoids morin and morin-3-O- $\beta$ -D-glucopyranoside holl from *Acridocarpus orientalis* – a wild arabian medicinal plant. **Molecules**, n. 19, p. 17763–17772, 2014.

HE, M.; DU, M; FAN, M; BIAN, Z. In vitro activity of eugenol against *Candida albicans* biofilms. **Mycopathologia**, v. 163, p. 137–143, 2007.

HOLETZ, F. B.; PESSINI, G. L.; SANCHES, N. R.; CORTEZ, D. A.; NAKAMURA, C. V. Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treayment of infectious diseases. **Mem I Oswaldo Cruz**, v. 97, p. 1027-1031, 2002.

HODEK, P.; TRFILL, P.; STIBOROVA, M. Flavonoids-potent and versatile biologically active compounds interacting with cytochromes P450. **Chemico-Biological Interactions**, n.139, p. 1–21, 2002.

HORACIO F. OLIVO, H. F.; PEEPLES, T. L.; RIOS, M. Y.; VELÁZQUEZ, F.; KIMB, J. W.; NARANG S. Microbial C-hydroxylation and 4-O-methylglucosidation of methyl-benzamide 7-azanorbornane ethers with *Beauveria bassiana*. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, n. 21, p. 97–105, 2003.

HOU, Y. C.; CHAO, P.D.L.; Profound difference in pharmacokinetics between morin and its isomer quercetin in rats. **Journal of Pharmacy and Pharmacooogy**, v.55, p.199-203, 2003.

HUMPHREY, A. Shake Flask to Fermentor: What Have We Learned? **Biotechnology Progress**, v. 14, n. 1, p. 3-7, 1998.

HUNG, H.C., MAURER, C., KAY, S.A., WEBER, F. Circadian transcription depends on limiting amounts of the transcription co-activator nejire/CBP. **Jounal Biology Chemistry**, v.43, p. 31349-31357, 2007.

HUSSAIN J. ; L. ALI, A.L. ; KHAN, N.U. ; REHMAN, F. ; JABEEN, J.S. ; KIM, A. AL- JIANG, Z. et al. Bacterial photoreceptor similarity to photoactive yellow protein and plant phytochromes. **Science**, v. 285, p. 406-409, 1999.

HUSZCZA, E.; DMOCHOWSKA-GŁADYSZ, J.; BARTMAN´SK, A. Transformations of Steroids by *Beauveria bassiana*. **Verlag der Zeitschrift für Naturforschung**, 2005.

JIANG, Z. et al. Bacterial photoreceptor similarity to photoactive yellow protein and plant phytochromes. **Science**, v. 285, p. 406-409, 1999.

JIANG, Z.; LIU, N.; DONG, G.; JIANG, Y.; LIU, Y.; HE, X.; HUANG, Y.; HE, S.; CHEN, W.; LI, Z.; ET AL. Scaffold hopping of sampangine: Discovery of potent antifungal lead compound against *Aspergillus fumigatus* and *Cryptococcus neoformans*. **Bioorganic Medicinal Chemistry Letters**, n. 24, p. 4090–4094, 2014.

JOVANOVIC, S. V. et al. Reduction potentials of flavonoid and model phenoxyl radicals. Which ring in flavonoids is responsible for antioxidant activity?. **Journal of the Chemical Society**, v. 2, p. 2497-250, 1996.

JUNG, H. J. *et al.* Evaluation of the Antiangiogenic, Antiinflammatory, and Antinociceptive Activities of Morin. **Planta Médica**, v. 76, p. 273–275, 2010.

KARABIN, M. *et al.* Biotransformations and biological activities of hop flavonoids. **Biotchnology Advances**, n. 33, p. 1063-1090, 2015.

KAWABATA, K.; TANAKA, T.; HONJO, S. Chemopreventive effect of dietary flavonoid morin on chemically induced rat tongue carcinogenesis. **International Journal of Cancer**, v. 83, p. 381, 1999.

KREN, V.;THIEM, J. Glycosylation employing bio-systems: from enzymes to whole cells. **Chemical Society Reviews**, v.26, 1997.

KITTELMANN, M.; OBERER, L.; BLUM, W.; GHISALBA, O. Microbial Hydroxylation and Simultaneous Formation of the 411-O-Methylglucoside of the Tyrosine-Kinase Inhibitor CGP 62706. **Chimia**, n. 53, p. 594-596, 1999.

KRULL, R. *et al.* Characterization and control of fungal morphology for improved production performance in biotechnology. **Journal of Biotechnology**, v. 163, n. 2, p. 112-123, 2013.

KUMAR, B. *et al.* A Review of Phytochemistry and Pharmacology of Flavonoids. **Internationale Pharmaceutica Scientia**, v. 1, n. 1, 2011.

LAGUNIN, A. ; ZAKHAROV, A.; FILIMONOV, D.; POROIKOV, V. QSAR Modelling of Rat Acute Toxicity on the Basis of PASS Prediction. **Mol Informatics**, n. 14, v. 30, p. 241-50, 2011.

LAZÉRA, M. S.; GUTIERREZ-GALHARDO, M. C.; CAVALCANTI, M. A. S.; WANKE, B. Criptococose: Dinâmica das doenças infecciosas e parasitárias. **Guanabara Koogan**, p. 1223-1236, 2005.

LEE, Y. S.; BAEK, N.; NAM, T. Natural, semisynthetic and synthetic tyrosinase inhibitors. **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**. v. 16, p. 1-13, 2015.

LERESCHE, J. E., MEYER, H. P. Chemocatalysis and Biocatalysis (Biotransformation): Some thoughts of a Chemist and of a Biotechnologist. **Organic Process Research & Development**, v. 10, p. 572-580, 2006.

LI, J. W. H., VEDERAS, J. C. Drug Discovery and Natural Products: End of an Era or an Endless Frontier? **Science**, n. 325, p. 161–165, 2009.

LI, Y. ; DURAND, P. ; OUAZZANI, J. ; BADET, B. ; BADET-DENISOT, M. A. An enzyme-coupled assay for amidotransferase activity of glucosamine-6-phosphate synthase. **Anal Biochemistry**, n. 370, v.2, p.142-6, 2007.

LIA, X.; YUNA, J. K.; CHOIA, J. S. Effects of Morin on the Pharmacokinetics of Etoposide in Rats. **Biopharmaceutics & Drug Disposition**, n. 28, p. 151–156, 2007.

