



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE FEIRA DE SANTANA

Autorizada pelo Decreto Federal nº 77.496 de 27/04/76
Recredenciamento pelo Decreto nº 17.228 de 25/11/2016



PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
COORDENAÇÃO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA

XXIV SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UEFS SEMANA NACIONAL DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA - 2020

FUNGOS DA FAMÍLIA GANODERMATACEAE, POTENCIAIS PRODUTORES DE PEROXIDASES. OBTENÇÃO DO ACETATO DE ISOEUGENILA, MATERIA PRIMA NO PROCESSO DE BIOTRANSFORMAÇÃO.

**Matheus Pires Miranda¹; Heiddy Márquez Alvarez²; Raquel Guimarães
Benevides²**

1. Bolsista PIBIC/CNPq, Graduando em Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Feira de Santana,
e-mail: mathebio@hotmail.com
2. Orientador, Departamento de Ciências Exatas, Universidade Estadual de Feira de Santana,
e-mail: marquezheiddy@gmail.com
2. Orientador, Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Feira de Santana,
e-mail: raquelgb@gmail.com

PALAVRAS-CHAVE: Peroxidase, fungos Ganodermataceae, acetato de isoeugenila

INTRODUÇÃO

Os fungos são organismos heterotrófico, multicelular ou unicelular, decompositores da matéria orgânica e, concomitantemente, realizam uma contínua reciclagem dos elementos nitrogenados do solo que os reutiliza; podem se apresentar como simbioses com raízes de plantas – micorrizas, bactérias e algas; e produzir diversas substâncias tóxicas, como as aflotoxinas, mas também a penicilina que é utilizada como antibiótico (RAVEN *et al.*, 2014). Os fungos da família Ganodermaceae são bem conhecidos na cultura oriental por seus diversos usos e aplicações. Eles possuem propriedades antialérgica, antiviral, antiplasmodial para o *P. falciparum* (MA *et al.*, 2015), antioxidante, analgésica, imunomodulatória, influencia na potência sexual e outras. (SANODIYA *et al.*, 2009). É utilizado na medicina popular como remédio para hipertensão, hepatite crônica, diabetes, anorexia, asma e outros (JONG; BIRMINGHAM, 1992). Além disso, esses basidiomicetos, possuem o sistema enzimático extracelular lignolítico oxidativo que degrada a lignina à água e dióxido de carbono e quebra anéis fenólicos (SANCHEZ, 2009) através da liberação das enzimas: Lignina Peroxidase (LiP), Manganês Peroxidase (MnP) e a fenol-oxidase Lacase (Lac).

Dentre o grupo de substâncias que as enzimas peroxidases reagem está o eugenol. O eugenol pode ser extraído em grande quantidade do cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum*), mais especificamente do botão floral, local de maior concentração, e também de outros vegetais como a noz moscada, manjerição e canela (KAMATOU; VERMAAK; VILJOEN, 2012). Ele possui diversas propriedades químicas e biológicas como afrodisíaca, antioxidantes, anestésica, antimicrobiana e outras (AFFONSO *et al.* 2012).

Este trabalho tem como objetivo geral a identificação de fungos da família Ganodermataceae presentes na Coleção de Culturas de Microrganismos da Bahia que

possuam potencial de produzir peroxidases e a obtenção do acetato de isoeugenila, um dos propenilbenzenos que será biotransformado por ação dos fungos da família Ganodermataceae.

Justifica-se a realização desse trabalho pelo fato das peroxidases terem grande aplicabilidade industrial e biotecnológica e que a obtenção do produto da biotransformação do isoeugenol, a vanilina, um dos aromas mais utilizados em alimentos, perfumes, bebidas e produtos farmacêuticos, é um processo natural de alto custo e baixo rendimento. Portanto, métodos que resultem em menor custo e maior rendimento, como o uso de microrganismos, é uma alternativa para que matéria prima seja produzida de forma mais rápida e auxilie no desenvolvimento da ciência.

MATERIAL E MÉTODOS OU METODOLOGIA

Para a reativação dos fungos foram coletados fragmentos de ágar com micélio preservados, cultivados em meios enriquecidos - Batata dextrose ágar (BDA) e ágar extrato de malte (MEA) a 28 °C no escuro. Após uma semana, estes cultivos foram avaliados a partir da observação direta.

