



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS E NATURAIS
FACULDADE DE QUÍMICA
SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL

Gustavo Romano Monteiro Lustosa

**Reação de Biotransformação com o Fungo Endofítico RZ3P3 Isolado da
Raiz do *Paspalum maritimum* Trin. e Ensaio Antibacteriano**

Belém - Pará
Novembro - 2017



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS E NATURAIS
FACULDADE DE QUÍMICA
SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL

Gustavo Romano Monteiro Lustosa

**Reação de Biotransformação com o Fungo Endofítico RZ3P3 Isolado da
Raiz do *Paspalum maritimum* Trin. e Ensaio Antibacteriano**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à
Faculdade de Química do Instituto de Ciências
Exatas e Naturais da Universidade Federal do
Pará para obtenção do título de Química
Industrial.

Orientador: Prof. Dr. Marivaldo José Costa
Corrêa.

Belém-Pará
Novembro - 2017

Gustavo Romano Monteiro Lustosa

Reação de Biotransformação com o Fungo Endofítico RZ3P3 Isolado da Raiz do *Paspalum maritimum* Trin. e Ensaio Antimicrobiano

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Faculdade de Química – UFPA como requisito à obtenção do Grau de Química Industrial.

Orientador: Prof. Dr. Marivaldo José Costa Corrêa.

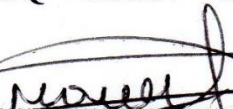
Data da Apresentação: 21/11/2017

Conceito: EXCELENTE

Banca Examinadora



Prof. Dr. Marivaldo José Costa Corrêa
PPGQ – ICEN – UFPA - Orientador



Prof. Msc. Manoel Leão Lopes Júnior
Campus Tocantins Cametá/ UFPA - Membro



Prof. Msc. Dalglish Gomes de Oliveira
SEDUC/PA - Membro

Dedico esta conquista a todos que
não desistiram de mim, e permitiram
que eu pudesse chegar ao fim desta estrada.

AGRADECIMENTOS

Principalmente à Deus pelo dom da vida e oportunidade de concluir esta meta tão importante em minha vida.

À Universidade Federal do Pará por todo o suporte cedido durante o trajeto.

À minha família, especialmente minha mãe Dona Eunice, e meu pai seu Gilberto, pelo incansável investimento e confiança depositados em mim.

Ao professor Dr. Marivaldo Corrêa pela confiança e oportunidade cedida para realização deste trabalho.

À amiga e Msc. Fabiane Trindade, pelo apoio, confiança, tempo e conhecimento dedicados e transmitidos com excelência.

E a todos que estiveram presentes desde o início, ou se juntaram durante o passar dos tempos, pois com certeza sem o apoio incondicional destas pessoas, eu não estaria aqui nesta condição.

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

AcOEt	Acetato de Etila
BDA	Batata, Dextrose e Àgar
BHI	Brain Heart Infusion
Cap.	Capítulo
CdCl₃-d	Clorofórmio deuterado
CIM	Concentração Inibitória Mínima
g	Gramma
Hex	Hexano
Hz	Hertz
J	Constante de acoplamento
MeOH	Metanol
mL	Mililitro
p.	Página
ppm	Parte Por Milhão
RMN ¹H	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
TTC	Cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazóico
V	Volume

RESUMO

Os fungos endofíticos constituem uma promissora e ainda pouco explorada fonte de substâncias potencialmente bioativas, que podem ser aproveitadas nas inúmeras áreas de conhecimento, tais como medicina, biotecnologia, química entre outras. O presente trabalho tem como finalidade a realização de biotransformação para avaliar e testar o potencial biocatalítico do fungo endofítico codificado como RZ2P3 no qual foi isolado da raiz da espécie vegetal *Paspalum maritimum* Trin, frente a uma chalcona sintética. O fungo foi ativado em placas de Petri utilizando como meio de cultura semissólido a batata-dextrose-ágar (BDA). O fungo endofítico foi utilizado em reação de biotransformação em meio líquido de caldo de batata e dextrose (BD), empregando o substrato sintético (2E)-1,3-difenil-prop-2-en-1-ona. O fungo RZ2P3 foi capaz de promover a redução da dupla ligação α,β -carbonilada dando origem ao produto 1,3-difenil-propan-1-ona. O produto de reação de biotransformação foi purificado por recristalização, e identificado pelo o método espectrométrico de Ressonância Magnética Nuclear de hidrogênio (RMN ^1H). O produto obtido foi submetido ao ensaio biológico antibacteriano, frente às bactérias *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae* e *Enterococcus faecalis* e suas atividades classificadas de acordo com os resultados analisados. Através dos resultados obtidos pode-se verificar a eficiência do micro-organismo na técnica de biotransformação.

Palavras-chave: Chalcona, Endofítico, Ensaio antibacteriano.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Mecanismo "chave-fechadura" para a Reação de Biotransformação.	14
Figura 2. Espécie vegetal <i>Paspalum maritimum</i> (a) e fungos endofíticos isolados das folhas (b).	20
Figura 3. Fungo endofítico RZ2P3: a) Frente b) Verso.....	21
Figura 4. Distribuição do meio de cultura	22
Figura 5. Meio de cultura na mesa agitadora (Shaker).....	22
Figura 6. Fluxograma do procedimento de biotransformação para o meio reacional.	23
Figura 7. Estrutura do Substrato	27
Figura 8. Espectro de RMN ¹ H (300 MHz, CDCl ₃) do substrato.....	28
Figura 9. Esquema de reação de biotransformação da (2E)-1,3-difenil-prop-en-1-ona.....	29
Figura 10. Espectro de RMN ¹ H (300 MHz, CDCl ₃) de S1.	30

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	10
2 REFERENCIAL TEÓRICO	11
2.1 ESPÉCIE VEGETAL <i>Paspalum maritimum</i>	11
2.2 CLASSIFICAÇÃO BOTÂNICA DA ESPÉCIE <i>Paspalum maritimum</i> TRIN.....	11
2.3 FUNGOS ENDOFÍTICOS	12
2.4 BIOTRANSFORMAÇÃO	13
2.5 ENSAIO ANTIMICROBIANO	16
3 OBJETIVOS	17
3.1 OBJETIVO GERAL.....	17
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	17
4 DESENVOLVIMENTO	18
4.1 MATERIAL	18
4. 1. 1 Equipamentos	18
4. 1. 2 Solventes.....	18
4. 1. 3 Meios de cultivos utilizados	18
4. 1. 4 Substrato utilizado para a biotransformação	18
4. 1. 5 Técnicas cromatográficas utilizadas para análises	18
4. 1. 6 Solvente Deuterado utilizado na análise de RMN de ¹ H.....	18
4. 1. 7 Material utilizado no ensaio antimicrobiano	19
4. 1. 8 Micro-organismos.....	19
4.2 MÉTODOS.....	20
4. 2. 1 Micro-organismo RZ2P3.....	20
4. 2. 3 Meio de cultivo para a reação de biotransformação	21
4. 2. 4 Obtenções dos extratos reacionais da biotransformação	23
4.3 ENSAIO ANTIMICROBIANO	24
4. 3. 1 Preparo do meio de cultivo BHI.....	24
4. 3. 2 Preparo do meio de cultivo Ágar BHI.....	24

4. 3. 3 Ativação das bactérias	24
4. 3. 4 Padronização das culturas.....	24
4. 3. 5 Preparo das amostras	25
4. 3. 6 Preparo do antibiótico controle.....	25
4. 3. 7 Ensaio para medir a CIM (Concentração Inibitória Mínima).....	25
4. 3. 8 Tipo de atividade	26
5 RESULTADOS	27
5.1 BIOTRANSFORMAÇÃO UTILIZANDO O FUNGO RZ2P3 COM SUBSTRATO (2E)- 1,3-DIFENIL-PROP-EN-1-ONA.....	27
5. 1. 1 Espectro de RMN ¹ H da (2E)-1,3-difenil-prop-en-1-ona.....	27
5.1.2 Biotransformação da (2E)-1,3-difenil-prop-en-1-ona	29
5.2 RESULTADO DO ENSAIO ANTIMICROBIANO.....	31
5. 2. 1 Análise do resultado do produto da biotransformação	31
6 CONCLUSÃO.....	32
REFERÊNCIAS	33

1 INTRODUÇÃO

A necessidade de sobrevivência do homem desde os tempos mais antigos, fez com que ele desenvolvesse formas de utilizar melhor os bens oferecidos pela natureza, assim ele foi retribuído com a obtenção de alimentos, moradia e medicamentos. Destacando a aquisição deste último, que abriu inúmeras opções para descobertas de novos fármacos, no qual sua importância só aumentou no decorrer do tempo.

