UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Biotransformação do lapachol por fungos filamentosos – análise proteômica
para identificação da rota de biotransformação**

LUCIANA BARBOSA COITINHO

**Ribeirão Preto
2018**

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Biotransformação do lapachol por fungos filamentosos – análise proteômica
para identificação da rota de biotransformação**

LUCIANA BARBOSA COITINHO

Ribeirão Preto
2018

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Biotransformação do lapachol por fungos filamentosos – análise proteômica
para identificação da rota de biotransformação**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Área de Concentração: Produtos Naturais e Sintéticos.

Orientada: Luciana Barbosa Coitinho

Orientador: Prof. Dr. Hamilton Cabral

Ribeirão Preto
2018

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

COITINHO, L. B. Biotransformação do lapachol por fungos filamentosos – análise proteômica para identificação da rota de biotransformação. 2018. 119f. Tese de Doutorado. Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2018.

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Produtos naturais e sintéticos.

Orientador: Cabral, Hamilton

1. Biotecnologia. 2. *Phanerochaete chrysosporium*. 3. Secretoma 4. Espectrometria de massas 5. Câncer.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Luciana Barbosa Coitinho

Biotransformação do lapachol por fungos filamentosos – análise proteômica para identificação da rota de biotransformação

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas para obtenção do Título de Doutor em Ciências

Área de Concentração: Produtos Naturais e Sintéticos.

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Dedico este trabalho àqueles que me deram a vida e amor incondicional, meus pais Nalziene e Advarte.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Hamilton Cabral pela oportunidade, orientação, compreensão e confiança.

Ao Departamento de Ciências Farmacêuticas e ao Programa de Pós-graduação da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (FCFRP) pela oportunidade concedida.

Ao Prof. Dr. Flavio da Silva Emery pela co-orientação e ao Laboratório de Química Heterocíclica e Medicinal (QHETEM) por terem me recebido tão bem.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela bolsa de doutorado e apoio financeiro sob Processo n° 2014/01497-9. Além disso, pela oportunidade de realização de doutorado sanduíche sob Processo n° 2016/01497-9.

Ao Prof. Dr. Loic Quinton e Prof. Dr. Edwin de Pauw, por terem me orientado durante o doutorado sanduíche na Universidade de Liège – Bélgica;

À Rita e Flavio, pela amizade, por serem como uma família em Ribeirão Preto;

Ao Fernando por ter me ajudado imensamente na minha tese, dedicado tempo e paciência na eterna busca por um composto puro e um bom espectro de RMN!! À Shai, que junto com o Daí faz parte do Bonde, meu muito obrigada pela amizade e companheirismo de vocês!

A todos amigos do Laboratório de Tecnologia Enzimática (LTE), por tornarem o ambiente de trabalho mais agradável. Em especial à Claudinha, Nathalia e Youssef, pela ajuda com o desenvolvimento da tese, pela amizade que vai além do laboratório e pelo companheirismo, sem vocês tudo teria sido mais difícil.

Ao Guilherme, pelo amor e companheirismo.

Às minhas irmãs, Juliana e Tatiane e meu cunhado Emer, por serem inspiração, por serem meus melhores amigos e por sempre poder contar com vocês.

Aos meus pais, Nalziene e Advarte, pela total dedicação às filhas, por terem feito o impossível pela nossa educação. Vocês são minha inspiração e minha motivação, por vocês eu sigo em frente todos os dias;

À Deus, por permitir que tudo isso fosse possível.

“Disse a flor para o pequeno príncipe: é preciso que eu suporte duas ou três larvas se eu quiser conhecer as borboletas.”

Antoine de Saint-Exupéry

RESUMO

COITINHO, L. B. **Biotransformação do lapachol por fungos filamentosos – análise proteômica para identificação da rota de biotransformação.** 2018. 119f. Tese de Doutorado. Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2018.

Biotransformação é uma estratégia promissora para a descoberta de novas moléculas de interesse farmacêutico e industrial. Fungos têm demonstrado habilidade para biotransformar muitas moléculas naturais e sintéticas. Um produto natural muito estudado e de potencial para a indústria farmacêutica é o Lapachol, uma naftoquinona que apresenta uma ampla diversidade de atividades biológicas. Existem na literatura muitos estudos de biotransformação utilizando fungos, mas pouco se sabe sobre como esses microrganismos transformam essas moléculas, e quais proteínas e vias metabólicas estão envolvidas nesses processos. A proteômica tornou-se uma das principais abordagens para analisar e compreender os sistemas biológicos. Dessa forma, o objetivo desse estudo foi compreender o processo de biotransformação do lapachol pelo fungo *Phanerochaete chrysosporium*, identificando os biotransformados, suas atividades biológicas e investigando o proteoma do fungo durante o bioprocessamento a fim de identificar as proteínas e as vias metabólicas envolvidas. O fungo foi capaz de biotransformar o lapachol e gerou dois análogos, um já teve sua estrutura elucidada e é inédita na literatura. O proteoma intracelular foi analisado por eletroforese bidimensional e, após análises quanti e qualitativas, as proteínas selecionadas foram submetidas à espectrometria de massas por MALDI-TOF/TOF. Após análises, com a ferramenta de bioinformática BLAST2GO, determinou-se que as enzimas identificadas hiperabundante e ou exclusivas da condição lapachol estavam principalmente envolvidas com processos de detoxicação e resposta ao estresse oxidativo. Além disso, foram detectadas diversas enzimas com atividade de oxirredução. Além do mais, a técnica de *Shotgun* LC-MS/MS foi realizada. A identificação e quantificação (*label-free*) das proteínas foram feitas através da análise de dados MS/MS brutos pelo *software* MaxQuant/Andromeda. As diferenças nas expressões das proteínas identificadas entre os grupos foram computadas usando o *software* Perseus. Este estudo foi capaz de identificar um total de 221 proteínas intracelulares e 28 extracelulares, sendo que 54 proteínas intracelulares e 4 proteínas extracelulares foram estatisticamente diferentes ou únicas para uma condição (lapachol ou controle). Manganês-peroxidase e β -glicosidase, ambas enzimas com interesse biotecnológico, foram identificadas exclusivas e aumentada, respectivamente na condição lapachol, dessa forma, o lapachol pode ser um bom agente pró-oxidante, pois estimulou a produção dessas enzimas oxidativas. Époxido desidrogenase e álcool desidrogenase parecem estar envolvidas na rota de biotransformação do lapachol, a primeira catalisando a abertura do epóxido e a segunda, reduzindo regioseletivamente carbonilas. O derivado PC01 mostrou-se mais tóxico para células de adenocarcinoma mamário que o lapachol e 3 e 5 vezes menos tóxico para células epiteliais normais que cisplatina e lapachol, respectivamente, mostrando-se um composto promissor. Esta é a primeira vez que a proteômica foi utilizada para investigar a biotransformação do lapachol.

Palavras chaves: *P. chrysosporium*, secretoma, espectrometria de massas, câncer.

ABSTRACT

COITINHO, L. B. **Biotransformation of lapachol by filamentous fungi - proteomic analysis to identification the biotransformation route**. 2018. 119f. Thesis (Doctoral). School of Pharmaceutical Sciences of Ribeirão Preto – University of São Paulo, Ribeirão Preto, 2018.

Biotransformation is a promising strategy to discovery of new molecules with pharmaceutical and industrial interest. Fungi have demonstrated the ability to biotransform many natural and synthetic molecules. A very studied natural product of potential for the pharmaceutical industry is Lapachol, a naphthoquinone with a great diversity of biological activities. There are many biotransformation studies in the literature using fungi but little is known about how these microorganisms transform these molecules, which proteins and metabolic pathways are involved in these processes. Proteomics has become one of the main approaches for analyzing and understanding biological systems. The objective of the present study was to understand the biotransformation process of lapachol by *Phanerochaete chrysosporium*, identifying the biotransformed and its biological activities and investigating the fungus proteome during the bioprocess to identify the proteins and the metabolic pathways involved. After 24 h of bioprocessing, the fungus was able to biotransform lapachol and generated two analogues, one already had its structure elucidated and is unpublished in the literature. The intracellular proteome was analyzed by two-dimensional electrophoresis and, after quantitative and qualitative analyzes, the selected proteins were submitted to MALDI-TOF/TOF mass spectrometry. After analysis, with the BLAST2GO bioinformatics tool, it was determined that the enzymes identified as hyperabundant and exclusive to the lapachol condition were mainly involved with detoxification and oxidative stress response processes. Moreover, several enzymes with oxredution activity were detected. In addition, the Shotgun LC-MS/MS technique was performed on intracellular and extracellular proteins. Identification and quantification (label-free) of the proteins were performed by the analysis of MS/MS raw data using MaxQuant/Andromeda software. Differences in the expressions of the proteins identified between the groups were computed using Perseus software. This study was able to identify a total of 221 intracellular and 28 extracellular proteins. 54 intracellular proteins and 4 extracellular proteins were different or unique statistics for a condition (lapachol or control). Manganese-peroxidase and β -glycosidase, both enzymes of biotechnological interest, were identified exclusively and increased respectively in the lapachol condition, thus, lapachol may be a good pro-oxidant agent, since it stimulated the production of these oxidative enzymes. Epoxide dehydrogenase and alcohol dehydrogenase appear to be involved in the lapachol biotransformation route, the first catalyzing the epoxide opening and the second, regioselectively reducing carbonyls. The PC01 derivative was shown to be more toxic to mammary adenocarcinoma cells than lapachol and approximately 3 to 5 times less toxic to normal epithelial cells than cisplatin and lapachol, showing a promising compaund. To our best knowledge, this is the first time that proteomics has been used to investigate the biotransformation of lapachol.

Key words: *P. chrysosporium*, secretome, mass spectrometry, cancer.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. <i>Phanerochaete chrysosporium</i> em madeira.....	11
Figura 2. Árvore da espécie <i>Tabebuia avellanedae</i> de onde é extraído, de suas cascas, o Lapachol. .	12
Figura 3. Estrutura química do Lapachol: 2- hidroxí-3-(3-metil-2-butenil)-1,4-naftoquinona.....	13
Figura 4. Diferentes metodologias combinadas em estudos proteômicos.....	19
Figura 5. Estratégia de identificação de proteínas utilizando eletroforese bidimensional	20
Figura 6. Esquema da estratégia de identificação de proteínas em uma mistura complexa.....	21
Figura 7. Estratégia sintética para produção do Lapachol a partir da Lausona.	24
Figura 8. Fluxograma das etapas experimentais realizadas para a obtenção do conjunto de dados proteômicos por LC-MS/MS.....	34
Figura 9. Cromatograma do lapachol obtido por CLAE.	40
Figura 10. Espectro de massas do Lapachol, obtido por CG-MS.	41
Figura 11. Cristais dourados de lapachol, obtidos por síntese orgânica tradicional.....	41
Figura 12. Avaliação da toxicidade de diferentes concentrações do Lapachol sobre o crescimento do fungo <i>Penicillium corylophilum</i>	42
Figura 13. Cromatogramas representativos do controle de estabilidade do lapachol no meio de cultura.	44
Figura 14. Estrutura química da dehidro- α -lapachona.	45
Figura 15. Estrutura química da furanoquinona.....	45
Figura 16. Cromatogramas obtidos por GC-MS da biotransformação do lapachol com o fungo <i>A. flavus</i> no terceiro dia de biotransformação.....	46
Figura 17. Cromatogramas obtidos por GC-MS da biotransformação do lapachol com o fungo <i>A. fumigatus</i>	47
Figura 18. Cromatogramas obtidos por GC-MS da biotransformação do lapachol com o fungo <i>F. oxysporum</i> após 72 h de bioprocesso.	48
Figura 19. Estrutura química do norlapachol.	49
Figura 20. Cromatogramas obtidos por GC-MS da biotransformação do lapachol com o fungo <i>P. variotti</i>	50
Figura 21. Cromatogramas obtidos por GC-MS da biotransformação do lapachol com o fungo <i>P. corylophilum</i>	51
Figura 22. Estrutura química do isolapachol.....	51
Figura 23. Cromatograma obtido por GC-MS após 36 h de biotransformação do lapachol com o fungo <i>R. miehei</i>	52
Figura 24. Cromatogramas obtidos por CG-MS da biotransformação do lapachol com o fungo <i>R. microsporus</i> após 48 h de bioprocesso.....	53
Figura 25. Cromatogramas obtidos por GC-MS da biotransformação do lapachol com o fungo <i>T. asperellum</i>	54
Figura 26. Cromatogramas obtidos por CG-MS da biotransformação do lapachol com o fungo <i>P. chrysosporium</i>	55

Figura 27. Cromatogramas obtidos por CG-MS da biotransformação do lapachol com o fungo <i>P. chrysosporium</i> , após 24h de biotransformação.	56
Figura 28. Estrutura proposta do derivado PC01 gerado a partir da biotransformação do lapachol com o fungo <i>P. chrysosporium</i>	57
Figura 29. Espectro de RMN obtido de ^1H obtido em CDCl_3 a 300 MHz para o composto PC01....	58
Figura 30. Representação da correlação observada no RMN HMBC para o derivado PC01	59
Figura 31. Espectro de massas EI (CG-MS) do derivado PC01.	60
Figura 32. Fotos dos géis bidimensionais representativos das proteínas extraídas do micélio de <i>P. chrysosporium</i> submetido ao bioprocessamento por 24 horas.....	62
Figura 33. Gráfico da distribuição (em porcentagem) de proteínas identificadas por grupos de função molecular, confeccionadas através de ferramentas de bioinformática (Blast2GO).....	68
Figura 34. Gráfico da distribuição (em porcentagem) de proteínas identificadas por participação em processos biológicos GO, obtidos através de análise de bioinformática (Blast2GO).	69
Figura 35. <i>Multi scatter plot</i> mostrando a correlação entre os dados.....	73
Figura 36. Diagrama de Venn mostrando as replicatas biológicas de cada condição.	73
Figura 37. Diagrama de Venn mostrando a distribuição das proteínas intracelulares nas condições lapachol e controle.	74
Figura 38. <i>Volcano plot</i> das proteínas intracelulares quantificadas do conjunto de dados de Controle versus Lapachol.....	75
Figura 39. Gráfico gerado a partir das análises do software Blast2GO mostrando a distribuição das proteínas diferencialmente expressas e exclusivas de acordo com as suas funções moleculares.	88
Figura 40. Gráfico gerado a partir das análises do <i>software</i> Blast2GO mostrando a distribuição das classes enzimáticas das proteínas intracelulares expressas diferencial e exclusivamente nas condições lapachol e controle.	89
Figura 41. Gráfico mostrando a distribuição das proteínas intracelulares diferencialmente expressas nos processos biológicos pelo software Blast2GO.....	90
Figura 42. Diagrama de Venn mostrando as replicatas biológicas de cada condição.	93
Figura 43. Diagrama de Venn mostrando a distribuição das proteínas extracelulares identificadas nas condições controle e lapachol	93
Figura 44. Atividade proteolítica durante a biotransformação do lapachol após 24 horas (24hs) e do controle (24hs+), utilizando o substrato FRET.	96
Figura 45. Esquema sugerido de formação do composto PC01 a partir da biotransformação do lapachol por <i>P. chrysosporium</i>	97

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Alguns marcos do uso de biotransformações e processos biocatalíticos relevantes industrialmente.	3
Tabela 2. Algumas vantagens e desvantagens do uso de catalisadores biológicos em síntese orgânica.	5
Tabela 3. Classificação das enzimas utilizadas em reações de biocatálise e percentagem de utilização em bioprocessos.	7
Tabela 4. Vantagens e desvantagens do uso de enzimas e microrganismos como catalisadores em biotransformação.	9
Tabela 5. Propriedades biodegradativas de <i>P. chrysosporium</i>	11
Tabela 6. Ocorrência do lapachol em famílias e espécies de plantas.	12
Tabela 7. Produtos de biotransformação do Lapachol por fungos filamentosos.	15
Tabela 8. Concentrações de Lapachol escolhidas para os processos de biotransformações. ..	42
Tabela 9. Dados de RMN ^1H , ^{13}C e HMBC para o derivado PC01.	58
Tabela 10. Proteínas intracelulares do processo de biotransformação do lapachol e do controle após 24 h de cultivo, identificadas pelo Mascot.	63
Tabela 11. Proteínas intracelulares identificadas aumentadas e exclusivas da condição Lapachol.	76
Tabela 12. Proteínas intracelulares identificadas diminuídas na condição lapachol e exclusivas da condição controle.	77
Tabela 13. Proteínas intracelulares identificadas sem diferenças estatisticamente significantes.	80
Tabela 14. Proteínas do secretoma identificadas reduzidas na condição lapachol e exclusivas da condição controle.	94
Tabela 15. Proteínas extracelulares identificadas sem diferença estatística significativa.	95
Tabela 16. Atividade tripanocida dos compostos PC01, lapachol e o do fármaco de referência benzonidazol.	99
Tabela 17. Concentração inibitória de 50% das células de epitélio mamário MCF10, após 48 horas de tratamento na presença de cisplatina, lapachol ou biotransformado.	100
Tabela 18. Concentração inibitória de 50% das células de adenocarcinoma mamário MCF7, após 48 horas de tratamento na presença de cisplatina, lapachol ou biotransformado.	100

LISTA DE SIGLAS

2-DE	Eletroforese bidimensional
ACN	Acetonitrila
CCD	Cromatografia de camada delgada
CG	Cromatografia gasosa
CG-MS	Cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massa
DMSO	Dimetilsulfóxido
DTT	Ditiotreitol
IAA	Iodoacetamida
<i>J</i>	Constante de acoplamento (em Hz)
LC	Cromatografia líquida
LC-MS	Cromatografia líquida acoplada espectrometria de massas
MS	Espectrometria de massas
MS/MS	Espectrometria de massas em <i>tandem</i>
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide
NCBI	National Center for Biotechnology Information
PDA	Ágar dextrose batata
pI	Ponto isoelétrico
RMN	Ressonância magnética nuclear
RMN ¹³ C	Ressonância magnética nuclear de carbono 13
RMN ¹ H	Ressonância magnética nuclear de hidrogênio
rpm	Rotações por minuto
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
TFA	Ácido trifluoracético
UV	Ultravioleta

LISTA DE SÍMBOLOS

α	Alfa
β	Beta
δ	Deslocamento químico (ppm)
®	Marca Registrada

SUMÁRIO

RESUMO	i
ABSTRACT.....	ii
LISTA DE FIGURAS.....	iii
LISTA DE TABELAS.....	v
LISTA DE SIGLAS.....	vi
LISTA DE SÍMBOLOS	vii
1. Introdução.....	1
2. Revisão Bibliográfica	3
2.1. Biotransformações	3
2.2. Uso de fungos filamentosos e enzimas em processos de biotransformação	6
2.3. O fungo filamentoso <i>Phanerochaete chrysosporium</i>	10
2.4. Lapachol.....	12
3.1. Estudos de Proteômica.....	18
3. Objetivos	23
4. Metodologia.....	24
4.1. Obtenção do Lapachol	24
4.2. Microrganismos utilizados no estudo	24
4.3. Manutenção dos fungos filamentosos.....	25
4.4. Verificação dos efeitos tóxicos do Lapachol sobre os fungos filamentosos.....	25
4.5. Processos de Biotransformação	25
4.5.1. Processo de biotransformação com pré-cultivo.....	26
4.5.2. Biotransformação com cultivo direto	26
4.6. Obtenção das frações orgânicas das fermentações	26
4.7. Avaliação dos perfis químicos das frações orgânicas.....	27
4.8. Isolamento do composto biotransformado.....	27
4.9. Análise por espectrometria de massas de alta resolução (HMRS)	28
4.10. Análises de Ressonância Magnética Nuclear (RMN).....	28
4.11. Análises proteômicas utilizando a técnica de 2D-SDS-PAGE.....	28
4.11.1. Preparação das amostras do proteoma intracelular.....	28
4.11.2. Precipitação das proteínas intracelular para análise em 2DE.....	29
4.11.3. Eletroforese bidimensional das proteínas intracelulares	29
4.11.4. Digestão trípica e espectrometria de massas (MALDI-ToF/ToF).....	32
4.11.5. Determinação das sequências e análise funcional das proteínas identificadas....	32
4.12. Análises proteômicas pela técnica de LC-MS/MS	33
4.12.1. Preparo das amostras	34
4.12.2. Análise de espectrometria de massas.....	35
4.12.3. Identificação das proteínas e análises estatísticas	35
4.13. Avaliação da atividade proteolítica com substrato peptídico com supressão intramolecular de fluorescência (FRET).....	36
4.14. Ensaios biológicos com o composto biotransformado PC01.....	37

4.14.1. Avaliação da atividade biológica contra <i>Trypanosoma cruzi</i>	37
4.14.2. Avaliação da inibição da proliferação de células cancerígenas.....	38
5. Resultados e Discussão.....	40
5.1. Lapachol.....	40
5.2. Determinação da concentração de Lapachol utilizada no processo de biotransformação	41
5.3. Processos de Biotransformação do Lapachol (Screening).....	43
5.3.1. Controle de estabilidade do lapachol.....	44
5.3.2. Biotransformação do lapachol com o fungo <i>Aspergillus flavus</i>	46
5.3.3. Biotransformação do lapachol com o fungo <i>Aspergillus fumigatus</i>	47
5.3.4. Biotransformação do lapachol com o fungo <i>Fusarium oxysporum</i>	48
5.3.5. Biotransformação do lapachol com o fungo <i>Paecilomyces variotii</i>	49
5.3.6. Biotransformação do lapachol com o fungo <i>Penicillium corylophilum</i>	50
5.3.7. Biotransformação do lapachol com o fungo <i>Rhizomucor miehei</i>	51
5.3.8. Biotransformação do lapachol com o fungo <i>Rhizopus microsporus</i>	52
5.3.9. Biotransformação do lapachol com o fungo <i>Trichoderma asperellum</i>	53
5.3.10. Biotransformação do lapachol com o fungo <i>Phanerochaete chrysosporium</i>	54
5.4. Isolamento dos produtos da biotransformação do lapachol pelo fungo <i>P. chrysosporium</i>	56
5.4.1. Determinação da estrutura do Composto PC01.....	57
5.5. Análises das proteínas intracelulares pela técnica de 2DE	61
5.6. Análises proteômica pela técnica de LC-MS/MS	72
5.6.1. Proteínas Intracelulares.....	73
5.6.2. Proteínas extracelulares (Secretoma).....	92
5.7. Avaliação de atividade proteolítica intra e extracelular.....	96
5.8. Sugestão de rota de biotransformação do lapachol pelo fungo <i>P. chrysosporium</i>	97
5.9. Atividades biológicas do composto PC01	99
5.9.1. Atividade tripanocida	99
5.9.2. Atividade anticâncer de mama	100
6. Conclusões.....	102
8. Referências.....	104
APÊNDICE A	Erro! Indicador não definido.
APÊNDICE B.....	Erro! Indicador não definido.
APÊNDICE C	Erro! Indicador não definido.
APÊNDICE D	Erro! Indicador não definido.
APÊNDICE E.....	Erro! Indicador não definido.
APÊNDICE F.....	Erro! Indicador não definido.
APÊNDICE G	Erro! Indicador não definido.
APÊNDICE H	Erro! Indicador não definido.

1. Introdução

Estudos de biotransformações podem ser realizados para a obtenção de novos produtos e/ou descoberta de novas enzimas com potencial para uso industrial e/ou biotecnológico. Um exemplo de agentes biotransformadores são os fungos filamentosos, que, sendo organismos bastante versáteis, são amplamente utilizados para a produção de enzimas (HERRERA BRAVO DE LAGUNA; TOLEDO MARANTE; MIOSO, 2015; LERESCHE; MEYER, 2006).

As biotransformações com fungos filamentosos podem ser utilizadas para, por exemplo, modificações de moléculas naturais e ou sintéticas com o objetivo de produzir derivados com maior valor agregado para a indústria e/ou com atividades biológicas interessantes para a indústria farmacêutica (PARSHIKOV; WOODLING; SUTHERLAND, 2015; VENISETTY; CIDDI, 2003).

A seleção de microrganismos apresenta-se como uma das principais etapas nos processos de biotransformação (DE CARVALHO et al., 2010; TONIAZZO et al., 2006). Dessa forma, estudos de *screening*, como o realizado nesse trabalho, são fundamentais para o sucesso dos estudos de biotransformação.

Um produto natural de grande interesse para a indústria farmacêutica é o Lapachol, uma naftoquinona extraída de árvores do gênero *Tabebuia* (HUSSAIN et al., 2007), que possui diversas atividades biológicas, com destaque para sua atividade antitumorogênica. Essa atividade tem levado o Lapachol a ser considerado um bom candidato para transformações químicas e derivatizações, a fim de desenvolver compostos líderes através de estudos da relação entre estrutura química e atividade biológica (HUSSAIN; GREEN, 2017).

Dessa forma, novos análogos e/ou derivados do Lapachol podem ser obtidos por biotransformação com fungos filamentosos (SILVA et al., 2016). Nesse caso, o fungo utiliza enzima(s) que podem ser do seu metabolismo básico ou serem produzidas em decorrência da presença do Lapachol. O produto de uma reação enzimática, muitas das vezes, pode ser difícil de ser obtido por vias sintéticas orgânicas tradicionais, o que torna os derivados produzidos por biotransformação ainda mais interessantes (ALCÁNTARA, 2017; SHAH et al., 2014).

Uma vez biotransformado, surge um importante questionamento sobre quais enzimas e vias metabólicas o fungo utilizou para metabolizar/transformar essa molécula, já que tais vias podem ser futuramente de grande importância para outras transformações químicas e de interesse biotecnológico.

Uma maneira de compreender o metabolismo do fungo em um dado momento (no caso, durante o processo de biotransformação), através da identificação das proteínas presentes, e consequentemente relacionar as enzimas que podem estar envolvidas no processo de biotransformação do Lapachol, é por meio de estudos proteômicos (MARTINS et al., 2017).

Nesse trabalho, a biotransformação do lapachol por fungos filamentosos foi avaliada, em especial, pelo fungo *Phanerochaete chrysosporium*, objetivando principalmente identificar as vias metabólicas e ou enzimas utilizadas pelo fungo para a biotransformação dessa naftoquinona. Além disso, foi realizada a identificação de um biotransformado e a avaliação de algumas de suas atividades biológicas.

2. Revisão Bibliográfica

2.1. Biotransformações

As biotransformações podem ser definidas como o uso de biocatalisadores naturais - enzimas - para a transformação de compostos orgânicos não naturais (FABER, 2011). A definição da biocatálise é simplesmente o uso de enzimas na síntese química. Ambos os termos são usados para descrever a aplicação de enzimas, tanto em preparações isoladas ou em células completas (células nativas ou células hospedeiras com proteínas recombinantes) em um dado programa sintético, com o objetivo de aproveitar a precisão enzimática em termos de quimiosseletividade (transformação seletiva de um grupo funcional na presença de outros), regioseletividade (formação de um regioisômero em relação a outro) ou estereosseletividade (formação de um estereoisômero sobre outro) (ALCÁNTARA, 2017).

Os processos de biotransformação são usados pela humanidade há milhares de anos. Por exemplo, a biotransformação de etanol em ácido acético (vinagre) por *Acetobacter* foi provavelmente desenvolvida concomitantemente com a produção de etanol a partir de açúcares fermentecíveis pelos nossos ancestrais na Babilônia (Mesopotâmia) (LERESCHE; MEYER, 2006).

A tabela 1 mostra alguns marcos no uso das biotransformações durante a história, exemplificando, assim, a grande utilidade destes processos para a indústria.

Tabela 1. Alguns marcos do uso de biotransformações e processos biocatalíticos relevantes industrialmente.

<i>Ano</i>	<i>Processo</i>
500 a.C.	Produção do Vinagre
1897	E. Buchner descobre enzimas de levedura que transformam açúcar em álcool
1934	Bioxidação regioseletiva de sorbitol a sorbose para a síntese de Vitamina C
1940	Inversão de sacarose usando uma invertase
1950	Bioconversão de esteroides
1970	Hidrólise da penicilina em ácido 6-aminopenicilânico
1974	Isomerização de glicose a frutose com glicose-isomerase imobilizada
1985	Processo enzimático para a produção de acrilamida

Ano	Processo
1990	Hidrólise por protease (tripsina) de insulina suína para insulina humana
1995	3000 ton de plantas/ano para a biotransformação de nicotinonitrila em nicotinamida

a.C: antes de cristo

Fonte: Adaptado de (LERESCHE; MEYER, 2006).

