

**UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ**

**FERNANDA ZANTEDESCHI RODRIGUES**

**BIOTRANSFORMAÇÃO DO SESQUITERPENO  $\beta$ -CARIOFILENO POR FUNGOS  
ISOLADOS DO SOLO**

**TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO**

**SANTA HELENA  
2021**

**FERNANDA ZANTEDESCHI RODRIGUES**

**BIOTRANSFORMAÇÃO DO SESQUITERPENO  $\beta$ -CARIOFILENO POR FUNGOS  
ISOLADOS DO SOLO**

**Biotransformation of  $\beta$ -caryophyllene sesquiterpene by isolated fungi from soil**

Trabalho de Conclusão de Curso de Graduação,  
apresentado ao Curso Superior de Licenciatura  
em Ciências Biológicas, da Universidade  
Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR, como  
requisito parcial para obtenção do título de  
Biólogo.

Orientadora: Profa. Dra. Erika Izumi

**SANTA HELENA  
2021**



[4.0 Internacional](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

Esta licença permite compartilhamento, remixe, adaptação e criação a partir do trabalho, mesmo para fins comerciais, desde que sejam atribuídos créditos ao(s) autor(es). Conteúdos elaborados por terceiros, citados e referenciados nesta obra não são cobertos pela licença.

**FERNANDA ZANTEDESCHI RODRIGUES**

**BIOTRANSFORMAÇÃO DO SESQUITERPENO  $\beta$ -CARIOFILENO POR FUNGOS  
ISOLADOS DO SOLO**

Trabalho de Conclusão de Curso de Graduação  
apresentado como requisito para obtenção do título  
de Licenciado em Ciências Biológicas da  
Universidade Tecnológica Federal do Paraná  
(UTFPR).

Data de aprovação: 01/dezembro/2021

---

Erika Izumi  
Titulação (Doutorado)  
Universidade Tecnológica Federal do Paraná

---

Jociani Ascari  
Titulação (Doutorado)  
Universidade Tecnológica Federal do Paraná

---

Rejane Barbosa de Oliveira  
Titulação (Doutorado)  
Universidade Tecnológica Federal do Paraná

**SANTA HELENA**

**2021**

Dedico aos meus pais, por todo apoio, carinho e pelos exemplos que são na minha vida, sempre me inspirando a evoluir.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a minha família, minha mãe Gláucia, meu pai Jádriel, minha avó Esmeralda e meu irmão Danilo, que estiveram comigo durante todos os momentos bons e ruins, e sempre me apoiaram, me incentivaram e se dedicaram para que eu fosse capaz de seguir meu próprio caminho. Sem eles eu não estaria onde estou.

A minha tia Roseli (in memoriam) e avó Isaura (in memoriam), que não estão mais aqui, mas sempre foram exemplos de mulheres fortes na minha vida, que acreditaram no meu potencial e me incentivaram a estudar.

Ao Danilo Cavazim por todo apoio, incentivo e companheirismo, que durante todos os anos de estudo foi minha segunda família.

Aos meus amigos e colegas de curso Beatriz, Laís, e Leonardo pelos trabalhos conjuntos, pelo companheirismo e todo o apoio durante os anos de estudo;

Agradeço a Universidade Tecnológica Federal do Paraná, aonde tive a oportunidade de cursar um ensino gratuito de qualidade, o qual me inseriu no universo acadêmico e proporcionou diversos aprendizados profissionais e pessoais.

A minha orientadora Profa. Dra. Erika Izumi, pela oportunidade de participar do projeto de iniciação científica em microbiologia, o que levou ao início desse trabalho, e por toda a orientação durante os anos em que trabalhamos juntas.

A Profa. Dra. Jociani Ascari que com seu conhecimento em biotransformação me ajudou e orientou durante os experimentos, principalmente na área química.

Ao Prof. Dr. Domingos Savio Nunes, que cedeu gentilmente o óleo essencial  $\beta$ -cariofileno que foi utilizado nos experimentos deste trabalho.

A todos os colegas e técnicos do Laboratório de Microbiologia (UTFPR-SH) e do Laboratório de Química (UTFPR-SH) que me ensinaram e auxiliaram.

E a todos os professores e colegas que conheci durante o curso, os quais contribuíram para a minha formação pessoal e profissional.

“Graças a um feliz encontro de momentos difíceis, aqui estamos nós.”

(SAINT-EXUPÉRY, 1943).

## RESUMO

RODRIGUES, Fernanda Zantedeschi. **Biotransformação do sesquiterpeno  $\beta$ -cariofileno por fungos isolados do solo**. 2021. 24 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Curso Superior de Licenciatura em Ciências Biológicas), Coordenação do Curso de Licenciatura em Ciências Biológicas, Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Santa Helena, 2021.

A biotransformação microbiana de fármacos e compostos naturais ativos pode ser aplicada para modificar moléculas químicas de interesse, possibilitando a geração de novos compostos, aumentando seu potencial farmacológico e reduzindo sua toxicidade. Diversos estudos têm mostrado o potencial da biotransformação, muitas vezes gerando compostos derivados mais ativos do que a molécula original. Por serem alterações químicas causadas por enzimas, o processo de biotransformação é realizado em meio aquoso, sendo considerado menos poluente do que a síntese convencional. O composto natural  $\beta$ -cariofileno, encontrado em plantas, é conhecido por ter diversas atividades biológicas, incluindo atividade antimicrobiana. Este trabalho teve como objetivo selecionar fungos de solo capazes de biotransformar o composto natural  $\beta$ -cariofileno. Amostras de solo e serrapilheira foram coletadas, diluídas e plaqueadas em dois tipos de meios, um meio complexo contendo rosa bengala e o meio Czapek modificado contendo o composto. As placas foram incubadas a 27°C por 7 dias, e as colônias filamentosas foram reisoladas. A biotransformação foi realizada em placas de petri contendo meio ágar Czapek modificado, com 300  $\mu\text{g/mL}$  de  $\beta$ -cariofileno. Os fungos isolados foram semeados na superfície da placa e estas foram incubadas por 14 dias a 27°C. Foram feitos controles visando avaliar a presença de metabólitos próprios do fungo e possíveis modificações da molécula alvo por ação do meio de cultivo e características da incubação, portanto placas contendo somente o meio de cultivo puro, somente o meio e a droga, e somente o meio e o fungo, foram feitos para comparação. Ao término da incubação, o ágar foi seccionado em fragmentos menores, colocados em um erlenmeyer com 20 mL de acetato de etila para extração dos compostos presentes. Quatro isolados de fungos filamentosos foram obtidos e um deles, obtido do meio Czapek, se mostrou promissor para biotransformação do composto teste  $\beta$ -cariofileno, sendo possível visualizar a presença de pelo menos duas moléculas diferentes, conforme observações de cromatografia em camada delgada. Outros estudos serão realizados no intuito de identificar a espécie do isolado e os compostos químicos derivados observados.

**Palavras chave:** Biotransformação.  $\beta$ -cariofileno. Fungos.

## ABSTRACT

RODRIGUES, Fernanda Zantedeschi. **Biotransformation of  $\beta$ -caryophyllene sesquiterpene by isolated fungi from soil**. 2021. 24 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Curso Superior de Licenciatura em Ciências Biológicas), Coordenação do Curso de Licenciatura em Ciências Biológicas, Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Santa Helena, 2021.

Microbial biotransformation of drugs and active natural compounds can be applied to modify chemical molecules of interest, enabling the generation of new compounds, increasing their pharmacological potential and reducing their toxicity. Several studies have shown the potential of biotransformation, often generating more active derivative compounds than the original molecule. As they are chemical alterations caused by enzymes, the biotransformation process is carried out in an aqueous medium, being considered less polluting than the conventional synthesis. The natural compound  $\beta$ -caryophyllene, found in plants, is known to have several biological activities, including antimicrobial activity. This work aimed to select soil fungi capable of biotransforming the natural compound  $\beta$ -caryophyllene. Soil and litter samples were collected, diluted and plated in two types of media, a complex medium containing rose bengal and a modified Czapek medium containing the compound. The plates were incubated at 27°C for 7 days, and the filamentous colonies were re-isolated. Biotransformation was performed in petri dishes containing modified Czapek agar medium, with 300  $\mu\text{g/mL}$  of  $\beta$ -caryophyllene. The isolated fungi were seeded on the surface of the plate and these were incubated for 14 days at 27°C. Controls were carried out to evaluate the presence of metabolites of the fungus and possible modifications of the target molecule by the action of the culture medium and incubation characteristics, therefore, plates containing only the pure culture medium, only the medium and the drug, and only the medium and the fungus, were made for comparison. At the end of incubation, the agar was sectioned into smaller fragments, placed in an Erlenmeyer flask with 20 mL of ethyl acetate to extract the compounds present. Four isolates of filamentous fungi were obtained and one of them, obtained from the Czapek medium, showed promise for biotransformation of the  $\beta$ -caryophyllene test compound, being possible to visualize the presence of at least two different molecules, according to thin layer chromatography observations. Other studies will be carried out in order to identify the species of isolate and the chemical compounds observed.