LIN, L. Z. ; HARNLY, J. M. A Screening Method for the Identification of Glycosylated Flavonoids and Other Phenolic Compounds Using a Standard Analytical Approach for All Plant Materials. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, n. 55, v. 4, p. 1084–1096, 2007.

LOBO, M. A.; *et al.* Avaliação da atividade antifúngica *in vitro* de frações semi-purificadas obtidas a partir do rizoma *Typha domingensis pers* (TYPHACEAE). **BioScience**, v. 2, n. 1, p. 42 – 51, 2013.

LÓPEZ, J. L. C. *et al.* Production of lovastatin by *Aspergillus terreus*: effects of the C:N ratio and the principal nutrients on growth and metabolite production. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 33, p. 270-277, 2003.

MALAJOVICH, M. A. *Biotecnologia* 2011. **Rio de Janeiro: Edições da Biblioteca Max Feffer do Instituto de Tecnologia ORT**, 2012.

MASEK, A.; CHRZESCIJANSKA, E.; ZABORSKI, M. Electrooxidation of morin hydrate at a Pt electrode studied by cyclic voltammetry. **Food Chemistry**, n. 148, p. 18–23, 2014

MASISI, K. et al. Antioxidant properties of diverse cereal grains: A review on *in vitro* and *in vivo* studies. **Food Chemistry**, v. 196, n. 1, p. 90–97, 2016.

MASUREKAR, P. S. Nutritional and engineering aspects of microbial process development. In: (Ed.). **Natural Compounds as Drugs Volume I**: Springer, 2008. p.291-328.

MIYAKOSHI, S.; AZAMI, S.; KUZUYAMA, T. Microbial glucosylation of flavonols by *Cunninghamella echinulata*. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 110, n. 3, p. 320–321, 2010.

MIYAZAKI, Y, *et al.* The natural flavonoid myricetin inhibits gastric H<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase. **European Journal of Pharmacology**, n. 820, p. 2017-221, 2018.

MORALES, B. P. Suscetibilidade *in vitro* de *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii* frente a drogas antifúngicas pela citometria de fluxo. **Fundação Oswaldo Cruz**, Mestrado em pesquisa clínica em doenças infecciosas, Rio de Janeiro, 2009.

MOREIRA NETO, S. L.; MATHEUS, D. R.; MACHADO, K. M. G. Influence of pH on the growth, laccase activity and RBBR decolorization by tropical basidiomycetes. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 52, p. 1075-1082, 2009.

O'BRIEN, B.J.; BRIGGS, A.H. Analysis of uncertainty in health care cost-effectiveness studies: an introduction to statistical issues and methods. **Statistical Methods in Medical Research**, n. 11, v. 6 p. 455-468, 2002.

OLIVEIRA, L. A. et al. Elaboração de Bebida Fermentada Utilizando Calda Residual da Desidratação Osmótica de Abacaxi (*Ananas comosus* L.). **Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial**, v. 6, n.1, p. 702 – 712, 2012.

ORHAN, I. E.; KHAN, M. T. H. Flavonoid Derivatives As Potent Tyrosinase Inhibitors – A Survey of Recent Findings Between 2008-2013. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 14, p. 1486-1493, 2014.

- PAKULA, R.; FREEMAN, A. A new continuous biofilm bioreactor for immobilized oildegrading filamentous fungi. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 49, n. 1, p. 20-5, 1996.
- PANDEY, R. P. *et al.* Microbial production of natural and non-natural flavonoids: Pathway engineering, directed evolution and systems/synthetic biology. **Biotechnology Advances**, v. 34, n. 5, p. 634–662, 2016.
- PANDEY, R. P. ; SOHNG, J. K. Glycosyltransferase-Mediated Exchange of Rare Microbial Sugars with Natural Products. **Frontiers in Microbiology**, n. 1849, v. 7, p. 1-4, 2016.
- PAPAGIANNI, M. Fungal morphology and metabolite production in submerged mycelial processes. **Biotechnology Advances**, v.22, p.189-259, 2004.
- PARK, E. Y. *et al.* Morphological diversity of *Mortierella alpina*: Effect of consumed carbon to nitrogen ratio in flask culture. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v. 6, n. 3, p. 161-166, 2001.
- PARASURAMAN S. Toxicological screening. **Journal Pharmacoly Pharmacother.**, n. 2, v.2, p. 74-79, 2011.
- PENSO, J. *et al.* Vasorelaxant activity of 7- $\beta$ -O-glycosides biosynthesized from flavonoids. **European Journal of Pharmacology**, v. 733, p. 75-80, 2014.
- PEREA, S.; LÓPEZ-RIBOT, J.L.; KIRKPATRICK, W.R.; MCATEE, R.K.; SANTILLÁN, R.A.; MARTÍNEZ, M.; CALABRESE, D.; SANGLARD, D.; PATTERSON, T.F. Prevalence of molecular mechanisms of resistance to azole antifungal agents in *Candida albicans* strains displaying high-level fluconazole resistance isolated from human immunodeficiency virus-infected patients. **Antimicrobial Agents Chemother**, n. 45, p. 2676–2684, 2001.
- PERUZZI, M. F. Avaliação da Atividade Antioxidante pela Inibição da Peroxidação Lipídica e Quelação de Íon Ferro de Extratos Metanólicos de *Azadirachta indica* (NEEM). **Simpósio de Bioquímica e Biotecnologia**, n. 5, p. 1, 2015.
- PETERSON, D. H.; MURRAY, C. H. Microbiological oxygenation of steroids at carbon 11. **Journal of American Chemical Society**, v. 74, n. 7, p. 1871-1872, 1952.