Mesmo com a grande diversidade sintética que foi obtida com a química combinatória, os produtos naturais e suas estruturas relacionadas continuam a ser elementos importantes das farmacopeias. Essas substâncias apresentam metabólitos secundários com imensa variedade funcional. No passado, métodos para identificar e caracterizar essas atividades não eram tão eficientes. Hoje, com o avanço da tecnologia do século 21, como genômica, proteômica, metabolômica e a bioinformática, houve uma aceleração da descoberta e análise desses metabólitos, permitindo uma maior utilização dos produtos naturais na indústria (NGO et al., 2013).

No entanto, a complexidade de muitos produtos naturais pode limitar o alcance para fazer modificações químicas para otimizar seu uso terapêutico. Além disso, obter um fornecimento renovável de compostos ativos de fontes biológicas podem ser problemáticas. No entanto, como o recente multigramma de síntese total do potente anticâncer produto natural discordermolide mostra, o aumento da eficiência de química orgânica sintética reduziu a barreira representada por fornecimento natural limitado, mesmo para materiais com estruturas muito complexas (CLARDY; WALSH, 2004).

A reação de biotransformação é um dos métodos utilizados pelos produtos naturais que empregam cepas fúngicas sido descritos na literatura como estratégias para obtenção de derivados com maior atividade biológica, menos toxicidade, com propriedades farmacocinéticas melhoradas ou, ainda, para aumentar a diversidade química através da obtenção de novas estruturas (BORGES et al., 2009), esses que são os chamados metabólitos secundários. Esses processos biocatalíticos, utilizando células íntegras ou enzimas isoladas, têm encontrado diversas aplicações, especialmente nas indústrias química, agroquímica e farmacêutica (PINHEIRO; MARSAIOLI; 2007; HUISMAN, 2002).

A partir disso, o trabalho tem como objetivo realizar estudos sobre o micro-organismo endofítico buscando testar seu potencial biocatalítico, frente ao substrato chalcona.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 ESPÉCIE VEGETAL *Paspalum maritimum*

A espécie vegetal da qual foram isolados os fungos endofíticos neste trabalho é denominada *Paspalum maritimum*, conhecida popularmente como capim-gengibre e que segundo Souza Filho (2006) é uma espécie de planta daninha que tem por principal característica a alta capacidade de invadir áreas de pastagens cultivadas da região amazônica, com tendências para formar estandes puros, dominando, em poucos anos, tanto as espécies de plantas forrageiras como as outras plantas encontradas nas áreas, como é o caso das plantas daninhas.

2.2 CLASSIFICAÇÃO BOTÂNICA DA ESPÉCIE *Paspalum maritimum* TRIN.

Quadro 1. Classificação botânica da espécie *Paspalum maritimum* Trin. (CORRÊA, 2010).

Classificação botânica	
Reino	Plantae
Divisão	Magnoliophyta
Classe	Liliopsida
Ordem	Poales
Família	Poaceae
Subfamília	Panicoideae
Tribo	Paniceae
Gênero	<i>Paspalum</i>
Espécie	<i>Paspalum maritimum</i> Trin.

2.3 FUNGOS ENDOFÍTICOS

Micro-organismos endófitos foram mencionados pela primeira vez no início do século XIX, mas foi Bary (1866) quem primeiro delineou uma possível distinção entre eles e patógenos de plantas (AZEVEDO, 1998). Segundo Petrini et al. (1992), fungos endofíticos são organismos que durante determinado período de suas vidas colonizam seus hospedeiros (plantas) sem causar sintomas visíveis de doenças.

Definidos como assintomáticos, não produzindo, portanto, efeitos benéficos ou prejudiciais aos seus hospedeiros, permaneceram praticamente esquecidos até o final dos anos 70, quando, por uma série de motivos, começaram a chamar atenção. Nessa época verificou-se que, longe de serem meros habitantes do interior de vegetais, possuíam propriedades de interesse, como por exemplo, conferir proteção contra insetos pragas, outros micro-organismos patogênicos e inclusive contra herbívoros. Atualmente, sabe-se que endófitos podem produzir toxinas, antibióticos e outros fármacos (AZEVEDO, 1998).

Atualmente cerca de 1% dos micro-organismos conhecidos são estudados devido à dificuldade de cultivá-los por técnicas comuns de laboratório. No entanto, existem inúmeros compostos terapêuticos eficazes produzidos por micro-organismos capazes de serem cultivados. Adicionalmente, existe uma grande parte desse mundo microbiano, ainda inexplorado, capaz de ser estudado para a descoberta de novos fármacos (NEWMAN; CRAGG, 2013). Na relação simbiótica entre endófito e planta hospedeira está a produção de enzimas extracelulares, como proteases, lipases, entre outras, que podem ser aplicadas em diferentes áreas (ESPOSITO; AZEVEDO, 2010) Estas enzimas apresentam grande importância para indústrias no processamento de alimentos, bebidas, formulação de medicamentos e detergentes, amaciamento de carnes, indústria têxtil e de couro (FOUKIS et al., 2012).

As interações endófito/planta, ainda não são muito bem compreendidas, mas podem ser simbióticas, neutras ou antagônicas (neste caso, estudadas pela fitopatologia). Nas interações simbióticas os micro-organismos produzem ou induzem a produção de metabólitos primários e secundários que podem conferir diversas vantagens à planta tais como: a diminuição de herbivoria e do ataque de insetos, o aumento da tolerância a estresses abióticos e o controle de outros micro-organismos (ARAÚJO, 1996; RODRIGUES; DIAS, 1996; PEREIRA, 1993).

Os metabólitos secundários bioativos isolados de fungos endofíticos têm representado diversas classes químicas, incluindo alcalóides, flavonóides, fenilpropanóides, lignanas, peptídeos, esteróides, xantonas, fenóis, isocumarinas, quinonas, terpenóides, citocalasinas, compostos alifáticos e clorados (TAN; ZOU, 2001; SCHULZ; BOYLE, 2005). Aproximadamente um quarto de todos os produtos naturais biologicamente ativos foram obtidos de fungos (KONGSAEREE et al., 2003).

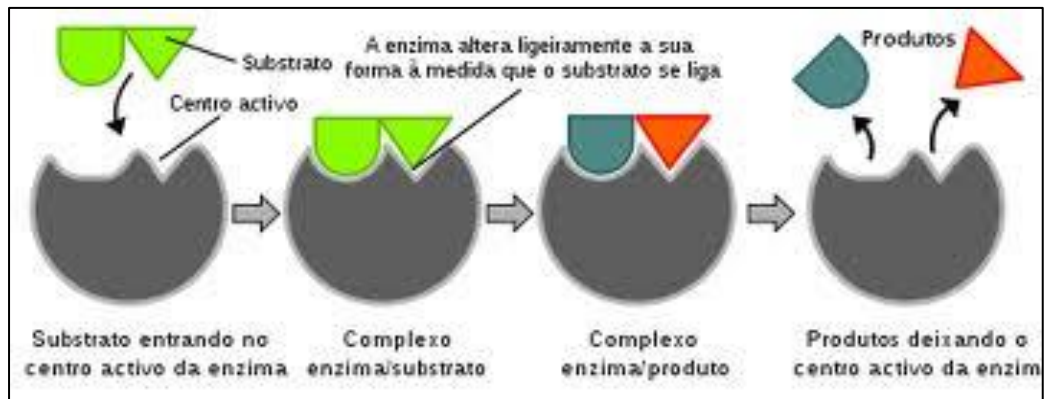
2.4 BIOTRANSFORMAÇÃO

Biotransformações de substâncias orgânicas, ou biocatálise em química orgânica, pode ser entendida como o uso de catálise enzimática para realizar pequeno número de modificações em substâncias orgânicas, geralmente apenas uma reação química está envolvida (OLIVEIRA; OLIVEIRA, 2012). As bioconversões (conversões químicas realizadas por métodos biológicos – uso de organismos vivos ou parte desses) (MEYER; LERESCHE, 2006) apresentam grande potencial na obtenção de novos compostos e na produção mais eficientes de compostos já conhecidos (GIRI et al., 2001)