**Keywords:** Biotransformation.  $\beta$ -caryophyllene. Fungi.



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1– Molécula do $\beta$ -cariofileno. ....	7
Figura 2- Biotransformação da isoforona pelo <i>Alternaria alternata</i> e <i>Neurospora crassa</i> . ....	9
Figura 3 - Estruturas químicas do diterpeno pimaradieno (1) e dos compostos obtidos pela biotransformação do fungo <i>Aspergillus ochraceus</i> . ....	10
Figura 4- Estruturas químicas da lactona sesquiterpênica piretrosina e os compostos derivados da biotransformação pelo fungo <i>Rhizopus nigricans</i> . ....	11
Figura 5 - Síntese da cortisona (3) causada pela hidroxilação da progesterona (1) pelo <i>R. arrhizus</i> , formando a 11- $\alpha$ -hidroxiprogesterona (2). ....	12
Figura 6 - Fármacos são produzidos com o auxílio de biotransformações. ....	12
Figura 7 - Síntese das penicilinas semi-sintéticas. ....	13
Figura 8 - Isolado fúngico CC1 em placas contendo o $\beta$ -cariofileno e seu controle fúngico. ....	18
Figura 9 – Extração dos compostos presentes. ....	19
Figura 10 – Metabólitos extraídos utilizados na CCD. ....	20
Figura 11– Foto da placa cromatográfica indicando biotransformação pelas flechas. Controle fungo CC1 (14) e CE2 (20) no meio Czapek-Dox. Experimento fungos CC1 (15) e CE2 (21) com o $\beta$ -cariofileno no meio Czapek-Dox. Controle $\beta$ -cariofileno (C) no meio Czapek-Dox. ....	20

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E ACRÔNIMOS

$\beta$	-	Beta, segunda letra do alfabeto grego
CCD	-	Cromatografia em camada delgada
g	-	Grama
L	-	Litro
mL	-	Mililitros

# SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO GERAL</b>	<b>4</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b>	<b>5</b>
2.1	Objetivo geral	5
2.2	Objetivos específicos	5
<b>3</b>	<b>REFERENCAL TEÓRICO</b>	<b>5</b>
3.1	Compostos naturais ativos e o $\beta$ -cariofileno	5
3.2	Fungos	7
3.3	Biotransformação	8
<b>4</b>	<b>METODOLOGIA</b>	<b>14</b>
4.1	Meios de cultivo	14
4.2	Composto utilizado	14
4.3	Isolamento dos fungos	14
4.4	Biotransformação	15
4.5	Extração e isolamento dos compostos biotransformados	15
4.6	Cromatografia em Camada Delgada (CCD)	16
<b>5</b>	<b>RESULTADOS</b>	<b>16</b>
5.1	Amostras fúngicas selecionadas e utilizadas	17
5.2	Placas preparadas	17
5.3	Biotransformação	18
5.4	Extração do metabólitos	18
5.5	Cromatografia em camada delgada	19
<b>6</b>	<b>DISCUSSÃO</b>	<b>21</b>
<b>7</b>	<b>CONCLUSÕES</b>	<b>22</b>
<b>8</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b>	<b>23</b>
<b>9</b>	<b>REFERÊNCIAS</b>	<b>23</b>

## 1 INTRODUÇÃO GERAL

Com o crescimento das áreas biotecnológicas, a utilização de células e seus derivados, como as enzimas, tem ganhado atenção visando resolver diversos problemas industriais, como melhoria na obtenção de matéria prima de origem vegetal e animal, bem como transformações químicas de moléculas de interesse (SMITHA; SINGH; SINGH, 2017).

O processo de síntese química de moléculas é responsável pela produção de diversos compostos ativos, como fármacos, herbicidas, pigmentos, etc., e embora seja essencial, têm como consequência a geração de resíduos tóxicos provenientes dos solventes orgânicos (FLORINDO, 2019).

Diante do novo cenário mundial de preservação e redução de poluentes, é importante o desenvolvimento de novas técnicas que busquem produzir ou transformar moléculas de interesse por processos menos poluidores, como as biotransformações, seja utilizando células vivas ou suas enzimas.

Segundo Vieira (2006), a síntese enzimática em processos de biotransformações evidencia uma opção acessível, denominada “química ecologicamente correta” (green chemistry). Essa opção tem como objetivo realizar processos químicos que permitem reduzir ou não produzir substâncias adversas, as quais podem ser causadas desde a fabricação até o descarte do produto químico utilizado (UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY, 2021).

A biotransformação de compostos naturais ativos visa utilizar a capacidade enzimática de microrganismos para modificar moléculas químicas de interesse, possibilitando a geração de novos compostos derivados da biotransformação, tanto aumentando seu potencial farmacológico quanto reduzindo sua toxicidade, como por exemplo a síntese das penicilinas semi-sintéticas, antibióticos de grande eficácia mundialmente consumidos em abundância (FRAGA; HOFFMAN, 1993; LOWE; ELANDER, 1983; LIESE; SEELBACH; WANDREY, 2001).

A utilização de microrganismos da natureza favorece a síntese orgânica, pois esses seres possuem uma variedade de processos metabólicos, e encontra-se em número ilimitado na natureza (VIEIRA, 2006).

Os sesquiterpenos existem em diversos óleos essenciais, exemplificando, estão presentes no óleo do lúpulo, da espécie *Humulus lupulus* (Cannabaceae), o

cedreno, presente no óleo da madeira do cedro (Pinaceae), e muitos outros (HANSON, 2003). A *Artemisia marítima* (Asteraceae) fornece o sesquiterpeno santonino, o qual vem sendo utilizado para a eliminação de vermes do intestino (DEWICK, 2002; HANSON, 2003).

Por meio do processo de biotransformação do composto natural  $\beta$ -cariofileno, presente em diversos óleos naturais, por fungos de solo, os quais são de fácil acesso e diversidade no campus de Santa Helena, será possível analisar a atuação desses microrganismos diante das transformações com o composto químico, o que poderá proporcionar novas substâncias ou compostos ativos para a produção de fármacos que sejam relevantes para a indústria farmacêutica.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo geral**

Este estudo visa biotransformar compostos naturais ativos por meio da capacidade enzimática de isolados fúngicos, utilizando o  $\beta$ -cariofileno como droga alvo para triagem.

### **2.2 Objetivos específicos**

- Obtenção de isolados fúngicos de diferentes amostras de solo;
- Avaliar a capacidade de biotransformação do composto  $\beta$ -cariofileno;

## **3 REFERENCIAL TEÓRICO**

### **3.1 Compostos naturais ativos e o $\beta$ -cariofileno**

Produtos naturais provenientes de plantas, animais e microrganismos, têm sido usados pela humanidade desde tempos remotos. Na forma bruta, esses produtos naturais apresentam diversos compostos químicos ativos, derivados do metabolismo secundário, o qual é produzido por esses organismos para proteger contra estresses causados por fatores bióticos e abióticos. No entanto a maioria das substâncias geradas por esse metabolismo é sintetizada em pequenas concentrações no seu local de origem natural (HARBORNE; TOMAS-BARBERAN, 1991; SANTOS, 2003).

O recente aperfeiçoamento das técnicas de cromatografia e espectroscopia tem possibilitado obter e identificar com mais facilidade as estruturas moleculares complexas dos compostos naturais, que depois de purificados podem ter sua atividade farmacológica caracterizada e melhorada, visto que muitas moléculas naturais possuem ação terapêutica em doenças com poucas opções de tratamento (LAUTIÉ et al., 2020).

Os sesquiterpenos são capazes de ser identificados em diversos óleos essenciais, como o cariofileno, presente no óleo do cravo-da-índia, espécie *Eugenia caryophyllata* (Myrtaceae), o longifoleno, presente na resina terebinto, espécie *Pinus ponderosa* (Pinaceae), etc (HANSON, 2003). A Organização Mundial da Saúde (OMS) vem recomendando a utilização do sesquiterpeno isolado da *Artemisia annua* (Asteraceae), a artemisinina, para o tratamento de cepas resistentes do parasita causador da malária (MOJAB, 2012).