A atividade enzimática foi determinada por método colorimétrico, baseado na descoloração do meio de cultura devido à formação do produto de oxidação do guaiacol, o tetraguaiacol. Para tal, elaborou-se o meio ágar-malte com 0,2 g de Guaiacol; 10 g de ágar / 15 g malte; 500 mL de água destilada, onde foram inoculados os fungos no meio e observado o resultado após sete dias de crescimento com incubação a 27 °C.

A proteção da hidroxila fenólica presente no isoeugenol dando origem ao acetato de eugenila, adaptando a metodologia de Lima *et al.* (2018) e Krasniak (2015), foi realizada da seguinte maneira: Em um balão de fundo chato de 100 mL, foi adicionado o isoeugenol (30 mmol; 4,92 g), acetato de sódio - catalisador (11 mmol; 0,30g) e anidrido acético (90 mmol; 27,54g). A mistura reacional ficou sob agitação durante 12 horas sob temperatura ambiente, adaptado de Lima (2018). Após, transferiu-se a mistura para um funil de separação e foi realizada 10 lavagens com 15 mL de hidróxido de sódio, sendo 3 com 1 mol/L, 3 com 2,5 mol/L e 4 com 3 mol/L. A fase aquosa apresentou-se uma coloração amarelada. Esta foi removida e colocada em um béquer para ser tratado com ácido clorídrico e recuperar o isoeugenol. A fase orgânica foi então lavada com 15 mL de solução de cloreto de amônio (0,1 mol/L), adaptado de Krasniak (2015) e deixada na estufa para evaporar o solvente. Durante o transcurso da reação foram realizadas várias cromatografias de camada delgada para avaliar se a reação de acetilação foi bem sucedida. Na cromatografia foi utilizada como fase estacionária uma placa de sílica gel e para gotejar o isoeugenol e a mistura de reação, um capilar. A fase móvel foi uma mistura de hexano/acetato de etila na proporção 8:2. A revelação foi realizada com o iodo sublimado (LIMA, 2018).

RESULTADOS E/OU DISCUSSÃO

A reativação foi em triplicata no meio ágar Malte (20 g Malte e 16 g ágar-nutriente). As placas de petri inoculadas foram observadas e pelo menos um fungo de cada código cresceu. Sendo que o melhor crescimento/tempo foi o 601 seguido de 452, 379D e 359D. Posteriormente, foram retirados plugs com os fungos e o meio de cultura e conservados em Castellani.

Os fungos cultivados com o meio contendo guaiacol cresceram e formou-se um halo vermelho-escuro indicando que os fungos produziram peroxidases e estas reagiram oxidando o guaiacol em tetraguaiacol.



Figura 1 Teste colorimétrico com o guaiacol

O isoeugenol pode ser transformado tanto por via química quanto enzimática em vanilina. Sabe-se que a lacase age diretamente na hidroxila, portanto, essa enzima não é interessante para realizar experimentos com essa finalidade. Para contornar esse problema, foi feita a proteção da hidroxila fenólica presente no isoeugenol dando origem ao acetato de isoeugenila, adaptando a metodologia de Lima *et al.* (2018) e Krasniak (2015).