A produção de fármacos e hormônios esteroidais é um dos melhores exemplos da aplicação bem sucedida da tecnologia microbiana em processos industriais de larga escala (DONOVA; EGOROVA, 2012; FERNANDES et al., 2003). Nas décadas de 50-60, destacam-se os estudos de biotransformação para a síntese de corticosteroides utilizando fungos. A reação de 11α -hidroxilação da progesterona em uma única etapa usando *Rhizopus arrizus*, descrita em 1952, é muito importante economicamente para a síntese de hormônios adrenocorticais (corticosterona, cortisona e hidrocortisona) e permitiu interessantes possibilidades na preparação de derivados bioativos (prednisona, prednisolona e hidrocortisona) (BORGES et al., 2009)

Além disso, há vários exemplos de biotransformações bem sucedidas utilizadas pela indústria, como por exemplo a produção de acrilamida, com produção anual de 100 mil toneladas, e da niacina (Vitamina B3), ambas com biocatálise realizada pela bactéria *Rhodococcus rhodochrous* (DIAS; FERREIRA; CUNHA, 2012).

O uso de biotransformações aumentou consideravelmente nas últimas décadas, complementando a síntese química clássica em várias indústrias, incluindo produtos farmacêuticos, produtos químicos finos ou alimentos (ALCÁNTARA, 2017; SHELDON; WOODLEY, 2018). Destaca-se, por exemplo, a aplicação na indústria farmacêutica para o desenvolvimento de fármacos, principalmente quando se deseja obter fármacos enantiomericamente puros (LOUGHLIN, 2000).

O processo de biotransformação oferece algumas vantagens sobre a síntese química tradicional: (i) o processo pode ser realizado em condições suaves, como temperatura e pressão ambientes; (ii) possui estereoseletividade, permitindo a produção de compostos enantiomericamente puros (BORGES et al., 2008), eliminando os processos de separação e purificação dos compostos; dessa forma é possível diminuir os custos da obtenção de novas moléculas; (iii) pode-se ainda acrescentar que esta técnica se enquadra dentro da “química verde” que é a aplicação de processos e produtos químicos para reduzir ou eliminar o uso ou a geração de substâncias perigosas à saúde humana e ao meio ambiente (SHELDON; WOODLEY, 2018).

São desvantagens apresentadas pelas reações de biotransformação, a instabilidade dos microrganismos e/ou enzimas às temperaturas e ao pH extremos (BOMMARIUS; RIEBEL, 2005). Além disso, a maior atividade catalítica ocorre em meio aquoso, dificultando a disposição de substratos hidrofóbicos à ação dos biocatalisadores. Estas desvantagens podem ser contornadas com a utilização de microrganismos extremófilos resistentes a condições de pH e temperaturas extremas e a utilização de sistemas bifásicos (GOMES; STEINER, 2004).

Algumas das vantagens e desvantagens do uso de biotransformações como catalisadores de reações químicas estão sumarizadas na tabela 2.

Tabela 2. Algumas vantagens e desvantagens do uso de catalisadores biológicos em síntese orgânica.

<i>Vantagens</i>	<i>Desvantagens</i>
Catalisadores eficientes	Sensíveis às condições energéticas
Ecologicamente corretos – Química verde	Difíceis de serem recuperados no final da reação – no caso de enzimas isoladas
Seletividade: quimiosseletividade, regioseletividade ou diastereosseletividade e enantioseletividade.	
Reações em meios aquosos	Insolubilidade em água dos substratos
Condições reacionais suaves	

Fonte: elaborada pela autora.

Metodologicamente, o processo de biotransformação envolve a adição de substrato durante ou após a fase de crescimento da cultura microbiana. A formação do complexo enzimático microbiano, capaz de metabolizar os nutrientes, ocorre durante a fase de crescimento. Nessa fase, a adição do composto de partida (substrato alvo) induz a expressão de enzimas que normalmente não são produzidas pelo microrganismo, sendo maiores as chances de um resultado positivo, ou seja, com a geração de um novo produto (HANSON, 1992).

Se o substrato for adicionado após o desenvolvimento completo do microrganismo, o microrganismo é inicialmente cultivado sob condições ótimas e a biomassa é separada por centrifugação ou filtração. Em seguida, as células são transferidas para outro meio de cultura simples e o substrato é adicionado. A composição simples do meio de cultura facilita o isolamento do produto, porém, a transformação depende de enzimas já expressas, podendo não ocorrer de maneira precisa (HANSON, 1992).

As biotransformações são em geral realizadas em meio aquoso ou em sistemas com a presença de água, dessa forma, torna-se necessária a extração líquido-líquido com solvente orgânico para análise dos produtos formados. Para esta técnica é preciso que o solvente extrator forme uma fase distinta com a fase aquosa e efetue a extração adequada dos reagentes e produtos do meio reacional (PAVIA et al., 2013; SCHAEFER, 2015)

Independente da técnica de extração utilizada, a formação ou não dos produtos oriundos das reações biocatalisadas por microrganismos podem ser monitoradas por diversas técnicas, entre elas a ressonância magnética nuclear (RMN), a polarimetria, e, com destaque, a cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-MS) (SCHAEFER, 2015).

A RMN de hidrogênio (^1H) e de carbono-13 indicam a disposição do esqueleto hidrocarbônico, ou seja, os diferentes ambientes químicos dos átomos de hidrogênio e carbono na estrutura. A RMN é uma das técnicas espectroscópicas mais poderosas utilizada no estudo estrutural e de dinâmica de compostos orgânicos em solução, utilizada não somente para determinar a estrutura de um composto mas, também, para verificar o teor de pureza de uma determinada amostra e acompanhar o rendimento de uma reação de síntese (PAULI; JAKI; LANKIN, 2005).

A espectroscopia de massas, por sua vez, além de fornecer dados que permitam determinar a fórmula química dos compostos, pode contribuir também na elucidação estrutural através dos padrões de fragmentação inerentes às diferentes funções orgânicas (RIBEIRO; DE SOUZA, 2007).

A cromatografia gasosa acoplada a massas (CG-MS) é uma ferramenta instrumental muito útil para a separação e análise de compostos orgânicos, sendo bastante utilizada para testar a pureza de substâncias e para separar componentes de misturas, para determinar as quantidades relativas de cada componente de uma mistura e para a identificação de compostos, comparando-os com seus respectivos padrões (PAVIA et al., 2013). Os espectros MS gerados podem ser comparados a Bibliotecas Espectrais para identificação dos compostos sendo a NIST e a Willey, as mais usuais e difundidas.

2.2. Uso de fungos filamentosos e enzimas em processos de biotransformação

Vários microrganismos na natureza podem ser utilizados em processos de biotransformação para modificar e/ou degradar uma gama de moléculas orgânicas complexas

produzindo novas moléculas de interesse humano (DE CONTI; RODRIGUES; MORAN, 2001; FARNET; ZAZOPOULOS, 2005).

Os microrganismos (fungos, leveduras ou bactérias) selecionados podem ser identificados através de análise de dados de literatura e obtidos a partir de coleções de culturas de instituições de pesquisa ou serem identificados através de um processo empírico de seleção (triagem) a partir do ambiente (GLASER; NIKAIDO, 2007; MOREIRA, 2009). Nesta triagem realizam-se experimentos em pequena escala com os microrganismos selecionados e analisam-se os metabólitos produzidos frente a um experimento controle sem o substrato escolhido.

Assim, após a identificação do microrganismo de interesse, pode-se trabalhar com as enzimas envolvidas na via metabólica de biotransformação ou mesmo, trabalhar com células íntegras.

O uso de enzimas como catalisadores em biotransformação é um método atrativo já que essas macromoléculas podem ser purificadas ou isoladas e possuem propriedades interessantes como alta eficiência catalítica e seletividade, além de diferentes capacidades catalíticas, exemplificadas na Tabela 3 (CHOI; HAN; KIM, 2015; SHELDON; PEREIRA, 2017).

Tabela 3. Classificação das enzimas utilizadas em reações de biocatálise e percentagem de utilização em bioprocessos.

<i>Classe</i>	<i>Reação Catalisada</i>	<i>Utilização</i>
Hidrolases	Hidrólises com formação de ésteres, amidas, lactonas, lactamas, epóxidos, anidridos, glicosídeos, nitrilas.	65%
Oxidoredutases	Oxidação-redução: oxigenação de C-H, C-C, C=C.	25 %
Transferases	Transferência de grupos aldeídos, cetônicos, acil, metil.	5 %
Liasas	Adição-eliminação de moléculas C=C, C=N, C=O.	5%
Isomerases	Isomerização, racemização, epimerização.	1%
Ligases	Formação-clivagem de C-O, C-S, C-N, C-C.	1%

Fonte: Adaptada de (FABER, 2011).

As hidrolases são a classe de enzimas mais utilizadas em processos de biotransformação pela indústria (FABER, 2011; FERRER et al., 2015). Essas enzimas catalisam um número significativo de reações hidrolíticas ou de formação de ligação reversa, dependendo da especificidade de cada subclasse de enzimas dessa classe. O fato de não

requererem cofatores e a capacidade de trabalhar, não apenas em sistemas aquosos, mas também em solventes orgânicos, tornaram possível sua incorporação em rotas sintéticas, atraindo a atenção de muitos químicos orgânicos e inorgânicos devido ao seu fácil manuseio (LÓPEZ-IGLESIAS; GOTOR-FERNÁNDEZ, 2015).

Devido às características das hidrolases apresentadas acima, foi possível o desenvolvimento de métodos eficientes para a produção de moléculas orgânicas interessantes, como álcoois, aminas, ésteres, amidas, epóxidos, nitrilas, entre outros. A aplicação de hidrolases foi adaptada para uma perspectiva industrial, recebendo atenção especial na síntese de agroquímicos, produtos farmacêuticos e outros compostos de alto valor agregado (LÓPEZ-IGLESIAS; GOTOR-FERNÁNDEZ, 2015). As lipases são as hidrolases mais frequentemente empregadas em aplicações industriais devido à sua alta atividade e estabilidade de solventes inorgânicos (SUN et al., 2017b).

Com 25 % do total de utilizações, as oxidoreduktases são a segunda maior classe de enzimas utilizadas como biocatalisadores em transformações químicas (FABER, 2011). Essas enzimas são dependentes de cofatores e assim, as reações redox biocatalíticas são frequentemente realizadas usando biocatalisadores de células inteiras, pois as células contêm os cofatores redox recicláveis e são menos suscetíveis à desnaturação do que as enzimas isoladas (MARTÍNEZ et al., 2017; MILNER; MAGUIRE, 2012).

As oxidoreduktases usam uma variedade de receptores de elétrons e um grande número de substratos doadores de elétrons, produzindo muitos produtos de interesse industrial (GYGLI; J.H. VAN BERKEL, 2015). Os fungos, em primeiro lugar os basidiomicetos da podridão-da-madeira (*rot-fungi*), estão envolvidos na degradação oxidativa da biomassa lignocelulósica, reciclando o carbono fixado pela fotossíntese das plantas através de uma série de oxidoreduktases secretadas e com alto potencial redox (GYGLI; J.H. VAN BERKEL, 2015; MARTÍNEZ et al., 2017).

Oxidoreduktases fúngicas de interesse biotecnológico incluem tipicamente: i) peroxidases e peroxigenases contendo heme, sendo ativadas por H_2O_2 como único aceptor de elétrons; ii) oxidases e desidrogenases contendo flavina, sendo ativadas por O_2 e outros oxidantes como Fe^{3+} e quinonas; e iii) oxidases e monooxigenases contendo cobre, sendo ativadas por O_2 , este último com um mecanismo de ativação mais complexo (MARTÍNEZ et al., 2017).

Liasas são enzimas que catalisam a remoção de grupos dos seus substratos por outros meios que não hidrólise e oxidação e geram novas ligações duplas. A aplicação mais proeminente de liasas é a hiperprodução de L-3,4-hidroxifenilalanina (L-DOPA), fármaco

predominantemente utilizado para o tratamento da doença de Parkinson, que utilizou células inteiras de *Erwinia herbicola* expressando a tirosina fenol-liase. As liases também encontram outras aplicações na síntese de intermediários farmacêuticos (SUN et al., 2017).

A descoberta de novas atividades catalíticas é uma tarefa desafiadora na química orgânica e na bioquímica e as enzimas podem contribuir para o projeto de rotas sintéticas eficientes e ambientalmente amigáveis (LÓPEZ-IGLESIAS; GOTOR-FERNÁNDEZ, 2015).

Comparando com o uso de enzimas isoladas em biotransformações (Tabela 4), as células íntegras de microrganismos representa uma alternativa mais acessível e mais atrativa economicamente, uma vez que, como já mencionado, esse sistema contém os cofatores necessários e os caminhos metabólicos para sua regeneração, evitando a necessidade de suplementação (DIAS; FERREIRA; CUNHA, 2012; JOSINEIDE SILVA MOREIRA, 2009; MILNER; MAGUIRE, 2012).

Tabela 4. Vantagens e desvantagens do uso de enzimas e microrganismos como catalisadores em biotransformação.

<i>Fonte</i>	<i>Vantagens</i>	<i>Desvantagens</i>
<i>Células íntegras</i>	Baixo custo; Regeneração natural de cofatores; Estabilidade operacional.	Instáveis em solvente orgânico; Ocorrência de reações secundárias.
<i>Enzimas Isoladas</i>	Permite a permeabilidade do substrato na membrana da célula; Elevada eficiência catalítica; Elevada estabilidade em solvente orgânico; Facilidade de isolamento do(s) produto(s).	Processo dispendioso; Utilização de cofatores (NADP, NAD, ATP, K ⁺ , Fe ²⁺ ou Fe ³⁺); Poucos produtores de enzimas

Fonte: Elaborada pela autora, adaptada de (DIAS; FERREIRA; CUNHA, 2012)

Os fungos são os sistemas celulares mais frequentemente estudados para a aplicação nas reações de biotransformação, superando as células vegetais ou animais, pois são organismos amplamente conhecidos em relação às suas capacidades de decomposição de matéria orgânica, apresentam um crescimento rápido, são de fácil manejo e os meios de cultura utilizados são normalmente bem caracterizados quimicamente (PAPAGIANNI, 2004; MA, LIU, LIANG, & ZHANG, 2011). Especificamente, o uso de fungos filamentosos se

destaca na indústria de biotecnologia, onde são usados para produzir uma ampla variedade de produtos, desde agentes terapêuticos humanos como antibacterianos e antifúngicos até especialidades químicas como enzimas comerciais e ácidos orgânicos, que juntos representam bilhões de dólares anuais em vendas (KIM; NANDAKUMAR; MARTEN, 2007).

Para que o processo de biotransformação utilizando fungos ocorra, o substrato deve entrar em contato com as enzimas produzidas pelo microrganismo. Essas enzimas podem ser extracelulares, estando dispersas no meio de fermentação, ou intracelulares, presentes no interior da célula. Nesse último caso, o substrato deve ser capaz de atravessar a parede celular do microrganismo para que ocorra a biotransformação (LOUGHLIN, 2000).

Além do uso das biotransformações utilizando fungos para reações biocatalíticas e geração de novos compostos, o uso de fungos como modelo de metabolismo de fármacos é uma abordagem que tem ganhado destaque na literatura. Nesse caso, modelos microbianos constituem uma alternativa ou, pelo menos, um complemento à utilização de sistemas de origem animal, desde que possam imitar o metabolismo dos mamíferos e proporcionar informações pertinentes sobre o destino metabólico do fármaco. Smith & Rosazza, na década de 1970, concluíram que o sistema de biotransformação dos microrganismos é muito semelhante ao dos mamíferos na fase I (MURPHY, 2015).

Além de servirem como modelos de metabolismo de fármacos em mamíferos, os microrganismos são facilmente escalonáveis e, portanto, podem ser usados para a produção de metabólitos de fármacos, que podem ser exigidos como padrões autênticos ou em programas de triagem de toxicidade, durante o desenvolvimento de medicamentos. A abordagem microbiológica é mais ecologicamente correta do que a alternativa sintética, mais eficiente e econômica do que o uso de preparações microssômicas a partir de hepatócitos e não levanta questões éticas como aquelas encontradas na dosagem em animais (ASHA; VIDYAVATHI, 2009; MURPHY, 2015).

As transformações microbianas têm se tornado um instrumento importante, tanto para prever a presença e a natureza do metabólito, como para prepará-los em maior quantidade para a elucidação de sua estrutura e estudos toxicológicos (MURPHY, 2015).

2.3. O fungo filamentoso *Phanerochaete chrysosporium*

P. chrysosporium (Figura 1) é um membro do filo Basidiomycota sendo o fungo mais estudado do grupo de fungos conhecidos como “podridão branca”, os quais são conhecidos pela sua habilidade de degradar lignina de madeira e descolorir a pigmentação marrom

associada a esse polímero. Metabolicamente, o *P. chrysosporium* também pode produzir inúmeros compostos metabólicos secundários e degradar vários compostos orgânicos, sendo largamente utilizado em processos de biorremediação (Tabela 5) (SINGH; CHEN, 2008).

Este fungo emprega uma extensa coleção de enzimas hidrolíticas, que incluem celulases e hemicelulases para degradar polissacarídeos e enzimas oxidativas extracelulares, que incluem lignina peroxidases (LiP) e manganês peroxidases (MnP) para despolimerizar lignina e abrir anéis fenílicos (RAY et al., 2012).

Devido ao seu grande potencial biotecnológico, principalmente em relação a produção de enzimas, esse fungo tem sido intensivamente estudado.

Figura 1. *Phanerochaete chrysosporium* em madeira.

Fonte: extraída de <https://microbewiki.kenyon.edu/images/c/c1/Whiterot.jpg>

Tabela 5. Propriedades biodegradativas de *P. chrysosporium*.

<i>Degrada</i>	<i>Enzima produzida</i>
Ligninas alcalinas de pinho e palha	Lignina peroxidases
Resíduos de fábricas de papel e celulose	Manganês peroxidases
Álcool Veratril e seu éter metílico	Glioxal oxidase
Descoloriza as águas têxteis residuais	Peroxidases
Triclorofenol, petaclorofenol, tolueno	Xilanases
Vermelho Congo, Amaranto, Atrazina,	Celulases
Azocorantes	Succinimidas
DDT, benzeno, tolueno, xileno	Aril-álcool desidrogenase
Ácido húmico	Celobiose desidrogenase

Fonte: (SINGH; CHEN, 2008).

2.4. Lapachol

O lapachol é uma naftoquinona natural, extraído de árvores de várias espécies da família *Bignoniaceae*, especialmente do gênero *Tabebuia* (Figura 2), mas também de outras famílias, como *Verbenaceae*, *Proteaceae*, *Leguminosae*, *Sapotaceae*, *Scrophulariaceae* e *Malvaceae* (Tabela 6) (HUSSAIN et al., 2007).

Figura 2. Árvore da espécie *Tabebuia avellanedae* de onde é extraído, de suas cascas, o Lapachol.

Fonte: (HUSSAIN et al., 2007).

Tabela 6. Ocorrência do lapachol em famílias e espécies de plantas.

<i>Família</i>	<i>Espécies</i>
<i>Bignoniaceae</i>	<i>Tabebuia flavescens</i> Benth; <i>T. guayacan</i> Hemsl; <i>T. avellanedae</i> ; <i>T. serratifolia</i> ; <i>T. rosa</i> T. bata; <i>T. pentaphylla</i> ; <i>T. heptaphylla</i> ; <i>Haplophragma adenophyllum</i> ; <i>Heterophragma adenophyllum</i> ; <i>Kigelia pinnata</i> ; <i>Phyllarthron comorense</i> ; <i>Radermachera sinica</i> ; <i>Paratecoma peroba</i> ; Kuhl; <i>Tecoma araliaceae</i> ; <i>T. undulata</i> ; <i>Stereospermum suaveolens</i> .
<i>Verbenaceae</i>	<i>Tectona grandis</i> ; <i>Avicennia tomentosa</i> ; <i>Avicennia officinalis</i>
<i>Proteaceae</i>	<i>Conospermum teretifolium</i> R. Br.
<i>Leguminosae</i>	<i>Diphyssa robinoide</i> Bent
<i>Malvaceae</i>	<i>Hibiscus tiliaceus</i>
<i>Scrophulariaceae</i>	<i>Paulownia kawakamii</i>
<i>Sapotaceae</i>	<i>Bassia latifolia</i>

Fonte: adaptado de (HUSSAIN et al., 2007)

O lapachol foi descrito pela primeira vez por Paternò, em 1821 (MORRISON et al., 1970), tendo sua estrutura química estabelecida desde 1896, por Hooker, que o identificou como o 2- hidroxi-3-(3-metil-2-butenil)-1,4-naftoquinona (Figura 3) (RAO; MCBRIDE; OLESON, 1968).

Figura 3. Estrutura química do Lapachol: 2- hidroxi-3-(3-metil-2-butenil)-1,4-naftoquinona.

Fonte: Elaborado pela autora, utilizando o software ChemDraw.

Esse composto possui diversas atividades biológicas já descritas, como propriedades anticancerígenas, ações anti-inflamatória (DE ALMEIDA et al., 1990), analgésica (HUSSAIN; GREEN, 2017), antibiótica (NAGATA, HIRAI, KOYAMA, WADA, & TAMURA, 1998; PARK, et al., 2006), antimalária (ANDRADE-NETO, ET AL., 2004; SCHUCK, et al., 2013), antileishmania (LIMA et al., 2004) e antitripanossoma (SALAS et al., 2008).

As investigações sobre os efeitos terapêuticos do lapachol começaram na década de 60 onde este composto mostrou efeitos muito potentes em relação aos tumores cancerígenos em ratos (RAO; MCBRIDE; OLESON, 1968). Além disso, em 1980, foi relatado que o uso do lapachol foi capaz de reduzir de forma eficaz diversos tipos de tumores (fígado, mama, próstata, rim e colo uterino), além de ter alcançado remissão completa dos tumores de três pacientes (revisado por ALMEIDA, 2009; HUSSAIN; GREEN, 2017).

Em outro estudo, realizado com o objetivo de avaliar os efeitos do lapachol em uma linhagem celular de câncer humano (HeLa) e seu potencial como um fármaco antimetastático, foi observado que o lapachol, na concentração máxima não tóxica para as células, induziu alterações no perfil de expressão de proteínas e inibiu a capacidade de invasão, representando, assim, uma importante atividade antimetastática (ALMEIDA, 2009; BALASSIANO et al., 2005).

Os mecanismos de ação do lapachol e outras naftoquinonas ainda não são completamente elucidados. Acredita-se que a atividade antitumoral do lapachol pode ser devido à sua interação com os ácidos nucleicos já que ocorre uma interação da porção naftoquinona com o DNA, entre os pares de bases da sua hélice, e consequentemente há uma inibição da replicação do DNA e da síntese de RNA (BALASSIANO et al., 2005; HUSSAIN et al., 2007).

Além disso, o lapachol e seus derivados têm sido extensivamente estudados por sua capacidade de induzir o estresse oxidativo, através da formação intracelular de espécies reativas do oxigênio (EROs), como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), o ânion-radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$) e o radical hidroxil ($HO^{\cdot}$). Estas espécies podem danificar alguns componentes celulares importantes, tanto de células normais como de malignas (DA SILVA; FERREIRA; DE SOUZA, 2003).

Embora o lapachol tenha vários efeitos benéficos, ele não é de forma alguma uma droga anticâncer perfeita. Apesar da ausência de toxicidade significativa, mesmo em altas doses, as concentrações plasmáticas são muito baixas para demonstrar um efeito terapêutico. No entanto, por causa de sua atividade antitumoral, é um candidato ideal para modificação sistemática afim de desenvolver uma compreensão de sua relação de reatividade estrutural, assim, eventualmente, desenvolver análogos com melhor atividade e perfil farmacocinético (ALMEIDA, 2009; HUSSAIN et al., 2007; SUBRAMANIAN; FERREIRA; TRSIC, 1998).

Dessa forma, o lapachol desperta grande interesse pela busca por novos derivados e/ou análogos. E, como já mencionado anteriormente, através dos processos de biotransformação, utilizando fungos filamentosos, há a possibilidade de geração de novas moléculas.

No entanto, há poucos estudos relatados na literatura sobre a biotransformação do lapachol. Na tabela 7 estão listados os fungos utilizados e os produtos de biotransformação obtidos nos trabalhos já publicados. A maioria dos metabólitos derivados da biotransformação do lapachol também possuem atividades biológicas. Além disso, um dos principais metabólitos do lapachol e isolado em várias culturas, o lomatiol, é também encontrado em mamíferos como metabólito do lapachol após administração via oral (OTTEN; ROSAZZA, 1979).

Tabela 7. Produtos de biotransformação do Lapachol por fungos filamentosos.

<i>Microrganismo</i>	<i>Produtos de Biotransformação</i>	<i>Referências</i>
<i>Beauveria sulfurescens</i> <i>Streptomyces albus</i>	Lomatiol	(DAVID; VESCHAMBRE, 1985)
	Lomatiol ácido	
	Lomatiol acetato	
<i>Penicillium citreonigrum</i>	Lomatiol	(DA SILVA et al., 1997)
<i>Curvularia luneta</i>	Dehydro- α -lapachona 	(OTTEN; ROSAZZA, 1979)
<i>Continua</i>		

Microrganismo	Produtos de Biotransformação	Referências
<i>Cunninghamella echinulata</i>	Lomatiol	(OTTEN; ROSAZZA, 1978)
	Lomatiol acetato éster Lomatiol glicose	
<i>Cunninghamella echinulata</i>		(OTTEN; ROSAZZA, 1981)

Continua

Microrganismo	Produtos de Biotransformação	Referências
<i>Bifidobacterium</i> sp e <i>Lactobacillus acidophilus</i> (co-cultura)	4a-hydroxy-2,2-dimethyl-5-oxo-2,3,4,4a,5,9b-hexahydroindeno [1,2-b] pyran-9b-carboxilic acid.	(SILVA et al., 2014)

Fonte: Elaborada pela autora.

Além da possibilidade de geração de novos derivados, a realização de estudos direcionados à compreensão do metabolismo de naftoquinonas poderá contribuir para o planejamento de novas moléculas derivadas e para o entendimento das etapas de biotransformação de fármacos com estruturas relacionadas. Essa compreensão do metabolismo pode ser alcançada, por exemplo, com estudos proteômicos.

3.1. Estudos de Proteômica

Apesar da prevalência do uso de fungos filamentosos nos campos da biotecnologia, indústria e proteção ambiental e da sua importância como patógenos humanos e vegetais, ainda há poucos estudos proteômicos sobre esses microrganismos (SZEWCZYK et al., 2014).

A análise proteômica consiste no estudo do proteoma, que designa o conjunto de proteínas que estão sendo expressas por uma célula, tecido ou organismo em um determinado momento e que são responsáveis direta ou indiretamente pelo controle de todos ou quase todos os processos biológicos (BARBOSA et al., 2012).

O proteoma pode ser dividido em subproteomas, como por exemplo, o proteoma intracelular e o secretoma. O secretoma é definido como a combinação de proteínas nativas secretadas e a maquinaria celular envolvida na sua secreção (TJALSMA et al., 2000). Estudos relacionados ao secretoma são particularmente relevantes na compreensão de fungos filamentosos, pois muitos deles secretam um grande número de proteínas (KIM; NANDAKUMAR; MARTEN, 2007).

A expressão proteica de determinada célula é bastante dinâmica, dependendo do estado de desenvolvimento, da presença de ativadores ou inibidores e também das condições do meio. Assim, o proteoma reflete o estado atual de funcionamento do sistema em condição fisiológica específica (PANDEY; MANN, 2000).

Com o estudo proteômico é possível identificar vias metabólicas, viabilizar a identificação de novas moléculas bioativas em extratos biológicos naturais além de identificar marcadores biológicos (PANDEY; MANN, 2000).

De maneira geral, os métodos empregados em proteômica (Figura 4) compreendem a separação das proteínas e a análise por espectrometria de massas.

Figura 4. Diferentes metodologias combinadas em estudos proteômicos. Dentre os mais comumente utilizados estão aqueles que envolvem extração de proteínas da amostra, separação por eletroforese uni (1-DE) ou bidimensional (2-DE) e/ou por cromatografia líquida, ionização, fragmentação, análise e detecção de peptídeos e análise de dados.

Fonte: extraída de (BARBOSA et al., 2012).

Uma das estratégias utilizadas para separação das proteínas é a eletroforese bidimensional (2-DE), onde as proteínas são separadas em duas etapas consecutivas. Na primeira, denominada focalização isoeletrica (IEF), as moléculas migram em gel de poliacrilamida com gradiente de pH imobilizado até atingirem um ponto (pH) no qual sua carga líquida é igual a zero (ponto isoeletrico ou pI). Na segunda etapa, as proteínas são submetidas a uma eletroforese com direção perpendicular à IEF em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE). Nessa técnica, as proteínas revestidas pelo detergente SDS migram através da rede entrelaçada formada pela acrilamida, sendo separadas, basicamente, por sua massa molecular (Figura 5). Essa segunda etapa é similar a uma eletroforese 1-D, na qual as moléculas são diretamente aplicadas no gel SDS-PAGE e separadas de acordo com seu tamanho (BARBOSA et al., 2012).