Os sesquiterpenos compreendem uma classe química diversa de metabólitos secundários, comumente isolados de plantas, e apresentam um amplo espectro de atividade farmacológica e biológica (DI SOTTO, 2010) O  $\beta$ -cariofileno (Figura 1) é um sesquiterpeno bi-cíclico e pode ser encontrado em óleos essenciais e óleo-resinas de várias espécies vegetais (FERREIRA, 2014).

É possível identificar o  $\beta$ -cariofileno em óleos essenciais de plantas como, *Piper nigrum* (Piperaceae) (POLITEO et al., 2011), *Eugenia caryophyllata* (Myrtaceae) (ZHENG; KENNEY; LAM, 1992), *Zingiber nimmoni* (Zingiberaceae) (SABULAL et al., 2006), na *Copaifera reticulata* (Fabaceae) (VEIGA et al., 2007), esse também é utilizado como bálsamo na medicina tradicional do norte e nordeste brasileiro.

Um exemplo do  $\beta$ -cariofileno produzido por metabólitos secundários, é no caso do milho (Poaceae), que para diminuir os prejuízos causados por predadores, é capaz de excretar componentes voláteis (RASMANN et al., 2005).

A atividade biológica descrita para o  $\beta$ -cariofileno, assim como para alguns óleos essenciais nos quais ele é majoritário, é muito ampla e compreende ação antifúngica (HO et al., 2011), antibacteriana (SHAFAGHAT, 2011), antiviral (DUNKIĆ; BEZIĆ; VUKO, 2011), anti-artrítica (KOBAYASHI et al., 2011), anestésica (GHELARDINI et al., 1997), antinociceptiva (PINHEIRO et al., 2011) e anti-inflamatória (AGARWAL; RANGARI, 2003).

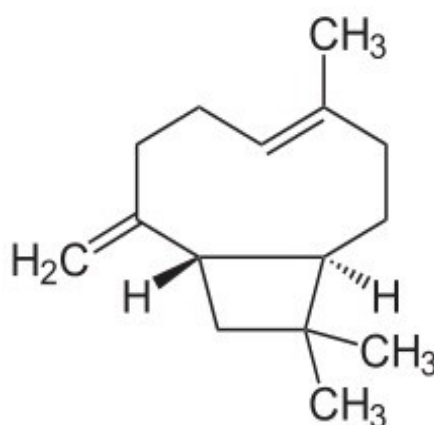


Figura 1– Molécula do  $\beta$ -cariofileno.  
FONTE: RODRIGUES (2018).

Os compostos naturais podem ser modificados por síntese orgânica ou por processos biológicos, tanto envolvendo bioconversão, através do uso de enzimas microbianas, ou biotransformação, através da utilização de microrganismos vivos em cultivo. As modificações estruturais são uma alternativa para ampliação de derivados bioativos, e a transformação biológica uma opção viável frente a modificações difíceis de serem alcançadas pela síntese tradicional (BOUFRIDI; QUINN, 2018).

### 3.2 Fungos

Os fungos dispõem de um metabolismo oportuno, eficaz em gerar novas substâncias ou de transformar estruturas de substâncias tóxicas, reduzindo a

toxicidade (KRUPINSK et al., 2014). Ademais esses microrganismos são hábeis em produzir o aperfeiçoamento de moléculas já existentes e moléculas com novas funções (RICO-MARTINEZ et al., 2014).

Os fungos também usufruem de um crescimento rápido, o que os tornam capazes de se desenvolverem em ambientes pobres em nutrientes. Esses microrganismos produzem enzimas hidrolíticas diversas, as quais já são comercialmente exploradas em várias áreas, como no processamento de alimentos, na fabricação de detergentes, tecidos, produtos farmacêuticos, também na terapia médica e na biologia molecular (STAMFORD; ARAÚJO; STAMFORD, 1998; CARRIM; BARBOSA; VIEIRA, 2006; SANTOS; VARVALLO, 2011).

As enzimas fúngicas exibem uma capacidade de biotransformação que abrange diferentes compostos químicos e a modificação de fármacos através de reações enzimáticas naturais poderia gerar moléculas com maior potencial biológico e menor toxicidade, auxiliando na busca de novas moléculas ativas para diversas finalidades (CONCEIÇÃO et al., 2005; SANKARAN et al., 2010; JUNIOR, 2016).

Uma vantagem das pesquisas na área química de metabólitos fúngicos é que os fungos podem ser cultivados em larga escala em biorreatores, usando meio aquoso, sem nenhum prejuízo ao meio ambiente, diferentemente do que ocorreria, por exemplo, com a síntese química de compostos orgânicos que utiliza solventes tóxicos (TAKAHASHI; LUCAS, 2008; SANTOS; VARVALLO, 2011).

Atualmente existem muitos fármacos provenientes de fungos que são comercializados no mundo todo, como antibióticos ( $\beta$ -lactâmicos e tetraciclina) (SRIVASTAVA et al., 2009; LIU et al., 2014), antitumorais como a bestatina (HUO et al., 2014), redutores de colesterol (lovastatina) (KUMAR et al., 2014), imunossupressores (ciclosporina A, ácido micodenólico) (PERLMAN; RAO, 2014), entre outros (GANASAN, 2008; HARVEY, 2008; SANTOS, 2017).

### 3.3 Biotransformação

Biotransformações ou bioconversões são reações que transformam compostos orgânicos utilizando células microbianas intactas, células vegetais ou



enzimas isoladas, originando novos produtos. A biotransformação tem sido uma ferramenta importante para a produção de novos fármacos, produtos químicos e para o desenvolvimento de tecnologias sustentáveis (DEMIRJIAN et al., 1999; BORGES, 2010).

Algumas vantagens de realizar biotransformações são as condições em que é possível realizar e a velocidade em que ocorre as reações, ou seja, as condições geralmente são brandas, os experimentos acontecem em temperaturas entre 20°C e 40°C, e as várias opções de reagentes que essas transformações possuem, os quais comumente são solventes aquosos (AZERAD, 1995).

Apesar das transformações com microrganismos terem como desvantagem um rendimento limitado os reagentes biológicos são variados, efetuando mudanças no tempo, aeração, temperatura e composição do meio durante o cultivo, e também é possível a utilização de mutantes ou outras espécies do gênero no mesmo reagente biológico, alternativas capazes de trazer melhorias no rendimento (MAGDALOU, 2008)

Kiran et al. (2013), avaliou a biotransformação da isoforona, um monoterpreno presente no fruto mirtilo vermelho, *Vaccinium oxycoccus* (Ericaceae), e um dos principais componentes da *Artemisia filifolia* (Asteraceae), pelos fungos *Alternaria alternata* e *Neurospora crassa*, e foram obtidos dois derivados monohidroxilados que apresentaram atividade antimicrobiana superior ao composto original (Figura 2).

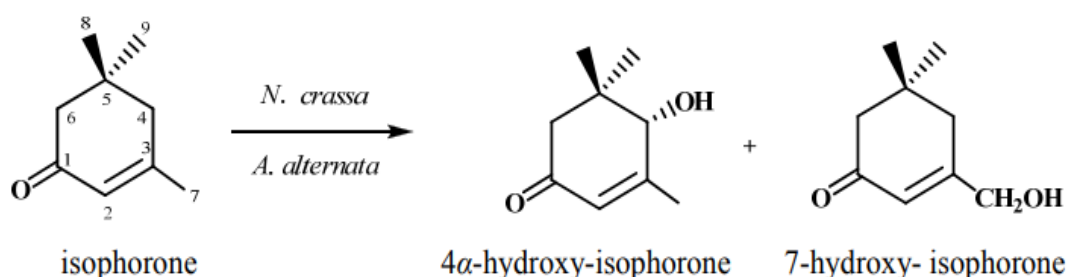


Figura 2- Biotransformação da isoforona pelo *Alternaria alternata* e *Neurospora crassa*.

FONTE: KIRAN et al. (2013).

A biotransformação do diterpeno pimaradieno, obtido das raízes da planta *Viguiera arenaria* (Asteraceae), foi avaliado por Porto et al. (2017) que utilizaram o fungo *Aspergillus ochraceus*, e dos cinco derivados biotransformados, dois apresentaram atividade antimicrobiana superior ao composto original, sendo um deles com atividade dez vezes superior (Figura 3).