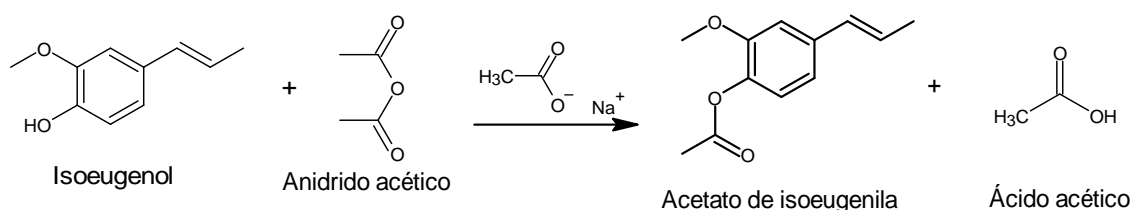


Figura 2 Reação de proteção do isoeugenol

A revisão bibliográfica permitiu identificar os parâmetros de otimização (pH e temperatura) da atividade enzimática, que melhor se aplica as enzimas. A Lacase tem sua atividade máxima no fungo *Ganoderma lucidum*, em pH ácido variando entre 3-5 (HARIHARAN; NAMBISAN, 2013; KUMAR *et al.*, 2015) e a temperatura em 27 °C (HARIHARAN; NAMBISAN, 2013) ou 25-35 °C, existindo algumas isoformas que atuam no ótimo entre 40-50 °C (KUMAR *et al.*, 2015; KUMAR *et al.*, 2017). Segundo estudo de Hariharan e Nambisan (2013), a LiP e a MnP têm atividade enzimática ótima em pH 4-6 e temperatura 25-29 °C.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Portanto, este trabalho identificou que os fungos da família Ganodermataceae produzem enzimas peroxidases; as condições que mais favorecem a expressão dessas enzimas e a necessidade da proteção da hidroxila para testes com lacase visando a obtenção de vanilina através da biotransformação fúngica.

Por fim, agradeço a FAPESB pelo financiamento ao plano de trabalho, as professoras orientadoras Heiddy Márquez Alvarez e Raquel Guimarães Benevides, e

aos funcionários e servidores do LABEXA, LAPEM e CCMB que contribuíram direta e indiretamente.

REFERÊNCIAS

AFFONSO, R. S. *et al.* Aspectos Químicos e Biológicos do Óleo Essencial de Cravo da Índia. *Revista Virtual de Química*. v.4, n.2, p.146-161, mar-abr, 2012.

HARIHARAN, Sudha; NAMBISAN, Padma. Optimization of Lignin Peroxidase, Manganese Peroxidase, and Lac Production from *Ganoderma lucidum* Under Solid State Fermentation of Pineapple Leaf. *BioResources*. v.8, p.250-271, 2013.

JONG, S. C.; BIRMINGHAM, J. M. Medicinal Benefits of the Mushroom *Ganoderma*. *Advances in applied microbiology*. v. 37, p.101-134, 1992.

KAMATOU, Guy P.; VERMAAK, Ilze; VILJOEN, Alvaro M. Eugenol-From the Remote Maluku Islands to The International Market Place: A Review of a Remarkable and Versatile Molecule. *Molecules*, v. 17, p.6953-6981, 2012.

KRASNIAK, Marina. Prospecção de biofungicidas visando o desenvolvimento de metodologias para o controle biorracional do fitopatógeno de pêssego *Monilinia fructicola* no pré e pós-colheita. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2015.

KUMAR, Amit *et al.* Gel-Based Purification and Biochemical Study of Laccase Isozymes from *Ganoderma* sp. And Its Role in Enhanced Cotton Callogenesis. *Frontiers in Microbiology*. v.8, p.1-15, 2017.

KUMAR, Amit *et al.* Laccase isozymes from *Ganoderma lucidum* MDU-7: Isolation, characterization, catalytic properties and differential role during oxidative stress. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. v.113, p.68-75, 2015.

LIMA, Josefa Aqueline da Cunha *et al.* Estudo comparativo de métodos para reação de acetilação do eugenol (*acetato de 4-alil-2-metoxifenil*). In: CONAPESC, 3., v.1, 2018, Campina Grande. *Anais...* p.1-9, 2018.

MA, Ke... *et al.* Six new 3,4-seco-27-norlanostane triterpenes from the medicinal mushrooms *Ganoderma boninense* and their antiplasmodial activity and agonistic activity to LXR β . *Tetrahedron*. v.71, p.1808-1814, 2015.

RAVEN, Peter H. ... *et al.* *Biologia Vegetal*. Tradução Ana Cláudia M. Vieira ... *et al.* 8 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2014.

SÁNCHEZ, Carmen. Lignocellulosic residues: Biodegradation and bioconversion by fungi. *Biotechnology Advances*. v. 27, p.185-194, 2009.

SANODIYA, Bhagwan S. *et al.* *Ganoderma lucidum*: A potent pharmacological macrofungus. *Current Pharmaceutical Biotechnology*. v.10, p.717-742, 2009.