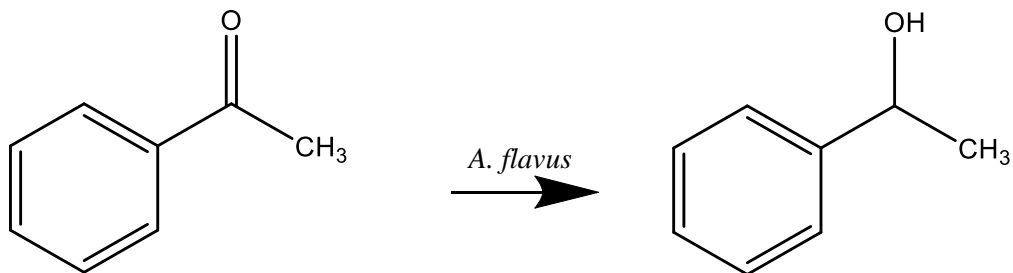
Dentre as diversas áreas biotecnológicas, a aplicação de processos enzimáticos é uma das alternativas mais promissoras para a substituição de metodologia convencionais. Atualmente, enzimas são empregadas industrialmente em diversos processos de produção como, por exemplo, produção de papel, tecidos, detergentes, alimentos, couro, cosméticos, biocombustíveis e produtos de química fina. As enzimas são altamente versáteis, podendo catalisar a transformação de substratos não naturais, de forma régio-, enantio-, e quimiosseletiva (JEGANNATHAN; NIELSEN, 2013). As enzimas atuam como catalisadores acelerando o processo de quebra e formação da ligação que ocorrem entre os substratos presentes na reação. Elas interagem com os reagentes (substratos) formando o complexo enzima-substrato ou complexo enzimático. Na maioria dos casos a associação entre a enzima e o substrato é do tipo não covalente (ligação iônica, ligação de hidrogênio, interações hidrofóbicas, etc.) (NELSON; COX, 2004).

O substrato, que é o composto alvo da enzima, é convertido em um outro composto denominado produto. A enzima e o substrato combinam-se formando um “complexo enzima-substrato”, que se dissocia formando o produto, conforme representado no esquema descrito (FERSHT, 1998) (Figura 1, p. 14).

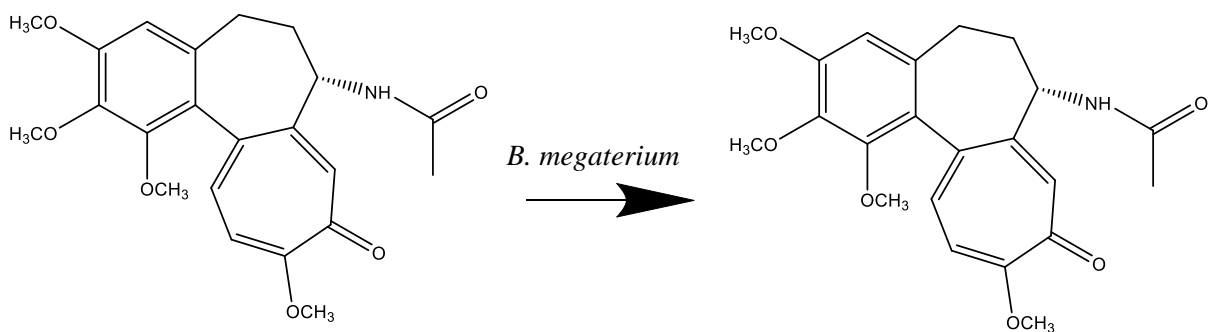
Figura 1. Mecanismo "chave-fechadura" para a Reação de Biotransformação.



Como exemplo de biotransformações realizadas por micro-organismos endofíticos podemos citar a modificação da acetofenona pelo o fungo *Aspergillus flavus*, endófito isolado da espécie vegetal *Paspalum maritimum* (RIBEIRO, 2013), como pode ser visto abaixo.



Assim como a reação realizada pelo *Bacillus megaterium* frente ao substrato colchicina (BOMBARDELLI et al., 2002).



A base teórica da utilização de biocatálise em transformações orgânicas é a grande diversidade e número de enzimas disponíveis na natureza. A análise do mapa metabólico evidencia uma extraordinária variedade de tipos de reações catalisada por enzimas. Estas vão desde reações de hidrólise até as que resultam na formação de ligações C-C (exemplo, condensações aldólicas) (OLIVEIRA; OLIVEIRA, 2012).

A diversidade metabólica dos fungos endófitos indica que esses micro-organismos apresentam rico sistema enzimático e, portanto, são biocatalisadores em potencial. Nesse contexto, é crescente, mas ainda pequeno, o número de publicações que reportam estudos biocatalíticos com fungos endófitos, como por exemplo, biotransformação (BORGES et al., 2007; PEDRINI et al., 2009) e biodegradação (DAI et al., 2010; PHILLIPS et al., 2008) de compostos orgânicos. De maneira geral, o habitat natural do fungo fornece informações importantes sobre o potencial biocatalítico desse organismo, e é um fator que deve ser considerado na busca de novos biocatalisadores (BORGES et al., 2007; PINEDO-RIVILLA et al., 2009).

Um das vantagens em se trabalhar com micro-organismos é a possibilidade de controle sobre os processos operacionais de maneira relativamente simples. Em comparação com as plantas, os fungos apresentam crescimento mais rápido em menor tempo e espaço. Além disso, as condições de cultivo (tempo, pH, nutrientes, temperatura, aeração) podem ser modificadas a fim de aumentar ou de direcionar a produção de metabólitos de interesse (PEARCE, 1997).

2.5 ENSAIO ANTIMICROBIANO

A utilização de antibióticos de maneira desordenada e inadequada pela população trouxe com o tempo a evolução genética de alguns micro-organismos, mais precisamente as bactérias, tornando-as super-resistentes a determinado tipo de antibióticos, atualmente são conhecidas como superbactérias, e se tornaram um dos mais complexos problemas de saúde pública mundial (PINTO, 2017).

Os mais simples organismos, como as bactérias, encontradas no ambiente implicam em graves patologias. As infecções bacterianas podem ser causadas por diversas espécies de bactérias Gram- e Gram+, como por exemplo, o *Staphylococcus aureus* cujas manifestações clínicas podem abranger desde infecções dermatológicas brandas a infecções sistêmicas graves (HARDY et. al., 2004; TRABULSI et. al., 1999). No ambiente hospitalar, *Pseudomonas aeruginosa* é frequentemente responsável por bacteremia e pneumonia associada à ventilação mecânica. Outra bactéria responsável por diferentes tipos de infecções é a *Escherichia coli*, sendo responsável por infecções do trato urinário, meningite e doença diarréica entérica (ÁLVAREZ-LERMA et. al., 2005)

Apesar da resistência aos antimicrobianos ser considerada um fenômeno natural de adaptação dos micro-organismos às drogas, o surgimento de cepas resistentes conduz à ineficácia da terapia medicamentosa. A resistência antimicrobiana é encarada como desafio e, nesse contexto, a exploração dos produtos naturais apresenta-se como alternativa para a descoberta de novos fármacos antimicrobianos e, conseqüentemente, para o combate a esse tipo de resistência (FERREIRA et al., 2016).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Este trabalho teve como objetivo realizar a reação de biotransformação com o fungo RZ2P3, pertencente à espécie vegetal *Paspalum maritimum* Trin, e realizar ensaio biológico com o produto.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Reativar os micro-organismos;
- ✓ Verificar o potencial de biotransformação do fungo RZ2P3;
- ✓ Monitorar o produto de reação através de técnicas cromatográficas;;
- ✓ Identificar o produto de biotransformação do meio reacional, utilizando o método de identificação de RMN de ^1H ;
- ✓ Realizar o ensaio antibacteriano.