Figura 5. Esquema da estratégia de identificação de proteínas utilizando eletroforese bidimensional

Fonte: (GARZON, 2017).

Outra ferramenta utilizada para identificação de proteínas e que não utiliza gel para separação das mesmas é denominada *Shotgun proteomics*. Nessa técnica, as proteínas de uma mistura complexa são digeridas com peptidases específicas (por exemplo, a tripsina) e os peptídeos resultantes são separados por cromatografia(s) líquida de alta eficiência (CLAE), que podem ser de troca catiônica e fase reversa ou com diferentes faixas de pH, permitindo o melhor fracionamento dos peptídeos. A espectrometria de massa em tandem (MS/MS) é então utilizada para identificação dos peptídeos (Figura 6) (BARBOSA et al., 2012).

Figura 6. Esquema da estratégia de identificação de proteínas em uma mistura complexa.

Legenda: TC (cromatografia em coluna de Troca Catiônica), FR (cromatografia em coluna de Fase Reversa). A coluna com microcapilar é utilizada para a injeção da amostra fracionada no espectrômetro de massas.

Fonte: (GARZON, 2017).

Antes de serem fragmentadas e analisadas por espectrometria de massas, as amostras precisam passar por um processo de ionização. A habilidade da espectrometria de massas em analisar proteínas e extratos biológicos advém dos grandes avanços obtidos com o desenvolvimento das técnicas de ionização branda, como a técnica de ionização eletrospray (ESI) e a ionização/ dessorção a *laser* assistida por matriz (MALDI), que são técnicas capazes de transformar macromoléculas em íons (EMIDIO et al., 2015; NADLER et al., 2017).

Na ionização por MALDI, a amostra é incorporada a uma matriz ácida que absorve energia do *laser* e que, ao aquecer, é vaporizada/ionizada juntamente com a amostra. No ESI, a amostra flui por um capilar e é submetida a um campo elétrico; como resultado, são formadas gotículas cada vez menores, que culminam na formação de íons carregados. Além disso, o ESI pode ser conjugado com sistemas de cromatografia líquida (LC) (GARZON, 2017; NADLER et al., 2017).

A literatura relata poucos estudos de processos de biotransformação correlacionando as rotas biosintéticas ou metabólicas em fungos. Estas informações podem começar a serem esclarecidas através de estudos de proteômica em fungos, quando estes estão na ausência e na presença do substrato alvo. Através dessa técnica, pode-se supor quais enzimas são de fato produzidas pelo microrganismo e que estão ativas no processo de biotransformação.

Portanto, estudos de determinação de rotas de biotransformações podem conduzir à identificação de enzimas com aplicações biotecnológicas, estabelecendo as condições ideais para a produção de macromoléculas envolvidas no processo de biotransformação por fungos.

Para compreender e manipular processos bioquímicos e as vias de sinalização, o conhecimento das interações proteínas-metabólitos pode ser extremamente útil. Recentes desenvolvimentos em espectrometria de massas de alta precisão, proteômica de alta resolução e perfis metabolômicos mais sensíveis estão começando a anunciar uma nova era de estudos globais de interactoma (conexão entre proteoma e metabolômica) que prometem mudar a pesquisa biomédica e a descoberta de fármacos (GUO; PENG; EMILI, 2017).

Assim, dado o potencial do lapachol e seus derivados, o fungo *Phanerochaete chrysosporium* foi utilizado para biotransformar o lapachol e, através do seu proteoma identificar as proteínas e as vias metabólicas envolvidas nesse processo.

3. Objetivos

Objetivo Geral

Compreender o processo de biotransformação do lapachol pelos fungos filamentosos por estudos de proteômica.

Objetivos específicos

- ✓ Padronizar o bioprocesso submerso para realização da biotransformação do lapachol;
- ✓ Selecionar uma cepa para estudos de proteômica a partir de um *screening* com cepas de fungos filamentosos;
- ✓ Identificar as proteínas (intracelulares e extracelulares) produzidas pelo fungo durante o processo de biotransformação, utilizando ferramentas proteômicas;
- ✓ Isolar e identificar os produtos de biotransformação;
- ✓ Avaliar as atividades biológicas do biotransformado derivado do lapachol.

4. Metodologia

4.1. Obtenção do Lapachol

O lapachol foi obtido por semi-síntese a partir da Lausona (Sigma-Aldrich®), de acordo com a estratégia sintética representada na Figura 7 (SUN; GEISER; FRYDMAN, 1998), no Laboratório de Química Heterocíclica e Medicinal (QHETEM) sob orientação do Professor Dr. Flavio Emery.

Figura 7. Estratégia sintética para produção do Lapachol a partir da Lausona.

Fonte: Elaborada pela autora.

4.2. Microrganismos utilizados no estudo

As cepas dos fungos filamentosos foram obtidas e mantidas na micoteca do Laboratório de Tecnologia Enzimática da FCFRP-USP, sob orientação do Professor Dr. Hamilton Cabral. Os fungos utilizados para a realização do *screening* foram: *Aspergillus flavus*, *Aspergillus fumigatus* Fresen 1863, *Fusarium oxysporum*, *Paecilomyces variotii*, *Rhizomucor miehei*, *Phanerochaete chrysosporium*, *Penicillium corylophilum*, *Rhizopus microsporus* Tiegh. 18 e *Trichoderma asperellum*.

O fungo selecionado para os estudos de biotransformações e análises proteômicas foi o *Phanerochaete chrysosporium*. O fungo foi coletado de solo contendo pena de aves, na cidade de Miguelópolis-SP, isolado e submetido à identificação pelo grupo do Prof. Dr. André Rodrigues (Laboratório de Ecologia e Sistemática de Fungos, UNESP - Rio Claro). O fungo foi submetido à identificação molecular por comparação, utilizando-se a região ITS do DNA

ribossomal e apresentou 98% de similaridade com a sequência de *Phanerochaete chrysosporium* KCTC 6728 (AF475147).

4.3. Manutenção dos fungos filamentosos

Os fungos foram mantidos a 4°C em meio ágar dextrose batata (PDA) inclinado. A manutenção das cepas selecionadas ocorreu a cada 2 meses, porém as cepas utilizadas nos bioprocessos foram repicadas em placas de petri, de acordo com a necessidade, em meio PDA e incubadas por 7 dias na temperatura de 30 ou 45°C em incubadora com ventilação (B.O.D), dependendo da cepa selecionada (meso ou termofílica).

4.4. Verificação dos efeitos tóxicos do Lapachol sobre os fungos

Para determinar as concentrações de lapachol não tóxicas para o crescimento dos fungos, foram realizados experimentos pilotos com volume reduzido do meio de cultivo, variando a concentração de lapachol. O meio de cultura utilizado foi o Soja-glicose (farelo de soja, 5 g; glicose, 20 g; extrato de levedura, 5 g; NaCl, 5 g; K₂HPO₄, 5 g; água destilada, 1 mL; pH 7 (Otten e Rosazza, 1978), no volume final de 2 mL.

As concentrações de lapachol avaliadas variaram de 400 a 0,195 µg/mL. Como o lapachol é insolúvel em água, este foi previamente solubilizado em dimetilsulfoxido (DMSO) (Synth), resultando em uma concentração de 8 µg/mL (solução estoque), a qual foi adicionada em volumes adequados ao meio, de acordo com a concentração final desejada.

O inóculo preparado continha 10⁶ esporos/mL, no caso dos fungos que esporulam e 5 discos de 5 mm de diâmetro, no caso dos fungos que não esporulam. O inóculo foi cultivado durante 3 dias na temperatura de 30 ou de 45°C, dependendo da fisiologia do fungo, sob agitação constante de 120 rpm. Foram feitos controles de esterilidade do meio de cultivo e de crescimento do inóculo na presença de DMSO e controle positivos, onde os fungos foram cultivados sem adição do lapachol.

4.5. Processos de Biotransformação

Os processos de biotransformação foram realizados de duas maneiras: direto, onde o lapachol foi adicionado logo após a inoculação do fungo e indireto, onde houve a realização de um pré-cultivo.

4.5.1. Processo de biotransformação indireto (pré-cultivo)

Para essa metodologia, os fungos, previamente cultivados em meio PDA durante 7 dias, foram inoculados na concentração de 10^6 esporos/mL, no caso dos fungos que esporulam, ou 14 discos de 7 mm no caso dos fungos que não esporulam, em 50 mL de meio soja-glicose contidos em frascos do tipo *erlenmeyers* de 250 mL, sob agitação constante de 120 rpm, durante 24 h. Os inóculos foram cultivados nas temperaturas de 30 ou de 45°C, dependendo da fisiologia do fungo.

Em seguida, os fermentados foram transferidos para tubos *falcons* estéreis, centrifugados (9000 x g, 10 min, 24°C), o sobrenadante foi descartado e a massa micelial foi transferida para um novo *erlenmeyer* de 250 mL contendo 50 mL de meio Czapeck modificado (sacarose 3%, nitrato de sódio 0,2%, fosfato de potássio dibásico 0,1%, cloreto de potássio 0,05% e sulfato ferroso 0,001%, pH 6). Nesse momento foi adicionado aos meios a solução de Lapachol em DMSO nas concentrações estabelecidas para cada cepa. Os bioprocessos foram avaliados até 72 horas. Alíquotas do meio foram recolhidas a cada 24h.

4.5.2. Biotransformação com cultivo direto

No bioprocesso direto, o fungo *Phanerochaete chrysosporium* previamente cultivado em meio PDA durante sete dias a 30°C, foi inoculado (40 cm² de micélio) em 400 mL de meio de cultivo (Glicose 1%, K₂HPO₄ 0,1%, KCl 0,05%, Fe₂SO₄ 0,01%, CaCl₂ 0,01%, MgSO₄ 0,01%, pH 6,0), contidos em frascos *erlenmeyers* de 2000 mL.

O Lapachol foi adicionado ao meio na concentração de 40 µg/mL a partir de uma solução estoque de lapachol a 8 µg/µL (em DMSO). A concentração final de DMSO no meio de cultura foi 0,5%. A fermentação ocorreu durante 96 h, sob agitação constante de 120 rpm e temperatura de 30 °C.

4.6. Obtenção das frações orgânicas das fermentações

Após o bioprocesso, os meios de cultivo foram recolhidos por filtração sob pressão reduzida e os filtrados obtidos foram submetidos a partição líquido-líquido com acetato de etila, por três vezes consecutivas, para obtenção da fração orgânica. As frações orgânicas

foram concentradas por evaporação sob vácuo e armazenadas em frascos âmbar sob refrigeração a 4°C.

4.7. Avaliação dos perfis químicos das frações orgânicas

Para identificar os produtos de biotransformação, as alíquotas foram analisadas por cromatografia gasosa acoplada a massas (CG-MS). As análises foram realizadas pela técnica Izabel Cristina Casanova na Central de Espectrometria de Massas de Micromoléculas Orgânicas, coordenado pelo Professor Dr. Noberto Lopes.

O equipamento utilizado foi GC-2010, GCMS-QP2010 (Shimadzu) acoplado à coluna Rtx-5 MS (30 x 0.25 mm, 0.25 mm), com o seguinte gradiente: 120°C (4min), 8°C/min, 300°C (12 min), com um tempo total de corrida de 37 min. As amostras foram solubilizadas em acetato de etila. Os perfis foram analisados pelo *software GCMS solution version 4.2* (Shimatsu®). Os compostos foram identificados utilizando a biblioteca de compostos disponíveis na literatura e os novos compostos foram submetidos às análises de ressonância magnética nuclear (RMN) para elucidação da sua estrutura química.

4.8. Isolamento do composto biotransformado

Inicialmente foi realizada uma pré-purificação por cromatografia em coluna de gel de sílica (63-200 µm), utilizando como fase móvel uma mistura de hexano:acetato de etila (1:1).

Em seguida, foram realizadas cromatografias em camada delgada (CCD) em alta escala, utilizando cromatofolhas de alumínio de sílica gel (Sigma Aldrich). Para a visualização dos componentes das análises em CCD foi utilizada uma lâmpada ultravioleta (254 nm), visto que o produto biotransformado absorve luz ultravioleta. A visualização das bandas também foi confirmada com coloração, utilizando a solução reveladora de *p*-anisaldeído (135 mL de etanol; 5 mL de ácido sulfúrico concentrado; 1,5 mL de ácido acético glacial e 3,7 mL de *p*-anisaldeído).

Após a visualização no UV, as bandas correspondentes ao produto de interesse foram recortadas e extraídas com acetato de etila grau HPLC. O solvente foi removido por pressão reduzida, sendo obtido um óleo amarelo pálido, que posteriormente foi submetido às análises de RMN e MS para elucidação estrutural.

4.9. Análise por espectrometria de massas de alta resolução (HMRS)

Os espectros de massas foram obtidos em aparelho de alta resolução, utilizando para calibração interna uma solução de Na-TFA a 10 mg/mL. O espectrômetro utilizado foi o ultrOTOFQ-ESI-TOF, da Bruker Daltonics. As condições utilizadas foram: bomba de infusão com fluxo de 300 μ l/h e o modo de detecção foi positivo.

4.10. Análises de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

As análises de RMN foram realizadas no Laboratório de Química Heterocíclica e Medicinal (QHETEM) sob orientação do professor Dr. Flavio Emery e com o auxílio do doutorando Fernando Fumagalli.

Os espectros de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN de ^1H) e os de Carbono-13 (RMN de ^{13}C) foram registrados utilizando os seguintes equipamentos e especificações, espectrômetro BRUKER(R) - Modelo DRX300 - Ultra Shield (R), com magneto de 7,05 T e sonda multinuclear de detecção inversa (^1H : 300,83 MHz e ^{13}C : 75,48 MHz) para tubos de 5 mm de diâmetro, com sistema de "lock" de deutério e bobina geradora de gradiente de campo em z (campo máximo de 53,5 Gauss.cm $^{-1}$).

Os deslocamentos químicos (δ) foram relatados em parte por milhão (ppm) em relação ao tetrametilsilano (TMS). As multiplicidades foram designadas como s = simpleto, sl = simpleto largo, d = duplete, t = tripleto, dd = duplo duplete, m = multiplete, a constante de acoplamento (J) em Hertz (Hz). Os números de hidrogênios foram deduzidos da integral relativa.

4.11. Análises proteômicas utilizando a técnica de 2D-SDS-PAGE

4.11.1. Preparação das amostras do proteoma intracelular

Para o preparo do proteoma intracelular, os micélios dos fungos, foram coletados por filtração à vácuo utilizando filtro de papel número 1 e recolhidos em tubos tipo *falcons* de 50 mL.

Em seguida, os micélios foram lavados duas vezes com uma solução 0,9 % (m/v) de NaCl. Para isso, o material foi centrifugado a $8000 \times g$, 4 °C por 5 min e o sobrenadante foi descartado. Esse mesmo processo foi repetido para lavagem com água ultrapura, também por

duas vezes. Após a lavagem, foi adicionada a solução de inibidores de proteases (Complete ULTRA – Roche).

O tubo contendo o material parcialmente lisado foi levado ao sonicador (Q125 sonicator, QSonica), mantido em recipiente com gelo, e submetido à lise utilizando o 75% de potência (93,75 W), com 10 ciclos de 1 min intercalado com intervalos de 30 s. O produto da lise micelial foi centrifugado a 8000 x g por 15 min a 4 °C. O sobrenadante foi filtrado em membranas de 0,22 µm e transferido para um novo tubo de 50 mL.

4.11.2. Precipitação das proteínas intracelular para análise em 2DE

Ao volume de sobrenadante contendo as proteínas intracelulares foi adicionado o mesmo volume de solução gelada de ácido tricloroacético (TCA) 30% (m/v) em acetona PA. O material foi mantido a -20 °C por 2 h e, após este período, a mistura foi centrifugada a 10.000 x g por 30 min a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e ao precipitado foram adicionados 20 mL de acetona PA gelada, seguido de centrifugação a 10.000 x g por 30 min a 4°C.

O sobrenadante foi descartado e o procedimento de lavagem com acetona PA gelada foi repetido. O material precipitado foi mantido a 25 °C até a completa volatilização da acetona residual e, posteriormente, solubilizado em tampão tiourea (7 M ureia, 2 M tiourea, 2% (m/v) CHAPS).

Após a precipitação, foi realizada uma etapa de lavagem para eliminação de resíduos do processo de precipitação, utilizando o 2-D Clean-Up Kit (GE Healthcare Life Sciences) de acordo com as instruções do fabricante. A concentração de proteínas totais foi determinada pelo método de Bradford (1976) utilizando albumina bovina na preparação da curva padrão e o material armazenado em ultra freezer -80 °C até o momento da focalização isoeletrica.

4.11.3. Eletroforese bidimensional das proteínas intracelulares

4.11.3.1. Primeira dimensão - focalização isoeletrica

Para a focalização isoeletrica, as amostras foram suplementadas com 0,002% de azul de bromofenol, 0,5% de IPG *buffer* e 2,8 mg/mL de ditioneitol (DTT).

As amostras foram então reidratadas passivamente, por 16 h a 20 °C, em tiras com gradiente linear de pH de 3 a 10 *Immobiline Dry Strip* (GE Healthcare Life Sciences). Para esta etapa, as tiras foram acomodadas em bandejas apropriadas e inseridas no aparato IPG Box (GE Healthcare Life Sciences).

As amostras foram submetidas à focalização isoeletrica em placa de cerâmica utilizando o sistema Ettan IPGphor 3 (GE Healthcare Life Sciences) e os parâmetros da focalização foram controlados utilizando o Ettan IPGphor 3 Control Software, seguindo as instruções do fabricante. Após a focalização foram acumulados 15500 Vh.

As tiras foram retiradas do sistema de focalização e imediatamente submetidas ao equilíbrio (conforme descrito na seção 4.11.3.2) ou armazenadas a -80 °C até o momento da utilização.

4.11.3.2. Equilíbrio da fita

Para a execução da segunda dimensão, inicialmente as tiras foram equilibradas em tampão de equilíbrio SDS (6 M de ureia; 75 mM Tris-HCl, pH 8,8; 29,3% (v/v) de glicerol; 2% (m/v) de dodecil sulfato de sódio - SDS; 0,002% (m/v) de azul de bromofenol) suplementado com DTT (10 mg/mL).

As tiras foram imersas nessa solução e mantidas sob agitação por 15 min a 20 °C. Após este período, a solução contendo DTT foi removida e às tiras foi adicionado o mesmo tampão, dessa vez suplementado com iodoacetamida (IAA) (25 mg/mL).

As tiras foram imersas nessa solução e mantidas sob agitação por 15 min a 20 °C. Após este período a solução foi removida e as amostras focalizadas estavam preparadas para a segunda etapa: a eletroforese desnaturante.

4.11.3.3. Segunda dimensão – eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida (SDS/PAGE)

Para a segunda dimensão, as tiras equilibradas foram acomodadas horizontalmente sobre a superfície do gel desnaturante 12,5% de poliacrilamida, com 16 cm de largura, e com o auxílio de papel filtro foi aplicado o marcador de massa molecular Amersham ECL *Full-Range Rainbow* (GE Healthcare Life Sciences).

As placas foram seladas com solução de agarose 0,5% (m/v) preparada em tampão Tris-glicina (25 mM Tris base, 192 mM glicina, 0,1% (m/v) SDS, 0,002% (m/v) azul de bromofenol) e o aparato foi introduzido na cuba eletroforética SE-600 Ruby acoplada ao banho termostático com circulação MultiTemp IV (GE Healthcare Life Sciences).

As cubas de eletroforese foram preenchidas com tampão Tris-glicina e a segunda dimensão foi realizada temperatura controlada de 10 °C, 15 mA/gel durante os 15 min iniciais e 30-60 mA/gel até o final da corrida.

4.11.3.4. Coloração dos géis

Após o término da eletroforese, os géis foram retirados das placas, colocados em recipiente contendo solução fixadora (10% (v/v) ácido acético, 40% (v/v) etanol) e fixados por 16 h a 20 °C.

Após este período, a solução fixadora foi removida e a coloração foi realizada utilizando a solução *Colloidal Coomassie Blue G-250* (8% (m/v) de sulfato de amônio; 0,8% (v/v) de ácido fosfórico; 0,08% (m/v) *Coomassie Blue G-250*; 20% (v/v) de metanol).

Os géis foram corados por 16 h a 20 °C, e, após este período, a solução foi descartada e o excesso de corante foi removido utilizando a água ultrapura. Os géis adequadamente descorados foram mantidos em solução contendo 5% (v/v) de ácido acético até a obtenção das imagens.

4.11.3.5. Obtenção e análise de imagens dos géis bidimensionais

Para a obtenção das imagens, os géis bidimensionais foram lavados com água ultrapura e digitalizados com o auxílio do densitômetro DS-6000 (Loccus Biotecnologia) utilizando o modo transparente e a resolução de imagem de 300 dpi.

As imagens capturadas foram arquivadas no formato TIF (Tagged Image File) e analisadas no programa Image Master 2D Platinum v7.0 (GE Healthcare Life Sciences) para a detecção dos *spots*, para a determinação de massa molecular e ponto isoeletrico e para a comparação dos níveis de expressão proteica em condições de bioprocessos diferentes.

Para a coleta dos *spots* de interesse foram estabelecidos os seguintes critérios: *spots* exclusivos de uma determinada condição e *spots* diferencialmente expressos (considerando os parâmetros: *fold* – nível de abundância > 2 e ANOVA com $\alpha < 0,05$).

Os *spots* selecionados de cada condição foram manualmente coletados com agulhas hipodérmicas estéreis, armazenados em tubos e congelados a -80°C até o momento da análise por espectrometria de massas.

4.11.4. Digestão trípica e espectrometria de massas (MALDI-ToF/ToF)

Os dados de espectrometria de massas foram obtidos no Centro de Química de Proteínas do Hemocentro de Ribeirão Preto sob supervisão do Prof. Dr. José César Rosa (FMRP).

Antes de serem submetidos à digestão trípica, os *spots* foram descorados com 100 µL de solução descorante (50% acetonitrila (ACN)/0,1 M NH₄HCO) por várias vezes, até a completa remoção da coloração. Posteriormente, os spots foram desidratados com ACN 100%, por 10 minutos, a solução foi descartada e o excesso de solvente removido em centrífuga a vácuo.

Os *spots* desidratados foram incubados com 100-200 ng de tripsina de pâncreas de porco dimetilada, grau proteômica (Sigma-Aldrich®) e 100 µL de solução 100 mM de NH₄HCO₃, por 22 h e a reação foi interrompida com 5 µL de ácido fórmico.

A solução contendo os peptídeos trípticos foi coletada após 4 horas e submetida à concentração e dessalinização em resina de fase reversa POROS® R2 (Applied Biosystems®) previamente empacotada em ponteiras com fibra de vidro AP4009000 (Merck Millipore). Inicialmente, a resina foi ativada em metanol e equilibrada em solução 0,2% (v/v) de ácido fórmico. Posteriormente, o material eluído, em solução de eluição (60 % (v/v) de ACN; 5 % (v/v) de ácido fórmico), foi seco em concentrador a vácuo rotacional 2-18 CDplus (Martin Christ) por 90 min a 1200 rpm e 35 °C.

Os peptídeos eluídos foram misturados com 6 µL de uma solução de matriz (5 mg/mL ácido α-ciano-4-hidroxicinaminico em 50 % ACN e 0,1 % ácido trifluoracético (v/v)) e 2 µL foram aplicados, em duplicata, em placas de inox para MALDI.

Os espectros MALDI MS/MS foram adquiridos utilizando o *software* de MALDI-TOF/TOF (Axima Performance, Kratos-Shimadzu). Os íons detectados tiveram suas massas determinadas utilizando como calibrante externo uma mistura de peptídeos (insulina bovina, citocromo C, aldolase de coelho e albumina sérica bovina), que compõem o padrão de calibração (Protein MALDI-MS Calibration Kit; MSCAL-1-1KT, Sigma-Aldrich®).

4.11.5. Determinação das sequências e análise funcional das proteínas identificadas

Os espectros MS/MS obtidos de cada proteína, em arquivos compatíveis com o *Mascot Generic Format*, foram analisados utilizando a ferramenta *MS/MS ions search* do *software online* Mascot Server version 2.2 (Matrix Science, Boston, Massachusetts, EUA) disponível em:

http://www.matrixscience.com/cgi/search_form.pl?FORMVER=2&SEARCH=MIS.

Para identificação das proteínas, foram utilizados os bancos de proteínas do Centro Nacional de Informação em Biotecnologia NCBI (NCBI não redundante) e SwissProt. Os parâmetros utilizados foram: restrição taxonômica: fungos; clivagem por tripsina e com permissão para até uma clivagem perdida; modificação fixa da cisteína – carbamidometil; modificação variável da metionina – oxidação; tolerância do peptídeo: 1,2 Da; tolerância do fragmento iônico MS/MS: 0,8 Da e massas médias.

Os resultados foram considerados significantes para um acerto aleatório individual com $p < 0,05$, que representa identidade ou homologia de acordo com o escore estabelecido pelo MASCOT (Matrix Science, Boston, Massachusetts, EUA).

Os resultados com identidade ou homologia foram submetidos às análises funcionais no *software online* Blast2GO *basic* (BioBam, Spain) disponível em <https://www.blast2go.com/>. As proteínas foram agrupadas em diferentes processos biológicos e funções moleculares, de acordo com o enriquecimento *gene ontology* (GO).

4.12. Análises proteômicas pela técnica de LC-MS/MS

As análises de LC-MS/MS foram realizadas, durante o período de doutorado sanduíche, no Laboratório de Espectrometria de Massas da Universidade de Liège na Bélgica sob orientação do professor Loïc Quinton.

As amostras utilizadas para as análises LC-MS/MS foram provenientes do cultivo direto do fungo *P. chrysosporium*.

O conjunto de dados, do proteoma intracelular e do secretoma do fungo *P. chrysosporium* durante a biotransformação do lapachol, foi obtido por análise proteômica *label-free*. Foram analisadas 12 amostras para gerar os dados proteômicos: proteoma intracelular da condição lapachol e controle em triplicata e proteoma extracelular das duas condições também em triplicata. A Figura 8 mostra o desenho experimental e a amostragem deste estudo.

Figura 8. Fluxograma das etapas experimentais realizadas para a obtenção do conjunto de dados proteômicos por LC-MS/MS. Os experimentos foram realizados em triplicata.

Fonte: elaborada pela autora.

4.12.1. Preparo das amostras

As amostras do secretoma, previamente liofilizadas, foram ressuspensas em 30 mL de água ultrapura e em seguida, foram concentradas até o volume de 500 µL, utilizando o sistema de concentração Amicon® 3 kDa (Merk), de acordo com as instruções do fabricante. Já as amostras do proteoma intracelular foram somente ressuspensas em 30 mL de água ultrapura.

As proteínas das amostras foram quantificadas utilizando o kit RCDC™ Protein Assay Kit (Biorad, USA) e, após a quantificação, os volumes referentes a 20 µg de proteínas totais para cada amostra foram adicionados a tubos do tipo *ependorf* de 2 mL.

As amostras foram então reduzidas na presença de 50 mM de DTT e alquiladas com 50 mM de IAA. Em seguida, foram processadas com o 2D Clean-Up kit (GE Healthcare Life

Sciences, USA), de acordo com as instruções do fabricante, afim de eliminar as impurezas não compatíveis com as etapas posteriores. Após esta etapa, os precipitados de proteínas foram solubilizados em 50 mM de bicarbonato de amônio.

Em seguida, as amostras solubilizadas foram digeridas por ação da enzima tripsina (tripsina/proteínas totais 1/50 (m/m)) a 37°C por 16 h e, após esta etapa, as amostras foram diluídas em 80% (v/v) de acetonitrila e uma nova reação com tripsina foi conduzida à 37 °C por 3 horas, desta vez na proporção de enzima/proteínas total de 1/100 (m/m).

As amostras digeridas foram secas em concentrador à vacuo e ressuspensas em 0.1% de ácido fórmico. Alíquotas de 10 µg de proteínas (de cada amostra digerida) foram purificadas usando ZipTip C₁₈ (Thermo Scientific®, Germany), de acordo com as instruções do fabricante. As amostras eluídas na etapa anterior foram secas em concentrador à vácuo e armazenadas à 4 °C até o momento da análise por MS.