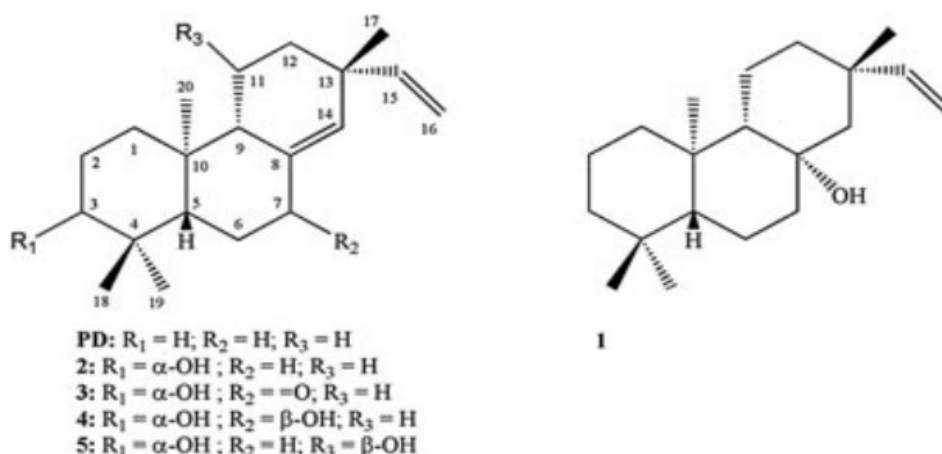


Figura 3 - Estruturas químicas do diterpeno pimaradieno (1) e dos compostos obtidos pela biotransformação do fungo *Aspergillus ochraceus*.

FONTE: PORTO et al. (2017)

Em outro estudo realizado por Galal (2001), a lactona sesquiterpênica piretosina, isolada das flores de *Chrysanthemum cinerariaefolium* (Asteraceae), foi biotransformada pelo fungo *Rhizopus nigricans* gerando cinco derivados mais ativos do que o composto precursor, incluindo atividades antimicrobianas, antiparasitárias e antitumorais (Figura 4).

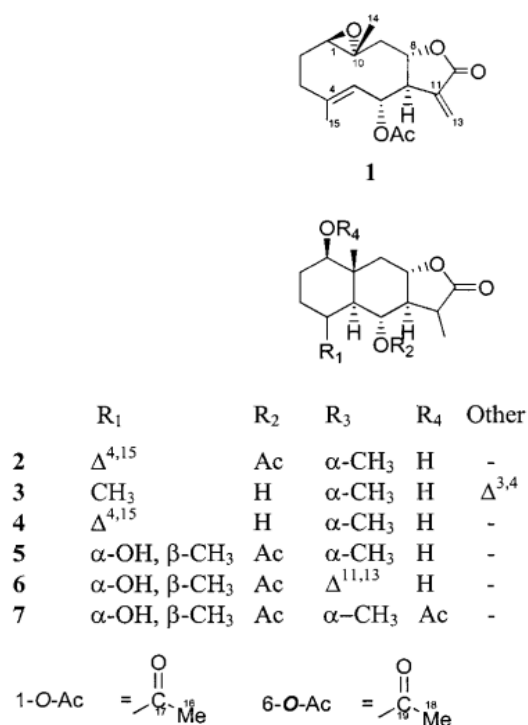


Figura 4- Estruturas químicas da lactona sesquiterpênica picrosina e os compostos derivados da biotransformação pelo fungo *Rhizopus nigricans*.

FONTE: GALAL (2001).

Uma grande variedade de novos compostos biotransformados foram obtidos de terpenóides, flavonóides, esteróides, etc, revelando que a transformação microbiana é um procedimento imprescindível na variedade estrutural de produtos naturais ou para obter melhores propriedades físico-químicas (CHEN et al., 2015; OHSE, 2019).

Um grande avanço para a indústria farmacêutica foi passar a aplicar os fungos *R. arrhizus* e o *Aspergillus niger* para a obtenção da síntese da cortisona (Figura 5). O *R. arrhizus* causou hidroxilação do carbono 11, e formou a 11- $\alpha$ -hidroxiprogesterona, o que fez a quantia gasta durante a produção de 1g de cortisona cair de U\$200,00 para U\$ 1,00 entre os anos de 1949 a 1979, tendo também uma queda no número de etapas existentes durante o processo, de 31 foi passou a ser 11 (PETERSON; MURRAY, 1952; DONOVA; EGOROVA, 2012; SANTOS, 2017).

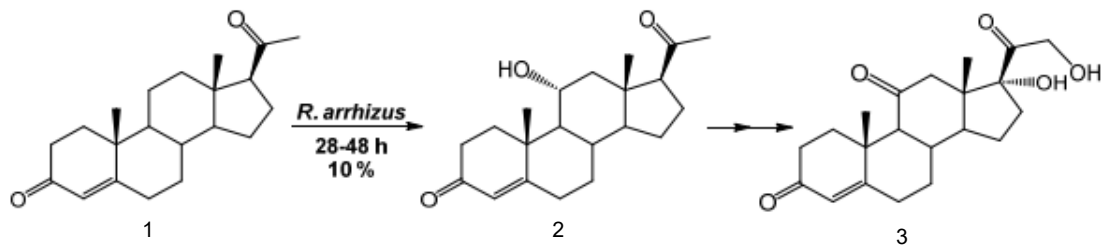


Figura 5 - Síntese da cortisona (3) causada pela hidroxilação da progesterona (1) pelo *R. arrhizus*, formando a 11-  $\alpha$ -hidroxiprogesterona (2).

FONTE: SANTOS (2017).

Uma variedade de fármacos são produzidos com o auxílio de biotransformações, como: pravastatina (reductor de colesterol), *L*-dopa (anti-Parkinsoniano), lamivudina (antiviral), saxagliptina (antidiabético), atazanavir (anti-HIV) (Figura 6), etc. E a substância MK0507, também produzida por meio da biotransformação, a qual é realizada pelo fungo *Neurospora crassa*, está presente na composição de um colírio utilizado para tratar o glaucoma (ZAKS; DODDS, 1997; PATEL, 1997; PATEL, 2008; SANTOS, 2017).

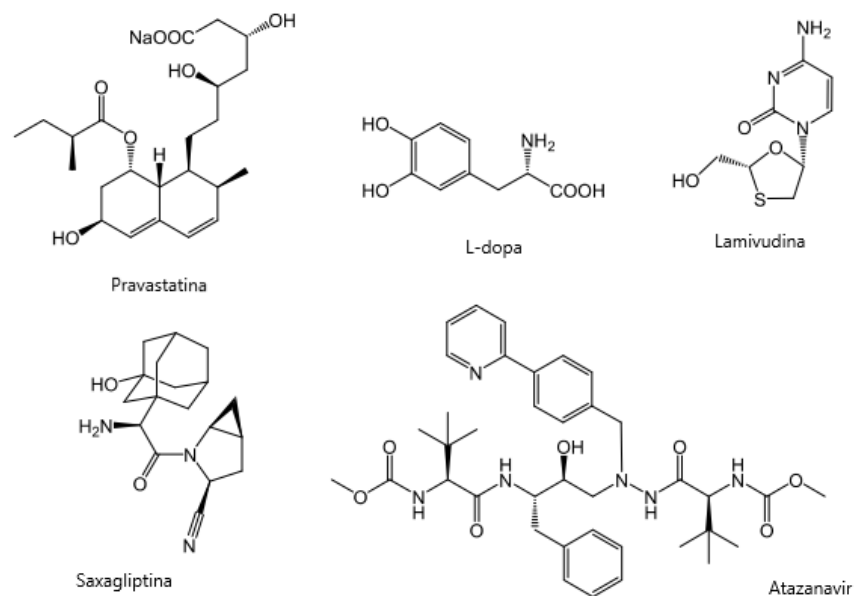


Figura 6 - Fármacos são produzidos com o auxílio de biotransformações.

FONTE: SANTOS (2017).

A penicilina G, antibiótico proveniente de fungos presentes na natureza, acabou por gerar resistência bacteriana, desse modo muitas pesquisas foram desenvolvidas com o objetivo de produzir penicilinas semi-sintéticas. Após diversas tentativas, Batchelor et al. (1959) descobriu que o composto da penicilina G, ácido 6-aminopenicilânico (6-APA), era o composto principal antibacteriano, o qual precisou ser isolado e passar por biotransformação como produto natural, assim a primeira síntese das penicilinas semi-sintéticas aconteceu. Essa permitiu a obtenção de diversos derivados com capacidades antimicrobianas superiores a original (Figura 7), que são utilizados até hoje (BAÍA, 1988).