- PLAZA, M.; POZZO, T.; LIU, J.; ARA, Q. Z.; TURNER, C. ; KARLSSON, E. Substituent Effects on in Vitro Antioxidizing Properties, Stability, and Solubility in Flavonoids. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 62, n. 15, p. 3321–3333, 2014.
- PIANALTO, K. M.; ALSPAUGH, J. A. New Horizons in Antifungal Therapy. **Journal of Fungi**, n. 2, v. 26, p. 2-24, 2016.
- PIEROZYNSKI, B.; ZIELINSKA, D. The Process of Electrooxidation of Quercetin 3,4'-di-O- $\beta$ -Glucopyranoside at Glassy Carbon Electrode. **Croatia Chemistry Acta**, n. 83, v. 2, p. 127–133, 2010.
- POMPELLA, A. Biochemistry and histochemistry of oxidant stress and lipid peroxidation. **Journal of Vitamin and Nutrition Research**, v. 67, n. 5, p. 289-297, 1997.
- PURWAR, J.R.; SACHAN, G.C. Insect pest through entomogenous fungi: A review. **Journal Applied Bioscience**, n. 32, v. 1, p. 1-26, 2006.
- QIAO, L. et al. Microbial transformation of lovastatin by *Beauveria bassiana*. **Acta Pharmaceutica Sinica B**, v. 2, n. 3, p. 300-305, 2012.
- RICE-EVANS, C. A. et al. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 20, n. 7, p. 933-956, 1996.
- RAJIĆ, T. S.; RISTIĆ, A. K. Antioxidants: Role on Health and Prevention. **Encyclopedia of Food and Health**, v. 1, n.1, p. 227-233, 2015.
- RINI, J. ; ESKO, J. ; VARKI, A. Glycosyltransferases and Glycan-processing Enzymes. **Essentials of Glycobiology**, n.2, 2009.
- SÁ, L.Z. C. M. **Determinação eletroanalítica e espectrofotométrica da atividade antioxidante de fermentados de jabuticava e vinhos de diferentes preferências**. 2013. 98 (Mestrado). Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Goiás, Goiânia.
- SANCHES, A. C. C.; LOPES, G. C.; NAKAMURA, C. V.; FILHO, B. B. D.; MELLO, J. C. P. Antioxidant and antifungal activities of extracts and condensed tannins from *Stryphnodendron obovatum* Benth. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 41, n. 1, 2005.
- SANGUINETTI, M.; POSTERARO, B.; FIORI, B.; RANNO, S.; TORELLI, R.; FADDA, G. Mechanisms of azole resistance in clinical isolates of *Candida glabrata* collected during a

hospital survey of antifungal resistance. **Antimicrobial Agents Chemother**, n. 49, p. 668–679, 2005.

SCHMIDELL, W.; FACCIOTTI, M. C. R. Biorreatores e Processos Fermentativos. In: SCHMIDELL, W.;LIMA, U. D. A., *et al* (Ed.). **Biotecnologia Industrial**. São Paulo: Blucher, v.2, 2001.

SEEBERGER, P.; FINNEY, N.; RABUKA, D.; BERTOZZI, C. R. Chemical and Enzymatic Synthesis of Glycans and Glycoconjugates. **Essentials of Glycobiology**, n.2, 2009.

SCHMIDELL, W.; FACCIOTTI, M. C. R. Biorreatores e Processos Fermentativos. In: SCHMIDELL, W.;LIMA, U. D. A., *et al* (Ed.). **Biotecnologia Industrial**. São Paulo: Blucher, v.2, 2001.

SOUSA, C. M. M. et al. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Quimica Nova**, v. 30, n. 2, p. 351-355, 2007.

SOUSA, J. P. B. et. al. A reliable quantitative method for the analysis of phenolic compounds in Brazilian propolis by reverse phase high performance liquid chromatography. **Journal of Separation Science**, v. 30, p. 2656-2665, 2007.

SOUSA, M. C.; BRAGA, R. C.; CINTRA, B. A. S.; OLIVEIRA, V.; ANDRADE, C. H. *In silico* metabolism studies of dietary flavonoids by CYP1A2 and CYP2C9. *Food Research International*, n. 50, p.102–110, 2013.

SOUZA, P. L. M. **N-Glicosilação de 5-(1-(3-Fluorofenil)-1h-Pirazol-4-II)-1htetrazol Catalisada por Células Fúngicas Livres e Imobilizadas de *Cunninghamella echinulata* ATCC 9244**. 2015 (Mestrado) Faculdade de Farmácia – Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2015.

SORDON, A.; POPŁOŃSKI, J.; HUSZCZA, E. Microbial Glycosylation of Flavonoids. **Polish Journal of Microbiology**, v. 65, n. 2, p. 137–151, 2016.

SPAKOWICZ, D. J.; STROBEL, S. A. Biosynthesis of hydrocarbons and volatile organic compounds by fungi: bioengineering potential. **Applied Microbiol Biotechnology**, n. 99, v. 12, p. 4943–4951, 2015.

TRUEBA, G. P. Los flavonoides: antioxidantes o prooxidantes. *Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas*, v. 22, n.1, 2003.

TRUEBA, G. P.; SÁNCHEZ, G. M. Los Flavonoides como Antioxidantes Naturales. **Acta Farmaceutica Bonaerense**, v. 20, n. 4, p. 297-306, 2001.

VANITHA, P. *et al.* Modulatory effects of morin on hyperglycemia by attenuating the hepatic key enzymes of carbohydrate metabolism and  $\beta$ -cell function in streptozotocin-induced diabetic rats. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 37, n. 1, p. 326-335, 2014.

VEDULA, P.; SMITH, K.; BOULWARE, D.R.; MEYA, D.B.; GARVEY, E.P.; HOEKSTRA, W.J.; SCHOTZINGER, R.J.; NIELSEN, K. Activity of VT-1129 against *Cryptococcus neoformans* clinical isolates with high fluconazole MICs. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.1, p. 17–21 2015.

WANG, L. *et al.* Bioprocessing strategies to improve heterologous protein production in filamentous fungal fermentations. **Biotechnology Advances**, v. 23, n. 2, p. 115-29, 2005.

WILSON, A. M. M.; ORTEGA, H. S.; QUINTANA, R. R. B. Relationship between structure, properties, and the radical scavenging activity of morin. **Journal of Molecular Structure**, v. 995, p. 134–141, 2011.

WU, T. W. *et al.* Molecular properties and myocardial salvage effects of morin hydrate. **Biochemical Pharmacology**, n. 49, p. 537-543, 1995.

XIAO, J.; MUZASHVILI, T. S.; GEORGIEV, M. L. Advances in the biotechnological glycosylation of valuable flavonoids. **Biotechnology Advances**, n. 32, p. 1145-1156, 2014.

XIM, X. L. *et al.* Biotransformation of major flavonoid glycosides in herb epimedii by the fungus *Cunninghamella blakesleana*. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 122, p. 141-146, 2015.