4.12.2. Análise de espectrometria de massas

Os peptídeos provenientes das hidrólises das proteínas foram analisados usando o sistema de purificação nanoAcquity UPLC® (Waters Corporation, USA). Este sistema único combina dois tipos de cromatografia em duas etapas cromatográficas em resina C₁₈ com separação em diferentes valores de pH (pH=10 e pH=3).

As análises das amostras foram realizadas pelo espectrômetro de massas Q-Exactive (ThermoFisher, Germany), o qual a fonte de ionização é o *electrospray*, o que aumenta a sensibilidade de detecção (limite inferior, 0,1–1 fmol de proteína) com alta resolução e acurácia (1 ppm) para as análises dos peptídeos. Todos os peptídeos foram fragmentados.

Em seguida, cada sequência e identidade foram obtidas a partir de buscas em banco de dados e correlação com a massa precisa medida para cada peptídeo parental fragmentado.

4.12.3. Identificação das proteínas e análises estatísticas

A identificação de proteínas e quantificação *label-free* foram realizadas pelo software MaxQuant (Max Planck Institute, Germany) (TYANOVA; TEMU; COX, 2016). A pesquisa das proteínas foi realizada usando o banco de dados “Fungi” do UNIPROT (www.uniprot.org), em 15 de junho de 2017 (6.850.980 sequências). Os parâmetros de pesquisa foram definidos como clivagem com tripsina, permitindo duas clivagens perdidas, carbamidometil como modificação fixa e oxidação de metionina como variável. Além disso,

apenas as identificações utilizando no mínimo dois peptídeos e um peptídeo único foram consideradas.

As análises estatísticas foram realizada utilizando o *software* Perseus 1.6.0.7 (Max Planck Institute, Germany) (TYANOVA et al., 2016). As diferenças de expressão proteica foram computadas comparando as condições controle e lapachol utilizando teste T (para cada duas amostras). Os valores de $p < 0.05$ indicaram diferença estatística significante.

A análise funcional das proteínas identificadas foi realizada utilizando o *software* Blast2GO *basic* (BioBam, Spain), disponível em <https://www.blast2go.com/>. As proteínas foram agrupadas em diferentes processos biológicos e funções moleculares, de acordo com o enriquecimento *gene ontology* (GO).

4.13. Avaliação da atividade proteolítica com substrato peptídico com supressão intramolecular de fluorescência (FRET)

O proteoma intracelular e o secretoma, oriundos do processo de biotransformação direto com o fungo *P. chrysosporium*, foram submetidos à avaliação quanto à atividade proteolítica utilizando substrato peptídico com supressão intramolecular de fluorescência (FRET). Este substrato tem em sua estrutura um grupo emissor de fluorescência (ácido orto-aminobenzóico - Abz) na extremidade amino-terminal e um grupo supressor de fluorescência (grupo etilenodiamo-dinitro-fenil – EDDnp) na extremidade carboxi-terminal (CHAGAS, JULIANO, & PRADO, 1991). Estes grupos são responsáveis pelo funcionamento do substrato: quando íntegro, o grupo EDDnp suprime a fluorescência emitida por Abz, porém, após a ação da peptidase, há um distanciamento destes dois grupos promovendo a emissão da fluorescência com maior intensidade (CARMONA, JULIANO, & JULIANO, 2009)

A reação enzimática ocorreu em cubeta de quartzo na presença 989 μ L de tampão MES 50mM pH 6,5, 10 μ L de secretoma/proteoma intracelular e 1 μ L do substrato Abz-KLRSSKQ-EDDnp, a 45°C durante 10 minutos sob agitação, e a avaliação da fluorescência emitida foi realizada em espectrofluorímetro modelo Lumina (Thermo) nos comprimentos de onda de excitação 320nm e emissão 420nm. O sistema é acoplado a um sistema *Peltier 4-position fluorescence cell holder*, responsável pela agitação e manutenção da temperatura da reação. O software utilizado foi o Luminous Software version 3.0.

4.14. Ensaios biológicos com o composto biotransformado PC01

4.14.1. Avaliação da atividade biológica contra *Trypanosoma cruzi*

Com o objetivo de investigar possíveis efeitos tripanocidas, os compostos biotransformados foram testados contra a forma promastigota de *T. cruzi*, cepa Tulahuen (LacZ) pelo método do CPRG (*Chlorophenol red-β-D-galactopyranoside*). Neste teste, o parasito geneticamente modificado, expressando o gene da β-galactosidase, é capaz de converter o reativo de cor formando como produto colorido o clorofenol vermelho que absorve luz no comprimento de onda de 570 nm.

Para isso, *T. cruzi* foi cultivado em células LLCMK-2 (epitélio renal de macaco) onde, após a liberação das formas tripomastigotas, o sobrenadante foi centrifugado a 183 x g por 10 minutos a 21 °C para remoção das células mortas e submetido à nova centrifugação a 1643 x g por 10 minutos a 21 °C para obtenção das formas tripomastigotas, que foram contadas e tiveram sua concentração acertada para 5×10^5 células/mL (proporção célula:parasita = 1:10).

Em placa de 96 poços foram adicionados 50 µl de células e 50 µL de parasitos e incubados a 37 °C, 5 % CO₂ por 48 horas para a infecção das células. Após esse período a placa foi tratada com o composto biotransformado em concentrações de 250-0,75 µM e novamente incubada por 72 horas. Ao final deste tempo, a placa recebeu o CPRG (400 µM em 0.3% Triton X-100) e foi finalmente incubada por mais seis horas. A detecção da absorbância foi obtida em leitor de microplacas Sinergy H1- Biotek® (Winoosk, VT, EUA).

Como controle positivo foi utilizado o benzonidazol nas mesmas concentrações e, como controle negativo, meio de cultura RPMI incolor. Os resultados expressos como IC₅₀ (µM) foram calculados pelo método estatístico de curva concentração-resposta sigmoidal, por meio do software *GraphPad Prism 5.0* (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

4.14.1.1. Ensaio de Citotoxicidade

A citotoxicidade dos compostos foi também avaliada em células LLCMK-2, pelo método do MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide), onde em células viáveis, há a conversão do composto pela atividade da enzima mitocondrial redutase, convertendo o reagente da cor amarela para púrpura, que absorve luz no comprimento de onda de 570 nm.

Para isso, a concentração de células supracitada foi plaqueada em placa de 96 poços, incubada nas mesmas condições por 48 horas e igualmente tratadas com os compostos por 72 horas.

Após esse período, a placa recebeu MTT e foi incubada por quatro horas. Após esse tempo, foram adicionados 50 µL DMSO para dissolver os cristais de azul de formazan formados e permitir a leitura da absorbância em leitor de microplacas Sinergy H1-Biotek® (Winoosk, VT, EUA). Como controle foi utilizado o benzonidazol nas mesmas concentrações testadas.

Os resultados expressos como CC₅₀ (µM) foram calculados pelo método estatístico de curva concentração-resposta sigmoidal, por meio do software *GraphPad Prism* 5.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

4.14.2. Avaliação da inibição da proliferação de células cancerígenas

As amostras de lapachol, PC01 e cisplatina (fármaco de referência) foram preparadas em uma solução estoque 25 mM em DMSO, previamente esterilizado em filtro de 0,22 micrômetros.

A linhagem cancerígena utilizada foi de adenocarcinoma mamário MCF7, e a linhagem controle de citotoxicidade para células normais foi de epitélio mamário MCF10.

Os frascos contendo as linhagens celulares MCF7 e MCF10 foram lavados com tampão fosfato salino (PBS), em seguida foram adicionados 5 mL do reagente Tryple (Gibco®) para facilitar a remoção das células, foram adicionados 5 mL de meio de cultura RPMI sem vermelho de fenol para diluir o reagente de remoção e interromper a ação. Estas soluções foram centrifugadas por 10 minutos a 1000 x g a 10 °C, e os sobrenadantes foram descartados, as células foram ressuspensas em 5 mL de RPMI sem vermelho de fenol, e contadas em câmara de Neubauer.

Em seguida, as células foram diluídas para a concentração de 4×10^4 células/mL e foram distribuídas em triplicata para cada tratamento em placa de 96 poços (4000 células/poço), o meio utilizado foi Roswell Park Memorial Institute 1640 sem vermelho de fenol (RPMI; Sigma), contendo 10% de soro fetal bovino (FBS; Gibco®), bicarbonato de sódio (2 g/L), l-glutamina (300 mg/L) e 1% (m/v) de penicilina/estreptomicina (Sigma-Aldrich®).

As placas foram incubadas em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂. Após 24 horas o meio de cultura foi removido, as células foram lavadas com PBS para garantir a remoção do

soro fetal bovino, e foram adicionados novos meios sem soro fetal bovino, com incubação de 16 horas. Após este tempo, foram realizados os tratamentos nas concentrações de 250,00; 125,00; 62,50; 31,25; 15,63; 7,81; 3,91 e 1,95 μM de lapachol, PC01 e cisplatina durante 48 horas, sendo observado em intervalos de 12 horas. Os controles, realizados nas mesmas condições dos experimentos foram: controle negativo (RPMI sem FBS + células), controle positivo (RPMI sem FBS + células + cisplatina nas mesmas concentrações), e controle do solvente (RPMI sem FBS + células + 1% de DMSO com diluições seriadas).

4.14.2.1. Ensaio de viabilidade celular das linhagens MCF7 e MCF10

A atividade citotóxica dos tratamentos sobre as linhagens celulares foi realizada com o ensaio colorimétrico com MTT.

A viabilidade celular foi determinada após a adição de 50 μL da solução estoque (2 mg/mL) de brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio em cada poço.

As células foram incubadas a 37 °C por 4 h, os sais de formazan convertidos pelas células vivas foram solubilizados em 50 μL de DMSO e a densidade óptica (DO) foi determinada por espectrofotometria a 570 nm. Os valores obtidos foram utilizados para determinar a porcentagem de células viáveis (VAN MERLOO et al., 2011), comparando com controle negativo, considerado como 100%.

Os resultados expressos como IC_{50} (μM) foram calculados pelo método estatístico de curva concentração-resposta sigmoidal, por meio do software *GraphPad Prism 5.0* (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

5. Resultados e Discussão

5.1. Lapachol

O Lapachol foi sintetizado usando a lausona como material de partida em uma metodologia “*one-pot*” envolvendo uma condensação inicial de Knoevenagel, seguida de redução catalisada por ácido fórmico com rendimento de 78% (Figura 7).

Na Figura 9, é possível observar o pico referente ao lapachol, após o produto da semi-síntese ser submetido à cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), que mostrou o sucesso da obtenção de lapachol com grau de pureza > 95%.

Figura 9. Cromatograma do lapachol obtido por CLAE com absorvância a 280 nm.

Legenda: CLAE: Cromatografia Líquida de Alta Eficiência. Os eixos da figura representam - Eixo y: absorvância a 280nm; eixo x: volume em mL

Fonte: Elaborado pela autora.

A fração referente ao lapachol foi submetida à análise por CG-MS, que identificou o produto como sendo o lapachol (Figura 10). O índice de pureza obtido por CLAE e a identificação por CG-MS tornam o lapachol sintetizado adequado para o uso.

Figura 10. Espectro de massas do Lapachol, obtido por CG-MS.

Fonte: obtida pela autora.

O lapachol apresenta-se como cristais dourados (Figura 11) e insolúveis em água, dessa forma para a sua utilização experimental, em meios de cultivo aquosos, foi necessária a sua dissolução prévia em DMSO.

Figura 11. Cristais dourados de lapachol, obtidos por síntese orgânica tradicional.

Fonte: Foto obtida pela autora.

5.2. Determinação da concentração de Lapachol utilizada no processo de biotransformação

Diferentes espécies de fungos filamentosos foram cultivadas em meio soja-glicose na presença de concentrações de lapachol variando de 400 a 0,195 µg/mL para avaliar, visualmente, sua capacidade de crescimento nessas condições. A figura 12 ilustra um exemplo desse experimento com o fungo *Penicillium corylophilum*.

Figura 12. Avaliação da toxicidade de diferentes concentrações do Lapachol sobre o crescimento do fungo *Penicillium corylophilum*. Da esquerda para a direita: Concentração de 12,5 µg/mL, concentração de 25 µg/mL, concentração de 50 µg/mL e o controle.

Fonte: foto obtida pela autora.

O lapachol não inibiu o crescimento das cepas avaliadas, sendo que a maioria não foi inibida mesmo na maior concentração de lapachol testada (400 µg/mL). No entanto, para esse estudo definiu-se que a maior concentração utilizada seria de 50 µg/mL, concentração já utilizada por outros grupos de pesquisa e que obtiveram bons resultados em processos de biotransformação com naftoquinona (SILVA et al., 2014).

Na tabela 8 encontram-se listadas as concentrações de lapachol escolhidas para cada espécie utilizada nos processos de biotransformação.

Tabela 8. Concentrações de Lapachol escolhidas para os processos de biotransformações.

<i>Fungos Filamentosos</i>	<i>Concentração Lapachol (µg/mL)</i>	<i>Crescimento</i>
<i>Aspergillus flavus</i>	25	Mesofilico
<i>Aspergillus fumigatus</i>	50	Mesofilico
<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	25	Mesofilico
<i>Fusarium oxysporum</i>	50	Mesofilico
<i>Paecilomyces variotii</i>	25	Mesofilico
<i>Penicillium corylophilum</i>	25	Mesofilico
<i>Rhizomucor miehei</i>	50	Termofilico
<i>Rhizopus microsporus</i>	50	Termofilico
<i>Trichoderma asperellum</i>	50	Mesofilico

Fonte: elaborada pela autora.

5.3. Processos de Biotransformação do Lapachol (*Screening*)

Os estudos preliminares de biotransformações do lapachol foram realizados com as nove cepas, com características mesofílicas ou termofílicas (tabela 8). Essas cepas foram escolhidas visando uma diversidade de gênero, espécie e origem, o que diversifica a capacidade metabólica e, conseqüentemente, aumenta as possibilidades de biotransformações para reacionais maior um mesmo substrato.

A seleção de microrganismos se apresenta como uma das principais etapas nos processos de biotransformação (PINHEIRO et al. 2004). Na triagem preliminar com os microrganismos selecionados, os experimentos foram realizados em pequena escala e os metabólitos produzidos foram analisados de modo comparativo com o experimento controle, realizado sem o lapachol.

A princípio foi realizado o processo de fermentação direta, onde os fungos foram inoculados e cultivados diretamente em um meio (soja-glicose) na presença ou na ausência de lapachol durante 10 dias. Segundo Hanson (1992), as chances da geração de um novo produto, nos processos de biotransformação, é maior quando o substrato é adicionado durante a fase de crescimento dos microrganismos, pois a presença do substrato induz a produção de enzimas capazes de biotransformá-los.

Assim, após o bioprocesso, os meios de cultivo foram recolhidos por filtração e os filtrados submetidos a partição líquido-líquido com acetato de etila para obtenção da fração orgânica. As frações orgânicas foram concentradas e analisadas por cromatografia gasosa acoplada a massas (CG-MS). No entanto, os perfis cromatográficos gerados, utilizando a fermentação direta como estratégia (em meio complexo soja-glicose), mostraram uma grande quantidade de produtos polares, gerando perfis pouco resolutivos que dificultaram a identificação dos compostos. A composição simples do meio de cultura facilita o isolamento do produto, porém a transformação depende de enzimas já expressas, podendo não ocorrer de maneira precisa (HANSON, 1992).

Por esse motivo, na tentativa de obter cromatogramas resolvidos, que facilitassem a identificação dos compostos gerados, foi adotado o processo de pré-fermentação. Nessa nova estratégia, os fungos filamentosos foram inoculados e pré-cultivados em meio soja-glicose e após o tempo inicial de cultivo foram transferidos para um meio simples contendo ou não lapachol.

Esse mesmo método foi utilizado nos experimentos de proteômica pela técnica de 2DE, cujos resultados serão abordados na seção 5.5.

5.3.1. Controle de estabilidade do lapachol

A cada experimento de biotransformação foi realizado um controle de estabilidade do lapachol no meio de cultura. Esse controle é necessário porque a estabilidade é um parâmetro importante para garantir que os produtos foram obtidos pela ação do fungo e não devido ao tempo do cultivo, à temperatura ou à agitação. Assim, após 24 h do bioprocessamento, o cromatograma obtido por GC-MS (Figura 13) mostrou dois picos principais: um pico com tempo de retenção de 26,5 min, que se refere ao lapachol, e um pico com tempo de retenção 26,7 min, que se refere à dehidro- α -lapachona.

Figura 13. Cromatogramas (em triplicata) representativos do controle de estabilidade do lapachol no meio de cultura após 24 h (rosa), 48 h (azul) e 72 h (preto) de bioprocessamento. Cromatograma obtido por GC-MS. No eixo X: tempo (min); eixo Y: abundância.

Fonte: obtido pela autora.

A dehidro- α -lapachona (Figura 14), é uma *para*-naftoquinona encontrada em cascas de plantas da família Bignoniaceae, assim como o lapachol, porém em menor quantidade (HUSSAIN; GREEN, 2017).

Figura 14. Estrutura química da dehidro- α -lapachona.

Fonte: elaborada pela autora utilizando o *software* ChemDraw.

A α -lapachona, assim como o lapachol, apresenta atividades biológicas muito interessantes, porém há relatos de que seja menos ativa na ação contra linhagens tumorais (RÍOS-LUCI et al., 2012) e contra o parasita *Trypanossoma cruzi* (BOURGUIGNON et al., 2011). Esse composto também foi identificado por Otten e Rosazza (1981) nos primeiros estudos de biotransformação de lapachol utilizando fungos como agentes biotransformadores (OTTEN; ROSAZZA, 1981).

No cultivo controle também foi encontrado outro derivado do lapachol (pico com tempo de retenção de 30,2 min), em uma baixa quantidade, que corresponde a furanoquinona (Naphtho[1,2-b]furan-4,5-dione) (Figura 15).

Figura 15. Estrutura química da furanoquinona.

Fonte: elaborada pela autora utilizando o *software* ChemDraw.

Inicialmente, essa furanoquinona foi isolada da planta *Avicennia marina* (SUTTON; GILLAN; SUSIC, 1985) e, posteriormente, sintetizada a partir do lapachol, com baixo rendimento global (SINGH; JAIN; KRISHNA, 2001). Essa molécula possui atividade anticancerígena relatada em vários trabalhos na literatura (revisado por TSAI et al., 2014).

O composto com tempo de retenção em 31,4 não pode ser confirmado somente por CG-MS, mas acredita-se que seja 2-acetil-3-hidroxinaftoquinona (massa molar de 256).

As moléculas derivadas do lapachol e detectadas no ensaio de controle de estabilidade serão citadas nos processos de *screening*, porém, não serão consideradas produtos de biotransformação.

Após o controle de estabilidade, as nove cepas de fungos filamentosos foram avaliadas frente à sua capacidade de biotransformarem o lapachol. Nesses experimentos, as cepas foram cultivadas por 24, 48, 72 e 96 horas. No entanto, observou-se que nesses tempos de cultivo algumas cepas degradaram o lapachol. Por isso, foram estabelecidos intervalos de tempos menores como 6, 12 e 18 horas. Nas seções de 5.3.2 a 5.3.10 serão apresentados, resumidamente, alguns resultados obtidos do bioprocesso com as cepas utilizadas no *screening*.

5.3.2. Biotransformação do lapachol com o fungo *Aspergillus flavus*

A biotransformação do lapachol pelo fungo *A. flavus* foi analisada comparando os cromatogramas do cultivo com lapachol contra os cromatogramas controle (cultivo do fungo na ausência de lapachol e estabilidade do lapachol). No terceiro dia de biotransformação, tempo máximo de avaliação, foi possível observar no extrato uma grande quantidade de lapachol e α -lapachona (Figura 16).

Figura 16. Cromatogramas obtidos por GC-MS da biotransformação do lapachol com o fungo *A. flavus* no terceiro dia de biotransformação. Em rosa: cromatograma da biotransformação com o lapachol; em azul: cromatograma do controle fúngico; em preto: cromatograma do controle de estabilidade do lapachol no meio de cultura. No eixo X: tempo (min); eixo Y: abundância.

Fonte: obtido pela autora.

Também foi observada a ausência de novos picos, diferentes daqueles observados no controle de estabilidade do lapachol, não sendo possível identificar nenhum produto de biotransformação. Considerando os resultados observados, o fungo *A. flavus* não se mostrou uma cepa interessante para os processos de biotransformação do lapachol nas condições experimentais utilizadas.

5.3.3. Biotransformação do lapachol com o fungo *Aspergillus fumigatus*.

Os cromatogramas da biotransformação do lapachol pelo fungo *A. fumigatus* estão representados na figura 17.

Figura 17. Cromatogramas obtidos por GC-MS da biotransformação do lapachol com o fungo *A. fumigatus*. Em verde: cromatograma do controle de estabilidade do lapachol no meio de cultura; em vermelho: cromatograma do controle fúngico em 24h h; em azul: cromatograma da biotransformação com o lapachol em 24 h; em rosa: cromatograma do controle fúngico em 48 h em preto: cromatograma da biotransformação com o lapachol em 48 h. No eixo X: tempo (min); eixo Y: abundância.

Fonte: obtido pela autora.

É possível notar que, nas primeiras 24 horas de cultivo (cromatograma azul), foram detectadas pequenas quantidades de lapachol e seu derivado dehidro- α -lapachona. No cromatograma em preto, observa-se que, após 48 horas de bioprocessamento, foi identificada apenas a α -lapachona. Não foram observados picos nos cromatogramas que fossem diferentes dos controles. Dessa forma, *A. flavus* degradou o lapachol nos tempos analisados.

Além do derivado do lapachol, foram detectados dois metabólitos secundários interessantes nos bioprocessos com lapachol: o Pirrol[1,2-a]pirazina-1,4-diona,

hexahidro-3-(2-metilpropil), um potente antimicrobiano já identificado em alguns fungos, como por exemplo, no fungo endofítico e termofílico *Mortierella alpina* (MELO et al., 2014); e a outra molécula identificada foi o 2,4-bis phenol, que é promissora devido a sua excelente atividade antimicrobiana (KUMAR; DURAIANDIYAN; IGNACIMUTHU, 2014).

Metabólitos secundários são sintetizados quando o crescimento microbiano está na fase estacionária, são freqüentemente bioativos e de baixa massa molecular. São produzidos a partir de metabólitos primários, como aminoácidos e outras moléculas. Devido a suas propriedades bioativas, muitos destes metabólitos têm sido adotados para o uso farmacêutico como os antibióticos, agentes hipocolesterolemiantes, inibidores tumorais e imunossupressores (CHAVEZ et al., 2015; LOPES, 2011; YU; KELLER, 2005).

A produção de metabólitos secundários é influenciada pelas condições de cultivo, especialmente a composição do meio. Além disso, nem todas as linhagens de uma mesma espécie são capazes de produzir determinado metabólito (CHAVEZ et al., 2015; LOPES, 2011; YU; KELLER, 2005). Dessa forma, o lapachol agiu como indutor de metabolitos secundários pelo fungo.

5.3.4. Biotransformação do lapachol com o fungo *Fusarium oxysporum*.

No bioprocesso com o fungo *F. oxysporum* ocorreu uma baixa taxa de biotransformação do lapachol o qual manteve sua quantidade, após 72 horas de cultivo, praticamente inalterada (Figura 18).

Figura 18. Cromatogramas obtidos por GC-MS da biotransformação do lapachol com o fungo *F. oxysporum* após 72 h de bioprocesso. Em preto: Cromatograma da biotransformação com o lapachol; em rosa: cromatograma do controle fúngico; em azul: cromatograma do controle de estabilidade do lapachol no meio de cultura. No eixo X: tempo (min); eixo Y: abundância).

Fonte: obtido pela autora.

No entanto, foi detectado como produto de biotransformação, o norlapachol (Figura 19), um derivado do lapachol já descrito na literatura, com atividades biológicas interessantes como antimicobacteriana (CARNEIRO et al., 2011), antitripanossômica (DA SILVA et al., 2014), antileishmania (GUIMARÃES et al., 2013), dentre outras.

Figura 19. Estrutura química do norlapachol.

Fonte: obtido pela autora.

Já é descrito na literatura que o lapachol é convertido em norlapachol por uma reação de oxidação denominada Oxidação de Hooker. Essa reação apresenta um complexo mecanismo, onde a cadeia lateral alquílica do lapachol é encurtada em uma unidade de carbono (EYONG et al., 2013). A capacidade do fungo de biotransformar o lapachol em norlapachol retrata a complexidade e relevância das reações mediadas pelas enzimas destes microrganismos.

Além disso, foi também identificada a substância Pirrol[1,2-a] pirazina-1,4-diona, hexahidro-3-(2-metilpropil), um potente antimicrobiano já descrito anteriormente (seção 5.3.3).

5.3.5. Biotransformação do lapachol com o fungo *Paecilomyces variotii*

O perfil de CG-MS da biotransformação do *P. variotii* (Figura 20) não mostrou nenhum produto de biotransformação. Observando-se o cromatograma é possível visualizar que não há mais lapachol depois de 24h de bioprocessamento, mostrando que o substrato foi totalmente degradado pelo fungo.

Foram realizados experimentos com intervalos de tempo menores e foi constatado que mesmo após 6 h de biotransformação, o lapachol já havia sido degradado e nenhum análogo foi verificado.

Figura 20. Cromatogramas obtidos por GC-MS da biotransformação do lapachol com o fungo *P. variotti*. Em verde: cromatograma do controle de estabilidade do lapachol no meio de cultura; em vermelho: cromatograma do controle fúngico em 24h h; em azul: cromatograma da biotransformação com o lapachol em 24 h; em rosa: cromatograma do controle fúngico em 48 h em preto: cromatograma da biotransformação com o lapachol em 48 h. No eixo X: tempo (min); eixo Y: abundância.

Fonte: obtido pela autora.

A metabolização rápida do lapachol pelo fungo foi um fato bastante interessante e talvez indique que esse fungo já tenha tido contato com moléculas de estruturas semelhantes à essa naftoquinona, o que levaria à presença de genes envolvidos nas vias de degradação dessa molécula.

5.3.6. Biotransformação do lapachol com o fungo *Penicillium corylophilum*

Na biotransformação com o *P. corylophilum* praticamente todo o lapachol foi degradado e/ou biotransformado pelo fungo nas primeiras 24h, e com 48h todo lapachol e deidro- α -lapachona foram degradados, como pode ser visto na figura 21.

Figura 21. Cromatogramas obtidos por GC-MS da biotransformação do lapachol com o fungo *P. corylophyllum*. Em verde: cromatograma do controle de estabilidade do lapachol no meio de cultura; em vermelho: cromatograma do controle fúngico em 24h h; em azul: cromatograma da biotransformação com o lapachol em 24 h; em rosa: cromatograma do controle fúngico em 48 h em preto: cromatograma da biotransformação com o lapachol em 48 h. No eixo X: tempo (min); eixo Y: abundância.

Fonte: obtido pela autora.

No entanto, foi identificado o isolapachol (Figura 22), um análogo do lapachol que também apresenta atividade molucicida (DOS SANTOS et al., 2001; FEITOSA DOS SANTOS et al., 2000) e antileishmania (LIMA et al., 2004). Na síntese orgânica tradicional, esse composto pode ser obtido por semi-síntese a partir da lausona.

Figura 22. Estrutura química do isolapachol.

Fonte: elaborada pela autora utilizando o *software* ChemDraw.

5.3.7. Biotransformação do lapachol com o fungo *Rhizomucor miehei*

Na biotransformação com *R. miehei* não foi identificado nenhum produto de biotransformação (Figura 23).

Figura 23. Cromatograma obtido por GC-MS após 36 h de biotransformação do lapachol com o fungo *R. miehei*. Em rosa: Cromatograma da biotransformação com o lapachol; em preto: cromatograma do controle de estabilidade do lapachol no meio de cultura. No eixo X: tempo (min); eixo Y: abundância.

Fonte: obtido pela autora.

No entanto, foi identificada a substância Pirrol[1,2-a] pirazina-1,4-diona, hexahidro-3-(2-metilpropil), um potente antimicrobiano já descrito anteriormente na seção 5.3.3.

5.3.8. Biotransformação do lapachol com o fungo *Rhizopus microsporus*

Após 48 h de biotransformação com o fungo *R. microsporus* (Figura 24) foram detectados o lapachol e a α -lapachon em grandes quantidades. Também foi identificado o norlapachol (Figura 19), já descrito na seção 5.3.4. Além disso, outro produto de biotransformação foi detectado, mas não pôde ser identificado apenas pelo CG-MS (tempo de retenção de 34,56, indicado pela seta vermelha no cromatograma).