4 DESENVOLVIMENTO

4.1 MATERIAL

4.1.1 Equipamentos

- ✓ Autoclave vertical - Modelo Au PHOENIX;
- ✓ Capela de fluxo laminar - Modelo PA 320 PACHANE;
- ✓ Agitador Orbital tipo Shaker - MARCONI.

4.1.2 Solventes

- ✓ Acetato de Etila P.A. (ISO FAR);
- ✓ N-Hexano P. A. (TEDIA);
- ✓ Metanol P. A. (DINÂMICA).

4.1.3 Meios de cultivos utilizados

- ✓ Ágar (HIMEDIA);
- ✓ BHI (KASVI);
- ✓ Glicose-D anidra (NUCLEAR).

4.1.4 Substrato utilizado para a biotransformação

- ✓ (2E)-1,3-difenil-prop-en-1-ona (Chalcona).

4.1.5 Técnicas cromatográficas utilizadas para análises

- ✓ Cromatografia em Camada Delgada (CCD); Cromatoplasas Al de sílica gel 60 HF254 espessura 0,2 mm (MERCK).

4.1.6 Solvente Deuterado utilizado na análise de RMN de ^1H

- ✓ Clorofórmio-d (Cambridge Isotope Laboratories).

4. 1. 7 Material utilizado no ensaio antimicrobiano

- ✓ Placa de Elisa 96 poços (KASVI);
- ✓ TTC (Cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazóico) (NEON);
- ✓ Cloridrato de ciprofloxacino (Medley®);
- ✓ Dimetilsulfóxido (DMSO).

4. 1. 8 Micro-organismos

Quatro cepas bacterianas foram usadas nos ensaios: *Staphylococcus aureus* (ATCC25923), *Escherichia coli* (ATCC 8739), *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212) e *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 70063). As referidas cepas foram obtidas mediante solicitação à Fundação Osvaldo Cruz (Rio de Janeiro - RJ). As cepas liofilizadas foram suspensas em meios de cultura indicado pelo Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS). Utilizando-se a metodologia de suspensão e armazenamento preconizada por aquele instituto. As cepas foram armazenadas no laboratório de genética – Departamento de Biologia Molecular/CCB da – UFPA. Repiques das cepas foram cedidos ao grupo de pesquisa em Química de Produtos Naturais da Faculdade de Química da Unifesspa. As cepas foram cedidas ao grupo de pesquisa pela Prof^a. Dr. Marilene Nunes Oliveira, docente da Unifesspa.

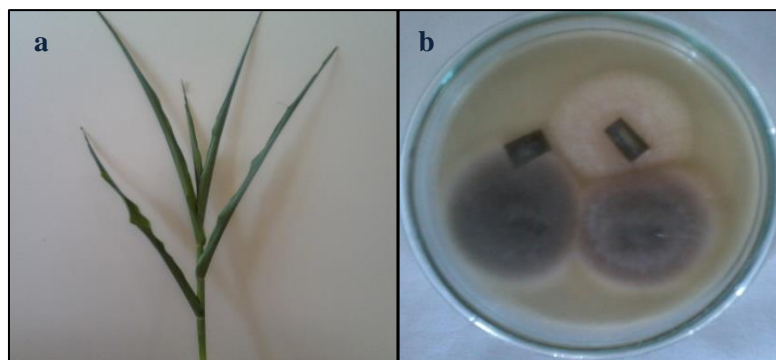
4.2 MÉTODOS

4.2.1 Micro-organismo RZ2P3

O micro-organismo utilizado foi escolhido de uma linhagem entre quatro espécies fúngicas isoladas (Figura 2, p. 20) das folhas e raízes do *Paspalum maritimum*, da qual a linhagem FERZPM2RP3 (Quadro 2, 20) foi selecionada para o desenvolvimento deste trabalho. O fungo foi recodificado sendo identificado como RZ2P3.

Os micro-organismos foram isolados pelo os discentes Prof. Msc. Williams Ribeiro e Fabiane Pinto em seus trabalhos acadêmicos no Laboratório de Química Pesquisa da Universidade Federal do Pará (UFPA).

Figura 2. Espécie vegetal *Paspalum maritimum* (a) e fungos endofíticos isolados das folhas (b).



(Fonte: RIBEIRO, 2014)

Quadro 2. Fungos isolados de *Paspalum maritimum*.

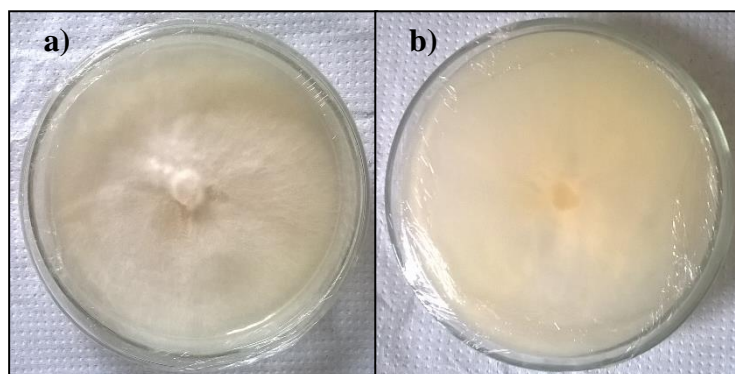
Partes da planta	Isolados
Folhas	FEFLPM2RP1
	FEFLPM2RP2
	FEFLPM2RP3
Raiz	FERZPM2RP3

FEFLPM: Fungo Endofítico das Folhas de *P. maritimum*, FERZPM: Fungo Endofítico da raiz de *P. maritimum*, 2R: Segundo Repique, P: representa as placas.

4. 2. 2 Ativação de desenvolvimento do fungo

Uma cepa do micro-organismo foi retirada e inoculada em placa de Petri com o meio BDA (Batata, Dextrose, Ágar). Para o preparo do meio de cultura foram utilizados 20 g de batata inglesa, no qual foi lavada e cortada para ser fervida em 100 mL de água destilada, onde o caldo da batata foi obtido por filtração e nele adicionado 2 g de glicose e 2 g de ágar, logo após a solução foi homogeneizada em um erlenmeyer, o meio foi esterilizado em autoclave durante 15 minutos a 121° C. Cerca de 2 mL da solução foram distribuídos na placa de Petri e colocada em repouso na temperatura ambiente no fluxo laminar para que o meio ficasse semissólido, sendo em seguida inoculado, em capela de fluxo laminar, um micélio para cada placa em seguida, armazenadas na micoteca do Laboratório de Química de Micro-organismos (LabQuiM) da Universidade Federal do Pará (UFPA), onde permaneceram para o desenvolvimento das hifas. A Figura 3 (p. 21) mostra em placas de Petri com o micro-organismo escolhido após quinze dias de crescimento em BDA.

Figura 3. Fungo endofítico RZ2P3: a) Frente b) Verso.



(Fonte: PINTO, 2017)

4. 2. 3 Meio de cultivo para a reação de biotransformação

Para realizar a reação de biotransformação foi utilizado como meio de cultivo caldo de batata e dextrose (BD), que foi escolhido por ser considerado o melhor meio em que o fungo se desenvolveu. Para o seu preparo foram utilizados 500 mL de água destilada, 100 g de batata inglesa, 10 g de glicose-d anidra e extrato de levedura a 2%, o meio foi homogeneizado e distribuído em 5 frascos de erlenmeyer de 250 mL, contendo cada um 100 mL do meio, em seguida foi esterilizado no autoclave durante 15 minutos a 121° C.