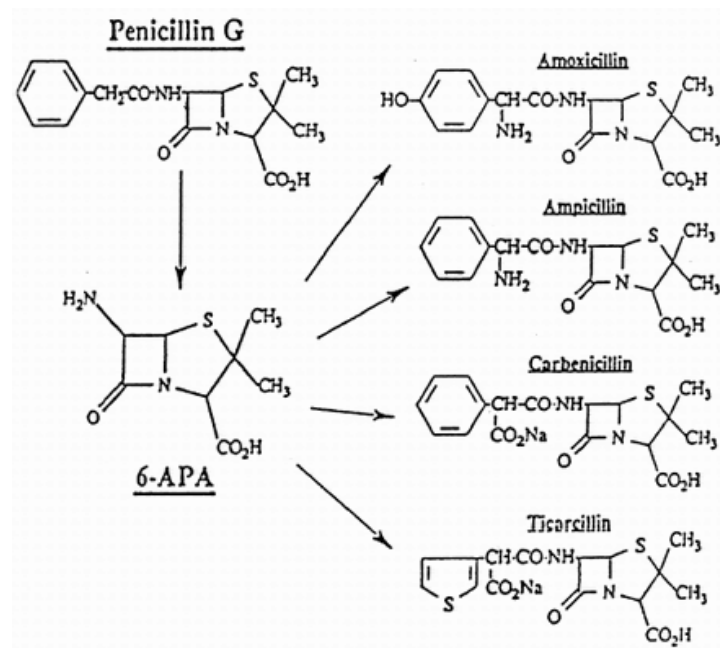


Figura 7 - Síntese das penicilinas semi-sintéticas.

FONTE: RIBEIRO (2010).

## 4 METODOLOGIA

### 4.1 Meios de cultivo

- Meio Rosa Bengala, composto por: Digestão péptica de tecido animal (5,0 g/L), Dextrose (10,0 g/L), Fosfato monopotássico (1,0 g/L), Sulfato de Magnésio (0,5 g/L), Rosa Bengala (0,025g/L), Cloranfenicol (0,1 g/L), Agar (15,0 g/L), pH final (a 25°C):  $5,6 \pm 0,2$ . Fórmula padronizada.
- Meio Czapek-Dox, composto por: glicose (40,0 mg/L), extrato de levedura (1,0 g/L),  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (5,0 g/L),  $\text{NaNO}_3$  (2,0 g/L),  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (0,5 g/L),  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (0,01 g/L),  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (0,005 mg/L), 2% de ágar (20,0 g/L) em água destilada (1 L).

### 4.2 Composto utilizado

O composto puro  $\beta$ -cariofileno utilizado neste trabalho foi gentilmente cedido para teste de biotransformação, pelo prof. Dr. Domingos Savio Nunes, da Universidade Estadual de Ponta Grossa-PR.

### 4.3 Isolamento dos fungos

Amostras de serrapilheira e de solo que ficam abaixo de folhas secas em estado de decomposição foram coletadas nos jardins do campus da Universidade Tecnológica Federal do Paraná em Santa Helena/PR (-24.8464 S, -54.3420 W).

Aproximadamente 1g dessas amostras foram homogeneizadas em 10 mL de água e alíquotas foram semeadas em dois meios de cultivo distintos, um meio de cultivo complexo contendo o corante Rosa Bengala, o qual reduz a multiplicação dos

fungos filamentosos, evitando que as colônias se sobreponham o que facilita o isolamento.

O outro meio de cultivo mínimo, Czapek-Dox, proporcionou fonte de carbono em pequena quantidade para o crescimento dos fungos por meio da adição de glicose, componente necessário para a nutrição dos fungos, e que foi compensado pela adição do composto  $\beta$ -cariofileno, atuando então como fonte de carbono nesse meio, para ser possível a obtenção de fungos filamentosos de interesse. As placas foram incubadas a 27°C por até 7 dias.

#### 4.4 Biotransformação

Os isolados fúngicos obtidos, previamente selecionados e repicados, foram submetidos ao teste de biotransformação. Esses foram cultivados em meio sólido Czapek-Dox, em placas de Petri, contendo o composto natural  $\beta$ -cariofileno, o qual foi diluído em dimetilsulfóxido (DMSO) e meio de cultivo, de modo a evitar que a concentração de DMSO excedesse 1,5% do meio final, assim a concentração foi de 300  $\mu$ g/mL. Então, os fungos isolados foram semeados na superfície e as placas foram incubadas por 14 dias a 27°C.

Placas controle com o meio Czapek-Dox foram preparadas, sendo um controle contendo somente o composto, sem inóculo microbiano, um controle contendo o fungo, porém sem o composto, e um último controle contendo apenas o meio de cultivo. Esse processo foi realizado com cada isolado fúngico, e essas placas também foram incubadas por 14 dias a 27°C.

#### 4.5 Extração e isolamento dos compostos biotransformados

Após o período de incubação para biotransformação, o meio sólido foi cortado em fragmentos menores e colocado em erlenmeyer juntamente com 20 mL de acetato de etila, sendo homogeneizando de modo a extrair os compostos presentes.

Após 1 hora de extração, o solvente com os compostos extraídos foi coletado por meio de filtração, e após sua evaporação a temperatura ambiente o extrato foi avaliado quanto a possibilidade de conter novos compostos ao comparar com os extratos de controle através da cromatografia em camada delgada (CCD).

#### 4.6 Cromatografia em Camada Delgada (CCD)

A cromatografia em camada delgada tem o objetivo de separar e diferenciar as moléculas existentes em uma determinada amostra. A placa cromatográfica possui uma camada fina, sólida e adsorvente composta por sílica gel, polar e porosa, que é a fase estacionária. A amostra, dissolvida em um solvente volátil, é aplicada em uma extremidade com auxílio de capilares. Em seguida a placa é colocada em um sistema fechado contendo a fase móvel, composta por uma mistura de solventes orgânicos, que se ascende através da fase estacionária por capilaridade, desde modo promovendo o deslocamento das moléculas químicas presentes na amostra, que se separam por diferenças de polaridade.

Neste trabalho foram utilizadas placas cromatográficas de sílica gel para identificar possíveis moléculas que foram biotransformadas pelos isolados obtidos, pré-selecionados. O extrato bruto da biotransformação foi dissolvido e aplicado na placa com auxílio de capilares. Para determinar a fase móvel ideal, foram feitos vários testes com diferentes concentrações de solventes, de diferentes polaridades, de modo a obter a melhor resolução. Por fim, foi utilizado o revelador, para ser possível de observar os deslocamentos ocorridos pela fase móvel na placa cromatográfica, o revelador também foi determinado a partir de testes que possibilitaram uma melhor visualização das moléculas de interesse.

## 5 RESULTADOS



Após o isolamento inicial dos fungos, em ambos os meios de cultivo, o crescimento no meio de cultivo Rosa Bengala evitou como esperado a sobreposição de colônias, auxiliando na escolha dos fungos utilizados, e o meio Czapek-Dox com o  $\beta$ -cariofileno como fonte de carbono também permitiu o crescimento de colônias. Desse modo foi possível selecionar os 4 isolados fúngicos os quais posteriormente foram repicados para a continuidade do experimento.

### 5.1 Amostras fúngicas selecionadas e utilizadas

As 4 amostras fúngicas selecionadas e utilizadas para a triagem da biotransformação foram nomeadas de modo a facilitar o experimento, seus nomes neste trabalho são apenas uma representação de cada amostra.

Amostras:

- CE2
- CE3
- CC1
- CC2

### 5.2 Placas preparadas

As placas preparadas para a biotransformação e para análise cromatográficas dos metabolitos extraídos foram:

- (1) Controle:  $\beta$ -cariofileno e meio de cultivo Czapek-Dox
- (2) Controle: apenas com meio de cultivo Czapek-Dox
- (3) Controle: CE3 e meio de cultivo Czapek-Dox
- (4) Amostra: CE3 com  $\beta$ -cariofileno e meio Czapek-Dox
- (5) Controle: CE2 e meio de cultivo Czapek-Dox
- (6) Amostra: CE2 com  $\beta$ -cariofileno e meio Czapek-Dox
- (7) Controle: CC1 com meio de cultivo Czapek-Dox

(8) Amostra: CC1 com  $\beta$ -cariofileno e meio Czapek-Dox

(9) Controle: CC2 com meio de cultivo Czapek-Dox

(10) Amostra: CC2 com  $\beta$ -cariofileno e meio Czapek-Dox

### 5.3 Biotransformação

As placas do experimento de biotransformação com os isolados fúngicos no meio de cultivo Czapek juntamente com a droga  $\beta$ -cariofileno, e também as placas controle (fungo e meio de cultivo) que haviam sido preparadas, obtiveram um crescimento fúngico semelhante (Figura 8).



