

UNIVERSIDADE DE RIBEIRÃO PRETO
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

DESENVOLVIMENTO DE PROCESSOS PARA OBTENÇÃO DA
(-) - HINOQUININA A PARTIR DA BIOTRANSFORMAÇÃO DA
(-) – CUBEBINA POR *Aspergillus niger*

DANIELE DE SOUZA EUGENIO

Ribeirão Preto – SP

2018

UNIVERSIDADE DE RIBEIRÃO PRETO
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

**DESENVOLVIMENTO DE PROCESSOS PARA OBTENÇÃO DA (-) -
HINOQUININA A PARTIR DA BIOTRANSFORMAÇÃO DA (-) – CUBEBINA
POR *Aspergillus niger***

DANIELE DE SOUZA EUGENIO

Orientador: Prof.^a Dr.^a Paula Bruzadelle Vieira

Dissertação apresentada a Universidade de
Ribeirão Preto – (UNAERP), para obtenção do
título de Mestre em Biotecnologia.

Ribeirão Preto – SP

2018

Ficha catalográfica preparada pelo Centro de Processamento Técnico
da Biblioteca Central da UNAERP

- Universidade de Ribeirão Preto -

Eugenio, Daniele de Souza, 1994-

E87d Desenvolvimento de processos em biorreatores para obtenção da
(-)- hinoquinina a partir da biotransformação da (-)- cubebina por *Aspergillus
niger*. / Daniele de Souza Eugenio. - - Ribeirão Preto, 2018.

72 f.: il. color.

Orientadora: Prof^a Dr^a. Paula Bruzadelle Vieira.

Dissertação (mestrado) - Universidade de Ribeirão Preto,
UNAERP, Biotecnologia. Ribeirão Preto, 2018.

1. *Aspergillus niger*. 2. (-)- cubebina. 3. (-)- hinoquinina,
Biorreator. I. Título.

CDD 660

DANIELE DE SOUZA EUGENIO

DESENVOLVIMENTO DE PROCESSOS PARA OBTENÇÃO DA (-)-HINOQUININA
A PARTIR DA BIOTRANSFORMAÇÃO DA (-)- CUBENINA POR *ASPERGILLUS*
NÍGER

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa
de Pós-Graduação em Biotecnologia da
Universidade de Ribeirão Preto, para obtenção do
título de Mestre em Biotecnologia.

Área de Concentração: Biotecnologia Aplicada à Saúde

Data da defesa: 28 de maio de 2018

Resultado: Aprovada

BANCA EXAMINADORA



Profa. Dra. Paula Bruzadelle Vieira
Universidade de Ribeirão Preto - UNAERP



Profa. Dra. Niece Araçari Jacometti Cardoso Furtado
Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - USP



Profa. Dra. Ana Lúcia Fachin Saltoratto
Universidade de Ribeirão Preto - UNAERP

RIBEIRÃO PRETO
2018

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pela oportunidade de ter realizado mais um sonho, por ter me dado forças para seguir até aqui, por ter segurado minha mão todas as vezes que pensei em desistir. Sem ele nada teria acontecido.

Agradeço imensamente aos meus pais, que sempre me incentivaram e nunca mediram esforços pra me ajudar no que for preciso, por estarem comigo em todos os momentos. Agradeço aos meus amigos por sempre acreditarem em mim e entenderem quando não pude estar por perto.

Aos meus amigos do Laboratório, Gustavo, Pauline, Cyro, Letícia, Luis, Denise, Cássio e Bruno por sempre me ajudarem tanto nos experimentos quanto por fazer meus dias mais felizes com a amizade de vocês.

Agradeço muito ao Arthur, Ana e Saad por terem me acompanhado e por colaborarem na parte experimental do trabalho, obrigada por terem facilitado meus dias com momentos bons que passamos juntos no laboratório!

Agradeço à minha orientadora Prof.^a Paula Bruzadelle Vieira, por ter acreditado em mim. Pela atenção, paciência mesmo em meios às dificuldades que encontramos no decorrer do trabalho, por todo conhecimento adquirido que irei levar comigo sempre. Agradeço por ter me ouvido todas as vezes que precisei, não somente como uma orientadora mais como uma amiga. Muita gratidão!