Em 3 dos cinco frascos de erlenmeyer após o resfriamento foram direcionados à capela de fluxo laminar, onde foram adicionados 3 fragmentos do fungo no primeiro dia e logo em seguida levados para agitação em mesa agitadora orbital (Shaker). No terceiro dia foi observado um bom desenvolvimento do micro-organismo, então foram adicionados no meio reacional 40 mg do substrato chalcona que foi solubilizado em 50 μ L de dimetilsulfóxido (DMSO), para em seguida ser levado novamente para a agitação por mais sete dias. Desta forma a distribuição dos erlenmeyers ficou da seguinte maneira: Três frascos ficaram para controle onde: um ficou somente com o meio; um com meio mais substrato; em outro ficou com meio e fungo; por fim dois ficaram com meio, fungo e substrato (meio reacional) (Figura 4, pág. 22). Todos os frascos com o sistema reacional e os de controle foram colocados na mesa agitadora orbital (Figura 5, pág. 22) e permaneceram por um período total de dez dias.

Figura 4. Distribuição do meio de cultura

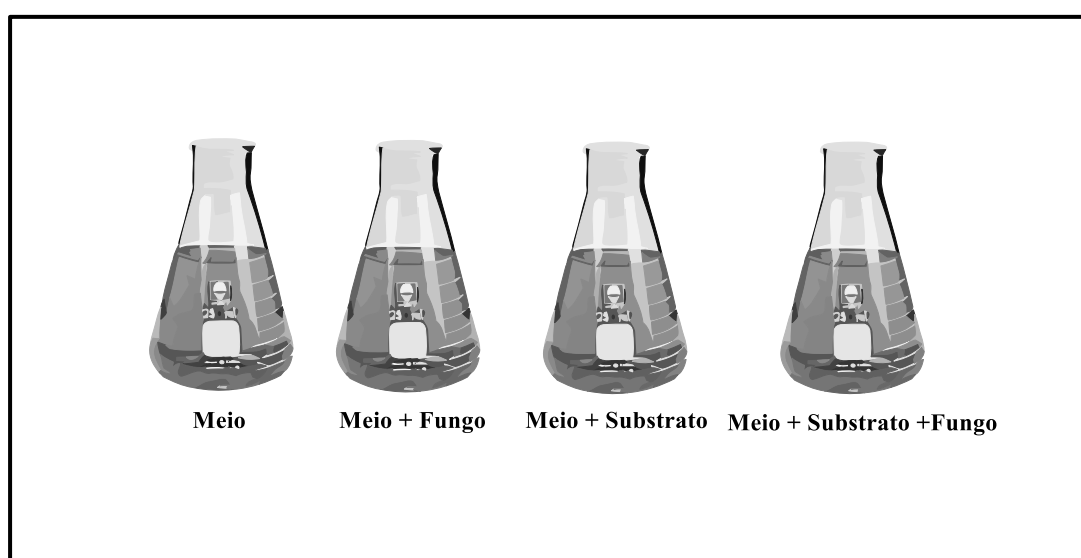


Figura 5. Meio de cultura na mesa agitadora (Shaker).

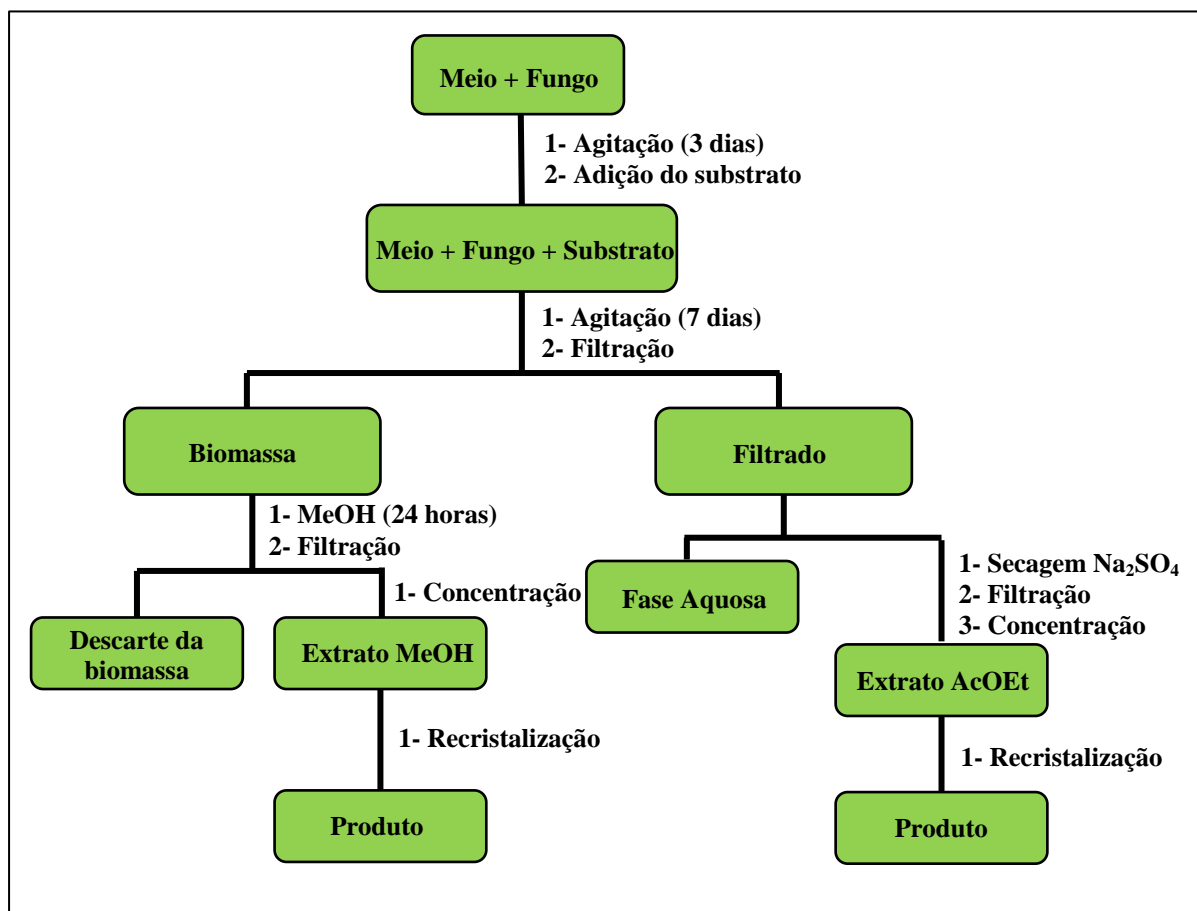


(Fonte: PINTO, 2017)

4. 2. 4 Obtenções dos extratos reacionais da biotransformação

Após período de dez dias os meios foram filtrados a vácuo, os filtrados foram particionados com acetato de etila duas vezes na proporção 1:1, em seguida a fase orgânica foi secada com sulfato de sódio anidro (Na_2SO_4), depois filtrado e concentrado em evaporador rotativo, obtendo-se o extrato acetato de etila. Aos frascos que continham a biomassa fúngica, foram adicionados metanol e permaneceram durante 24 horas, com a finalidade de eliminar os esporos e evitando o risco de contaminação, após esse tempo os sistemas foram filtrados e concentrados obtendo assim o extrato metanólico. Nos frascos que ficaram a biomassa foram deixados em um local separado para que volatizasse o restante de solvente dos extratos e após esse procedimento os frascos passaram pelo processo de descontaminação em autoclave durante 45 minutos a 121°C . No Fluxograma (Figura 6, p. 23) abaixo pode-se observar a obtenção dos extratos reacionais.

Figura 6. Fluxograma do procedimento de biotransformação para o meio reacional.



4.3 ENSAIO ANTIMICROBIANO

A metodologia para realização deste ensaio é baseada na Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2003).

4.3.1 Preparo do meio de cultivo BHI

Para 300 mL de meio são utilizados 11,1 g de meio de cultura BHI.

4.3.2 Preparo do meio de cultivo Ágar BHI

Foram utilizados 13,5 g de ágar bacteriológico em 300 mL de caldo BHI. Após essas dissoluções todos os meios foram esterilizados em autoclave a 121 ° C durante 15 minutos.