Figura 8 - Isolado fúngico CC1 em placas contendo o  $\beta$ -cariofileno e seu controle fúngico.

FONTE: Autoria própria.

### 5.4 Extração do metabólitos

O método de extração de metabólitos foi eficaz, e o solvente acetato de etila foi capaz de extrair os metabólitos presentes nos meios sólidos, fragmentados, no erlenmeyer (Figura 9). Os metabólitos extraídos ficaram mantidos em recipientes etiquetados, representando cada uma das amostras fúngicas utilizadas (CE2, CE3, CC1 e CC2). O solvente também foi capaz de evaporar rapidamente, gerando o extrato bruto, facilitando as análises em CCD.



Figura 9 – Extração dos compostos presentes.

FONTE: Autoria própria.

## 5.5 Cromatografia em camada delgada

Após a extração e isolamento dos compostos biotransformados, foram feitas análises das placas cromatográficas contendo o experimento e seus controles (Figura 10). Foi observado que dos quatro isolados fúngicos avaliados, um pode ter biotransformado, pois a análise da CCD permitiu inferir a presença de ao menos duas moléculas diferentes dos demais controles.

A melhor combinação para a fase móvel foi Clorofórmio e Acetato de etila (4:1). Sendo o melhor revelador o Anisaldeído sulfúrico. Também foi possível observar os compostos na luz ultravioleta no comprimento de onda 254 nm.

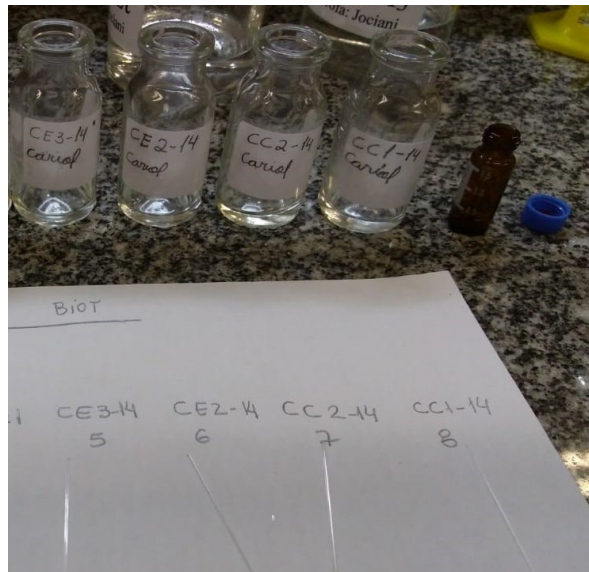


Figura 10 – Metabólitos extraídos utilizados na CCD

FONTE: Autoria própria.

Analisando as placas cromatográficas de todos os experimentos, a biotransformação do composto  $\beta$ -cariofileno foi confirmada, e ocorreu com o isolado fúngico CC1, onde foi possível observar 2 moléculas mais polares do que a molécula original (Figura 11).

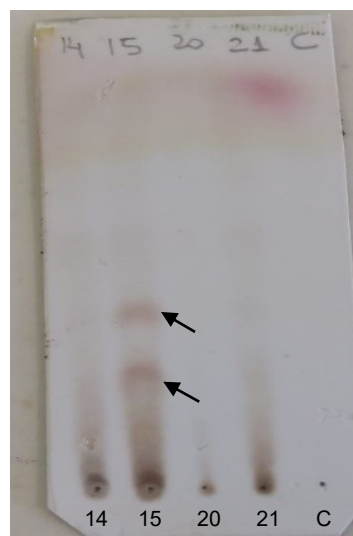


Figura 11– Foto da placa cromatográfica indicando biotransformação pelas flechas. Controle fungo CC1 (14) e CE2 (20) no meio Czapek-Dox. Experimento fungos CC1 (15) e CE2 (21) com o  $\beta$ -cariofileno no meio Czapek-Dox. Controle  $\beta$ -cariofileno (C) no meio Czapek-Dox.

FONTE: Aatoria própria.

## 6 DISCUSSÃO

Durante os processos de isolamentos fúngicos do presente trabalho foram utilizados o meio complexo com Rosa Bengala e o meio Czapek-Dox, este último com acréscimo da droga teste para verificar se auxiliaria na triagem dos fungos. O isolado que houve suspeita de biotransformação foi isolado do meio Czapek, mostrando que a presença da droga teste já no isolamento pode resultar em isolados fúngicos com melhor perfil enzimático para a biotransformação.

A biotransformação do  $\beta$ -cariofileno pelos 4 isolados fúngicos e seus controles não foi realizada no meio de cultivo Rosa Bengala, pois esse é um meio mais nutritivo para os fungos, e o objetivo da biotransformação é causar um estresse nutricional nesse microrganismo, para que suas enzimas modifiquem e utilizem o  $\beta$ -cariofileno como fonte de nutrição. Assim, o meio de cultivo Rosa Bengala foi utilizado apenas para facilitar o isolamento dos fungos coletados do solo, evitando a sobreposição das colônias fúngicas no início do experimento.

Meios complexos encontrados na literatura, como no de Santos (2017), utilizados para a biotransformação possuem composições similares com o Czapek-Dox utilizado, e também tem como objetivo de causar estresse nutricional nos microrganismos selecionados.

Neste trabalho o meio Czapek-Dox foi preparado com o composto  $\beta$ -cariofileno, iniciando a biotransformação assim que foi feita a incubação, é possível encontrar experimentos, como no de Batur et al. (2019), onde a biotransformação teve início 24 horas depois da incubação feita pela adição do  $\beta$ -cariofileno.

Um dos 4 isolados fúngicos foi promissor, pois acreditamos que ele tenha sido capaz de biotransformar, resultando em possíveis 2 moléculas derivadas diferentes, mais polares que o composto original, avaliadas por cromatografia em camada delgada (CCD). Também no experimento de Batur et al. (2019), a biotransformação foi iniciada após a incubação, foram obtidos pelo menos 3 compostos polares, os quais foram avaliados por cromatografia gasosa.

Muitos dos procedimentos de biotransformação e isolamento dos fungos encontrados abordam sobre o uso de meios cultivos líquidos. Entretanto, nosso

estudo mostrou ser possível detectar a biotransformação em meio sólido ágar em placas de petri, para uma triagem inicial de vários isolados, utilizando assim menos reagentes.

O teste de biotransformação do nosso estudo foi realizado durante 14 dias. A incubação por um período maior ou menor poderia resultar em um número diferente de moléculas alteradas, mas somente novos testes vão poder afirmar. As condições de incubação, como temperatura, oxigenação e composição química do meio, também interferem na biotransformação, sendo fatores importantes a serem avaliados para otimização do processo.

## **7 CONCLUSÕES**

Conclui-se que o método de biotransformação é uma alternativa ecológica para modificação de moléculas, como complemento à síntese tradicional, pois algumas enzimas são capazes de alterações químicas difíceis de serem realizadas pela síntese.

O isolamento microbiano em meio de cultivo com baixa concentração de fonte de carbono, contendo a droga teste, foi mais eficiente para triar isolados capazes de alterar a droga. Do mesmo modo, a biotransformação realizada em meio sólido com restrição de fonte de carbono, em placas de petri, foi eficiente e econômica, permitindo triar isolados fúngicos com capacidade enzimática de interesse.

O estudo em biotransformação de moléculas ativas pode levar a novos compostos de interesse farmacológico e a biodiversidade microbiana da região oeste do Paraná parece ser promissora para a descoberta de isolados com tal capacidade.

## 8 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os estudos em biotransformação realizados inauguraram uma nova linha de pesquisa na instituição, mostrando o oeste do Paraná como detentor de uma diversidade fúngica promissora para tais estudos. A coleção biológica foi ampliada e novos estudos com diferentes moléculas serão realizados.

Posteriormente o isolado fúngico mostrado neste trabalho será identificado, caracterizado e os metabólitos resultantes da biotransformação serão purificados e identificados. O isolado promissor também será estudado para biotransformar outras drogas de interesse, conseqüentemente o método de biotransformação será otimizado.

## 9 REFERÊNCIAS

AGARWAL, R. B.; RANGARI, V. D. **Phytochemical investigation and evaluation of anti-inflammatory and anti-arthritic activities of essential oil of *Strobilanthus ixiocephala* Benth.** Indian J Exp Biol. 2003 Aug;41(8):890-4. PMID: 15248491.