Agradeço á todos os professores e pesquisadores do bloco de Biotecnologia da UNAERP, por todo conhecimento adquirido. Em especial á Prof.^a Dr.^a Silvia Taleb Contini, Prof.^a Dr.^a Ana Lúcia Fachin Saltoratto e Prof.Dr.^a Mirian Verginia Lourenço por terem cedido materiais e equipamentos para realização do trabalho e pelo auxilio nas discussões deste trabalho.

Agradeço a todas funcionarias do bloco da Biotecnologia e da secretária de Pós-graduação.

Por fim agradeço à CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pelo apoio financeiro que foi indispensável para realização deste trabalho.

Meu muito obrigada à todos !

RESUMO

A biotransformação de compostos orgânicos é uma ferramenta eficaz para produção de novos compostos. A (-)-hinoquinina é uma lignana que possui diversas atividades biológicas já relatadas na literatura, com destaque para a tripanocida. Estudos recentes demonstraram que esta molécula pode ser obtida através da biotransformação da (-)-cubebina pelo fungo *Aspergillus niger*. No entanto, a obtenção da (-)-hinoquinina por este método, relata que a concentração alcançada do produto em estudos anteriores pode estar aquém da capacidade real de produção. Sendo assim, este trabalho se propôs a compreender em quais condições o fungo se torna capaz de promover as reações de bioconversão e ainda estabelecer condições ideais de cultivos para a produção da (-)-hinoquinina em biorreator visando seu alto rendimento. Para isso, *A.niger* foi inoculado em meio PDB e após 75 horas no *shaker*, foi transferido para o biorreator de tanque agitado sob condições obtidas no delineamento experimental que foi proposto. Sendo assim a massa micelial foi transferida para o meio Czapek Dox modificado (1% de sacarose, 0,2% de NaNO₃, 0,1% , K₂HPO₄ 0,1%, MgSO₄ 0,05% , KCl 0,05% , FeSO₄ 0,001%), a cubebina foi adicionada na concentração de 200 mg/L e o pH foi ajustado para 6. A temperatura foi mantida a 30°C, frequência de agitação 200 rpm e vazão de ar igual a 0,12 SLPM (litro padrão por minuto). Através do software Statistica 8, foi analisado os efeitos das variáveis testadas pH(6;8), concentração de sacarose (10 g/L;30g/L) e de (-)-cubebina 100 mg/L; 200 mg/L). Para o monitoramento da conversão, alíquotas foram retiradas de 48 em 48 horas pelo período de 20 dias para análise em CLAE. Após este período constatou-se que o rendimento obtido nas condições estabelecidas foi de 50,05%. Analisando-se os efeitos das variáveis do processo, observou-se que as maiores interferências são das concentrações de sacarose, seguido do pH e da concentração de (-)- cubebina. O rendimento obtido foi consideravelmente favorável quando comparado ao recente estudo através deste processo onde se obteve um rendimento de 14 %. Considerando-se então, os resultados obtidos neste trabalho, constatou-se através rendimento obtido em biorreator que esse tipo de processo é promissor. Além disso, trata-se de um processo biotecnológico e apresenta uma alternativa “verde” para obtenção da (-)-hinoquinina.

Palavras-chave: Biotransformação, *Aspergillus niger*, (-)- cubebina, (-)- hinoquinina, biorreator.