YANG, S. H.; CHOI, H. G.; LIM, S. J. *et al.* Effects of morin on the pharmacokinetics of etoposide in 7,12-dimethylbenz[a]anthracene-induced mammary tumors in female Sprague-Dawley rats. **Oncology Reports**. V. 29, n. 3, p. 1215-1223, 2012.

YANG,X; WANG, J.; SONG, H.; ZOU, W. Thermal properties and solubility of methyl  $\alpha$ -D-glucopyranoside in methanol at different temperatures. **Fluid Phase Equilibria**, v. 409,p. 417-424, 2016.

YOSHIE, Y. et al. Distribution of flavonoids and related compounds of seaweeds in Japan. **Journal of Tokyo University of Fisheries**, v. 89, n. 1, p. 1-6, 2003.

ZHAN, I. ; GUNATILAKA, A. A. L. Selective 4'-O-methylglycosylation of the pentahydroxy-flavonoid quercetin by *Beauveria bassiana* ATCC 7159. **Biocatalysis and Biotransformation**, n. 24, v. 5, p. 396-399, 2006.

ZHANG, Z.T.; CAO, X.B.; XIONG, N. *et al.* Morin exerts neuroprotective actions in Parkinson disease models in vitro and in vivo. *Acta Pharmacol. Sin.* N. 31, p. 900–906, 2010.

ZI, J.; VALIENTE, J.; ZENG, J.; ZHAN, J. Metabolism of quercetin by *Cunninghamella elegans* ATCC 9245. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 112, n. 4, p. 360–362, 2011.

ZHI-QI, Y.; LEI, W.; WEN-CAI, Y.; JIAN, Z.; CHANG-LIN, Z.; SHOU-XUN, Z. A New Anthraquinone Glycoside Biotransformed by *Beauveria bassiana*. **Chinese Journal of Natural Medicines**, n. 6, p. 0103-0104, 2008.

## **7 ANEXOS**

---

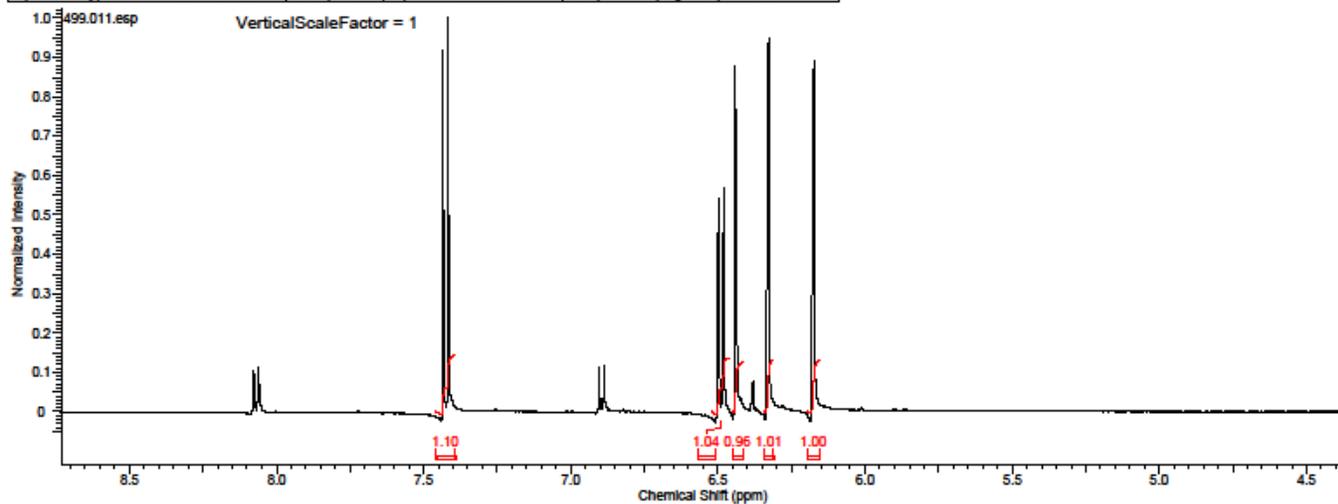
## 7. ANEXOS

### 7.1. RMN<sup>1</sup>H Morina

This report was created by ACD/NMR Processor Academic Edition. For more information go to [www.acdlabs.com/nmrproc/](http://www.acdlabs.com/nmrproc/)

13/11/2017 15:09:44

Acquisition Time (sec)	5.4788	Comment	v-labiocin499 Kamila Labiocin 18mg MeOD	Date	13 Apr 2015 09:45:52
Date Stamp	13 Apr 2015 09:45:52	File Name	D:\USU\8RIOSKAMILA JAPIASSU\DESKTOP\RMN2\RMN499\11\FID	Number of Transients	16
Frequency (MHz)	500.13	Nucleus	<sup>1</sup> H	Points Count	32768
Original Points Count	32768	Owner	nmrsu	Pulse Sequence	zgpgpr
Receiver Gain	64.00	SW(cyclical) (Hz)	5980.86	Solvent	METHANOL-d4
Spectrum Type	STANDARD	Sweep Width (Hz)	5980.68	Temperature (degree C)	25.160
				Spectrum Offset (Hz)	2439.5305