4.3.3 Ativação das bactérias

As bactérias testadas nos ensaios foram ativadas em placa de Petri de 9 cm de diâmetro, contendo ágar BHI, por um período de 24 h. Após esse período foram transferidas, com auxílio de uma haste bacteriológica estéril, aproximadamente três colônias de cada bactéria para um tubo de ensaio contendo 3 mL do caldo BHI e incubadas por mais um período de 24 h. Suas concentrações foram padronizadas para se obter uma cultura com aproximadamente $1,0 \times 10^8$ Unidade Formadora de Colônia (UFC). Após atingir essa concentração realizou-se diluições até alcançar a concentração de $1,0 \times 10^4$ UFC.

4.3.4 Padronização das culturas

Primeiramente preparou-se uma solução de sulfato de bário numa concentração referente a $1,0 \times 10^8$ UFC/mL. Para se obter essa concentração foi necessário fazer uma mistura das soluções de H_2SO_4 1% (9,95 mL) e BaCl_2 1% (0,05 mL). Feito isso comparou-se o grau de turvação do tubo de ensaio contendo a bactéria com o padrão sulfato de bário. Com essa padronização o tubo contendo a bactéria apresentara uma concentração aproximadamente de $1,0 \times 10^8$ UFC.

4. 3. 5 Preparo das amostras

Para os extratos e as substâncias foi utilizado de massa 1 mg a serem testadas, dissolveu-se em 100 μL de DMSO, contidos em um tubo de Eppendorf e agitou-se (Vortex) para homogeneizar a solução. Em seguida foram adicionados 900 μL de caldo BHI esterilizado e agitou-se novamente a solução.

4. 3. 6 Preparo do antibiótico controle

Pesou-se 1 mg do antibiótico Cloridrato de ciprofloxacino e dissolveu-se em 1 mL de água destilada estéril. Desta solução pipetou-se 5 μL e dilui-se em 995 μL de caldo BHI, contido em um tubo de Eppendorf. Obteve-se assim uma concentração de 5 $\mu\text{L}/\text{mL}$.

4. 3. 7 Ensaio para medir a CIM (Concentração Inibitória Mínima)

Nas placas de Elisa de 96 furos foram adicionados 100 μL de caldo BHI em cada cavidade. Em seguida acrescentou-se na primeira cavidade de cada coluna 100 μL da solução contendo a amostra a ser testada e homogeneizou-se essa solução. Após isso foram realizadas sucessivas diluições, retirando-se 100 μL da primeira cavidade (cavidade A) transferindo esse volume para a próxima (cavidade B), homogeneizando, esse procedimento é repetido até a penúltima cavidade da placa de Elisa, de onde são retirados 100 μL e descartados. A última linha da placa é usada como um controle do meio usado não acrescentando nessa a amostra a ser testada. Por fim em cada cavidade adicionou-se 5 μL da suspensão bacteriana e incubou-se as placas a 37 ° C por 24 h. A leitura dos resultados foi feita com TTC (cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólico).

4. 3. 8 Tipo de atividade

Nas cavidades onde não apresentou coloração vermelha, as amostras foram novamente inoculadas em placa de Petri contendo meio de cultura ágar BHI e incubadas a 37 °C por 24 h. Onde houve impedimento do crescimento da bactéria, indica que a amostra possui efeito bacteriostático a essa concentração e onde a bactéria não apresentou crescimento, indica que a amostra possui efeito bactericida.

5 RESULTADOS

5.1 BIOTRANSFORMAÇÃO UTILIZANDO O FUNGO RZ2P3 COM SUBSTRATO (2E)-1,3-DIFENIL-PROP-EN-1-ONA.

Após a realização do experimento da reação de biotransformação foi possível confirmar a modificação na estrutura do substrato e obter como produto a substância 1,3-difenil-propan-1-ona.

5.1.1 Espectro de RMN ^1H da (2E)-1,3-difenil-prop-en-1-ona

O substrato (2E)-1,3-difenil-prop-en-1-ona (Figura 7, pág. 27) foi analisado por meio do espectro de RMN ^1H (Figura 8, p. 28) a fim de verificar a pureza do substrato e caracterizá-lo.

Figura 7. Estrutura do Substrato

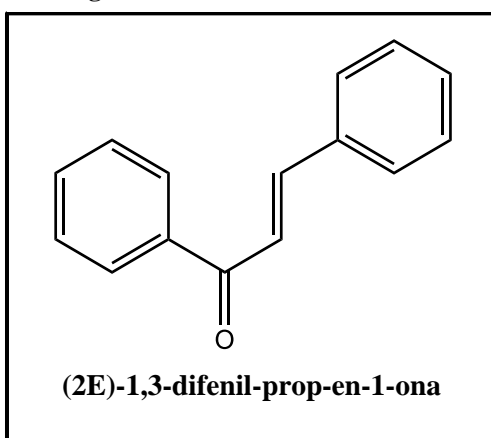
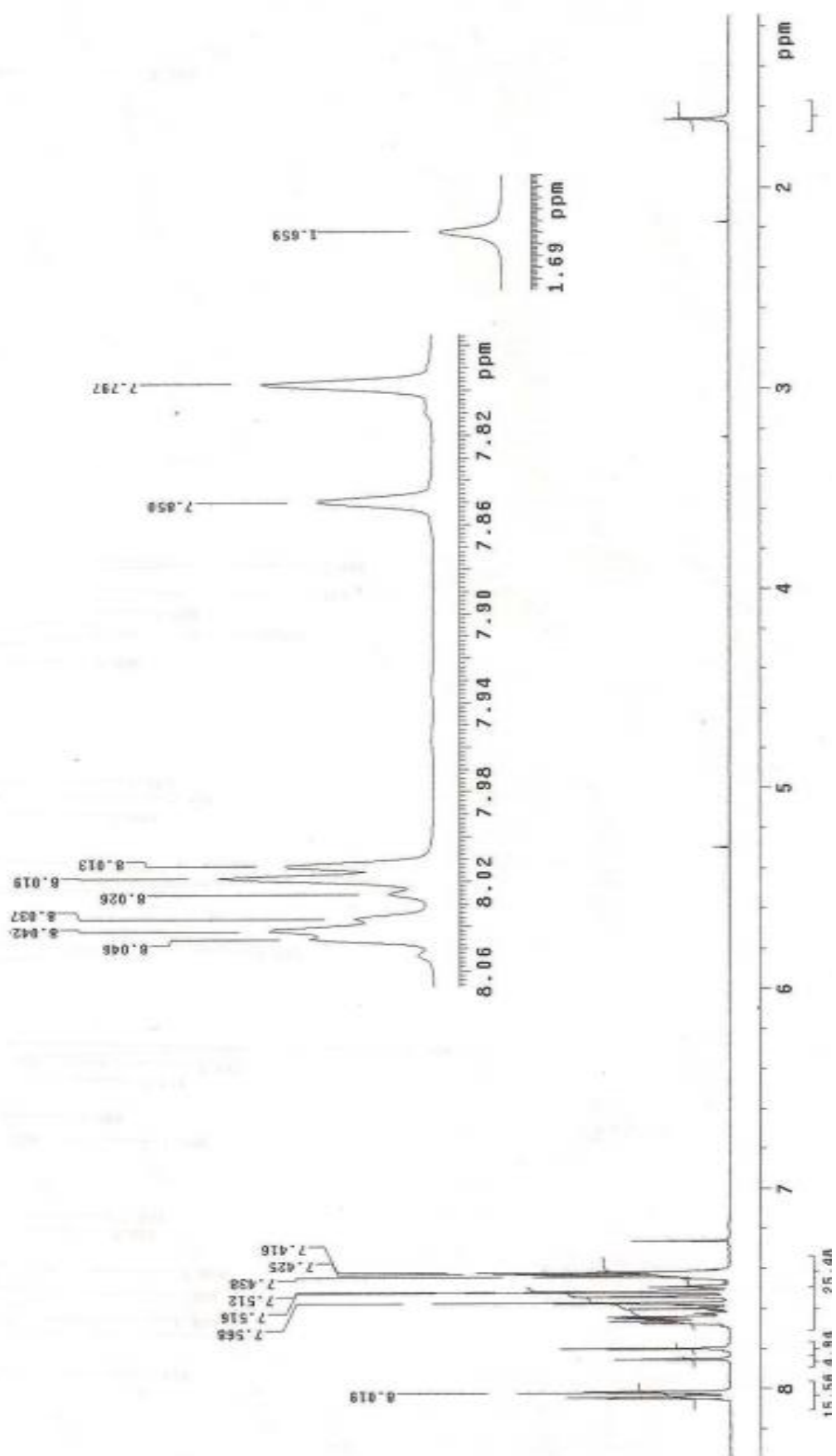


Figura 8. Espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) do substrato.