ABSTRACT

Biotransformation of organic compounds is an effective tool for the production of new compounds. (-) - Hinokinin is a lignan that has several biological activities already reported in the literature, with emphasis on trypanocides. Recent studies have demonstrated that this molecule can be obtained through the biotransformation of (-) - cubebin by the fungus *Aspergillus niger*. However, obtaining (-) - hinoquinine by this method reports that the achieved concentration of the product in previous studies may be below the actual production capacity. Thus, this work aims to understand under which conditions the fungus becomes capable of promoting bioconversion reactions and also establish optimal conditions of cultures for the production of (-) - hinokinin in bioreactor aiming at its high yield. For this, *A.niger* was inoculated in PDB medium and after 75 hours in the shaker, it was transferred to the stirred tank bioreactor under conditions obtained in the proposed experimental design. Thus the cells were transferred to the modified Czapek Dox medium (1% sucrose, 0.2% NaNO₃, 0.1%, 0.1% K₂HPO₄, 0.05% MgSO₄, 0.05% KCl, 0.001 FeSO₄ %), the cubebin was added at the concentration of 200 mg / L and the pH was adjusted to 6. The temperature was maintained at 30 ° C, stirring frequency 200 rpm and air flow rate equal to 0.12 SLPM (standard liter per minute). Through the software Statistica 8, the effects of the tested variables (pH, [] sucrose and [] (-) - cubebin were analyzed. For the monitoring of the aliquot conversion were withdrawn every 48 hours for the period of 20 days for analysis in HPLC. After this period it was verified that the yield obtained in the establish conditions was of 50,05%. Studying the effects of the process variables, it was observed that the highest interferences are of the sucrose concentrations, followed by the pH and concentration of the (-) - cubebin. The yield obtained was fairly favorable when compared to the recent study by this process where a yield of 14% was obtained. Considering the results obtained in this work, it was verified that the yield obtained in bioreactor is promising and it is still possible to emphasize that the biotechnological process is a "green" alternative to obtain (-) –hinokinin.

Keywords: Biotransformation, *Aspergillus niger*, (-) - cubebin, (-) - hinokinin, bioreactor

Lista de Figuras

Figura 1. Estrutura da (-)- cubebina.....	13
Figura 2. Estrutura da (-)- hinoquinina.....	14
Figura 3. Exemplo da obtenção de cortisona pela biotransformação da progesterona pelo fungo <i>Rhizopus arrhizus</i>	16
Figura 4. Reação da obtenção do ácido ascórbico por <i>Gluconobacter oxydans</i>	17
Figura 5. Obtenção do álcool perílico pela hidroxilação do limoneno por <i>Fusarium verticilloides</i>	17
Figura 6. Exemplo de biorreatores: Tanque agitado e <i>airlift</i>	20
Figura 7. Perfis de concentração de células e de substratos em processos realizados em biorreator com diferentes tipos de operação.....	21
Figura 8. Contagem dos esporos de <i>Aspergillus niger</i> em câmara de Neubauer....	31
Figura 9. Cinética de crescimento do fungo <i>Aspergillus niger</i> em quatro meios de cultura diferentes.....	32
Figura 10. Curva de calibração construída para quantificação de (-)-hinoquinina.....	33
Figura 11. Curva de calibração construída para quantificação de (-)-hinoquinina.....	34
Figura 12. <i>A.niger</i> cultivados em PDB juntamente com a (-)-cubebina.....	35
Figura 13. <i>A. niger</i> cultivado em meio PDB.....	35
Figura 14. Cromatograma do Padrão autêntico de (-)- Hinoquinina.....	36
Figura 15. Cromatograma do 6º dia de biotransformação na concentração de 200 mg/L de (-)-cubebina.....	36
Figura 16. Cromatograma do 8º dia de biotransformação na concentração de 400 mg/L de (-)-cubebina.....	37
Figura 17. Cromatograma do 10º dia de incubação na concentração de 600 mg/L de (-)-cubebina.....	37
Figura 18. Cromatograma do 12º dia de incubação na concentração de 800 mg/L de (-)-cubebina.....	37