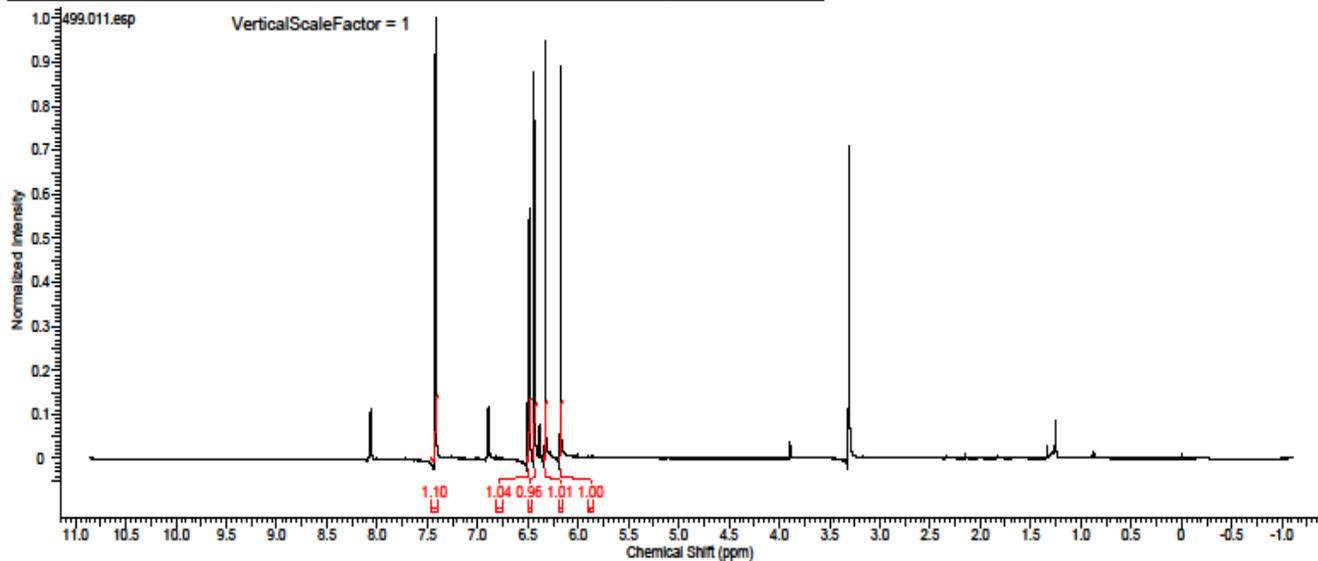
No.	(ppm)	Value	Absolute Value	Non-Negative Value
1	6.19	1.00115156	7.41446502e+9	1.00115156
2	6.34	1.01176441	7.49306317e+9	1.01176441
3	6.45	0.95705670	7.08790118e+9	0.95705670
4	6.52	1.03560531	7.66962688e+9	1.03560531
5	7.45	1.10305536	8.16915814e+9	1.10305536

## 7.2. RMN<sup>1</sup>H Morina Ampliado

This report was created by ACD/NMR Processor Academic Edition. For more information go to [www.acdlabs.com/nmrproc/](http://www.acdlabs.com/nmrproc/)

13/11/2017 15:10:11

Acquisition Time (sec)	5.4788	Comment	v-labiocn499 Kamila Labiocn 18mg MeOD	Date	13 Apr 2015 09:45:52
Date Stamp	13 Apr 2015 09:45:52	File Name	D:\USU\RIOSIKAMILA_JAPIASSU\DESKTOP\IRMN2\RMN499\1\FID		
Frequency (MHz)	500.13	Nucleus	<sup>1</sup> H	Number of Transients	16
Original Points Count	32768	Owner	nmrsu	Points Count	32768
Receiver Gain	64.00	SW(cyclical) (Hz)	5980.86	Solvent	METHANOL-d4
Spectrum Type	STANDARD	Sweep Width (Hz)	5980.68	Temperature (degree C)	25.160
				Spectrum Offset (Hz)	2439.5305



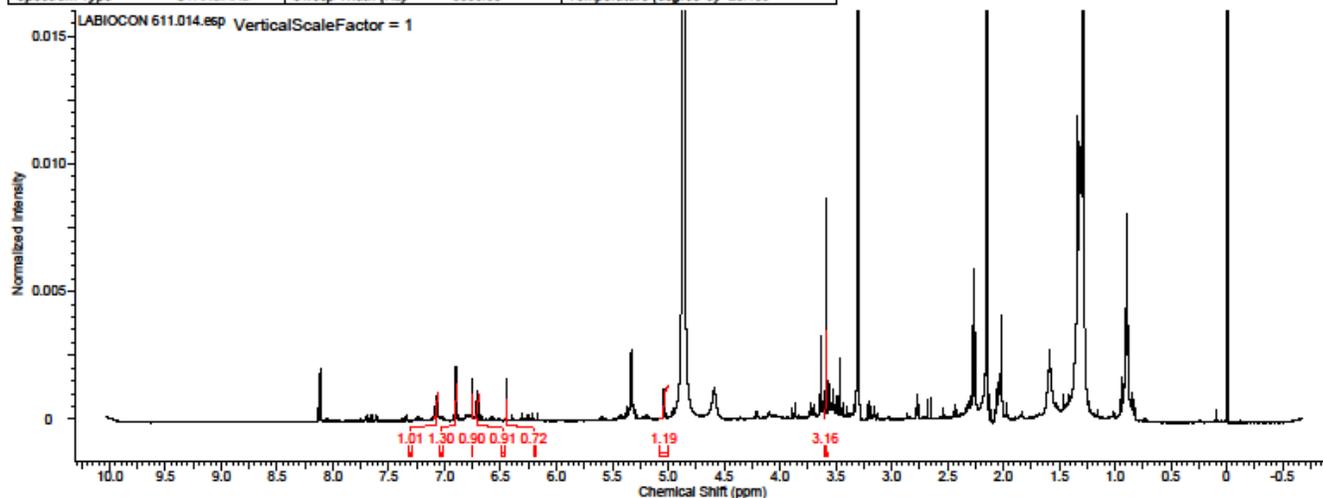
No.	(ppm)	Value	Absolute Value	Non-Negative Value
1	523 . 6.19	1.00115156	7.41446502e+9	1.00115156
2	117 . 6.34	1.01176441	7.49306317e+9	1.01176441
3	147 . 6.45	0.95705670	7.08790118e+9	0.95705670
4	162 . 6.52	1.03560531	7.66962688e+9	1.03560531
5	909 . 7.45	1.10305536	8.16915814e+9	1.10305536

### 7.3. RMN<sup>1</sup>H LaBiocon 100

This report was created by ACD/NMR Processor Academic Edition. For more information go to [www.acdlabs.com/nmrproc/](http://www.acdlabs.com/nmrproc/)

13/11/2017 15:16:48

Acquisition Time (sec)	6.1167	Comment	5 mm TBI 1H/13C/D-BB Z-GRD Z86240014	Date	23 Mar 2017 17:09:36
Date Stamp	23 Mar 2017 17:09:36	File Name	D:\USU6RIOSIKAMILA JAPIASSU\DESKTOP\RMN2\RMN\LABIOCON 611114\FID		
Frequency (MHz)	500.13	Nucleus	1H	Number of Transients	46
Original Points Count	32768	Owner	Lab	Points Count	32768
Receiver Gain	101.00	SW(cyclical) (Hz)	5357.14	Solvent	METHANOL-d4
Spectrum Type	STANDARD	Sweep Width (Hz)	5356.98	Temperature (degree C)	25.160
				Spectrum Offset (Hz)	2341.8284