5.1.2 Biotransformação da (2E)-1,3-difenil-prop-en-1-ona

Na análise entre os espectros de RMN ^1H do meio reacional (Figura 10, p. 30), pode-se observar a presença de dois sinais tripletos, um na região de δ_{H} 3,35 (*t*, 2H- α) e outro em δ_{H} 3,10 (*t*, 2H- β) referentes aos hidrogênios metilênicos α - β -carbonilado. Esses sinais confirmam a biotransformação do substrato para o produto 1,3-difenil-propan-1-ona (**S1**), onde o esquema pode ser visto abaixo (Figura 9, p. 29).

Figura 9. Esquema de reação de biotransformação da (2E)-1,3-difenil-prop-en-1-ona

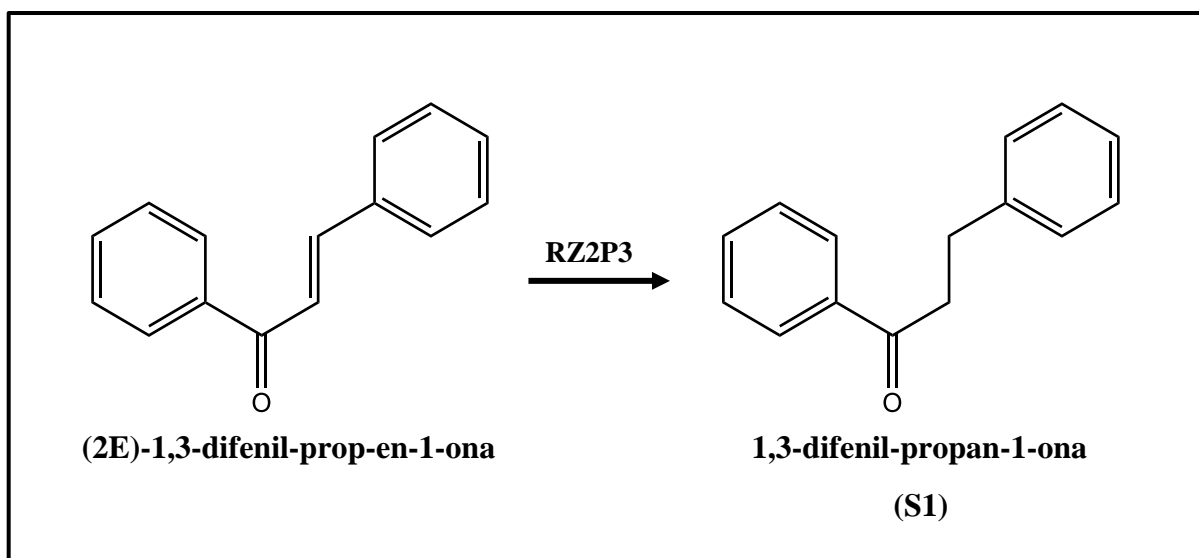
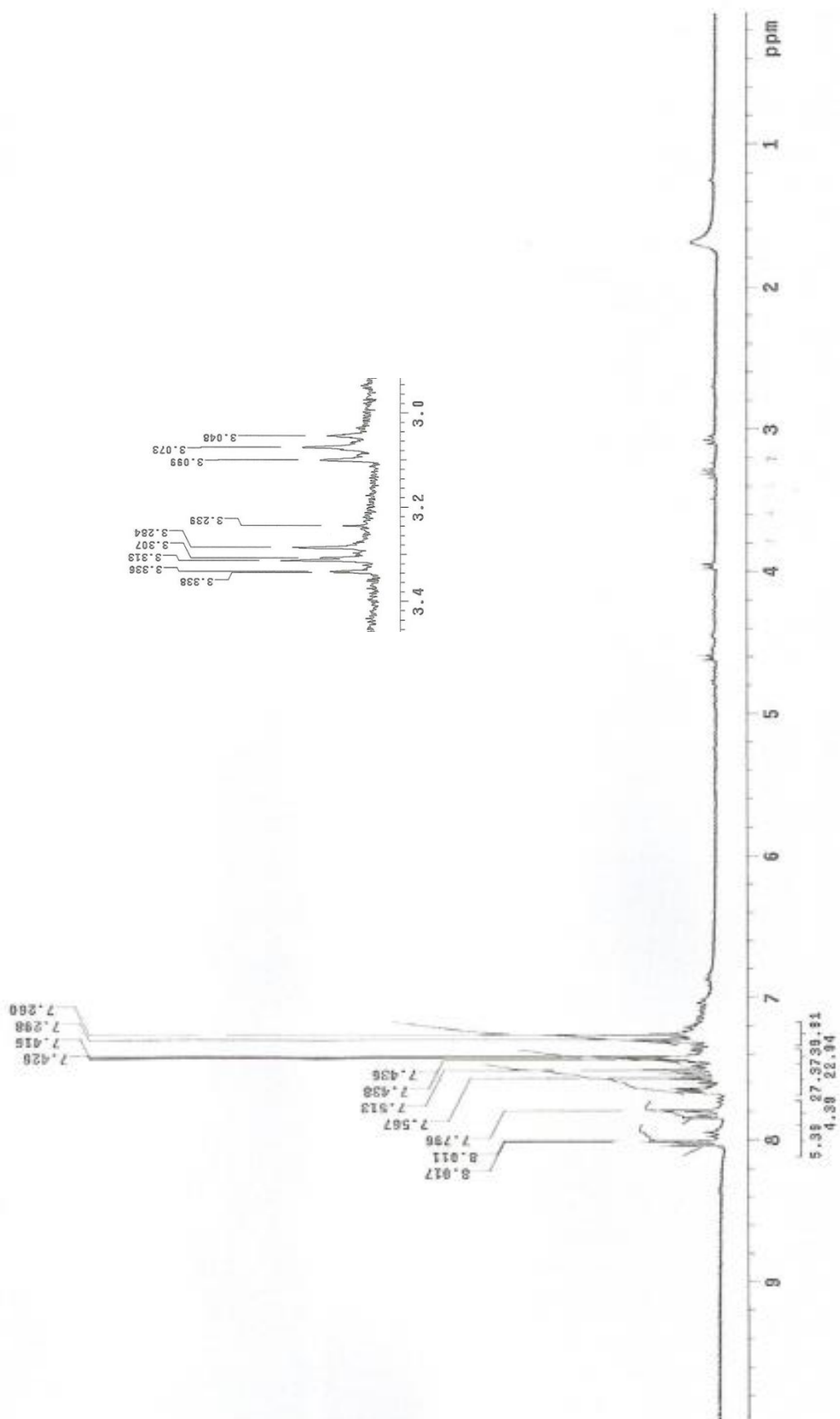


Figura 10. Espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) de S1.

5.2 RESULTADO DO ENSAIO ANTIMICROBIANO

O produto da biotransformação obtido foi testado frente às bactérias *Escherichia coli* (ATCC 8739), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212) e *Klebsiela pneumoniae* (ATCC 70063).

5. 2. 1 Análise do resultado do produto da biotransformação

Em relação ao produto da biotransformação a substância **S1** mostrou capacidade de inibição frente apenas à bactéria *Enterococcus faecalis*, as concentrações 500 a 7,8125 µg/mL (Tabela 1, p. 31) apresentando a atividade bacteriostática.

Tabela 1. Resultado ensaio antimicrobiano frente a bactéria *E. faecalis*.