AZERAD, R. **Application of biocatalysts in organic synthesis.** Bulletin de la Societe Chimique de France, 1995, 132, 71-51.

BAÍA, M. F. C. G. **ESTABILIDADE E BIODISPONIBILIDADE DE PENICILINAS SEMI-SINTÉTICAS.** Dissertação (Doutorado em Farmácia). Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto. 1988.

BATCHELOR, F. R.; DOYLE, F. P.; NAYLER, J. H. C.; ROLINSON, G. N. **Synthesis of Penicillin: 6-Aminopenicillanic Acid in Penicillin Fermentations.** Nature, volume 183, pages 257–258 (1959).

BATUR, Ö. Ö.; KIRAN, I.; BERGER, R. G.; DEMIRCI, B. **Microbial transformation of  $\beta$ -caryophyllene and longifolene by *Wolfiporia extensa*.** Natural Volatiles & Essential Oils, Vol. 6, No. 3, 8 – 15. 2019.

BORGES, B. K. **Análise estereosseletiva de fármacos com aplicação em estudos de biotransformação empregando fungos.** Tese (Doutorado em Ciências), Programa de Pós-Graduação em Toxicologia, Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto. Ribeirão Preto, 2010.

BOUFRIDI, A.; QUINN, R.J. **Harnessing the Properties of Natural Products.** *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 2018. 58:451–70.

CARRIM, A. J. I.; BARBOSA, E. C.; VIEIRA, J. D. G. **Enzymatic activity of endophytic bacterial isolates of *Jacaranda decurrens* Cham. (Carobinha-do-campo).** *Brazilian Archives of Biology and Technology*, Curitiba, v. 49, n. 3, p. 353-359, 2006.

CHEN, L.X., ZHAO, Q., ZHANG, M., LIANG, Y.Y., MA, J.H., ZHANG, X., DING, L.Q., ZHAO, F., QIU, F. **Biotransformation of curcumenol by *Mucor polymorphosporus*.** *J. Nat. Prod.* v. 78, p. 674–680, 2015.

DEMIRJIAN, D.C.; SHAH, P.C.; MORÍS-VARAS, F. (1999). **Screening for Novel Enzymes.** In: Fessner WD. et al. (eds) *Biocatalysis - From Discovery to Application. Topics in Current Chemistry*, vol 200. Springer, Berlin, Heidelberg. [https://doi.org/10.1007/3-540-68116-7\\_1](https://doi.org/10.1007/3-540-68116-7_1).

DEWICK, P. M. **Medicinal Natural Products.** A Biosynthetic Approach. 2° Ed., Chichester: John Wiley & Sons, 2002, 550 p.

DI SOTTO, A.; MAZZANTI, G.; CARBONE, F.; HRELIA, P.; MAFFEI, F. **Inhibition by beta-caryophyllene of ethyl methanesulfonate-induced clastogenicity in cultured human lymphocytes.** *Mutat Res.* 2010 Jun 17;699(1-2):23-8. doi: 10.1016/j.mrgentox.2010.04.008. Epub 2010 Apr 14. PMID: 20398787.

DONOVA, M. V.; EGOROVA, O. V. **Microbial steroid transformations: current state and prospects.** *Applied Microbiology and Biotechnology*, 94, 1423-1447, 2012.

DUNKIĆ, V.; BEZIĆ, N.; VUKO, E. **Antiphytoviral activity of essential oil from endemic species *Teucrium arduini*.** *Nat Prod Commun.* 2011 Sep; 6(9):1385-8. PMID: 21941920.

FERREIRA, D. A. S. **Avaliação do efeito protetor do beta-cariofileno em modelos celulares de doenças neurodegenerativas.** Tese (Doutorado em Ciências), Programa de Pós-Graduação em Toxicologia, Universidade de São Paulo,



Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo. Ribeirão Preto, 2014.

FLORINDO, R. H. S. **Bioprospecção de metabólitos secundários bioativos produzidos por fungos endofíticos associados à *Piper sp.* coletada no Parque Estadual do Rio Doce, Minas Gerais.** Dissertação (Pós-Graduação em Biotecnologia) Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia PPGBIOTEC, Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas, Universidade Federal de Ouro Preto. Ouro Preto, 2019.

FRAGA, B.M.; HOFFMANN, J.J. **Microbial transformation of diterpenes: Hydroxylation of 17-acetoxy-kolavenol acetate by *Mucor plumbeus*.** *Phytochemistry*, 1993, 33, 827 – 830.

GALAL, A.M. **Microbial Transformation of Pyrethrosin.** *J. Nat. Prod.* **2001**, *64*, 1098-1099.

GHELARDINI, C.; GALEOTTI, N.; SALVATORE, G.; MAZZANTI, G. **Local anaesthetic activity of the essential oil of *Lavandula angustifolia*.** *Planta Med.* 1999 Dec; 65(8):700-3. doi: 10.1055/s-1999-14045. PMID: 10630108.

HANSON, J. R. **Natural Products: The Secondary Metabolites.** Cambridge: Royal Society of Chemistry. 2003, 147 p.

HARBORNE, J. B.; TOMAS-BARBERAN F. A. **Ecological Chemistry and Biochemistry of Plant Terpenoids.** Oxford [England]: Clarendon Press, 1991.

HO, C. L.; LIAO, P. C.; WANG, E. I.; SU, Y. C. **Composition and antifungal activities of the leaf essential oil of *Neolitsea parvigemma* from Taiwan.** *Nat Prod Commun.* 2011 Sep;6(9):1357-60. PMID: 21941915.

HUO, X.; LIU, Q.; WANG, C.; MENG, Q.; SUN, H.; PENG, J.; MA, X.; SUN, P.; LIU, K. **Inhibitory effect of valsartan on the intestinal absorption and renal excretion of bestatin in rats.** *J Pharm Sci.* 2014 Feb;103(2):719-29. doi: 10.1002/jps.23805. Epub 2013 Dec 11. PMID: 24338900.

JUNIOR, G. M. Y. **Biotransformação do inseticida flubendiamida por fungos de solo e lacase; análise dos metabólitos por espectrometria de massas (LC-MS/MS).** Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental), Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental Câmpus Apucarana/Londrina, Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Londrina, 2016.

KIRAN, I.; DURCEYLAN, Z.; KIRIMERB, N.; BAŞERB, K. H. C.; NOMAC, Y.; DEMIRCI, F. **Biotransformation of  $\alpha$ -Cedrol and Caryophyllene Oxide by the**

**Fungus *Neurospora crassa*.** Natural Product Communications Vol. 5, No. 4, 515 – 518. 2010.

KIRAN, I.; ÖZŞEN, Ö.; ÇELİKA, T.; İLHAN, S.; GURSUB, B. Y.; DEMIRCI, F. **Microbial Transformations of Isophorone by *Alternaria alternata* and *Neurospora crassa*.** Natural Product Communications. Vol. 8, No. 1, 59 – 61. January 2013.

KOBAYASHI, C.; FONTANIVE, T. O.; ENZWEILER, B. G.; DE BONA, L. R.; MASSONI, T.; APEL, M. A.; HENRIQUES, A. T.; RICHTER, M. F.; ARDENGHI, P.; SUYENAGA, E. S. **Pharmacological evaluation of *Copaifera multijuga* oil in rats.** Pharm Biol. 2011 Mar;49(3):306-13. doi: 10.3109/13880209.2010.515595. PMID: 21323483.

KRUPIŃSKI, M.; JANICKI, T.; PALECZ, B.; DLUGONSKI, J. (2014). **Biodegradation and utilization of 4-n-nonylphenol by *Aspergillus versicolor* as a sole carbon and energy source.** Journal of hazardous materials. 280C. 678-684. 10.1016/j.jhazmat.2014.08.060.

KUMAR, S.; SEN GUPTA, B.; GOMES, J. **Lovastatin production by *Aspergillus terreus* using lignocellulose biomass in large scale packed bed reactor.** In: Food and Bioproducts Processing. 2014 ; Vol. 92, No. 4. pp. 416-424.

LAUTIÉ, E.; RUSSO, O.; DUCROT, P.; BOUTIN, J.A. **Unraveling Plant Natural Chemical Diversity for Drug Discovery Purposes.** Front. Pharmacol. 11:397 (2020). doi: 10.3389/fphar.2020.00397.

LIESE, A.; SEELBACH, K.; WANDREY, C. **Industrial Biotransformations.** Germany: Wiley-VCH: 2001, 425 p.