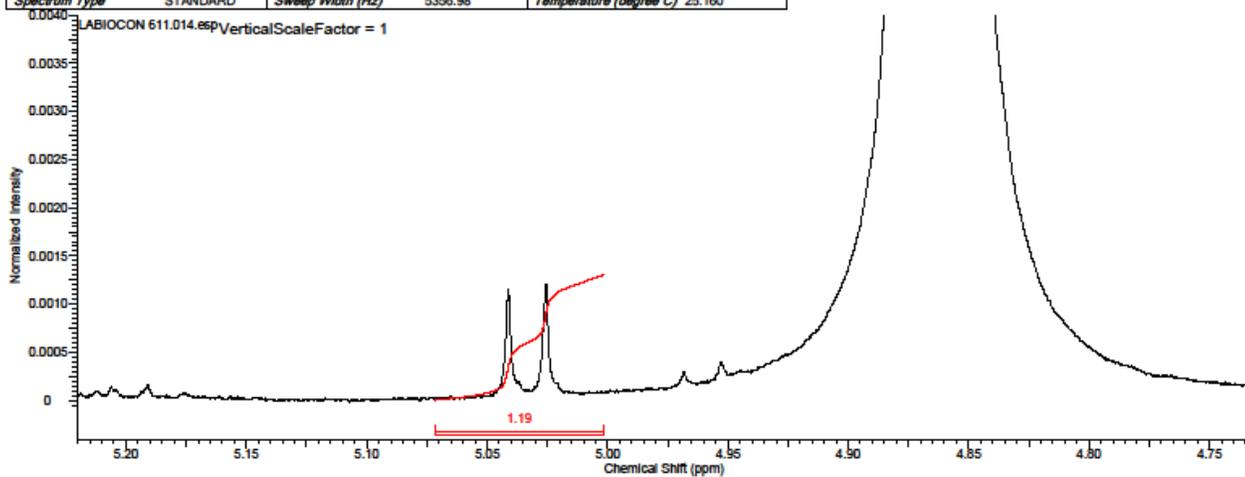
No.	(ppm)	Value	Absolute Value	Non-Negative Value
1	811	3.59316061497	2.28366899e+9	3.16061497
2	014	5.07118508863	8.56273280e+8	1.18508863
3	419	6.45072178751	5.21519936e+8	0.72178751
4	920	6.72090965527	6.57261824e+8	0.90965527
5	7465	6.75090042055	6.50589376e+8	0.90042055
6	910	6.91129737377	9.37403712e+8	1.29737377
7	641	7.08101471031	7.33168192e+8	1.01471031

## 7.4. RMN<sup>1</sup>H LaBiocon 100 dupleto

This report was created by ACD/NMR Processor Academic Edition. For more information go to [www.acdlabs.com/nmrproc/](http://www.acdlabs.com/nmrproc/)

13/11/2017 15:17:35

Acquisition Time (sec)	6.1167	Comment	5 mm TBI 1H/13C/D-BB Z-GRD Z86240014	Date	23 Mar 2017 17:09:36
Date Stamp	23 Mar 2017 17:09:36	File Name	D:\USJ6RIOS\KAMILA JAPIASSU\DESKTOP\RMN2\RMNLABIOCON 611114\FID		
Frequency (MHz)	500.13	Nucleus	1H	Number of Transients	46
Original Points Count	32768	Owner	Lab	Points Count	32768
Receiver Gain	101.00	SW(cyclical) (Hz)	5357.14	Solvent	METHANOL-d4
Spectrum Type	STANDARD	Sweep Width (Hz)	5356.98	Temperature (degree C)	25.160
				Pulse Sequence	zg
				Spectrum Offset (Hz)	2341.8284



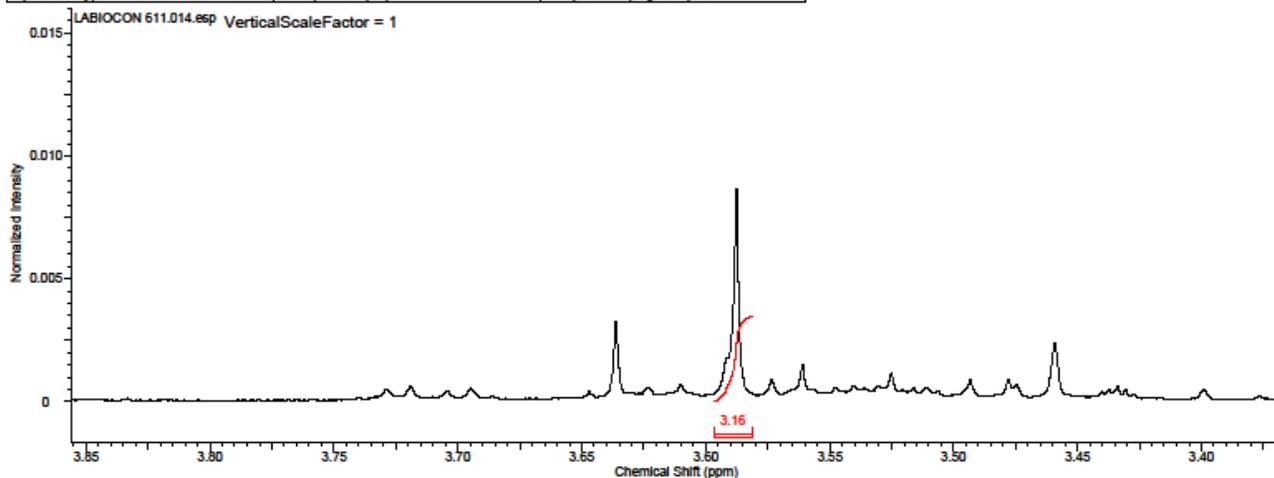
No.	(ppm)	Value	Absolute Value	Non-Negative Value
1	3.59	3.16061497	2.28366899e+9	3.16061497
2	5.07	1.18508863	8.56273280e+8	1.18508863
3	6.45	0.72178751	5.21519936e+8	0.72178751
4	6.72	0.90965527	6.57261824e+8	0.90965527
5	6.75	0.90042055	6.50589376e+8	0.90042055
6	6.91	1.29737377	9.37403712e+8	1.29737377
7	7.08	1.01471031	7.33168192e+8	1.01471031