RZ2P3	
[µg/mL]	S1
500	=
250	=
125	=
62,5	=
31,25	=
15,625	=
7,8125	=
Branco	+

(+) Sem atividade; (=) Bacteriostático.

6 CONCLUSÃO

O desenvolvimento e aperfeiçoamento dos métodos para obtenção de novas moléculas bioativas vêm se expandindo, através da constatação de resultados bastante satisfatórios através da utilização dessa metodologia, gerando assim uma nova alternativa mais rápida, eficaz e promissora. O fungo endofítico RZ2P3 isolado do *Paspalum maritimum* demonstrou através dessa técnica de reação biotransformação a capacidade de biorredução da dupla ligação α,β -carbonilada do substrato (2E)-1,3-difenil-prop-en-1-ona gerando como produto o 1,3-difenil-propan-1-ona, assim evidenciando o potencial biocatalítico de biotransformação desses endofíticos. 1,3-difenil-propan-1-ona. O potencial destes endofíticos em reações de biotransformação, assim como a necessidade de metodologias ecologicamente corretas e a aplicação industrial deste processo, espera-se que mais pesquisas sejam desenvolvidas nesta área do conhecimento científico com o intuito de divulgar o potencial biocatalítico de células íntegras de fungos.

REFERÊNCIAS

ÁLVAREZ-LERMA, F., PALOMAR, M., OLAECHEA, P., INSAUSTI, J., BERMEJO, B., CERDÁ-CERDÁ, E. **Med Intensiva**, 29, p.1-12, 2005.

ARAÚJO, W. L. **Isolamento, identificação e caracterização genética de bactérias endofíticas de porta enxertos de citros**. 111f. Dissertação (Mestrado em Química), ESALQ. Piracicaba, São Paulo, 1996.

AZEVEDO, J. L. Microrganismos endofíticos. EMBRAPA-CNPMA. **Ecologia microbiana**. cap. 4, p. 117-137, 1998.

AZEVEDO, J. L.; ESPOSITO, E. (Ed.). **Biodiversidade microbiana e potencial biotecnológico**. Caxias do Sul: Ed. UCS, p. 533, 2010.

BARY, A. Morphologie und physiologie der Pilze, Flechten und Myxomyceten. **Leipzig: Engelamn**, p. 316, 1866.

BOMBARDELLI, E.; PONZONE, C.; BOMBARDELI, E. New biotransformation of colchiconederivatives to anti-tumor 3-O-glycosylcolchicone compounds. US6372458-B1, 2002.

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

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

CLARDY, J.; WALSH, C. Lessons from natural molecules. **Nature**, v. 432, p.829-837, 2004.

CLSI – Clinical and Laboratory Standards Institute. Methods for Dilution and Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that Grow Aerobically, CLSI Approved Standard M7-A4: Wayne-PA, v. 23, n. 2, 2003.

CORRÊA, M. J. C. **Paspalum maritimum Trin.: Estudo químico, isolamento de endofíticos, biotransformações, sínteses e atividade alelopática.** 194f. Tese (Doutorado em Química). Instituto de Ciências Exatas e Naturais, Universidade Federal do Pará, Belém, 2010.

ESPOSITO, E.; AZEVEDO, J. L. Fungos uma introdução a biologia, bioquímica e biotecnologia, 2ª Ed., EDUCS: Caxias do Sul, 2010.

FERREIRA, H. K. L.; MACHADO, S. E. F.; SANTANA, R. C. F.; ALBUQUERQUE, L. E. F.; SILVA, I. E. G.; SILVA-LACERDA, G. R.; ARAÚJO, J. M.; LIMA, G. M. S. Avaliação *in vitro* do potencial antimicrobiano de *Streptomyces* sp G-27 contra microrganismos de interesse clínico. **Rev. Bras. Gest. Amb. Sustent.** v. 3, n. 6, p. 367-373, 2016.

FERSTH, A. Structure and mechanism in protein Science: a guide to enzyme catalysis and protein folding. W. H. Freeman and Company, p. 381, 1998.

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

HARDY, K.J., HAWKEY, P.M., GAO, F., OPPENHEIM, B.A. **British Journal of Anaesthesia**, v.92, No.1, p.121-30, 2004.

HUISMAN, G. W; GRAY, D. 2002. **Current Opinion in Biotechnology**, 13:352.

JEGANNATHAN, K. R.; NIELSEN, P. H.; *J. Cleaner Prod.* **2013**, 42, 228

KONGSAEREE, P.; PRABPAI, S.; SRIUBOLMAS, N.; VONGVEIN, C. & WIYAKRUTTA, S. *Antimalarial dihydroisocoumarins* produced by *Geotrichum sp.*, an endophytic fungus of *Crassocephalum crepidioides*. **Journal Natural Products** 66(5): 709, 2003.

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

NELSON, D. L.; COX, M. M. *Lehninger principles of biochemistry*. New York: W. H. Freeman, p. 520-521, 2004.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products a continuing source of novel drug leads. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1830, n. 6, p. 3670-3695, 2013.

NGO, L. T.; OKOGUN, J. I.; FOLK, W. R. 21st Century natural products research and drug development and traditional medicines. **Nat. Prod. Rep.**, v. 30, p. 584-592, 2013.

OLIVEIRA, K. B.; OLIVEIRA, B. H. Obtenção de substâncias bioativas através da biotransformação de produtos naturais. **Revista eletrônica de farmácia**, v. 9, p. 3, 2012.

PEARCE, C. 1997. Biologically active fungal metabolites. **Advances in Applied Microbiology**, v.44: p.1-68.

PEREIRA, J. O.; AZEVEDO, J. L.; PETRINI, O. 1993. Endophytic fungi of *Stylosanthes*: a first report: **Mycologia**, v. 85, p. 362-364, 1993.

PETRINI, O.; SIEBER, T. N.; TOTI, L.; VIRET, O. "Ecology, metabolite production, and substrate utilization in endophytic fungi". **Natural Toxins**, v.1, p.185-196, 1992.

PINEDO-RIVILLA, C.; CAFÊU, M. C.; CASATEJADA, J. A.; ARAUJO, R. A.; COLLADO, I. G. Asymmetric microbial reduction of ketones: absolute configuration of trans-4-ethyl-1-(1*S*-hydroxyethyl)cyclohexanol. **Tetrahedron: Asymmetry**, v. 20, p. 2666-2672, 2009.

PINHEIRO, L.; MARSAIOLI, A. J. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, 44, 78, 2007.

PINTO, F.T. **Metabólitos secundários, reações de biotransformação com o fungo endofítico RZ2P3 isolado da raiz da espécie vegetal *Paspalum maritimum* Trin e ensaio biológico**. 98f. Dissertação (Mestrado em Química), Universidade Federal do Pará, Belém, 2017.

RIBEIRO, W. S. **Metabólitos Secundários e Reações de Biotransformações do Fungo Endofítico *Aspergillus flavus* Isolado de *Paspalum maritimum* Trin. (Poaceae)**. 122f. (Dissertação de Mestrado) Universidade Federal do Pará, Instituto de Ciências Exatas e Naturais, Belém, 2013.

RODRIGUES, K. F.; DIAS-FILHO, M. B. 1996. Fungal endophytes in the tropical grasses *Brachiaria brizantha* cv. Marandu and *B. humidicola*. **Pesq. Agropec. Bras**, 31(12), p.905-909, 1996.

SCHULZ, B.; BOYLE, C. The Endophytic Continuum. **Mycological Research**, v. 109, n.6, p. 661-686, 2005.

SOUZA FILHO, A. P. S. Interferência potencialmente alelopática do capim-gengibre (*Paspalum maritimum*) em áreas de pastagens cultivadas. **Planta Daninha**, v. 24, n.3, p. 451-456, 2006.

TAN, R. X.; ZOU, W. X. 2001. Endophytes: a rich source of functional metabolites. **Natural Products Reports**, v.18, p. 448-459, 2001.

TRABULSI, L R *et al.* **Microbiologia**. 3.ed. São Paulo: Atheneu, 1999