Figura 24. Cromatogramas obtidos por CG-MS da biotransformação do lapachol com o fungo *R. microsporus* após 48 h de bioprocesso. Em preto: cromatograma da biotransformação com o lapachol; em rosa: cromatograma do controle fúngico; em azul: cromatograma do controle de estabilidade do lapachol no meio de cultura. No eixo X: tempo (min); eixo Y: abundância.

Fonte: obtido pela autora.

Também foram identificados os compostos, 2,4-bis(1,1-dimetil-etil)-fenol (KUMAR, DURAIPANDIYAN, & IGNACIMUTHU, 2014), Pirrol[1,2-a] pirazina-1,4-diona, hexahidro-3-(2-metilpropil), já descritos anteriormente na seção 5.3.3, além da Cyclo Pro-Leu, uma dicetopiperazina que apresenta atividade antibacteriana, antifúngica, entre outras (KUMAR, DURAIPANDIYAN, & IGNACIMUTHU, 2014).

5.3.9. Biotransformação do lapachol com o fungo *Trichoderma asperellum*

Durante as primeiras 48h de bioprocesso com o fungo *T. asperellum*, o lapachol e seu análogo α -lapachona ainda estavam presentes em grande quantidade (Figura 25). Após 72h, todo o lapachol havia sido biotransformado.

Figura 25. Cromatogramas obtidos por GC-MS da biotransformação do lapachol com o fungo *T. asperellum*. Em verde: cromatograma do controle de estabilidade do lapachol no meio de cultura; em vermelho: cromatograma do controle fúngico em 24h h; em azul: cromatograma da biotransformação com o lapachol em 24 h; em rosa: cromatograma do controle fúngico em 48 h em preto: cromatograma da biotransformação com o lapachol em 48 h. No eixo X: tempo (min); eixo Y: abundância.

Fonte: obtido pela autora.

Pelas análises de CG-MS dos dois primeiros dias desse bioprocesso foi identificado o metabólito secundário α -bisabolol, um sesquiterpeno comumente presente na camomila, que já é relatado na literatura e apresenta atividade antimicrobiana (FORRER et al., 2013), atividade anti-leishmania (CORPAS-LÓPEZ et al., 2015), antitumoral (SEKI et al., 2011), anti-inflamatória (MAURYA et al., 2014), entre outras.

5.3.10. Biotransformação do lapachol com o fungo *Phanerochaete chrysosporium*

Foi verificado que o fungo *P. chrysosporium* biotransformou o lapachol no período de 24 horas, sendo que em 48 horas os picos referentes aos biotransformados desapareceram. Dessa forma, foram avaliados tempos menores de biotransformação (12, 18 e 24 horas) que estão representados na figura 26.

Figura 26. Cromatogramas obtidos por CG-MS da biotransformação do lapachol com o fungo *P. chrysosporium*. Em verde oliva: cromatograma do controle de estabilidade do lapachol no meio de cultura; em azul escuro: cromatograma do controle fúngico em 12 h; em verde: cromatograma da biotransformação com o lapachol em 12 h; em vermelho: cromatograma do controle fúngico em 18 h; em azul claro: cromatograma da biotransformação com o lapachol em 18 h; em rosa: cromatograma do controle fúngico em 24 h; em preto: cromatograma da biotransformação com o lapachol em 24 h. No eixo X: tempo (min); eixo Y: abundância.

Fonte: obtido pela autora.

Para a continuidade dos experimentos em maior escala, foi selecionado o tempo de 24 h, afim de garantir a maior concentração dos produtos sem risco de degradação do biotransformado. Na figura 27 são apresentados os cromatogramas obtidos por CG-MS após 24 h de bioprocessamento onde foram observados dois compostos derivados do processo de biotransformação do lapachol, denominados de compostos PC01 e PC02.

Figura 27. Cromatogramas obtidos por CG-MS da biotransformação do lapachol com o fungo *P. chrysosporium*, após 24h de biotransformação. Em preto: Cromatograma da biotransformação com o lapachol; em rosa: cromatograma do controle fúngico; em azul: cromatograma do controle de estabilidade do lapachol no meio de cultura. As setas vermelhas indicam os picos referentes aos produtos de biotransformação. No eixo X: tempo (min); eixo Y: abundância.

Fonte: obtido pela autora.

Retomando os experimentos com as nove cepas fúngicas, é possível afirmar que a maioria dos fungos testados tiveram, em maior ou em menor grau, a capacidade de biotransformar o lapachol. No entanto, o fungo *P. chrysosporium* foi selecionado para a continuação do trabalho pela sua capacidade de biotransformar o lapachol e gerar derivados, sejam eles já descritos ou preferencialmente novos na literatura e por possuir, no momento da escolha, genoma sequenciado, o que facilitaria nos estudos de proteômica. Ademais, este fungo já foi utilizado de modo eficiente para bioextração de metais pesados no tratamento de águas residuais e diversos outros processos de biorremediação (WU et al., 2009), o que demonstra o potencial enzimático desse fungo.

Devido a essas características, esse fungo mostra-se interessante para estudos de biotransformação. Nesse contexto, os resultados apresentados nos próximos tópicos se referem, portanto, aos estudos de biotransformação e proteômica do fungo *P. chrysosporium*.

5.4. Isolamento dos produtos da biotransformação do lapachol pelo fungo *P. chrysosporium*

Inicialmente, um bioprocessamento com 80 frascos tipo *erlenmeyers* foi realizado resultando em 2,5 litros de meio cultivados com lapachol e 1,5 litros de meio cultivado do controle. A fração orgânica do meio com lapachol foi submetida ao processo de purificação em coluna cromatográfica de gel de sílica. Ao final da cromatografia foram obtidos 4 mg do composto

PC01 puro, que teve sua estrutura elucidada (seção 5.4.1) e 3 mg do composto PC02 com impurezas, que, infelizmente ainda não teve sua estrutura elucidada devido à dificuldade de purificação do mesmo.

Após a realização de mais experimentos de biotransformação, foi constatado que o processo de biotransformação direto (como descrito na seção 4.5.2) também resultava na formação dos mesmos produtos biotransformados. Dessa forma, na tentativa de se obter maior quantidade de produtos e consequentemente, melhores espectros de RMN para elucidação da estrutura do PC02, esse bioprocessos foi realizado em grande escala. No entanto, devido à grande dificuldade de purificação de PC02, sua estrutura permaneceu não elucidada.

5.4.1. Determinação da estrutura do Composto PC01

O derivado PC01, isolado como descrito anteriormente, teve sua estrutura determinada (Figura 28) por RMN uni e bidimensionais, além de espectrometria de massas. Esse derivado do lapachol ainda não foi descrito na literatura.

Figura 28. Estrutura proposta do derivado PC01 gerado a partir da biotransformação do lapachol com o fungo *P. chrysosporium*

Fonte: elaborada pela autora utilizando o *software* ChemDraw.

O espectro de RMN ^1H está representado na figura 29 e os demais espectros de RMN, como o ^{13}C , DEPT, COSY, HSQC e HMBC, estão apresentados nos apêndices A a E, respectivamente. Os dados espectroscópicos obtidos para o derivado PC01 estão apresentados na tabela 9.

Figura 29. Espectro de RMN obtido de ^1H obtido em CDCl_3 a 300 MHz para o composto PC01.

Fonte: obtido pela autora.

Tabela 9. Dados de RMN ^1H , ^{13}C e HMBC para o derivado PC01.

Número	δ_{H} (J em Hz)	δ_{C}	HMBC
1		198,9	
2		80,2	
3	4,02, d (9,1)	79,9	C-2, C-4, C-1'
4	4,98, d (9,1)	70,5	C-3, C-4a, C8a
4 ^a		128,9	
5	7,83, d (7,9)	127,5	C-4, C-6
6	7,46, t (7,6)	128,8	C-5
7	7,70, t (7,6)	135,1	C-8, C-8 ^a
8	7,99, d (7,8)	127,5	C-1, C-7, C-8a
8 ^a		141,6	
1'	2,11, dd (14,6;7,1) e 2,88, dd (14,6; 8)	29,8; 29,6	C-1, C-2, C-2', C-3'

Continua

Número	δ_H (J em Hz)	δ_c	HMBC
2'	4,99, m	115,8	C-4', C-5'
3'		137,4	
4' e 5'	1,44, s e 1,68, s	18,1 e 26,1	C-2', C-3', C4', C-5'

Fonte: elaborada pela autora.

A figura 30 mostra o comportamento do derivado PC01 nos espectros de RMN bidimensionais, os quais foram úteis para elucidação da molécula.

Figura 30. Representação da correlação observada no RMN HMBC para o derivado PC01

Fonte: elaborada pela autora utilizando o *software* ChemDraw.

Os sinais relativos referentes a porção aromática do composto encontram-se na região entre 7,4-7,9, sendo que os hidrogênios ligados ao C-5 (δ 7,83) e ao C-8 (δ 7,99) se apresentam como dupletos devido ao acoplamento com os hidrogênios ligados aos C-6 e C-7 respectivamente. Já os hidrogênios ligados aos C-6 (δ 7,46) e C-7 (δ 7,70) se apresentam como tripleto aparente. O tripleto aparente é formado da sobreposição de dois dupletos relativos aos acoplamentos com os hidrogênios na posição *orto* de C-6 e C-7.

Em relação a cadeia prenífica ligada ao C-2, os sinais relativos dos hidrogênios das metilas C-4' e C-5' se apresentam como simpletos (δ 1,44 e 1,68). O hidrogênio ligado a C-2'

encontra-se sobreposto ao sinal do hidrogênio de C-4, não sendo possível verificar a multiplicidade. Os sinais dos hidrogênios diastereotópicos ligados ao C-1' se apresentam como duplo-dupletos (δ 2,11 e 2,88) devido ao acoplamento geminal e o acoplamento com o hidrogênio C-2'.

Os outros hidrogênios ligados a C-3 (δ 4,02) e C-4 (δ 4,98) do anel ciclohexanona apresentam-se como dupletos com constante de acoplamento que permite propormos que esses hidrogênios encontram-se em posição relativa *trans* (CHINWORRUNGSEE et al., 2006). Apesar de ser possível estabelecer a estereoquímica relativa desses dois hidrogênios, a estereoquímica absoluta do composto ainda não foi determinada. Além disso, devido à baixa quantidade do produto obtido e a sua característica oleosa, não possível obter um cristal que permitisse a determinação da estereoquímica por cristalografia de raio-X.

A redução regiosseletiva de uma das carbonilas pode ser confirmada pela presença de apenas um sinal relativo a carbonila C1 (δ 198,9).

É possível também observar, no espectro de ^1H , a presença de sinais que não apresentaram nenhuma correlação nos espectros de RMN bidimensionais, o que nos permite concluir que se tratam de impurezas. Apesar de aparecerem impurezas, pelo cromatograma obtido por CG-MS foi possível determinar a pureza do composto em 83%.

O composto possui massa molecular teórica de 262,12, o que corrobora com o resultado da espectrometria de massas EI com fragmentação (Figura 31).

Figura 31. Espectro de massas EI (CG-MS) do derivado PC01.

<< Target >>

Line#:2 R.Time:17.485(Scan#:2698) MassPeaks:194

RawMode:Single 17.485(2698) BasePeak:147.05(4071153)

BG Mode:None

Fonte: obtido pela autora.

A massa do composto também foi confirmada por espectrometria de massas de alta resolução, sendo possível observar a massa da molécula sodiada (285,1101) e ligada ao potássio (301,1008). O espectro da fragmentação encontra-se no APÊNDICE F.

O composto PC01 apresenta a adição de hidroxilas que aumentam a polaridade do derivado em relação ao lapachol. Essa característica concorda com o fato de que reações de biotransformação de xenobióticos geralmente levam a formação de compostos mais polares, o que facilita a sua excreção (ASHA; VIDYAVATHI, 2009).

Já é descrito na literatura que os fungos do gênero *Phanerochaete* produzem uma série de peroxidases extracelulares não específicas que são capazes de degradar uma diversidade de substratos. Além disso, esses fungos são descritos pela capacidade das suas enzimas em adicionarem grupamentos hidroxilas aos substratos, como ocorreu na formação de PC01, tornando-os mais polares (SILVA; MELO; FAY, 2004).

Para a formação de PC01 (figura 28), houve a redução seletiva de uma das carbonilas. Esse tipo de redução seletiva é dificilmente ou impossível de ser conseguida por síntese orgânica tradicional. A redução regio e estereoseletiva da função carbonila usando biocatalisadores é de grande importância na síntese de intermediários farmacêuticos quirais (HUISMAN; COLLIER, 2013).

Pelos métodos tradicionais, a obtenção de produtos opticamente ativos muitas vezes requer várias etapas de proteção e desproteção de grupos funcionais. A biocatálise se apresenta como uma etapa economicamente viável no desenvolvimento de processos químicos sustentáveis para a obtenção de produtos ou intermediários de síntese opticamente ativos.

5.5. Análises das proteínas intracelulares pela técnica de 2DE

Os extratos intracelulares obtido de *P. chrysosporium* provenientes dos processos de biotransformação do lapachol e dos cultivos controles, nos tempos de 18 horas (APÊNDICE G), 24 horas e 30 horas (APÊNDICE H), foram submetidos a eletroforese bidimensional (2DE). O perfil bidimensional dos ensaios realizados com 24 horas de cultivo está apresentado na (Figura 32). O tempo de 24 horas foi selecionado para identificação das proteínas, pois foi também o tempo utilizado para realização dos experimentos em larga escala.

Figura 32. Fotos dos géis bidimensionais representativos das proteínas extraídas do micélio de *P. chrysosporium* submetido ao bioprocesso por 24 horas. (A) controle, (B) lapachol.

O marcador de massa molecular utilizado foi o Amersham ECL Full-Range Rainbow com o seguinte padrão de bandas 225, 150, 102, 76, 52, 38, 31, 24, 17 e 12 kDa. Os géis foram carregados com 150 µg de proteínas totais e corados com *Coomassie* coloidal G-250.

Fonte: obtida pela autora.

As análises dos géis bidimensionais revelaram a presença de 471 ± 62 *spots* na condição controle e 508 ± 85 *spots* na condição lapachol. As análises do *software* Image Master 2D Platinum indicaram que desses *spots*, 398 foram comuns às duas condições, 221 foram exclusivos do cultivo controle e 185 exclusivos do cultivo com lapachol.

Matsuzaki et al, 2008 em um estudo proteômico com *P. chrysosporium* envolvendo a biodegradação do ácido benzoico mostrou que mais de 600 proteínas foram observadas no gel 2D e 50 proteínas estavam com expressão aumentada (*fold* > 2) e ou exclusivas em relação ao controle, mostrando também que esses fungos alteram seu perfil proteico em decorrência da exposição de xenobióticos.

Após as análises dos géis 2D, os *spots* selecionados foram analisados por espectrometria de massas (MALDI-TOF/TOF). Em nosso trabalho, 143 *spots* foram extraídos e foram identificadas 82 proteínas utilizando o *software* Mascot online. A tabela 10 mostra as proteínas identificadas e organizadas em grupos: aumentadas no cultivo com lapachol em relação ao controle (24), aumentadas no cultivo controle em relação ao lapachol (18), exclusivas no cultivo com lapachol (6), exclusivas no cultivo controle (7) e as comuns sem diferenças estatisticamente significantes entre o lapachol e o controle (26). Nesse estudo, todas as proteínas grafadas em negrito da tabela 10 serão posteriormente discutidas quanto às suas propriedades biológicas.

Tabela 10. Proteínas intracelulares do processo de biotransformação do lapachol e do controle após 24 h de cultivo, identificadas pelo Mascot.

<i>Spots</i>	<i>Acesso</i>	<i>Proteína</i>	<i>Escore</i>	<i>M(Da)</i>	<i>pI</i>	<i>Cobertura</i>
				<i>teórica</i>	<i>teórico</i>	<i>(%)</i>
Aumentadas no lapachol						
40	gi 449541391	peroxiredoxin PRX5 [<i>Gelatoporia subvermispora</i> B]	75	18161	5,70	5
42	gi 576984570	PGM2-phosphoglucomutase, putative [<i>Rhizoctonia solani</i> AG-3 Rhs1AP]	161	66317	5,80	4
63	G3P_PHACH	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase [<i>P. chrysosporium</i>]	66	36579	7,59	4
65	gi 599388592	hypothetical protein PHACADRAFT_260432 [<i>Phanerochaete carnosae</i>]	141	24362	8,64	8
85	gi 58268632	hypothetical protein [<i>Cryptococcus neoformans</i> var. <i>neoformans</i> JEC21]	61	58582	6,00	3
95	gi 996637683	serine/threonine protein kinase [<i>Colletotrichum nymphaeae</i> SA-01]	73	90698	5,98	1
96	gi 754377061	hypothetical protein PHLGIDRAFT_116158 [<i>Phlebiopsis gigantea</i>]	90	15928	5,44	7
103	gi 599350491	hypothetical protein PHACADRAFT_248487 [<i>Phanerochaete carnosae</i>]	152	26990	5,22	9
104	gi 599382432	hypothetical protein PHACADRAFT_258633 [<i>Phanerochaete carnosae</i>]	61	28815	6,1	3
113	gi 599352440	hypothetical protein PHACADRAFT_249331 [<i>Phanerochaete carnosae</i>]	71	31446	5,97	8
118	gi 599372313	hypothetical protein PHACADRAFT_255375 [<i>Phanerochaete carnosae</i>]	168	57899	5,90	9
125	gi 754376621	hypothetical protein PHLGIDRAFT_126410 [<i>Phlebiopsis gigantea</i>]	332	29776	7,03	22
126	gi 763729231	hypothetical protein HYPsudRAFT_132546 [<i>Hypholoma sublateritium</i>]	71	24318	5,55	3
138	gi 302672998	hypothetical protein SCHCODRAFT_79949 [<i>Schizophyllum commune</i>]	279	28759	5,91	16
181	gi 618805032	malate dehydrogenase [<i>Stereum hirsutum</i>]	340	35644	8,8	15
190	RSSA_ARTOC	40S ribosomal protein [<i>Arthroderma otae</i>]	70	31530	4,79	4

<i>Spots</i>	<i>Acesso</i>	<i>Proteína</i>	<i>Escore</i>	<i>M(Da)</i> <i>teórica</i>	<i>pI</i> <i>teórico</i>	<i>Cobertura</i> <i>(%)</i>
Aumentadas no lapachol						
205	gi 618808089	transaldolase [<i>Stereum hirsutum</i>]	283	36245	5,84	12
221	gi 599395476	hypothetical protein PHACADRAFT_262596 [<i>Phanerochaete carnosae</i>]	117	40445	5,62	6
225	gi 924116634	hypothetical protein RSOLAG22IIIB_05869 [<i>Rhizoctonia solani</i>]	95	39387	6,28	8
79	gi 512125430	Chain A, Crystal Structure of The Glutathione Transferase Ure2p1 [<i>Phanerochaete Chrysosporium</i>]	136	25505	7,01	10
235	gi 763732844	hypothetical protein HYPsudRAFT_153762 [<i>Hypholoma sublateritium</i>]	199	44446	5,00	4
117	gi 927750864	opine oxidase subunit b [<i>Fusarium langsethiae</i>]	66	40129	4,88	2
Aumentadas no Controle						
28	gi 599357357	hypothetical protein PHACADRAFT_181976 [<i>Phanerochaete carnosae</i>]	205	16348	5,41	21
107	gi 629659663	putative phosphomannomutase protein [<i>Eutypa lata UCRELI</i>]	89	31070	5,34	9
133	gi 599389465	hypothetical protein PHACADRAFT_260738 [<i>Phanerochaete carnosae</i>]	133	23365	4,5	7
149	gi 62420901	14-3-3 1 protein [<i>Phanerochaete chrysosporium</i>]	465	28911	4,76	20
188	RSSA_LACBS	40S ribosomal protein S0 [<i>Laccaria bicolor</i>]	173	31115	5,35	8
199	gi 336375868	hypothetical protein SERLA73DRAFT_173643 [<i>Serpula lacrymans</i>]	312	39123	5,95	16
204	gi 599352979	hypothetical protein PHACADRAFT_249505 [<i>Phanerochaete carnosae</i>]	123	40297	6,06	10
227	gi 599395476	hypothetical protein PHACADRAFT_262596 [<i>Phanerochaete carnosae</i>]	86	40445	5,62	4
246	LEU3_PHACH	3-isopropyl malate dehydrogenase [<i>Phanerochaete chrysosporium</i>]	125	40789	9,17	7
247	gi 156036492	hypothetical protein SS1G_12935 [<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>]	62	43967	5,97	2

<i>Spots</i>	<i>Acesso</i>	<i>Proteína</i>	<i>Escore</i>	<i>M(Da)</i> <i>teórica</i>	<i>pI</i> <i>teórico</i>	<i>Cobertura</i> <i>(%)</i>
Aumentadas no Controle						
252	gi 691786864	hypothetical protein BN946_scf184781.g9 [<i>Trametes cinnabarina</i>]	268	43382	5,62	6
261	gi 74049161	S-adenosyl-L-homocysteine hydrolase [<i>Volvariella volvacea</i>]	294	47279	5,93	10
280	gi 599386804	hypothetical protein PHACADRAFT_148183 [<i>Phanerochaete carnososa</i>]	135	40617	5,45	5
281	gi 599350337	hypothetical protein PHACADRAFT_248428 [<i>Phanerochaete carnososa</i>]	531	47390	5,66	24
286	gi 599350337	hypothetical protein PHACADRAFT_248428 [<i>Phanerochaete carnososa</i>]	256	47390	5,66	7
177	gi 302696543	hypothetical protein SCHCODRAFT_71897 [<i>Schizophyllum commune</i>]	90	44344	4,74	4
284	gi 695534355	hypothetical protein HETIRDRAFT_145503 [<i>Heterobasidion irregulare</i>]	306	53748	6,73	9
296	gi 449548209	hypothetical protein CERSUDRAFT_112848 [<i>Gelatoporia subvermispora</i>]	168	47823	5,61	6
Exclusivas do Lapachol						
374	TSA1_CANAL	peroxiredoxin TSA1 [<i>Candida albicans</i>]	65	21960	4,98	7
390	gi 636618909	aconitate hydratase [<i>Trametes versicolor</i>]	61	85809	6,12	1
398	gi 472581922	glycosyltransferase family 4 protein [<i>Rhodotorula toruloides</i>]	61	71304	7,11	1
427	gi 754370414	hypothetical protein PHLGIDRAFT_130293 [<i>Phlebiopsis gigantea</i>]	89	37122	5,41	8
440	gi 599348896	hypothetical protein PHACADRAFT_111557 [<i>Phanerochaete carnososa</i>]	109	58266	7,64	6
417	gi 55792860	thioredoxin reductase [<i>Cryptococcus neoformans</i> var. <i>grubii</i>]	64	37044	4,96	2
Exclusivas do Controle						
481	gi 636604607	ubiquitin-domain-containing protein [<i>Trametes versicolor</i>]	262	86402	8,52	7

<i>Spots</i>	<i>Acesso</i>	<i>Proteína</i>	<i>Escore</i>	<i>M(Da)</i> <i>teórica</i>	<i>pI</i> <i>teórico</i>	<i>Cobertura</i> <i>(%)</i>
Exclusivas do Controle						
515	gi 575477414	hypothetical protein BATDEDRAFT_34772 [<i>Batrachochytrium dendrobatidis</i>]	69	83363	9,25	1
526	gi 599383649	hypothetical protein PHACADRAFT_259077 [<i>Phanerochaete carnosae</i>]	226	31857	5,88	12
537	gi 164564766	NAD-dependent formate dehydrogenase [<i>Gelatoportia subvermisporea</i>]	325	39517	6,28	11
544	gi 599350251	hypothetical protein PHACADRAFT_248374 [<i>Phanerochaete carnosae</i>]	138	37136	5,31	9
547	gi 599389767	hypothetical protein PHACADRAFT_260849 [<i>Phanerochaete carnosae</i>]	101	47140	5,93	2
554	gi 599400113	hypothetical protein PHACADRAFT_178364 [<i>Phanerochaete carnosae</i>]	61	61609	6,07	2
Proteínas Comuns sem diferenças estatísticas de expressão						
0	gi 695537273	hypothetical protein HETIRDRAFT_432146 [<i>Heterobasidion irregulare</i>]	68	13841	4,68	11
22	gi 599349845	hypothetical protein PHACADRAFT_248193 [<i>Phanerochaete carnosae</i>]	64	12418	5,56	10
30	gi 358371103	DUF1348 domain protein [<i>Aspergillus kawachii</i>]	70	18710	5,21	5
87	gi 401625128	scp160p [<i>Saccharomyces arboricola</i> H-6]	62	135357	5,71	1
110	gi 599353964	hypothetical protein PHACADRAFT_249863 [<i>Phanerochaete carnosae</i>]	104	27122	6,16	8
68	gi 636577667	glycosyltransferase family 2 protein [<i>Setosphaeria turcica</i> Et28A]	61	32560	8,59	4
91	gi 513030995	aaceriAFR481Wp [<i>Saccharomycetaceae</i> sp. 'Ashbya aceri']	59	14229	10,5	9
94	gi 599369793	hypothetical protein PHACADRAFT_254575 [<i>Phanerochaete carnosae</i>]	84	79374	6,03	3
158	gi 597984239	short-chain dehydrogenase [<i>Dichomitus squalens</i> LYAD-421 SS1]	86	30301	5,66	6
249	gi 409047276	hypothetical protein PHACADRAFT_118722 [<i>Phanerochaete carnosae</i>]		42964	6,87	2

<i>Spots</i>	<i>Acesso</i>	<i>Proteína</i>	<i>Escore</i>	<i>M(Da)</i>	<i>pI</i>	<i>Cobertura</i>
				<i>teórica</i>	<i>teórico</i>	<i>(%)</i>
Proteínas Comuns sem diferenças estatísticas de expressão						
301	gi 599385967	hypothetical protein PHACADRAFT_259730 [<i>Phanerochaete carnosae</i>]	114	55150	6,19	5
347	gi 599374286	hypothetical protein PHACADRAFT_256057 [<i>Phanerochaete carnosae</i>]	131	77183	5,76	3
154	gi 754372387	hypothetical protein PHLGIDRAFT_74762 [<i>Phlebiopsis gigantea</i>]	205	35005	5,79	19
294	gi 302692110	hypothetical protein SCHCODRAFT_65406 [<i>Schizophyllum commune</i>]	316	57468	5,69	11
309	gi 754378234	hypothetical protein PHLGIDRAFT_100713 [<i>Phlebiopsis gigantea</i>]	131	52302	5,03	4
330	gi 599404079	hypothetical protein PHACADRAFT_265217 [<i>Phanerochaete carnosae</i>]	708	63123	5,82	21
282	gi 827765652	fumarate hydratase [<i>Schizopora paradoxa</i>]	378	50453	6,1	12
193	gi 599391142	hypothetical protein PHACADRAFT_261305 [<i>Phanerochaete carnosae</i>]	248	34310	6,46	7
207	gi 169857103	TAL1 [<i>Coprinopsis cinerea</i> okayama7#130]	150	36037	5,51	7
229	gi 599405258	hypothetical protein PHACADRAFT_265663 [<i>Phanerochaete carnosae</i>]	118	39453	5,85	6
231	gi 164564766	NAD-dependent formate dehydrogenase [<i>Gelatoporia subvermispora</i>]	96	39517	6,28	5
364	gi 599350337	hypothetical protein PHACADRAFT_248428 [<i>Phanerochaete carnosae</i>]	132	47390	5,66	6
220	gi 164564401	epoxide hydrolase [<i>Phanerochaete chrysosporium</i>]	92	37950	5,45	3
223	gi 599369996	hypothetical protein PHACADRAFT_254658 [<i>Phanerochaete carnosae</i>]	93	43447	6,27	5

As proteínas identificadas foram classificadas de acordo com a função pelo *software* Blast2GO e agrupadas nas seguintes categorias: a) função molecular (Figura 33) que se refere à atividade bioquímica do gene ou produto e b) processo biológico (Figura 34), que se refere à atividade biológica com o qual o gene ou seu produto contribui. A determinação de função por *Gene Ontology* (GO) é possível através da homologia das sequências gênicas ou proteicas pesquisadas com outras sequências já depositadas em bancos gênicos ou proteômicos com funções determinadas experimentalmente.

Figura 33. Gráfico da distribuição (em porcentagem) de proteínas identificadas por grupos de função molecular, confeccionadas através de ferramentas de bioinformática (Blast2GO). Em A, estão apresentadas as proteínas superexpressas e exclusivas do controle e em B, as proteínas superexpressas e exclusivas do lapachol.