## 7.5. RMN<sup>1</sup>H LaBiocon 100 simpleto

This report was created by ACD/NMR Processor Academic Edition. For more information go to [www.acdlabs.com/nmrpro/](http://www.acdlabs.com/nmrpro/)

13/11/2017 15:18:02

Acquisition Time (sec)	6.1167	Comment	5 mm TBI 1H/13C/D-BB Z-GRD Z8624/0014	Date	23 Mar 2017 17:09:36
Date Stamp	23 Mar 2017 17:09:36	File Name	D:\USU6RIOS\KAMILA JAPIASSU\DESKTOP\RMN2\RMNLABIOCON 6111\4\FID		
Frequency (MHz)	500.13	Nucleus	1H	Number of Transients	46
Original Points Count	32768	Owner	Lab	Points Count	32768
Receiver Gain	101.00	SW(cyclical) (Hz)	5357.14	Solvent	METHANOL-d4
Spectrum Type	STANDARD	Sweep Width (Hz)	5356.98	Temperature (degrees C)	25.160
				Spectrum Offset (Hz)	2341.8284

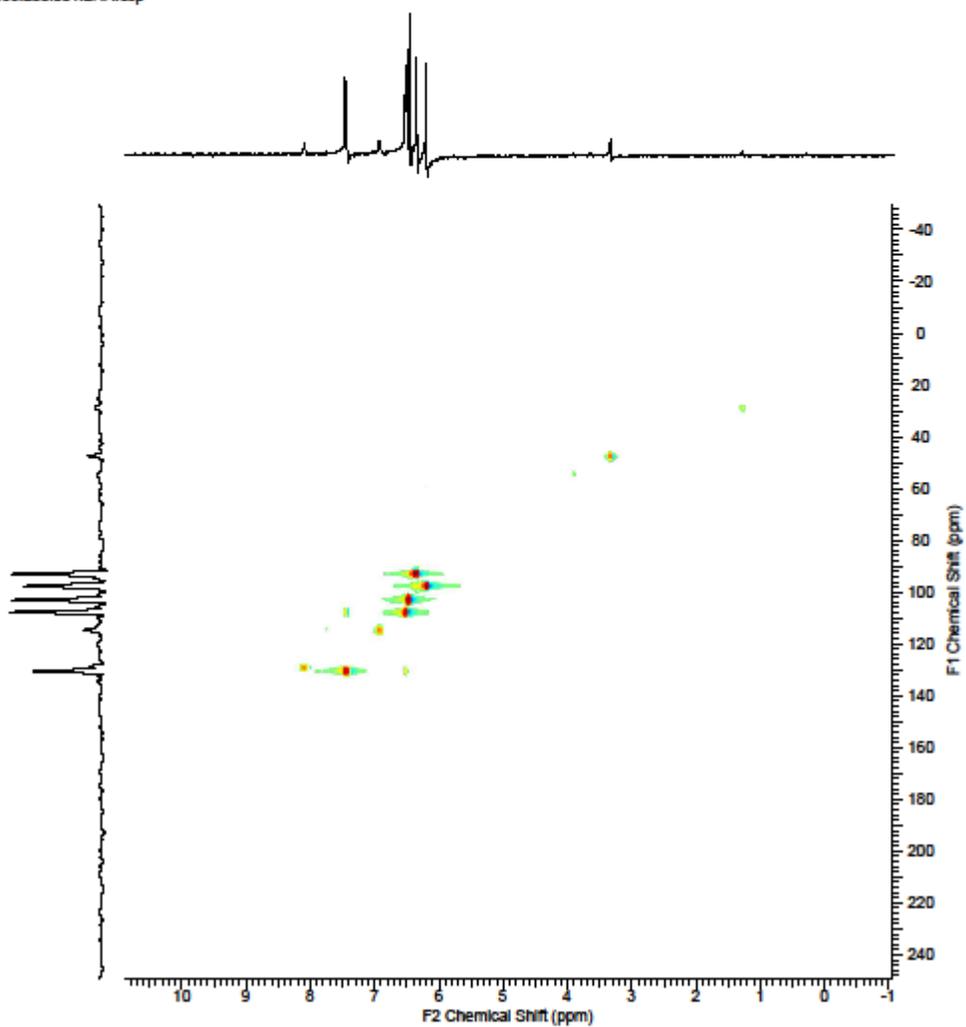


No.	(ppm)	Value	Absolute Value	Non-Negative Value
1	3.59	3.16061497	2.28366899e+9	3.16061497
2	3.07	1.18508863	8.56273280e+8	1.18508863
3	6.45	0.72178751	5.21519936e+8	0.72178751
4	6.72	0.90965527	6.57261824e+8	0.90965527
5	6.75	0.90042055	6.50589376e+8	0.90042055
6	6.91	1.29737377	9.37403712e+8	1.29737377
7	7.08	1.01471031	7.33168192e+8	1.01471031

## 7.6. RMN HSQC Morina

This report was created by ACD/NMR Processor Academic Edition. For more information go to [www.acdlabs.com/nmrproc/](http://www.acdlabs.com/nmrproc/)