LIU, C; DUTTA, D.; MITSCHER, L. **Design and synthesis of new cephalosporin antibiotics.** Monatshefte fur Chemie, 145, 633-638, 2014.

LOWE, D.A.; ELANDER, R.P. **Contribution of mycology to the antibiotic industry.** Mycologia, 1983, 75, 2, 361 - 373.

MAGDALOU, J.; Fournel-Gigleux, S.; Testa, B. ; Ouzzine, M. **The Practice of Medicinal Chemistry.** Prestwick Chemical, France: Elsevier, 3° Ed., 2008, 736 p.

MOJAB F. **Antimalarial natural products: a review.** Avicenna J Phytomed. 2012 Spring;2(2):52-62. PMID: 25050231; PMCID: PMC4075661.

OHSE K. C. **Biotransformação da quercetina e produção de metabólitos ativos por *Penicillium* sp. 392 (ghg2 2.1) isolado de *Gustavia elliptica* M. (Lecythidaceae).** Tese (Doutorado em Biotecnologia), Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia da Rede BIONORTE, Rede de Biodiversidade e Biotecnologia da Amazônia Legal, Universidade Federal do Amazonas. Manaus, 2019.

PERLMAN, R. L.; RAO, P. S. **Quality of life of kidney patients undergoing renal transplantation: finding the right immunosuppressive treatment.** Drugs and Aging, 31, 103-109, 2014.

PETERSON, D. H.; MURRAY, H. C. **Microbiological oxygenation of steroids at carbon 11.** Journal of the American Chemical Society, 74, 1871-1872, 1952.

PINHEIRO, B. G.; SILVA, A. S.; SOUZA, G. E.; FIGUEIREDO, J. G.; CUNHA, F. Q.; LAHLOU, S.; DA SILVA, J. K.; MAIA, J. G.; SOUSA, P. J. **Chemical composition, antinociceptive and anti-inflammatory effects in rodents of the essential oil of *Peperomia serpens* (Sw.) Loud.** J Ethnopharmacol. 2011 Nov 18;138(2):479-86. doi: 10.1016/j.jep.2011.09.037. Epub 2011 Sep 29. PMID: 21971207.

POLITEO, O.; SKOCIBUSIC, M.; MARAVIC, A.; RUSCIC, M.; MILOS, M. **Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of endemic Dalmatian black pine (*Pinus nigra ssp. dalmatica*).** Chem Biodivers. 2011 Mar;8(3):540-7. doi: 10.1002/cbdv.201000185. PMID: 21404437.

PORTO, T.S.; SIMÃO, M.R.; CARLOS, L.Z.; MARTINS, C.H.G.; FURTADO, N.A.J.C.; SAID, S.; ARAKAWA, N.S.; SANTOS, R.A.; VENEZIANI, R.C.S.; AMBRÓSIO, S.R. **Pimarane-type Diterpenes Obtained by Biotransformation: Antimicrobial Properties Against Clinically Isolated Gram-positive Multidrug-resistant Bacteria.** Phytother. Res. 27: 1502–1507 (2013).

RASMANN, S.; KÖLLNER, T. G.; DEGENHARDT, J.; HILTPOLD, I.; TOEPFER, S.; KUHLMANN, U.; GERSHENZON, J.; TURLINGS T. C. **Recruitment of entomopathogenic nematodes by insect-damaged maize roots.** Nature. 2005 Apr 7;434(7034):732-7. doi: 10.1038/nature03451. PMID: 15815622.

RICO-MARTINEZ, M.; MEDINA, F. G.; MARRERO, J. G.; OSEGUEDA-ROBLES, S. **Biotransformation of diterpenes.** RSC Advances, 4, 10627-10647, 2014.

RODRIGUES, J. **Cariofileno | Molécula da semana**. Fciências: Ciência e Tecnologia, 2018. Disponível em: <<https://www.fciencias.com/2018/11/01/cariofileno-molecula-da-semana/>>. Acesso em: 01 nov. 2021.

SABULAL, B.; DAN, M.; J, A. J.; KURUP, R.; PRADEEP, N.S.; VALSAMMA, R. K.; GEORGE, V. **Caryophyllene-rich rhizome oil of *Zingiber nimmonii* from South India: Chemical characterization and antimicrobial activity**. *Phytochemistry*. 2006 Nov;67(22):2469-73. doi: 10.1016/j.phytochem.2006.08.003. Epub 2006 Sep 14. PMID: 16973189.

SAINT-EXUPÉRIE, A. **Carta a um refém**. 1943.

SANTOS, R. M. G. D. S. **Metabolismo secundário dos fungos *Penicillium sp* e *Fusarium moniliforme* isolados como endofíticos de *Melia azedarach* (Meliaceae)**. Orientador: Professor Doutor Edson Rodrigues Filho. 2003. 453 p. Tese (Pós-Graduação em Química Orgânica) - FAPESP, São Carlos, 2003.

SANTOS, T. T.; VARAVALLO, M. A. **Aplicação de microrganismos endofíticos na agricultura e na produção de substâncias de interesse econômico**. *Semina: Ciências Biológicas e da Saúde*, Londrina, v. 32, n. 2, p. 199-212, jul./dez. 2011.

SANTOS, G. F. **Biotransformação de terpenos naturais por fungos de solos e aproximação à biossíntese de sesquiterpenos isolados do fungo fitopatogênico *Botrytis cinérea***. Tese (Doutorado em Ciências – Química). Universidade Federal de Minas Gerais Instituto de Ciências Exatas Departamento de Química. Belo Horizonte, 2017.

SHAFAGHAT, A. **Antibacterial Activity and GC/MS Analysis of the Essential Oils from Flower, Leaf and Stem of *Origanum vulgare ssp. viride* Growing Wild in Northwest Iran**. *Natural Product Communications*. September 2011. doi:10.1177/1934578X1100600933.

SMITHA, M.S.; SINGH, S.; SINGH, R. **Microbial biotransformation: a process for chemical alterations**. 2017. *J Bacteriol Mycol Open Access*. 2017;4(2):47–51. DOI: 10.15406/jbmoa.2017.04.00085.

SRIVASTAVA, S.; LUQMAN, S.; FATIMA, A.; DAROKAR, M.; NEGI, A. S.; KUMAR, J. & SHANKER, K.; CHANOTIYA, C.; TANDON, S.; KHANUJA, S. **Biotransformation of artemisinin mediated through fungal strains for obtaining**

**derivatives with novel activities.** Nature Precedings. 10.1038/npre.2012.6925.1. (2012).

STAMFORD, T. L. M.; ARAÚJO, J. M.; STAMFORD, N. P. Atividade enzimática de microrganismos isolados do jacatupé (*Pachyrhizus erosus* L. Urban). *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, Campinas, v. 18, n. 4, 1998.

TAKAHASHI, J. A.; LUCAS, E. M. F. **Ocorrência e diversidade estrutural de metabólitos fúngicos com atividade antibiótica.** *Química Nova*, São Paulo, v. 31, n. 7, p. 1807-1813, 2008.

UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (EPA). **Green Chemistry. Basics of Green Chemistry.** 2021. Disponível em: <<https://www.epa.gov/greenchemistry>>. Acesso em: 01 nov. 2021.

VEIGA JUNIOR, V. F.; ROSAS, E. C.; CARVALHO, M. V.; HENRIQUES, M. G.; PINTO, A. C. **Chemical composition and anti-inflammatory activity of copaiba oils from *Copaifera cearensis* Huber ex Ducke, *Copaifera reticulata* Ducke and *Copaifera multijuga* Hayne--a comparative study.** *J Ethnopharmacol.* 2007 Jun 13;112(2):248-54. doi: 10.1016/j.jep.2007.03.005. Epub 2007 Mar 7. PMID: 17446019.

VIEIRA, M. R. **Estudo da biorredução de compostos carbonílicos por linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* sp.** Dissertação (Mestrado em Química), Programa de Pós-Graduação em Química. Blumenau, 2006.

ZAKS, A.; DODDS, D. R. (1997). **Application of biocatalysis and biotransformations to the synthesis of pharmaceuticals.** *Drug Discovery Today*, 2, 513-531.

ZHENG, G. Q.; KENNEY, P. M.; LAM, L.K. **Sesquiterpenes from clove (*Eugenia caryophyllata*) as potential anticarcinogenic agents.** *J Nat Prod.* 1992 Jul;55(7):999-1003. doi: 10.1021/np50085a029. PMID: 1402962.