Fonte: elaborada pela autora.

No controle (Figura 33-A), as proteínas foram classificadas em 3 grupos quanto à função molecular: proteínas com atividade catalítica (52%), proteínas de ligação (*binding*)(42%) e proteínas com atividade estrutural (6%). Já as proteínas exclusivas e hiperabundantes no lapachol (Figura 33-B) foram agrupadas em: proteínas com atividades catalíticas (56%), proteínas de ligação (31%), proteínas de atividade antioxidante (8%) e proteínas de transporte (4%).

Várias proteínas anotadas (Blast2GO) identificadas como hiperabundantes (fold>2 e ANOVA $p < 0,05$) e exclusivas do cultivo com lapachol foram também classificadas por sua participação em diferentes processos biológicos (Figura 34).

Figura 34. Gráfico da distribuição (em porcentagem) de proteínas identificadas por participação em processos biológicos GO, obtidos através de análise de bioinformática (Blast2GO). Em (A) proteínas hiperabundantes e exclusivas do controle; (B) proteínas hiperabundantes e exclusivas do lapachol.

Fonte: elaborada pela autora.

No contexto avaliado nesse estudo, os processos de detoxificação (4% das proteínas) e resposta a estímulos (5% das proteínas) ganham destaque (Figura 34-B), pois esses processos biológicos não foram correlacionados às proteínas do cultivo controle (Figura 34-A). O lapachol possui efeito tóxico para as células (GUERRA et al., 2001), assim, é possível que na presença desse composto, o fungo *P. chrysosporium* tenha produzido proteínas de resposta a estímulos exógenos e com função de detoxificação .

Até o momento, este é o primeiro trabalho que utiliza ferramentas proteômicas para relatar a modulação proteica de um microrganismo na presença do lapachol. Dessa forma, discutiremos com trabalhos da literatura que estudaram o proteoma do *P. chrysosporium* na presença de xenobióticos e o papel das enzimas encontradas em estudos de biotransformação e/ou biodegradação.

Uma das proteínas identificadas no proteoma intracelular e exclusiva do cultivo com lapachol foi a peroxirredoxina TSA1 pertencente à família das peroxirredoxinas, que são proteínas tiol-ubiquitina específicas, com múltiplas funções na proteção ao estresse, incluindo a proteção contra o estresse oxidativo. Elas exibem dupla atividade: como peroxidase atuando na desintoxicação de hidroperóxidos ou como chaperona molecular que protege contra o estresse térmico (SUN et al., 2017a; WEIDS; GRANT, 2014).

O lapachol possui a capacidade de induzir o estresse oxidativo através da formação intracelular de espécies reativas do oxigênio, como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), o ânion-radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$) e o radical hidroxil ($HO^{\bullet}$) (DA SILVA; FERREIRA; DE SOUZA, 2003), sendo assim, a presença da proteína peroxirredoxina TSA1, apenas na condição lapachol, sugere uma resposta do *P. chrysosporium* à ação oxidante do lapachol presente no meio de cultivo.

Outra proteína exclusiva do proteoma intracelular de *P. chrysosporium* cultivado com lapachol e que também apresenta funções antioxidantes é a tiorredoxina redutase-TRX. Essa proteína participa na proliferação de células, e executa funções antioxidantes ao eliminar espécies reativas de oxigênio (ERO) e regenerar proteínas inativadas pelo estresse oxidativo (MIŠKINIENE et al., 1998).

Proteínas tradicionalmente do metabolismo de carboidratos, que foram mais abundantes na presença do lapachol, como a gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) e a malato desidrogenase (MDH) também estão envolvidas na resposta adaptativa ao estresse oxidativo (HUANG et al., 2017; JAYASINGHE et al., 2008). MDH catalisa reversivelmente a oxidação de L-malato para oxaloacetato, e GAPDH catalisa reversivelmente a oxidação de glicerol-3-fosfato em diidroxiacetona-fosfato, ambas dependentes dos cofatores NAD e NADH (DASIKA; VINNAKOTA; BEARD, 2015).

A enzima transaldolase também foi mais abundante na condição lapachol. As aldolases constituem um grupo específico de liases que catalisam as adições reversíveis (reações de aldolização) de compostos doadores (nucleófilos) em compostos aceitadores (eletrófilos). Na maioria dos casos, o substrato doador é invariável, enquanto uma gama de aldeídos é tolerada como aceitadores (SAMLAND et al., 2011). Liasas estão envolvidas na

formação seletiva das ligações carbono-carbono (FABER; KROUTIL, 2005), o que indica que esta proteína não está ligada na formação do composto PC01, no entanto, pode estar envolvida na formação de compostos intermediários e/ou não identificados ainda.

No proteoma intracelular do fungo *P. chrysosporium* exposto ao lapachol também foram identificadas outras proteínas relevantes envolvidas com processos de oxidorredução, como por exemplo, a glicosiltransferase.

A enzima transaldolase também foi mais abundante na condição lapachol. As aldolases constituem um grupo específico de liases que catalisam as adições reversíveis (reações de aldolização) de compostos doadores (nucleófilos) em compostos aceitadores (eletrófilos). Na maioria dos casos, o substrato doador é invariável, enquanto uma gama de aldeídos é tolerada como aceitadores (SAMLAND et al., 2011). Liasas estão envolvidas na formação seletiva das ligações carbono-carbono (FABER; KROUTIL, 2005), o que indica que esta proteína não está ligada na formação do composto PC01, no entanto, pode estar envolvida na formação de compostos intermediários e/ou não identificados ainda.

No proteoma intracelular do fungo *P. chrysosporium* exposto ao lapachol também foram identificadas outras proteínas relevantes envolvidas com processos de oxidorredução, como por exemplo, a glicosiltransferase.

A superfamília das glicosiltransferases (GTs) é composta por enzimas que estão envolvidas na síntese de carboidratos, lipídeos, esteroides e outras moléculas pequenas. As glicosiltransferases microbianas podem converter muitos compostos lipofílicos pequenos (fenóis, terpenóides, cianidrinhas e alcaloides) em carboidratos, utilizando açúcares do tipo uridina difosfato ativados (LIANG et al., 2015). As reações de glicosilação, realizadas pelas GT, estão principalmente envolvidas em processos de estabilização, como a desintoxicação e a solubilização dos substratos (HYUNG KO; GYU KIM; JOONG-HOON, 2006). Essas propriedades podem estar relacionadas a desintoxicação em resposta ao lapachol.

As epóxido-hidrolases (EHs) identificadas, sem diferenças significativa, no proteoma intracelular dos grupos controle e com lapachol, são encontradas em todas as células de mamíferos, assim como nas de microrganismos, nas quais funcionam como agentes desintoxicantes. Essas enzimas são amplamente utilizadas em biocatálise para a abertura de epóxidos promovendo uma hidrólise enantiomericamente seletiva. As EHs são biocatalisadores interessantes porque são independentes de cofatores e possuem várias isoenzimas, que cobrem um amplo espectro dos substratos (ARCHELAS; IACAZIO; KOTIK, 2016; BOTES; MITRA; PIENAAR, 2007). Na seção 5.8 serão discutidos os possíveis envolvimento dessas enzimas na rota de biotransformação do lapachol.

5.6. Análises proteômica pela técnica de LC-MS/MS

Como visto anteriormente, a abordagem metodológica combinando 2-DE e MALDI-TOF/TOF foi eficiente para avaliar o perfil de proteínas intracelulares de *Phanerochaete chrysosporium* moduladas, pelo bioprocesso indireto com pré-cultivo, para a transformação do lapachol. No entanto, essa mesma abordagem não foi eficaz para análise das proteínas do secretoma.

Um dos motivos para o insucesso dessa técnica é a baixa quantidade de proteínas totais detectadas no secretoma, mesmo quando o bioprocesso foi realizado em grande volume. Além disso, o secretoma se constituiu como uma amostra muito complexa e mesmo após a utilização de técnicas para remoção de contaminantes, como o kit Clean-Up (GE), a focalização isoeletrica não foi realizada do modo necessário para a continuidade.

Dessa forma, se optou pela realização dos estudos proteômicos com a abordagem *shotgun*, durante o período de doutorado sanduíche (Outubro 2016 – Julho 2017), em um laboratório de espectrometria de massas voltado para proteínas. Nesse cenário, foram realizadas as análises tanto do secretoma quanto do proteoma intracelular do fungo *P. chrysosporium* utilizando o bioprocesso direto, sem pré-cultivo.

A proteômica é uma abordagem bem estabelecida para detectar simultaneamente a expressão de um elevado número de proteínas em amostras biológicas. Assim, esse estudo foi feito para investigar a diferença na abundância de proteínas de *P. chrysosporium* submetido do cultivo com lapachol (biotransformação direta do lapachol) em relação ao cultivo controle (não exposto ao lapachol).

A análise de proteômica *Shotgun* de *P. chrysosporium* foi capaz de identificar 221 proteínas intracelulares e 28 proteínas extracelulares sem ambiguidade (FDR < 1%). Além disso, estas proteínas foram quantificadas, usando a contagem de espectros pela abordagem de quantificação *label-free*.

O gráfico *multi scatter plot* (Figura 35-A,B) foi feito para mostrar a correlação entre os dados obtidos das triplicatas biológicas. Nessa correlação, quanto mais próximo de 1 é o valor do coeficiente, maior é a correlação entre os dados comparados. Como mostrado na figura 35, as amostras apresentaram reprodutibilidade entre as replicatas biológicas de cada grupo.

Figura 35. *Multi scatter plot* mostrando a correlação entre os dados. O número dentro de cada *scatter plot* indica a correlação calculada entre os dados indicados no eixo x e y. L1-3: replicatas da condição lapachol e C1-3: replicatas da condição controle. A = Amostras do proteoma intracelular e B = amostras do proteoma extracelular.

Fonte: elaborada pela autora utilizando o *software* Perseus.

5.6.1. Proteínas Intracelulares

O diagrama de Venn na figura 36-A,B mostra a comparação entre proteínas intracelulares entre as replicatas biológicas de cada grupo. O número de vezes que uma determinada proteína é detectada reflete a confiabilidade da medida.

Figura 36. Diagrama de Venn mostrando as replicatas biológicas de cada condição. (A) Diagrama de Venn que representa o número de proteínas observadas para cada uma das três replicatas biológicas da condição Lapachol; (B) diagrama de Venn mostrando os dados obtidos da condição controle.

Fonte: elaborada pela autora.

Como pode ser visto no diagrama de Venn, na figura 36-A se observou uma sobreposição de 77% das proteínas, ou seja, 169 das 219 proteínas identificadas no controle foram comuns às três replicatas. Na figura 36-B se observou uma sobreposição de 68%, ou seja, 148 das 215 proteínas identificadas no cultivo com lapachol foram comuns às três replicatas.

Após aplicação dos filtros adequados e a eliminação de possíveis contaminantes, um total de 221 proteínas intracelulares de *P. chrysosporium* foram identificadas, cujo padrão de distribuição está apresentado no diagrama de Venn (Figura 37).

Figura 37. Diagrama de Venn mostrando a distribuição das proteínas intracelulares nas condições lapachol e controle.

Fonte: elaborada pela autora.

Entre as proteínas identificadas 186 eram comuns as duas condições, das quais 19 foram diferentemente expressas, com significância estatística. Destas 19 proteínas, de acordo com o critério de $fold \geq 1,5$; 9 foram positivamente reguladas pelo lapachol (Tabela 11) e 10 foram negativamente reguladas pelo lapachol (Tabela 12). A relação entre os grupos, após a análise estatística, é mostrada pelo gráfico *Volcano Plot* (Figura 38).

Figura 38. *Volcano plot* de 221 proteínas intracelulares quantificadas do conjunto de dados de Controle *versus* Lapachol que exibem a relação entre a significância estatística e o *Fold* de cada proteína.

O log2 Fold é plotado no eixo x e o valor -logp é plotado no eixo y. Os pontos azuis representam as 19 proteínas que tiveram uma expressão diferencial estatisticamente significativa ($p \leq 0,05$).

Fonte: elaborada pela autora utilizando o *software* Perseus.

Além disso, os resultados revelaram que 10 proteínas foram exclusivas (Tabela 11) da condição de lapachol, enquanto que 25 foram exclusivas do controle (Tabela 12). As proteínas identificadas sem diferença estatística significativa estão listadas na Tabela 13.

Tabela 11. Proteínas intracelulares identificadas aumentadas e exclusivas da condição Lapachol.

<i>Código de Acesso</i>	<i>Nomes das Proteínas</i>	<i>Taxonomia</i>
Proteínas aumentadas na condição Lapachol		
O59930	3-isopropylmalate dehydrogenase	<i>Phanerochaete chrysosporium</i>
A0A0D0E8U6	6-phosphogluconate dehydrogenase	<i>Paxillus rubicundulus</i>
Q01982	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	<i>Phanerochaete chrysosporium</i>
A0A1C7LNE3	Plasma membrane ATPase 2	<i>Grifola frondosa</i>
A0A0H2RE41	p-loop containing nucleoside triphosphate hydrolase	<i>Schizopora paradoxa</i>
A0A0D0DMZ4	Transaldolase	<i>Paxillus rubicundulus</i>
P19848	Ubiquitin	<i>Coprinellus congregatus</i>
Q25BW5	β-glucosidase 1A	<i>Phanerochaete chrysosporium</i>
Proteínas exclusivas na condição Lapachol		
P04802	Aspartate-tRNA ligase	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
A0A1C7LK81	Fructose-bisphosphate aldolase 1	<i>Grifola frondosa</i>
P19136	Manganese peroxidase H4	<i>Phanerochaete chrysosporium</i>
A0A0K6FXL1	Prolyl-tRNA synthetase	<i>Rhizoctonia solani</i>
A0A165P767	Proteasome subunit alpha type	<i>Neolentinus lepideus</i>
Q6QWR1	Pyranose 2-oxidase	<i>Phanerochaete chrysosporium</i>
A0A0D0E379	Unplaced genomic scaffold scaffold_371	<i>Paxillus rubicundulus</i>
A0A165P2K3	Urease	<i>Neolentinus lepideus</i>
A0A0H2SJ96	V-type ATPase	<i>Schizopora paradoxa</i>
P31411	V-type proton ATPase subunit B	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>

Tabela 12. Proteínas intracelulares identificadas diminuídas na condição lapachol e exclusivas da condição controle.

<i>Código de acesso</i>	<i>Nome das proteínas</i>	<i>Taxonomia</i>
Proteínas diminuídas na condição Lapachol		
A0A0D0EAF1	Alanine--tRNA ligase	<i>Paxillus rubicundulus</i>
A0A1C7LPG5	Clathrin heavy chain	<i>Grifola frondosa</i>
A0A1C7MFU3	Exportin-1	<i>Grifola frondosa</i>
Q5BGP0	F-actin-capping protein subunit bet	<i>Emericella nidulans</i>
A0A1C7M0Z4	Heat shock protein	<i>Grifola frondosa</i>
A0A0H2SIQ8	Heat shock protein 70	<i>Schizopora paradoxa</i>
A0A0K6G971	Heat shock protein HSS1	<i>Rhizoctonia solani</i>
P62792	Histone H4	<i>Phanerochaete chrysosporium</i>
G5EB89	Importin subunit alpha	<i>Emericella nidulans</i>
A0A165QMZ0	Inositol-1-monophosphatase	<i>Neolentinus lepideus</i>
A0A1C7MLF8	Myosin regulatory light chain cdc4	<i>Grifola frondosa</i>
A0A165UY98	NADPH--cytochrome P450 reductase	<i>Neolentinus lepideus</i>
A0A165SV58	PCI-domain-containing protein	<i>Neolentinus lepideus</i>
A0A165RNX4	Peptide chain release factor eRF/aR	<i>Neolentinus lepideus</i>
A0A1C7MLX9	Polyadenylate-binding protein	<i>Grifola frondosa</i>
A0A0D0EDD0	Proteasome subunit β type	<i>Paxillus rubicundulus</i>
P00445	Superoxide dismutase [Cu-Zn]	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
A0A1C7LWM2	Suppressor of kinetochore protein 1	<i>Grifola frondosa</i>
Q6C7L4	Thioredoxin reductase	<i>Yarrowia lipolytica</i>

Código de acesso	Nome das proteínas	Taxonomia
Proteínas diminuídas na condição Lapachol		
A0A1C7MQD3	U5 small nuclear ribonucleoprotein	<i>Grifola frondosa</i>
A0A1C7ME62	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase	<i>Grifola frondosa</i>
A0A1C7MFY6	Uncharacterized protein	<i>Grifola frondosa</i>
A0A1E3PVV5	Uncharacterized protein	<i>Lipomyces starkeyi</i>
A0A1C7LKE2	Uncharacterized protein C31F10.16	<i>Grifola frondosa</i>
A0A0D0E9G0	Unplaced genomic scaffold scaffold	<i>Paxillus rubicundulus</i>
Proteínas exclusivas do controle		
B0D360	Adenylate kinase	<i>Laccaria bicolor</i>
A0A0H2RXE0	Calponin	<i>Schizopora paradoxa</i>
A0A1C7LPG5	Clathrin heavy chain	<i>Grifola frondosa</i>
P50867	Cysteine synthase 1	<i>Emericella nidulans</i>
Q5BGP0	F-actin-capping protein subunit β	<i>Emericella nidulans</i>
A0A1C7MG98	GTP-binding nuclear protein	<i>Grifola frondosa</i>
A0A1C7MLF8	Myosin regulatory light chain cdc4	<i>Grifola frondosa</i>
A0A165SV58	PCI-domain-containing protein	<i>Neolentinus lepideus</i>
A0A165RNX4	Peptide chain release factor eRF/aR	<i>Neolentinus lepideus</i>
A0A0H2SSN7	Proteasome subunit alpha type	<i>Schizopora paradoxa</i>
A0A1C7MFE5	Succinate dehydrogenase	<i>Grifola frondosa</i>
A0A1C7LWM2	Suppressor of kinetochore protein 1	<i>Grifola frondosa</i>

Código de acesso	Nome das proteínas	Taxonomia
Proteínas exclusivas do controle		
P49741	Tubulin alpha-1A chain	<i>Schizophyllum commune</i>
A0A1C7MQD3	U5 small nuclear ribonucleoprotein	<i>Grifola frondosa</i>
A0A1C7ME62	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase	<i>Grifola frondosa</i>
A0A165N773	Uncharacterized protein	<i>Neolentinus lepideus</i>
A0A1E3PVV5	Uncharacterized protein	<i>Lipomyces starkeyi</i>
A0A1C7LKE2	Uncharacterized protein C31F10.16	<i>Grifola frondosa</i>
A0A0D0DPN1	Unplaced genomic scaffold	<i>Paxillus rubicundulus</i>
A0A0D0E9G0	Unplaced genomic scaffold scaffold	<i>Paxillus rubicundulus</i>

Tabela 13. Proteínas intracelulares identificadas sem diferenças estatisticamente significantes.

<i>Código de Acesso</i>	<i>Nome das Proteínas</i>	<i>Taxonomia</i>
A0A1C7MGU5	26S protease regulatory subunit 7	<i>Grifola frondosa</i>
A0A0K6GDC9	26S proteasome regulatory subunit rp2	<i>Rhizoctonia solani</i>
A0A165TX12	2-isopropylmalate synthase	<i>Neolentinus lepideus</i>
A0A0K6FL64	2-methylcitrate dehydratase	<i>Rhizoctonia solani</i>
B0D174	40S ribosomal protein S0	<i>Laccaria bicolor</i>
Q9P546	40S ribosomal protein S0-B	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>
C1GGT8	40S ribosomal protein S1	<i>Paracoccidioides brasiliensis</i>
A0A1C7MQN3	40S ribosomal protein S11	<i>Grifola frondosa</i>
A0A0D0E406	40S ribosomal protein S12	<i>Paxillus rubicundulus</i>
P19115	40S ribosomal protein S14	<i>Neurospora crassa</i>
A0A0K6GHY7	40S ribosomal protein S15	<i>Rhizoctonia solani</i>
A0A1C7MQS0	40S ribosomal protein S17	<i>Grifola frondosa</i>
O93931	40S ribosomal protein S26	<i>Schizophyllum commune</i>
A0A1C7M300	40S ribosomal protein S3	<i>Grifola frondosa</i>
A0A0D0DCW3	40S ribosomal protein S4	<i>Paxillus rubicundulus</i>
A0A0K6FL65	40S ribosomal protein S5	<i>Rhizoctonia solani</i>
A0A0K6GE86	40S ribosomal protein S6	<i>Rhizoctonia solani</i>
P26786	40S ribosomal protein S7-A	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
A0A0K6G9X5	40S ribosomal protein S8	<i>Rhizoctonia solani</i>
A5X2M3	40S ribosomal protein S9	<i>Rhizoctonia solani</i>

<i>Código de Acesso</i>	<i>Nome das Proteínas</i>	<i>Taxonomia</i>
A0A0K6FW38	5-methyltetrahydropteroyltriglutamate-homocysteina methyltransferase	<i>Rhizoctonia solani</i>
A0A0K6G793	5-oxoprolinase (ATP-hydrolysing)	<i>Rhizoctonia solani</i>
A0A0D0DKU6	60S acidic ribosomal protein P0	<i>Paxillus rubicundulus</i>
A0A165P8E2	60S ribosomal protein L18	<i>Neolentinus lepideus</i>
A0A0D0D7D4	60S ribosomal protein L20	<i>Paxillus rubicundulus</i>
A0A1C7ML01	60S ribosomal protein L24-A	<i>Grifola frondosa</i>
A0A0D0E631	60S ribosomal protein L27	<i>Paxillus rubicundulus</i>
Q752U5	60S ribosomal protein L30	<i>Ashbya gossypii</i>
P40372	60S ribosomal protein L3-A	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>
A0A1C7LNH7	60S ribosomal protein L4-A	<i>Grifola frondosa</i>
A0A1C7M0J9	60S ribosomal protein L6	<i>Grifola frondosa</i>
A0A1C7MQN9	60S ribosomal protein L8	<i>Grifola frondosa</i>
A0A167XFF8	60S ribosomal protein L9	<i>Isaria fumosorosea</i>
A0A1C7M0T3	60S ribosomal protein L9-B	<i>Grifola frondosa</i>
A0A0H2S4Y3	AAA ATPase	<i>Schizopora paradoxa</i>
A0A0K6GCG3	Aconitate hydratase, mitochondrial	<i>Rhizoctonia solani</i>
A0A165MG11	Actin-like protein Arp3	<i>Neolentinus lepideus</i>
A0A1C7MPE3	Adenosylhomocysteinase	<i>Grifola frondosa</i>
P0CM17	ADP-ribosylation factor	<i>Cryptococcus neoformans</i>
A0A1C7LUM0	Alanine--tRNA ligase	<i>Grifola frondosa</i>

<i>Código de Acesso</i>	<i>Nome das Proteínas</i>	<i>Taxonomia</i>
P00330	Alcohol dehydrogenase 1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
Q9P4C2	Alcohol dehydrogenase 2	<i>Kluyveromyces marxianus</i>
O74187	Aldehyde dehydrogenase	<i>Agaricus bisporus</i>
A0A165SE97	Alpha-1,4 glucan phosphorylase	<i>Neolentinus lepideus</i>
A0A1C7M5I3	Alpha-glucosidase	<i>Grifola frondosa</i>
A0A0K6GI04	Argininosuccinate synthase	<i>Rhizoctonia solani</i>
A0A165PL49	Argininosuccinate synthetase	<i>Neolentinus lepideus</i>
A0A0H2RWD6	ATP citrate lyase isoform 2	<i>Schizopora paradoxa</i>
A0A0K6FXG2	ATP synthase subunit alpha	<i>Rhizoctonia solani</i>
A0A1C7LXA2	ATP synthase subunit β	<i>Grifola frondosa</i>
A0A1C7MTP7	ATP-dependent RNA helicase SUB2	<i>Grifola frondosa</i>
A0A1C7MHI7	Brefeldin A resistance protein	<i>Grifola frondosa</i>
A0A1C7MDV6	Calcium-transporting ATPase	<i>Grifola frondosa</i>
P84339	Calmodulin	<i>Agaricus bisporus</i>
A0A1C7MHA7	Catalase	<i>Grifola frondosa</i>
M7NSJ7	Chaperone DnaJ	<i>Pneumocystis murina</i>
A0A1C7MCE9	Citrate synthase	<i>Grifola frondosa</i>
A0A0H2RV13	Coatomer subunit β'	<i>Schizopora paradoxa</i>
A0A1C7MRB6	Cytosol aminopeptidase	<i>Grifola frondosa</i>
P78568	Delta-1-pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase	<i>Agaricus bisporus</i>

<i>Código de Acesso</i>	<i>Nome das Proteínas</i>	<i>Taxonomia</i>
A0A0K6FX28	Dihydroxyacetone kinase	<i>Rhizoctonia solani</i>
A0A0D0DQ72	Dipeptidyl peptidase 3	<i>Paxillus rubicundulus</i>
Q6C1E0	Diphthine methyl ester synthase	<i>Yarrowia lipolytica</i>
A0A0K6FPG5	E3 ubiquitin ligase complex SCF subunit sconC	<i>Rhizoctonia solani</i>
Q9HDF6	Elongation factor 1-alpha	<i>Serendipita indica</i>
A0A0H2S195	Elongation factor 1-gamma	<i>Schizopora paradoxa</i>
A0A1C7LUZ1	Elongation factor 2	<i>Grifola frondosa</i>
P00924	Enolase 1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
P00925	Enolase 2	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
A0A0D0DWB8	Eukaryotic translation initiation factor 6	<i>Paxillus rubicundulus</i>
A0A0K6GHX4	Extracellular metalloproteinase	<i>Rhizoctonia solani</i>
W0SKY4	Formate dehydrogenase	<i>Grifola frondosa</i>
A0A0K6G656	Fructose-bisphosphate aldolase, class II	<i>Rhizoctonia solani</i>
A0A0H2RVC8	GDP-mannose 4,6-dehydratase	<i>Schizopora paradoxa</i>
A0A0D0DGN5	Glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase	<i>Paxillus rubicundulus</i>
A0A0K6GHL0	Glucose-6-phosphate isomerase	<i>Rhizoctonia solani</i>
A0A1C7MH82	Glucose-regulated	<i>Grifola frondosa</i>
A0A162K1M7	Glutamate synthase	<i>Isaria fumosorosea</i>
Q873E8	Glutathione reductase	<i>Neurospora crassa</i>
P00360	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>

<i>Código de Acesso</i>	<i>Nome das Proteínas</i>	<i>Taxonomia</i>
A0A165VRV2	GMC oxidoreductase	<i>Neolentinus lepideus</i>
A0A068SD81	Gtp cyclohydrolase ii	<i>Lichtheimia corymbifera</i>
Q9C3Y4	GTP-binding protein rhoA	<i>Emericella nidulans</i>
A0A0K6GBX1	GTP-binding protein ypt1	<i>Rhizoctonia solani</i>
A0A1C7LTH1	Guanine nucleotide-binding protein subunit β like protein	<i>Grifola frondosa</i>
A0A0K6G1V7	Heat shock 70kDa protein 1/8	<i>Rhizoctonia solani</i>
Q5B041	Heat shock protein 60	<i>Emericella nidulans</i>
A0A165UQM1	Heat shock protein 70	<i>Neolentinus lepideus</i>
Q8J2M3	Heat shock protein HSP82	<i>Ashbya gossypii</i>
A0A1C7M1J6	Heat shock protein hsp88	<i>Grifola frondosa</i>
Q01877	Heat shock protein HSS1	<i>Puccinia graminis</i>
Q4PHE4	Histone H2A.Z	<i>Ustilago maydis</i>
Q59VN2	Histone H3.1/H3.2	<i>Candida albicans</i>
P00817	Inorganic pyrophosphatase	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
A0A0D0DRG1	Isocitrate dehydrogenase [NAD] subunit mythocondrial	<i>Paxillus rubicundulus</i>
O13439	Isocitrate lyase	<i>Coprinopsis cinerea</i>
A0A1C7LSJ2	Isovaleryl-CoA dehydrogenase, mitochondrial	<i>Grifola frondosa</i>
A0A0H2RCV1	Malate dehydrogenase	<i>Schizopora paradoxa</i>
A0A0H2RYU6	Metalloprotease	<i>Schizopora paradoxa</i>
A0A0K6G3G8	NADH dehydrogenase (Ubiquinone) Fe-S protein 2	<i>Rhizoctonia solani</i>