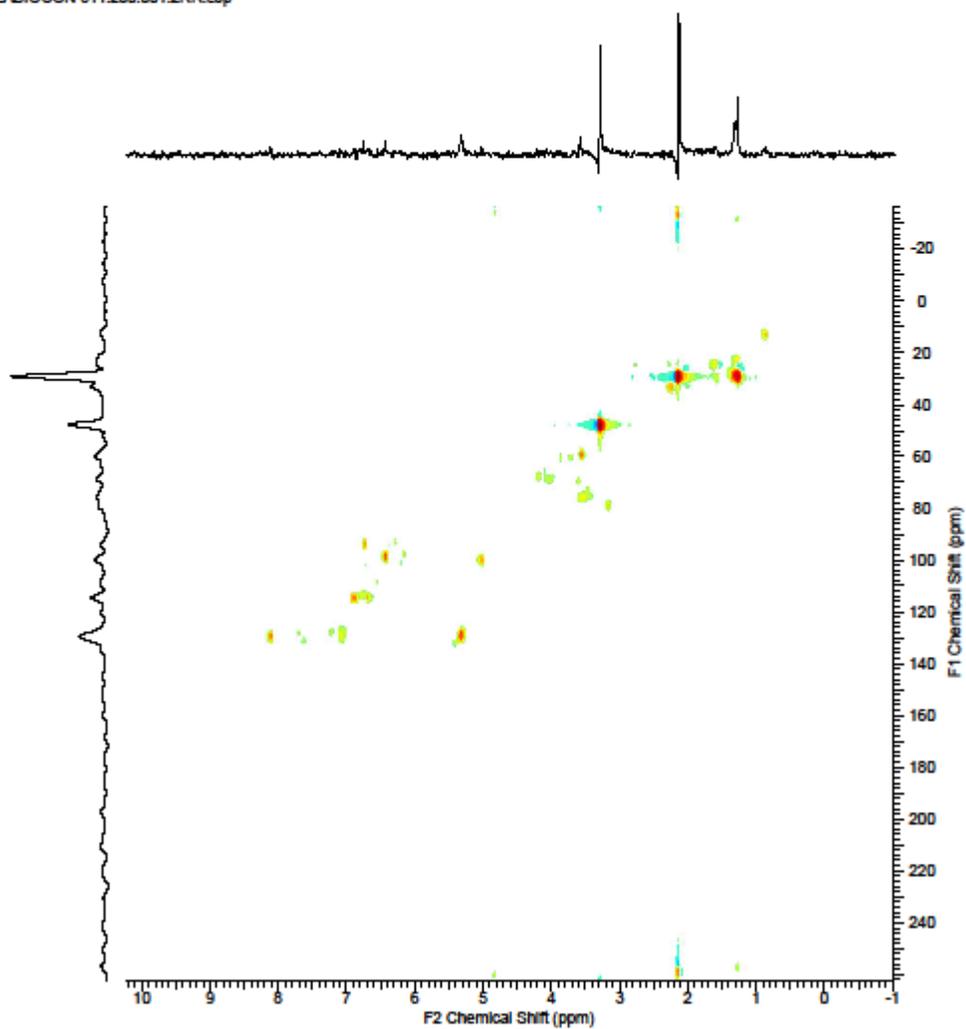
499.200.001.2RR.esp



## 7.7. RMN HSQC LaBiocon 100

This report was created by ACD/NMR Processor Academic Edition. For more information go to [www.acdlabs.com/nmrproc/](http://www.acdlabs.com/nmrproc/)

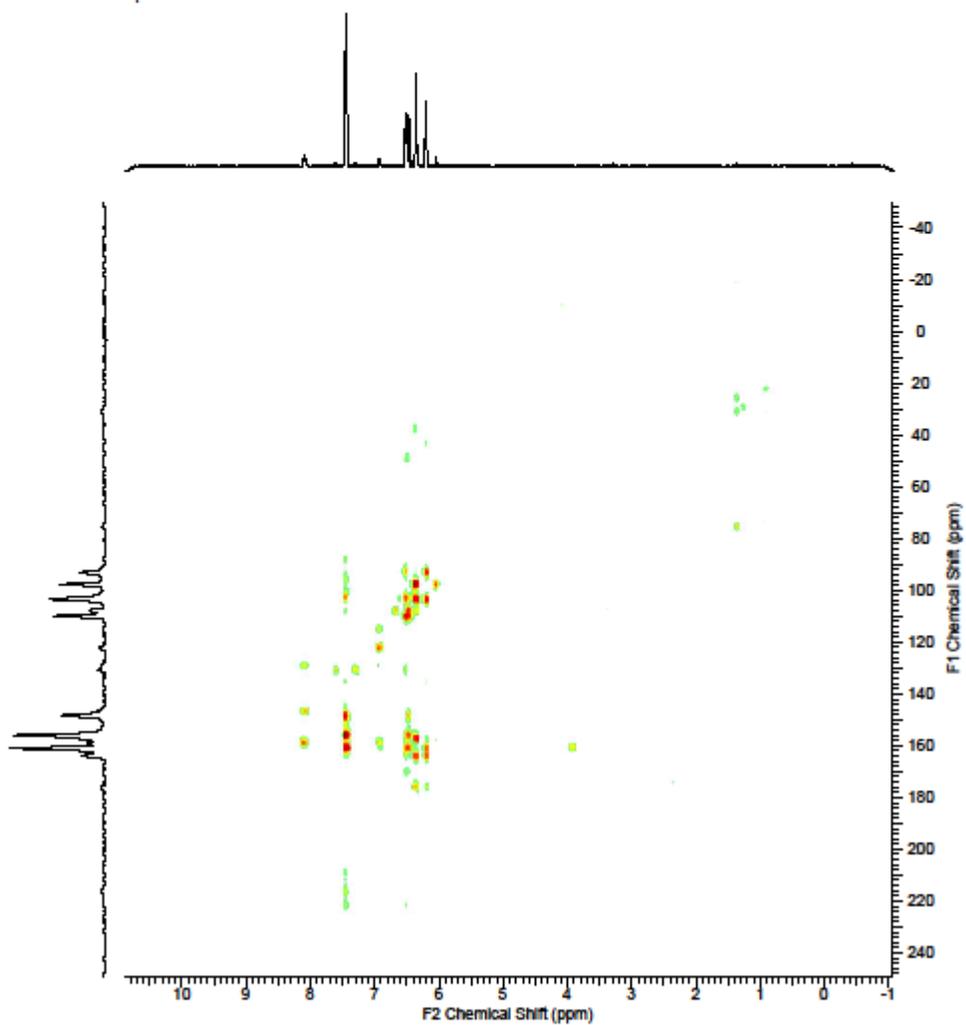
LABIOCON 611.200.001.2RR.esp



## 7.8. RMN HMBC Morina

This report was created by ACD/NMR Processor Academic Edition. For more information go to [www.acdlabs.com/nmrproc/](http://www.acdlabs.com/nmrproc/)

499.300.001.2RR.esp



## 7.9. RMN HMBC LaBiocon 100

This report was created by ACD/NMR Processor Academic Edition. For more information go to [www.acdlabs.com/nmrproc/](http://www.acdlabs.com/nmrproc/)

LABIOCON 611.300.001.2RR.esp