<i>Código de Acesso</i>	<i>Nome das Proteínas</i>	<i>Taxonomia</i>
A0A1C7LVH6	Nascent polypeptide-associated complex subunit β	<i>Grifola frondosa</i>
A0A1C7M930	Oxygen-dependent coproporphyrinogen-III oxidase	<i>Grifola frondosa</i>
A0A1C7LZ64	Phosphoenolpyruvate carboxykinase [ATP]	<i>Grifola frondosa</i>
P37012	Phosphoglucomutase 2	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
A0A165U4T5	Phosphopyruvate hydratase	<i>Neolentinus lepideus</i>
A0A0H2RZ12	Phosphoribosylformylglycinamidin	<i>Schizopora paradoxa</i>
A0A1C7M2A3	Phosphoribosylformylglycinamide syntase	<i>Grifola frondosa</i>
A0A0K6G7B4	Plasma membrane H ⁺ -transporting ATPase	<i>Rhizoctonia solani</i>
A0A165WAX0	p-loop containing nucleoside triphosphate hydrolase protein	<i>Neolentinus lepideus</i>
A0A1C7M4H8	Prolyl endopeptidase	<i>Grifola frondosa</i>
A0A1C7MFE2	Proteasome endopeptidase complex	<i>Grifola frondosa</i>
A0A0D0DWF7	Proteasome subunit alpha type	<i>Paxillus rubicundulus</i>
P29311	Protein BMH1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
A0A1C7M054	Putative 5-methyltetrahydropteroyltriglutamate-homocysteine methyl transferase	<i>Grifola frondosa</i>
A0A066X6E2	Putative carbon-nitrogen hydrolase	<i>Colletotrichum sublineola</i>
A0A1C7MHF7	Putative oxidoreductase YxbG	<i>Grifola frondosa</i>
A0A1C7M673	Putative phosphoketolase	<i>Grifola frondosa</i>
A0A0K6G5I0	Putative Ras-related protein Rab7	<i>Rhizoctonia solani</i>
A0A1C7MPV5	Putative T-complex protein 1 subunit eta	<i>Grifola frondosa</i>

<i>Código de Acesso</i>	<i>Nome das Proteínas</i>	<i>Taxonomia</i>
A0A1C7LVX0	Putative UTP--glucose-1-phosphate uridylyltransferase	<i>Grifola frondosa</i>
A0A1C7LNQ3	Pyruvate carboxylase	<i>Grifola frondosa</i>
A0A0S6XV35	Pyruvate kinase	<i>funga sp. No.11243</i>
A0A0D0E307	Rab GDP dissociation inhibitor	<i>Paxillus rubicundulus</i>
A0A165MM04	Ras-domain-containing protein	<i>Neolentinus lepideus</i>
A0A1C7M7N6	Ras-like protein	<i>Grifola frondosa</i>
A0A0K6G6B4	Ribosomal protein L15	<i>Rhizoctonia solani</i>
A0A165W3D2	Ribulose-phosphate 3-epimerase	<i>Neolentinus lepideus</i>
A0A1E1FA30	Rps2 protein	<i>Boletus reticulatus</i>
A0A165NWQ9	Saccharopine dehydrogenase	<i>Neolentinus lepideus</i>
A0A0K6FPB0	S-adenosylmethionine synthase	<i>Rhizoctonia solani</i>
P10659	S-adenosylmethionine synthase 1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
A0A0C9ME00	Serine/threonine-protein phosphatase	<i>Mucor ambiguus</i>
A0A1C7MP20	S-formylglutathione hydrolase	<i>Grifola frondosa</i>
A0A0K6FKF0	Small nuclear ribonucleoprotein D3	<i>Rhizoctonia solani</i>
A0A1C7LNY7	Small nuclear ribonucleoprotein-associated protein B	<i>Grifola frondosa</i>
A0A165VZ81	Sm-like ribonucleo protein	<i>Neolentinus lepideus</i>
A0A167W098	Threonine synthase	<i>Isaria fumosorosea</i>
O75003	Trehalose phosphorylase	<i>Grifola frondosa</i>
P79008	Tubulin β chain	<i>Coprinopsis cinerea</i>

<i>Código de Acesso</i>	<i>Nome das Proteínas</i>	<i>Taxonomia</i>
A0A165N8B6	Ubiquitin activating enzyme	<i>Neolentinus lepideus</i>
O94609	Ubiquitin-activating enzyme E1 1	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>
A0A1C7MQZ8	UDP-N-acetylhexosamine pyrophosphorylase	<i>Grifola frondosa</i>
A0A1L9MTN4	Uncharacterized protein	<i>Aspergillus tubingensis</i>
A0A1E3PZQ7	Uncharacterized protein	<i>Lipomyces starkeyi</i>
A0A1E3Q4D8	Uncharacterized protein	<i>Lipomyces starkeyi</i>
A0A165NR80	Uncharacterized protein	<i>Neolentinus lepideus</i>
A0A165U7J8	Uncharacterized protein	<i>Neolentinus lepideus</i>
A0A165UKZ2	Uncharacterized protein	<i>Neolentinus lepideus</i>
A0A0H2RG09	Uncharacterized protein	<i>Schizopora paradoxa</i>
A0A0D0E5E4	Unplaced genomic scaffold scaffold_157	<i>Paxillus rubicundulus</i>
A0A0D0E7T1	Unplaced genomic scaffold scaffold_295	<i>Paxillus rubicundulus</i>
A0A0D0D6M6	Unplaced genomic scaffold scaffold_457	<i>Paxillus rubicundulus</i>
A0A0D0DKT0	Unplaced genomic scaffold scaffold_47	<i>Paxillus rubicundulus</i>
A0A0D0E4H4	Unplaced genomic scaffold scaffold_486	<i>Paxillus rubicundulus</i>
A0A0D0D3H6	Unplaced genomic scaffold scaffold_617	<i>Paxillus rubicundulus</i>

Após as análises comparativas entre controle e lapachol foram identificadas 54 proteínas, diferencialmente expressas ou únicas de cada condição, que foram classificadas pelo *software* Blast2GO usando *Gene Ontology* (GO). Essas proteínas foram agrupadas nas seguintes categorias: a) função molecular no que se refere à atividade bioquímica do gene ou produto (Figura 39) e b) processos biológicos de 11 classes no que se refere à atividade biológica do gene ou seu produto (Figura 41).

Figura 39. Gráfico gerado a partir das análises do software Blast2GO mostrando a distribuição das proteínas diferencialmente expressas e exclusivas de acordo com as suas funções moleculares.

Fonte: elaborada pela autora.

Em comparação com as proteínas identificadas de *P. chrysosporium* submetidas ao cultivo controle, a condição lapachol apresentou mais proteínas com atividades catalíticas, atividades de ligação, transportadoras e atividades estrutural molecular (Figura 39). As proteínas identificadas também foram agrupadas de acordo com a sua classe (Figura 40).

Figura 40. Gráfico gerado a partir das análises do *software* Blast2GO mostrando a distribuição das classes enzimáticas das proteínas intracelulares expressas diferencial e exclusivamente nas condições lapachol e controle.

Fonte: elaborada pela autora.

Hidrolases e ligases foram mais expressas na condição lapachol; e as liases foram exclusivas da condição lapachol. As enzimas hidrolíticas são uma parte importante do metabolismo fúngico, além disso, têm sido amplamente utilizadas na biocatálise, uma vez que essas enzimas aceitam uma ampla gama de substratos não naturais e são simples de usar (SEIFERT, 2005).

Enzimas pertencentes à classe das liases foram identificadas somente na condição lapachol, corroborando com os achados nas análises 2-DE. A formação enantiomericamente seletiva das ligações carbono-carbono constitui uma das principais transformações na química orgânica sintética. Neste contexto, o potencial de liases, como as transcetolases e aldolases, tem sido amplamente explorado no sentido de catalisar esse tipo de reação estéreo-seletiva (FABER; KROUTIL, 2005).

A molécula derivada do lapachol (PC01) foi formada a partir de reações de oxidação e redução como anteriormente apresentada na figura 28. Sendo assim, as liases não parecem estar envolvidas diretamente na formação desse produto, porém elas podem estar envolvidas na formação de outros produtos e intermediários.

Outra análise realizada utilizando o *software* Blast2GO teve como objetivo agrupar as proteínas de acordo as suas participações em processos biológicos (Figura 41).

Figura 41. Gráfico mostrando a distribuição das proteínas intracelulares diferencialmente expressas nos processos biológicos pelo software Blast2GO.

Fonte: elaborada pela autora.

Observando o padrão de distribuição das proteínas identificadas, é possível indicar que a presença de lapachol alterou o perfil proteico intracelular do fungo *P. chrysosporium* e, conseqüentemente, os processos biológicos acometidos pelas condições de cultivo. JASZEK et al. (2014) relataram que a presença de outra naftoquinona, a menadiona (MQ, 2-metil-1,4-naftoquinona) também alterou o metabolismo intracelular de outro fungo “*white rot*”, o *Phellinus pini*.

Na Figura 41 é possível notar que algumas proteínas envolvidas em processos biológicos como os processos celulares, metabólicos, regulatórios, entre outros, são reguladas negativamente na condição de lapachol em comparação com o controle. Isso pode indicar uma alteração do metabolismo do fungo para se adaptar à condição com lapachol, priorizando proteínas necessárias para ao processamento desse composto, em detrimento de proteínas envolvidas com outros processos biológicos.

A molécula biotransformada do lapachol (como pode ser visto na figura 28) foi formada por oxidação (adição de hidroxila ao carbono saturado) e redução (formação de hidroxila a partir de uma carbonila). Essas modificações levaram à formação de uma molécula mais hidrofílica quando comparada ao lapachol.

De modo similar, já foi relatado que as enzimas envolvidas no metabolismo dos xenobióticos funcionalizam por oxidação ou redução, geralmente xenobióticos hidrofóbicos e compostos endógenos, e os convertem em produtos mais polares para facilitar a secreção (PARKINSON; KLAASEN; WATKINS, 2001).

Algumas enzimas (grafadas em **negrito** na Tabela 11), que foram identificadas aumentadas ou exclusivas na condição lapachol, estão envolvidas no processo biológico de oxidação-redução, tais como: a 3-isopropilmalato desidrogenase, a gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, a 6-fosfogluconato desidrogenase, a piranose 2-oxidase e a manganês peroxidase. Por esse motivo, é possível sugerir que essas enzimas podem estar envolvidas no processo de biotransformação.

A enzima álcool desidrogenase (grafada em **negrito** na Tabela 13), embora tenha sido detectada em ambas as condições (lapachol e controle), sem diferença estatística significativa, pode estar envolvida na redução regioespecífica da carbonila ($-C=O$). As desidrogenases alcoólicas (ADHs), que pertencem à superfamília das oxirredutases, catalisam a interconversão entre álcoois e aldeídos ou cetonas com alta estereosseletividade, sob condições suaves. As ADHs são amplamente utilizadas como biocatalisadores para a resolução cinética de substratos racêmicos e para a preparação de substâncias químicas enantiomericamente puras (KARA et al., 2014; ZHENG et al., 2017).

Como já discutido acima, o lapachol pode aceitar elétrons e gerar espécies reativas de oxigênio (EROs) ((peróxido de hidrogênio (H_2O_2), radical superóxido ($O_2^- \bullet$) e radical hidroxil ($HO \bullet$)); o que pode justificar a citotoxicidade produzida por esse composto. A produção de EROs pode causar estresse oxidativo celular severo, formando macromoléculas oxidadas, afetando lipídios, proteínas e DNA (BOLTON et al., 2000).

A enzima manganês-peroxidase-MnP (destacada em **negrito** na Tabela 11) é conhecida por estar envolvida em processos de desintoxicação, como na resposta ao estresse oxidativo (BREITENBACH et al., 2015), portanto é provável que a presença dessa enzima, apenas na condição lapachol, indique um mecanismo de resistência do fungo ao estresse oxidativo gerado pelo lapachol.

As peroxidases são frequentemente descritas na literatura no âmbito da indústria moderna e da biotecnologia, pois são aplicáveis em uma série de processos, tais como:

biotransformação de poluentes ambientais, descoloração de resíduos de tintas têxteis, processos de polimerização e branqueamento, processamento de alimentos, além de medicamentos (JASZEK et al., 2014).

JASZEK et al. (2014) relataram que o sistema de resposta ao estresse oxidativo, causado por indutores, seria uma abordagem eficiente para aumentar a biossíntese de compostos fúngicos biotecnologicamente aplicáveis e bioativos; e para estimular o potencial natural de biodegradação dos fungos.

Menadiona é uma quinona que estimula a geração de superóxidos em células e foi considerada como uma pró-oxidante muito interessante, especialmente para “*white rot*” fungos (CYRNE et al., 2003). Os pro-oxidantes também podem controlar a biossíntese de MnP, que catalisa a oxidação de compostos de lignina fenólica mediada por Mn (JASZEK et al., 2014). Dessa forma, o lapachol pode ser considerado um agente pró-oxidante.

Uma outra enzima de interesse biotecnológico, também aumentada na condição lapachol, foi a β -glicosidase 1A (grafadas em negrito na Tabela 11). As β -glicosidases constituem um grupo de enzimas bem caracterizadas e biologicamente importantes (BHATIA; MISHRA; BISARIA, 2002), que apresenta especificidade para uma grande variedade de substratos de glicosídeos, com uma ampla gama de aplicações biotecnológicas e portanto considerada de grande importância para a indústria (MOLINA et al., 2016).

5.6.2. Proteínas extracelulares (Secretoma)

O diagrama de Venn na Figura 42A,B mostra a comparação de proteínas extracelulares identificadas entre as replicatas de cada grupo. Como pode ser visto no diagrama de Venn se observou uma sobreposição de 60% das proteínas, ou seja, 17 das 28 proteínas identificadas no controle foram comuns as três replicatas (Figura 42-A). Na figura 42-B se observou uma sobreposição de 50%, ou seja, 14 das 28 proteínas identificadas no cultivo com lapachol foram comuns às três replicatas.

Figura 42. Diagrama de Venn mostrando as replicatas biológicas de cada condição. (A) diagrama de Venn que representa o número de proteínas observadas para cada uma das três replicatas biológicas da condição Lapachol; (B) diagrama de Venn mostrando os dados obtidos da condição controle.

Fonte: elaborada pela autora.

A distribuição das proteínas entre as condições Lapachol e controle está representada na figura 43.

Figura 43. Diagrama de Venn mostrando a distribuição das proteínas extracelulares identificadas nas condições controle e lapachol

Fonte: elaborada pela autora.

Após as análises estatísticas, utilizando o *software* Perseus, e a aplicação do teste *t* de Student (p-valor inferior a 0,05) e FDR igual a 1%, dentre o total de 28 proteínas, apenas uma proteína foi identificada como diferencialmente expressa e 4 proteínas foram exclusivas da condição controle (Tabela 14).

Tabela 14. Proteínas do secretoma identificadas reduzidas na condição lapachol e exclusivas da condição controle.

<i>Código de Acesso</i>	<i>Nomes das Proteínas</i>	<i>Taxonomia</i>
Proteínas diminuídas condição Lapachol		
Q9HG00	Alpha-galactosidase	<i>Phanerochaete chrysosporium</i>
Proteínas exclusivas do Controle		
S7RPN8	Glycoside hydrolase	<i>Gloeophyllum trabeum</i>
K5VBJ8	Glycoside hydrolase family 31 protein	<i>Phanerochaete carnosae</i>
P37012	Phosphoglucomutase 2	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
K5XA71	Uncharacterized protein	<i>Phanerochaete carnosae</i>

Considerando as proteínas identificadas na tabela 14 é possível propor que a produção de enzimas relacionadas ao metabolismo de carboidratos foi afetada quando o fungo *P. chrysosporium* foi cultivado presença de lapachol.

O fungo *P. chrysosporium* é bem conhecido pela sua capacidade de secretar uma grande quantidade de enzimas (KERSTEN; CULLEN, 2007). Sabe-se que os fungos podem se adaptar a diferentes ambientes e ajustar seu metabolismo para se acomodar a condições prejudiciais. Nesses processos, o microrganismo modula, de modo dinâmico o secretoma, degradando substratos complexos do ambiente extracelular (BIANCO; PERROTTA, 2015). Como dito anteriormente, o lapachol gera EROs e, consequentemente, estresse oxidativo nas células (EPIFANO et al., 2014).

Sendo assim, é possível hipotetizar que a redução de enzimas relacionadas ao metabolismo de carboidratos se deu como uma mobilização do metabolismo fúngico em uma tentativa de se livrar dos efeitos tóxicos do lapachol.

Na tabela 15 estão apresentadas as proteínas extracelulares, obtidas dos cultivos de *P. chrysosporium* em meio controle ou contendo lapachol, cujas diferenças em termos de abundância não foram significativas estatisticamente.

Tabela 15. Proteínas extracelulares identificadas sem diferença estatística significativa.

<i>Código de acesso</i>	<i>Nomes das Proteínas</i>	<i>Taxonomia</i>
P00817	Inorganic pyrophosphatase	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
P00924	Enolase 1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
P00925	Enolase 2	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
P12709	Glucose-6-phosphate isomerase	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
A0A0H2S996	Alpha-amylase	<i>Schizopora paradoxa</i>
A0A0C3NH10	Uncharacterized protein	<i>Phlebiopsis gigantea</i>
I7H4Q8	Calmodulin	<i>Phanerochaete chrysosporium</i>
A0A1C7MQX1	Glucan 1,3- β -glucosidase	<i>Grifola frondosa</i>
Q6XQ78	Alcohol dehydrogenase 1	<i>Saccharomyces bayanus</i>
C6H0M6	Endo- β -glucanase	<i>Phanerochaete chrysosporium</i>
K5W349	Glycoside hydrolase family 18 protein	<i>Phanerochaete carnosae</i>
Q281W2	Family S53 protease	<i>Phanerochaete chrysosporium</i>
K5WAS6	Glycoside hydrolase family 31 protein	<i>Phanerochaete carnosae</i>
K5WNY3	Uncharacterized protein	<i>Phanerochaete carnosae</i>
K5XBC0	Glycoside hydrolase family 31 protein	<i>Phanerochaete carnosae</i>
K7TM35	Putative β -xylosidase	<i>Phanerochaete chrysosporium</i>
Q0ZKA7	Copper radical oxidase	<i>Phanerochaete chrysosporium</i>
Q0ZKA4	Copper radical oxidase	<i>Phanerochaete chrysosporium</i>
Q281W3	Mannose-6-phosphatase	<i>Phanerochaete chrysosporium</i>
Q2Z1W1	Glucan 1,3- β -glucosidase	<i>Phanerochaete chrysosporium</i>
Q874E3	Putative laminarinase	<i>Phanerochaete chrysosporium</i>
Q9HFZ9	Alpha-galactosidase	<i>Phanerochaete chrysosporium</i>

5.7. Avaliação de atividade proteolítica intra e extracelular

Pela análise do secretoma, foi possível observar que a produção de enzimas envolvidas no metabolismo de carboidratos foi prejudicada no cultivo com o lapachol. Partindo dessa observação, uma abordagem adotada foi a verificação da atividade proteolítica do proteoma intracelular e do secretoma. Essas proteínas foram obtidas a partir do bioprocessamento direto com o fungo *P. chrysosporium* e o objetivo dessa análise foi observar se o metabolismo de proteínas também havia sido reduzido pela presença do lapachol. A figura 44 apresenta as atividades proteolíticas, intra e extracelulares, observadas nos cultivos controle e do lapachol.

Figura 44. Atividade proteolítica durante a biotransformação do lapachol após 24 horas (24hs) e do controle (24hs+), utilizando o substrato FRET. Em vermelho está representado o proteoma e em verde o secretoma.

Fonte: Elaborada pela autora.

O gráfico nos mostra a presença de atividade proteolítica em proteínas intracelulares sem diferenças estatisticamente significativas quando comparamos o cultivo controle com o cultivo lapachol. As proteases estão envolvidas nos mais diversos processos biológicos, tanto em aspectos fisiológicos quanto patológicos, o que justificaria essa similaridade entre as amostras. Por outro lado, apenas o secretoma do cultivo controle apresentou atividade proteolítica, indicando que a exposição ao lapachol inibiu a secreção de proteases pelo fungo *P.chrysosporium*.

Embora não tenham sido identificadas proteases no secretoma, utilizando ferramentas proteômicas, de modo geral, esse ensaio reforçou a capacidade do lapachol de modular as proteínas produzidas pelo fungo *P. chrysosporium* e sugere que o metabolismo de proteínas, assim como o de carboidratos, foi preterido em relação aos mecanismos de resistência ao estresse oxidativo causado pelas EROs produzidas pelo lapachol.

5.8. Sugestão de rota de biotransformação do lapachol pelo fungo *P. chrysosporium*

O fungo *P. chrysosporium* foi capaz de biotransformar o lapachol em uma nova molécula que teve sua estrutura elucidada (PC01). A partir da análise dos resultados de proteômica obtidos, foi possível estabelecer a relação de algumas enzimas com a rota de biotransformação do lapachol. Na figura 45 está representada uma possível rota de biotransformação do lapachol para a formação do composto PC01, composta por três etapas.

Figura 45. Esquema sugerido de formação do composto PC01 a partir da biotransformação do lapachol por *P. chrysosporium*.

Fonte: Elaborada pela autora utilizando o *software* ChemDraw.

➤ ***Primeira etapa: oxidação do lapachol a um derivado epóxido.***

Várias enzimas oxidativas, que realizariam essa reação, foram identificadas pelo estudo proteômico descrito anteriormente, muitas delas aumentadas ou exclusivas da condição lapachol. Dessa forma, embora seja difícil sugerir qual delas está envolvida no processo, é possível que qualquer enzima com atividade de oxidação-redução possa participar desta etapa.

➤ ***Segunda etapa: abertura do epóxido.***

A abertura do epóxido pode ter sido catalisada pela enzima epóxido-hidrolase - EH, que foi encontrada nas duas condições (lapachol e controle) no estudo proteômico usando a abordagem 2-DE. Como já descrito anteriormente, a enzima epóxido-hidrolase é capaz de biocatalisar a abertura de epóxidos através de hidrólise seletiva. As EHs catalisam a adição de uma molécula de água ao anel oxirano para formar o correspondente diol (ARCHELAS; IACAZIO; KOTIK, 2016). A maioria das EHs é responsável pela desintoxicação xenobiótica, diminuindo a toxicidade de reações que utilizam epóxidos como intermediários, convertendo-os em metabólitos mais polares e hidrossolúveis (dióis), facilitando a eliminação (MARTINS, 2008). A identificação de EHs nas duas condições de cultivo reforçam o potencial do microrganismo *P. chrysosporium*, uma vez que seu arsenal enzimático intracelular endógeno é adequado para a metabolização de xenobióticos.

➤ ***Terceira etapa: redução seletiva de carbonilas.***

Na última etapa, foram propostas a redução seletiva de duas das carbonila do intermediário, com formação dos respectivos álcoois. Já é bem descrito na literatura que as álcoois desidrogenases (ADHs) são enzimas capazes de promover a redução seletiva de cetonas (KARA et al., 2014; KOURIST; BORNSCHEUER, 2011; ZHENG et al., 2017). No secretoma e no proteoma intracelular de *P. chrysosporium* foram identificadas ADHs, tanto nas amostras oriundas do cultivo lapachol quanto do controle.

Por esse motivo, as ADHs podem estar envolvidas nessa etapa, além disso, vale ressaltar que também foram identificadas outras desidrogenases no proteoma das duas condições (lapachol e controle), utilizando as duas estratégias proteômicas (2-DE e *shotgun*).

As ADHs são muito importantes biotecnologicamente, pois a redução seletiva biocatalítica de cetonas em álcoois tem sido de grande interesse para os químicos orgânicos ao longo de muitas décadas. Enzimas redutoras como a álcool desidrogenase e as cetoreduases tornaram-se excelentes ferramentas para redução de cetonas na síntese orgânica. Uma vez que muitas reações de oxidorreductase dependem dos cofatores de NAD^+/NADH e

NADP/NADPH, eficientes sistemas de regeneração de cofator *in situ* já foram projetados, facilitando o uso dessas enzimas em grande escala (WOHLGEMUTH, 2013).

5.9. Atividades biológicas do composto PC01

5.9.1. Atividade tripanocida

A doença de Chagas é uma das mais importantes doenças endêmicas causadas pelo *Trypanosoma cruzi*, que afeta 16 a 18 milhões de pessoas em grandes áreas da América Latina. Os fármacos utilizados para o tratamento desta doença são o nifurtimox, um derivado do nitrofurano, e o benzonidazol, um derivado do nitroimidazol. Ambas os fármacos apresentam efeitos colaterais graves. Além disso, o nifurtimox não é mais usado em vários países devido à sua toxicidade. A necessidade de medicamentos eficazes, sem efeitos adversos, estimulou a busca de novos compostos com potencial utilidade clínica (SALAS et al., 2008).

O arsenal de fármacos atualmente disponível para combater doenças tropicais inclui muitos derivados de naftoquinona naturais e sintéticos que têm sido extensivamente estudados devido à sua capacidade de interferir com as atividades de enzimas conhecidas como topoisomerases, um grupo de enzimas que são críticas para a replicação do DNA nas células. Além disso, as naftoquinonas têm demonstrado induzir, como já mencionado, as chamadas EROs que podem causar danos às células (HUSSAIN et al., 2007; SALAS et al., 2008).

No ensaio biológico contra *T. cruzi*, o composto PC01 foi extremamente tóxico para as células hospedeiras, apresentando um IC₅₀ baixíssimo em comparação com o lapachol e principalmente com o fármaco de referência, o benzonidazol, como pode ser observado na tabela 16.

Tabela 16. Atividade tripanocida dos compostos PC01, lapachol e o do fármaco de referência benzonidazol.

<i>Atividade</i>	<i>Benzonidazol</i>	<i>Lapachol</i>	<i>PC01</i>
Atividade tripanocida (cepa Tulahuen)	158,9	20,23	1,11x10 ⁻³
IC ₅₀ (μM)			
Citotoxicidade (LLCMK-2)	158,9	20,23	1,11x10 ⁻³
CC ₅₀ (μM)			

Fonte: Elaborada pela autora.

Dessa forma, o composto PC01 eliminou todas as células hospedeiras e consequentemente os parasitas. Assim, sugere-se que a atividade tripanocida do composto PC01 seja reavaliada em menores concentrações.

5.9.2. Atividade anticâncer de mama

Na avaliação do potencial de inibição da proliferação, células de epitélio mamário da linhagem MCF10 foram submetidas ao tratamento com cisplatina, lapachol e PC01 com valores de IC50 apresentados na tabela 17.

Tabela 17. Concentração inibitória de 50% das células de epitélio mamário MCF10, após 48 horas de tratamento na presença de cisplatina, lapachol ou biotransformado.

<i>Inibição da proliferação celular</i>	<i>Cisplatina</i>	<i>Lapachol</i>	<i>PC01</i>
IC50 (µM)	60,00	34,94	175,00

Fonte: Elaborada pela autora.

De acordo com os valores de IC50, a cisplatina e o lapachol foram cerca de 3 e 5 vezes, respectivamente, mais tóxicos para as células de epitélio mamário normal MCF10 do que o composto biotransformado PC01.

A tabela 18 mostra os resultados de IC50 dos compostos avaliados no tratamento de células de adenocarcinoma mamário MCF7. É possível observar que o composto biotransformado foi mais tóxico para estas células em comparação com o lapachol. No entanto, a droga de referência, cisplatina, tem um IC50 aproximadamente três vezes menor. Mesmo assim, como o PC01 foi menos tóxico para células normais que a cisplatina, ele pode representar uma alternativa com menos efeitos colaterais no tratamento desse tipo de câncer.

Tabela 18. Concentração inibitória de 50% das células de adenocarcinoma mamário MCF7, após 48 horas de tratamento na presença de cisplatina, lapachol ou biotransformado.

<i>Inibição da proliferação celular</i>	<i>Cisplatina</i>	<i>Lapachol</i>	<i>PC01</i>
IC50 (µM)	53,00	261,10	164,10

Fonte: Elaborada pela autora.

Derivados da molécula de lapachol têm sido sintetizados e avaliados como inibidores do crescimento de células de diferentes linhagens tumorais *in vitro*, a maioria destes ensaios apresentaram resultados promissores significativos nas 60 linhagens testadas, em

concentrações de IC₅₀ da ordem de micromolar, e mostraram diferenças mínimas comparado com a molécula de origem (EPIFANO et al., 2014).

As naftoquinonas, como o lapachol, já foram relatadas como sendo responsáveis por muitos mecanismos da citotoxicidade, seguida de morte celular. Dentre estes mecanismos, está a formação de radicais livres a partir do transporte de elétrons do anel quinônico presente na estrutura das naftoquinonas (SREELATHA et al., 2014). A formação destes radicais está intimamente relacionada à manutenção e crescimento de células de linhagens cancerígenas. Estas linhagens celulares têm como característica apresentar maior concentração de espécies reativas de oxigênio (radicais hidroxila, peróxido de hidrogênio, radical anion superóxido, anion superóxido, oxigênio singlete e ozônio), o que está diretamente relacionado ao metabolismo mais ativo, consequência de maior taxa de estresse oxidativo e respiração celular (WELLINGTON, 2015).

Altas concentrações destas espécies reativas de oxigênio (EROs) causam danos ao DNA mitocondrial, seguidos de mutações que permitem maior taxa de proliferação e crescimento descontrolado do tumor. Por outro lado, o aumento de EROs também é uma das estratégias utilizadas como atividade antitumoral. A maior concentração de EROs, em consequência da ação de compostos contendo quinonas, pode sinalizar a ativação do mecanismo de morte celular (WELLINGTON, 2015).

De acordo com Li e colaboradores, ensaios com um derivado de naftoquinona inibiram o crescimento de linhagens celulares HL-60 de leucemia (IC₅₀: 3,8 µM) que passaram a apresentar morfologia de apoptose, corroborado por um aumento na porcentagem de células apoptóticas (LI et al., 2018).

Esses autores também observaram que derivados de naftoquinonas inibiram o crescimento celular de linhagens tumorais de hepatoma humano (Hep3B) e correlacionaram esta atividade com apoptose mediada por ativação via sinalização de espécies reativas de oxigênio (LI et al., 2018). Mais uma vez, a importância do papel das espécies reativas de oxigênio na atividade antitumoral de derivados de naftoquinonas é destacada, assim como o amplo espectro quanto o tipo de linhagem celular atingido por esta classe de moléculas.

Devido à toxicidade aumentada frente a células de adenocarcinoma mamário comparado ao lapachol e à toxicidade diminuída frente a células normais em comparação com o lapachol e com a droga de referência cisplatina, o composto PC01 mostra-se promissor para maiores estudos de atividades antitumorais com outras linhagens e para estudos de estrutura-atividade de derivados de naftoquinonas.

6. Conclusões

Estudos de biotransformações podem ajudar na descoberta de novas enzimas e reações com interessantes aplicabilidades nas indústrias. Além disso, o desenvolvimento de estratégias para novas reações biocatalíticas beneficia a interação interdisciplinar entre química, biologia e biotecnologia.

O lapachol produzido a partir da semi-síntese da lausona foi purificado e avaliado em estudos de biotransformação. Os fungos filamentosos possuem potencial de biotransformação sua complexidade metabólica. Nas condições de estudo 7 cepas se mostraram capazes de realizar a biotransformação do lapachol. Além disso, a presença de lapachol propiciou em alguns cultivos a produção metabólitos secundários bioativos.

No presente estudo foi selecionado o fungo *P. chrysosporium*, conhecido pelo seu potencial lignocelulolítico, que foi capaz de biotransformar o lapachol. Na tentativa de identificar as proteínas do microrganismo envolvidas no processo de biotransformação foram realizadas abordagens proteômicas. Nesses estudos foram observados que na presença de lapachol o fungo modificou sua expressão de proteínas intracelulares e extracelulares.

Nas estratégias 2-DE e *shotgun*, o cultivo com lapachol aumentou a abundância de proteínas envolvidas com mecanismos de resistência ao estresse oxidativo, detoxificação e de enzimas com atividade de oxirredução, sugerindo que o lapachol induziu efetivamente o estresse oxidativo nas células de *P. chrysosporium*.

No secretoma do cultivo com lapachol, analisado pela estratégia *shotgun*, se observou que a produção de enzimas envolvidas no metabolismo de carboidratos foi modulada negativamente, possivelmente na tentativa de focar as vias metabólicas do fungo para a desintoxicação. A ausência de atividade proteolítica no secretoma do cultivo com lapachol corrobora essa hipótese.

A biotransformação do lapachol pelo *P. chrysosporium* gerou dois derivados (PC01 e PC02), dos quais o derivado PC01 teve sua estrutura elucidada e é um composto inédito na literatura. A partir dessa informação foi proposta uma possível rota de biotransformação do lapachol em PC01, que envolve a participação das enzimas époxi-hidrolase e álcool desidrogenase devido às suas funções de abertura do epóxido e de redução regioseletiva de carbonilas, respectivamente.

A biotransformação de compostos contempla a obtenção de moléculas com propriedades bioativas, por isso o composto PC01 foi avaliado em relação ao seu potencial

tripanocida e anticâncer. Nas concentrações de PC01 avaliadas, a toxicidade da molécula foi extremamente alta, matando todas as células hospederias de *T. cruzi* e consequentemente os parasitas, dessa forma, os experimentos precisam ser refeitos com concentrações mais baixas do composto. No estudo com células de adenocarcinoma mamário MCF7, o biotransformado PC01 foi mais citotóxico que o lapachol menos tóxico que a cisplatina. No entanto, no ensaio em células epiteliais normais MCF10, o PC01 apresentou melhor performance por ser menos tóxico que o lapachol e a cisplatina. O biotransformado PC01 é um composto com potencial e mais estudos de atividades biológica devem ser realizados.

8. Referências

- ALCÁNTARA, A. R. Biotransformations in Drug Synthesis : A Green and Powerful Tool for or Medicinal Chemistry. **J Med Chem Drug Des.**, p. 1–7, 2017.
- ALMEIDA, E. Preclinical and Clinical Studies of Lapachol and Beta-Lapachone. **The Open Natural Products Journal**, , v. 2, n. 1, p. 42–47, 2009.
- ARCHELAS, A; IACAZIO, G; KOTIK, M. Epoxide Hydrolases and their Application in Organic Synthesis. **Green Biocatalysis**. [s.l: s.n.]. p. 179–229, 2016.
- ASHA, S; VIDYAVATHI, M. Cunninghamella - A microbial model for drug metabolism studies - A review. **Biotechnology Advances**, 2009.
- BALASSIANO, I., et al. Demonstration of the lapachol as a potential drug for reducing cancer metastasis. **Oncology Reports**, v. 13, n. 2, p. 329–333, 2005.
- BARBOSA, B. et al. Proteômica: metodologias e aplicações no estudo de doenças humanas. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 58, n. 3, p. 366–375, 2012.
- BHATIA, Y; MISHRA, S; BISARIA, V. S. Microbial β -glucosidases: Cloning, properties, and applications. **Critical Reviews in Biotechnology**, 2002.
- BIANCO, L; PERROTTA, G. Methodologies and perspectives of proteomics applied to filamentous fungi: From sample preparation to secretome analysis. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 16, n. 3, p. 5803–5829, 2015.
- BOLTON, J. L. et al. Role of quinones in toxicology. **Chemical Research in Toxicology**, 2000.
- BOMMARIUS, A. S.; RIEBEL, B. R. **Biocatalysis, Fundamentals and Applications Synthesis**, 2005.
- BORGES, K. B. et al. Stereoselective analysis of thioridazine-2-sulfoxide and thioridazine-5-sulfoxide: An investigation of rac-thioridazine biotransformation by some endophytic fungi. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 46, n. 5, p. 945–952, 2008.
- BORGES, K. B. et al. Stereoselective biotransformations using fungi as biocatalysts. **Tetrahedron Asymmetry**, 2009.
- BOTES, A; MITRA, R; PIENAAR, D. Epoxide hydrolases: Process applications. **Innovations in Pharmaceutical Technology**, , n. 22, p. 90–92, 2007.
- BOURGUIGNON, S. C. et al. Trypanosoma cruzi: Insights into naphthoquinone effects on growth and proteinase activity. **Experimental Parasitology**, , v. 127, n. 1, p. 160–166, 2011.
- BREITENBACH, M. et al. Oxidative Stress in Fungi: Its Function in Signal Transduction, Interaction with Plant Hosts, and Lignocellulose Degradation. **Biomolecules**, , v. 5, n. 2, p. 318–342, 2015.

CARNEIRO, P. F. et al. Quinonoid and phenazine compounds: Synthesis and evaluation against H37Rv, rifampicin and isoniazid-resistance strains of *Mycobacterium tuberculosis*. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 46, n. 9, p. 4521–4529, 2011.

CHAVEZ, R. F., F., GARCIA, R. O., Vaca, I. Filamentous fungi from extreme environments as a promising source of novel bioactive secondary metabolites. **Frontiers in Microbiology**, 2015.

CHINWORRUNGSEE, M. et al. Bioactive compounds from the seed fungus *Menisporopsis theobromae* BCC 3975. **Journal of Natural Products**, v. 69, n. 10, p. 1404–1410, 2006.

CHOI, J. HAN, S. S; KIM, H. S. Industrial applications of enzyme biocatalysis: Current status and future aspects. **Biotechnology Advances**, 2015.

CORPAS-LÓPEZ, V. et al. (-)- α -Bisabolol, a Promising Oral Compound for the Treatment of Visceral Leishmaniasis. **Journal of Natural Products**, v. 78, n. 6, p. 1202–1207, 2015.

CYRNE, L. et al. Regulation of antioxidant enzymes gene expression in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* during stationary phase. **Free Radical Biology and Medicine**, , v. 34, n. 3, p. 385–393, 2003.

DA SILVA, E. A. et al. Biotransformation of lapachol by *Penicillium citreogrum* dierckx: Characterization of lomatiol. **Revista de Microbiologia**, v. 28, n. 3, 1997.

DA SILVA, E. N. et al. Anti-*Trypanosoma cruzi* compounds: Our contribution for the evaluation and insights on the mode of action of naphthoquinones and derivatives. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, 2014.

DA SILVA, M. N.; FERREIRA, V. F.; DE SOUZA, M. B. V. Um panorama atual da química e da farmacologia de naftoquinonas, com ênfase na β -Lapachona e derivados. **Química Nova**, 2003.

DASIKA, S. K.; VINNAKOTA, K. C.; BEARD, D. A. Determination of the catalytic mechanism for mitochondrial malate dehydrogenase. **Biophysical journal**, v. 108, n. 2, p. 408–19, 2015.

DAVID, L; VESCHAMBRE, H. Microbiological conversion of lapachol by various microorganisms. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 49, n. 9, p. 2693–2698, 1985.

DE ALMEIDA, E. et al. Antiinflammatory action of lapachol. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 29, n. 2, p. 239–241, 1990.

DE CONTI, R.; RODRIGUES, J. A. R.; MORAN, P. J. S. Biocatálise: Avanços recentes. **Química Nova**, , v. 24, n. 5, p. 672–675, 2001.

DIAS, F. R. F.; FERREIRA, V. F.; CUNHA, A. C. Uma visão geral dos diferentes tipos de catálise em síntese orgânica. **Revista Virtual de Química**, v. 4, n. 6, p. 840–871, 2012.

DONOVA, M. V.; EGOROVA, O. V. Microbial steroid transformations: Current state and

prospects. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 2012.

DOS SANTOS, A. F. et al. Molluscicidal and trypanocidal activities of lapachol derivatives. **Planta Medica**, v. 67, n. 1, p. 92–93, 2001.

EMIDIO, N. et al. Proteômica: uma introdução aos métodos e aplicações. **HU Revista, Juiz de Fora**, v. 41, n. 3, p. 101–111, 2015.

EPIFANO, F. et al. Lapachol and its congeners as anticancer agents: A review. **Phytochemistry Reviews**, 2014.

FABER, K. **Biotransformations aid organic chemists**. [s.l: s.n.], 2011.

FABER, K.; KROUTIL, W. New enzymes for biotransformations. **Current Opinion in Chemical Biology**, 2005.

FARNET, C. M.; ZAZOPOULOS, E. Improving drug discovery from microorganisms. In: **Natural Products: Drug Discovery and Therapeutic Medicine**. [s.l: s.n.]. p. 95–106, 2005.

FEITOSA D. S., A. et al. Molluscicidal activity of 2-hydroxy-3-alkyl-1,4-naphthoquinones and derivatives. **International Journal for Parasitology**, v. 30, n. 11, p. 1199–1202, 2000.

FERNANDES, P. et al. **Microbial conversion of steroid compounds: Recent developments** **Enzyme and Microbial Technology**, 2003.

FERRER, M. et al. Biodiversity for biocatalysis: A review of the α/β -hydrolase fold superfamily of esterases-lipases discovered in metagenomes. **Biocatalysis and Biotransformation**, v. 33, n. 5–6, p. 235–249, 2015.

FORRER, M. et al. The antimicrobial activity of alpha-bisabolol and tea tree oil against *Solobacterium moorei*, a Gram-positive bacterium associated with halitosis. **Archives of Oral Biology**, , v. 58, n. 1, p. 10–16, 2013.

GARZON, N. G. R. **Estudo da alteração do perfil de proteínas de fungos filamentosos em diferentes condições de cultivo utilizando ferramentas proteômicas e ensaios enzimáticos**. Tese (Doutorado) 2017. Ribeirão Preto: 2017, 227p.

GLASER, A. N.; NIKAIDO, H. **Microbial biotechnology. Fundamentals of Applied Microbiology, Second Edition**, 2008.

GOMES, Joseph; STEINER, Walter. **The biocatalytic potential of extremophiles and extremozymes. Food Technology and Biotechnology**, 2004.

GUERRA, M. De O. et al. Toxicology of lapachol in rats: Embryolethality. **Braz. J. Biol.**, v. 61, n. 1, p. 171–4, 2001.

GUIMARÃES, T. T. et al. Potent naphthoquinones against antimony-sensitive and -resistant *Leishmania* parasites: Synthesis of novel α - And nor- α -lapachone-based 1,2,3-triazoles by copper-catalyzed azide-alkyne cycloaddition. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 63, p. 523–530, 2013.

GUO, H.; PENG, H.; EMILI, A. Mass spectrometry methods to study protein-metabolite interactions. **Expert Opinion on Drug Discovery**, v. 12, n. 12, p. 1271–1280, 2017.

GYGLI, G.; J.H. VAN BERKEL, W. Oxizymes for Biotechnology. **Current Biotechnology**, v. 4, n. 2, p. 100–110, 2015.

HANSON, J. R. The microbiological transformation of diterpenoids. **Natural Product Reports**, v. 9, n. 2, p. 139–151, 1992.

HUANG, J., NIAZI, A. K., YOUNG, D., ROSADO, L. A., VERTOMMEN, D., BODRA, N., REICHHELD, J. P. Self-protection of cytosolic malate dehydrogenase against oxidative stress in Arabidopsis. **Journal of Experimental Botany**, 2017.

HUISMAN, G. W.; COLLIER, S. J. On the development of new biocatalytic processes for practical pharmaceutical synthesis. **Current Opinion in Chemical Biology**, 2013.

HUSSAIN, H. et al. Lapachol: an overview. **Arkivoc**, v. 2007, n. ii, p. 145–171, 2007.

HUSSAIN, H.; GREEN, I. R. Lapachol and lapachone analogs: a journey of two decades of patent research(1997-2016). **Expert Opinion on Therapeutic Patents**, 2017.

HYUNG KO, J.; GYU K, B; JOONG-HOON, A. Glycosylation of flavonoids with a glycosyltransferase from *Bacillus cereus*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 258, n. 2, p. 263–268, 2006.

JASZEK, M. et al. Effective stimulation of the biotechnological potential of the medicinal white rot fungus: *Phellinus pini* by menadione-mediated oxidative stress. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 174, n. 2, p. 644–656, 2014.

JAYASINGHE, C. et al. Degradation of three aromatic dyes by white rot fungi and the production of ligninolytic enzymes. **Mycobiology**, v. 36, n. 2, p. 114–20, 2008.

KARA, S. et al. Bioreductions catalyzed by an alcohol dehydrogenase in non-aqueous media. **ChemCatChem**, v. 6, n. 4, p. 973–976, 2014.

KERSTEN, P.; CULLEN, D. Extracellular oxidative systems of the lignin-degrading Basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. **Fungal Genetics and Biology**, 2007.

KIM, Y; NANDAKUMAR, M. P.; MARTEN, M. R. Proteomics of filamentous fungi. **Trends in Biotechnology**, v. 25, n. 9, p. 395–400, 2007.

KOURIST, R.; BORNSCHEUER, U. T. Biocatalytic synthesis of optically active tertiary alcohols. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 91, n. 3, p. 505–517, 2011.

KUMAR, P. S.; DURAI PANDIYAN, V.; IGNACIMUTHU, S. Isolation, screening and partial purification of antimicrobial antibiotics from soil *Streptomyces* sp. SCA 7. **Kaohsiung Journal of Medical Sciences**, v. 30, n. 9, p. 435–446, 2014.

LERESCHE, J. E.; MEYER, H. P. Chemocatalysis and biocatalysis (biotransformation): Some thoughts of a chemist and of a biotechnologist. **Organic Process Research and**

Development, 2006.

LI, K. et al. Target ROS to induce apoptosis and cell cycle arrest by 5,7-dimethoxy-1,4-naphthoquinone derivative. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, 2018.

LIMA, N. M. F. et al. Antileishmanial activity of lapachol analogues. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 99, n. 7, p. 757–761, 2004.

LOPES, F. C. Produção e Análise de Metabólitos Secundários de Fungos Filamentosos. Dissertação (Mestrado). Porto Alegre: 2011, 130p.

LÓPEZ-IGLESIAS, M.; GOTOR-FERNÁNDEZ, V. Recent Advances in Biocatalytic Promiscuity: Hydrolase-Catalyzed Reactions for Nonconventional Transformations. **Chemical Record**, v. 15, n. 4, p. 743–759, 2015.

LOUGHLIN, W. A. Biotransformations in organic synthesis. **Bioresource Technology**, 2000.

MARTÍNEZ, A. T. et al. Oxidoreductases on their way to industrial biotransformations. **Biotechnology Advances**, 2017.

MARTINS, M.P. **Biotransformação de epóxidos com fungos de origem marinha e síntese de cloroidrinas**. Dissertação (Mestrado). São Carlos: 2008, 109p.

MAURYA, A. K. et al. α -(-)-bisabolol Reduces Pro-inflammatory Cytokine Production and Ameliorates Skin Inflammation. **Current pharmaceutical biotechnology**, v. 15, n. 2, p. 173–81, 2014.

MELO, I. S. et al. Isolation and biological activities of an endophytic *Mortierella alpina* strain from the Antarctic moss *Schistidium antarctici*. **Extremophiles**, v. 18, n. 1, p. 15–23, 2014.

MILNER, S. E.; MAGUIRE, A. R. Recent trends in whole cell and isolated enzymes in enantioselective synthesis. **Arkivoc**, 2012.

MIŠKINIENE, V. et al. Nitroreductase reactions of *Arabidopsis thaliana* thioredoxin reductase. **Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics**, v. 1366, n. 3, p. 275–283, 1998.

MOLINA, G. et al. Chapter 11 - β -Glucosidase From *Aspergillus A2* - Gupta, Vijai Kumar BT - **New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering**. In: Amsterdam: Elsevier, 2016. p. 155–169.

MOREIRA, J. S. **Triagem de microrganismos isolados no Estado da Bahia para biotransformação de compostos esteroidais**. Dissertação (Mestrado). Feira de Santana: 2009, 71p.

MORRISON, R. K. et al. Oral toxicology studies with lapachol. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 17, n. 1, p. 1–11, 1970.

MURPHY, C. D. **Drug metabolism in microorganisms** *Biotechnology Letters*, 2015.

NADLER, W. M. et al. MALDI versus ESI: The Impact of the Ion Source on Peptide Identification. **Journal of Proteome Research**, v. 16, n. 3, p. 1207–1215, 2017.

OTTEN, S.; ROSAZZA, J. P. Microbial transformations of natural antitumor agents: oxidation of lapachol by *Penicillium notatum*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 35, n. 3, p. 554–557, 1978.

OTTEN, S.; ROSAZZA, J. P. Microbial transformations of natural antitumor agents: conversion of lapachol to dehydro- α -lapachone by *Curvularia lunata*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 38, n. 2, p. 311–313, 1979.

OTTEN, Sharee L.; ROSAZZA, John P. Microbial Transformations of Natural Antitumor Agents. 17. Conversions of Lapachol by *Cunninghamella echinulata*. **Journal of Natural Products**, v. 44, n. 5, p. 562–568, 1981.

PANDEY, A.; MANN, M.. Proteomics to study genes and genomes. **Nature**, v. 405, n. June, p. 837–846, 2000.

PARKINSON, A.; KLAASEN, C. D.; WATKINS, J. B. Biotransformation of xenobiotics. **Casarett & Doull's Essentials of Toxicology**, p. 133–144, 2001.

PAULI, G. F.; JAKI, B. U.; LANKIN, D. C. Quantitative ^1H NMR: Development and Potential of a Method for Natural Products Analysis. **Journal of Natural Products**, v. 68, n. 1, p. 133–149, 2005.

PAVIA, D. L. et al. **Química orgânica experimental: Técnicas de escala pequena**. Bookman, 2013.

RAO, K. V.; MCBRIDE, T. J.; OLESON, J. J. Recognition and Evaluation of Lapachol as an Antitumor Agent. **Cancer Research**, v. 28, n. 10, p. 1952–1954, 1968.

RAY, A. et al. *Phanerochaete chrysosporium* produces a diverse array of extracellular enzymes when grown on sorghum. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 93, n. 5, p. 2075–2089, 2012.

RIBEIRO, C. M. R.; DE SOUZA, Nelson Ângelo. Esquema geral para elucidação de substâncias orgânicas usando métodos espectroscópico e espectrométrico. **Química Nova**, v. 30, n. 4, p. 1026–1031, 2007.

SALAS, C. et al. *Trypanosoma cruzi*: Activities of lapachol and α - and β -lapachone derivatives against epimastigote and trypomastigote forms. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 16, n. 2, p. 668–674, 2008.

SAMLAND, A. K. et al. The Transaldolase Family: New Synthetic Opportunities from an Ancient Enzyme Scaffold. **ChemBioChem**, v. 12, n. 10, p. 1454–1474, 2011.

SCHAEFER, C. A. **Biotransformação de compostos carbonílicos com microrganismos em sistema aquoso e/ou bifásico**. Dissertação (Mestrado). Florianópolis: 2015.

SEIFERT, K. Handbook of Industrial Mycology. **Journal of Natural Products**, v. 68, n. 6,

p. 967–968, 2005.

SEKI, T. et al. Antitumor effects of α -bisabolol against pancreatic cancer. **Cancer Science**, v. 102, n. 12, p. 2199–2205, 2011.

SHELDON, R. A.; PEREIRA, P. C. Biocatalysis engineering: the big picture. **Chem. Soc. Rev.**, v. 46, n. 10, p. 2678–2691, 2017.

SHELDON, R. A.; WOODLEY, J. M. Role of Biocatalysis in Sustainable Chemistry. **Chemical Reviews**, 2018.

SILVA, C. M. S.; MELO, I. S.; FAY, E. F. Biotransformação de Agrotóxicos e Biorremediação. **Agrotóxicos & Ambiente**, 2004.

SILVA, E. O. et al. Cytotoxicity of lapachol metabolites produced by probiotics. **Letters in Applied Microbiology**, v. 59, n. 1, p. 108–114, 2014.

SINGH, D.; CHEN, S. The white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*: Conditions for the production of lignin-degrading enzymes. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 2008.

SINGH, P.; JAIN, R.; KRISHNA, V. Chemical transformation of lapachol to dehydroiso- α -lapachone and related quinones. **Indian Journal of Chemistry - Section B Organic and Medicinal Chemistry**, v. 40, n. 2, p. 89–92, 2001.

SREELATHA, T. et al. Synthesis and SAR study of novel anticancer and antimicrobial naphthoquinone amide derivatives. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, , 2014.

SUBRAMANIAN, S.; FERREIRA, M. M. C.; TRSIC, M. A structure-activity relationship study of lapachol and some derivatives of 1,4-naphthoquinones against carcinosarcoma Walker 256. **Structural Chemistry**, v. 9, n. 1, p. 47–57, 1998.

SUN, Cen-Cen et al. Peroxiredoxin 1 (Prx1) is a dual-function enzyme by possessing Cys-independent catalase-like activity. **Biochemical Journal**, v. 474, n. 8, p. 1373–1394, 2017.

SUN, H. et al. Biocatalysis for the synthesis of pharmaceuticals and pharmaceutical intermediates. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, 2017.

SUN, J. S.; GEISER, A. H.; FRYDMAN, B. A preparative synthesis of lapachol and related naphthoquinones. **Tetrahedron Letters**, , v. 39, n. 45, p. 8221–8224, 1998.

SUTTON, D. C.; GILLAN, F. T.; SUSIC, M. Naphthofuranone phytoalexins from the grey mangrove, *Avicennia marina*. **Phytochemistry**, v. 24, n. 12, p. 2877–2879, 1985.

SZEWCZYK, R. et al. Intracellular proteome expression during 4-n-nonylphenol biodegradation by the filamentous fungus *Metarhizium robertsii*. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 93, p. 44–53, 2014.

TJALSMA, H. et al. Signal Peptide-Dependent Protein Transport in *Bacillus subtilis*: a Genome-Based Survey of the Secretome. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v.

64, n. 3, p. 515–547, 2000.

TYANOVA, S. et al. The Perseus computational platform for comprehensive analysis of (prote)omics data. **Nature methods**, v. 13, n. 9, p. 731–40, 2016.

TYANOVA, S.; TEMU, T.; COX, J. The MaxQuant computational platform for mass spectrometry-based shotgun proteomics. **Nature protocols**, v. 11, n. 12, p. 2301–2319, 2016.

VILLALBA, L. L. et al. White rot fungi laccases for biotechnological applications. **Recent patents on DNA & gene sequences**, v. 4, n. 2, p. 106–12, 2010.

WEIDS, A. J.; GRANT, C. M. The yeast peroxiredoxin Tsa1 protects against protein-aggregate-induced oxidative stress. **Journal of Cell Science**, v. 127, n. 6, p. 1327–1335, 2014.

WELLINGTON, K. W. Understanding cancer and the anticancer activities of naphthoquinones – a review. **RSC Adv.**, 2015.

WOHLGEMUTH, R. Development of sustainable biocatalytic reduction processes for organic chemists. In: **Synthetic Methods for Biologically Active Molecules: Exploring the Potential of Bioreductions**, 2013.

WU, Bing et al. Extracellular proteomic analysis for degradation of PAHs in source of drinking water with fusant strains. In: **ECOTOXICOLOGY**, 2009.

YU, J. H., KELLER, N. Regulation of Secondary Metabolism in Filamentous Fungi. **Annual Review of Phytopathology**, 2005.

ZHENG, Y.G. et al. Recent advances in biotechnological applications of alcohol dehydrogenases. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 101, n. 3, p. 987–1001, 2017.

APÊNDICE A - Espectro de RMN de ^{13}C obtido em CDCl_3 a 126 MHz para o composto PC01.

APÊNDICE B. Espectro de RMN de experimento do tipo DEPT obtido em CDCl_3 a 126 MHz do derivado PC01.

Fonte: obtido pela autora.

APÊNDICE C. Mapa de contornos COSY (^1H - ^1H) obtido em CDCl_3 a 300 MHz do derivado PC01.

Fonte: obtido pela autora.

APÊNDICE D. Mapa de contornos HSQC (^1H - ^{13}C) obtido em CDCl_3 a 300 MHz para o composto PC01.

Fonte: obtido pela autora.

APÊNDICE E. Mapa de contornos HMBC (^1H - ^{13}C) obtido em CDCl_3 a 500 MHz para o derivado PC01.

Fonte: obtido pela autora.

APÊNDICE F. Espectro de MS/MS obtido por HRMS do composto PC01

Fonte: obtido pela autora.

APÊNDICE G. Eletroforese bidimensional de proteínas extraídas do micélio de *P. chrysosporium* submetido ao bioprocesso por 18 horas. (A) Controle, (B) lapachol. O marcador de massa molecular utilizado foi o Amersham ECL Full-Range Rainbow com o seguinte padrão de bandas 225, 150, 102, 76, 52, 38, 31, 24, 17 e 12 kDa. Os géis foram carregados com 150 µg de proteínas totais e corados com *Coomassie* coloidal G-250.

Fonte: obtido pela autora.

APÊNDICE H. Eletroforese bidimensional de proteínas extraídas do micélio de *P. chrysosporium* submetido ao bioprocesso por 30 horas. (A) Controle, (B) lapachol. O marcador de massa molecular utilizado foi o Amersham ECL Full-Range Rainbow com o seguinte padrão de bandas 225, 150, 102, 76, 52, 38, 31, 24, 17 e 12 kDa. Os géis foram carregados com 150 µg de proteínas totais e corados com *Coomassie* coloidal G-250.

Fonte: obtido pela autora.