Figura 19. Cromatograma do 14º dia de incubação na concentração de 1000 mg/L de (-)-cubebina.....	38
Figura 20. Gráfico da concentração de HQ obtida a partir de diferentes concentrações de HQ adicionadas após 6 dias de incubação.....	38
Figura 21. Cromatograma do 14º dia do processo em que a cubebina foi adicionada na fase estacionária do fungo <i>A.niger</i>	39
Figura 22. Cromatograma do 16º dia do processo em que a cubebina foi adicionada na fase estacionária do fungo <i>A.niger</i>	40
Figura 23. Cromatograma do Tempo zero da biotransformação em Meio Czapek Dox.....	40
Figura 24. Cromatograma do 8º dia de biotransformação em Meio Czapek Dox	41
Figura 25. Cromatograma do 10º dia de biotransformação em Meio Czapek Dox	41
Figura 26. Cromatograma do 12º dia de biotransformação em Meio Czapek Dox	41
Figura 27. Cromatograma do 14º dia de biotransformação em Meio Czapek Dox	42
Figura 28. Cromatograma do extrato bruto do 18º dia de biotransformação em Meio Czapek Dox.....	42
Figura 29. Gráfico da concentração de (-)-hinoquinina em função do tempo obtida de biotransformação em frascos.....	43
Figura 30. Gráfico da concentração de HQ para cada tratamento do delineamento experimental.....	45
Figura 31. Superfície de resposta da [] de HQ em µg/mL a partir da [] de Sacarose no meio Czapek Dox e pH.....	46
Figura 32. Superfície de contorno representando a [] de HQ em µg/mL a partir da [] de Sacarose no meio Czapek Dox e pH.....	47
Figura 33. Superfície de resposta da [] de HQ em µg/mL a partir da [] de CB e pH.....	48
Figura 34. Superfície de contorno representando a [] de HQ em µg/mL a partir da [] de CB e pH.....	48
Figura 35. Superfície de resposta da [] de HQ em µg/mL a partir da [] de CB e [] Sacarose no meio Czapek Dox.....	49
Figura 36. Superfície de contorno representando a [] de HQ em µg/mL a partir	50

da [] de CB e [] Sacarose no meio Czapek Dox.....	
Figura 37. . Gráfico da concentração de Biomassa ao longo do tempo no biorreator.....	52
Figura 38. <i>Aspergillus niger</i> em meio Czapek Dox modificado no tempo zero e após 5 dias de incubação.....	53
Figura 39. Cromatograma do padrão de CB.....	53
Figura 40. Cromatograma do padrão de HQ	54
Figura 41. Cromatograma do tempo zero da biotransformação em biorreator.....	54
Figura 42. Cromatograma do 4º dia de biotransformação em biorreator.....	54
Figura 43. Cromatograma do 6º dia de biotransformação em biorreator.....	55
Figura 44. Cromatograma do 8º dia de biotransformação em biorreator.....	55
Figura 45. Cromatograma do 10º dia de biotransformação em biorreator.....	55
Figura 46. Cromatograma do 12º dia de biotransformação em biorreator.....	56
Figura 47. Cromatograma do 14º dia de biotransformação em biorreator	56
Figura 48. Cromatograma do 16º dia de biotransformação em biorreator	56
Figura 49. Cromatograma do 14º dia de biotransformação em biorreator	57
Figura 50. Cromatograma do 20º dia de biotransformação em biorreator.....	57
Figura 51. Cromatograma do controle (Fungo, meio, DMSO) após 4 dias de incubação	57
Figura 52. Cromatograma do controle (Fungo, meio, DMSO) após 8 dias de incubação	58
Figura 53. Cromatograma do controle (Fungo, meio, DMSO) após 12 dias de Incubação.....	58
Figura 54. <i>A.niger</i> em biorreator após 24 horas da adição de CB e no 20º dia de biotransformação.....	60

Figura 55. Gráfico da concentração de HQ e monitoramento do pH em função do tempo no biorreator..... 60

Figura 56. Esquema da conversão da (-)- cubebina em (-)- hinoquinina por *A.niger*..... 61

Lista de Tabelas

Tabela 1. Meios de cultura testados para construção da curva de crescimento do fungo <i>A.niger</i>	26
Tabela 2. Variáveis e condições do delineamento experimental proposto para obtenção de uma maior concentração de (-)- hinoquinina.....	30
Tabela 3. Estudo da quantificação de (-)- hinoquinina no processo de biotransformação em frascos.....	42
Tabela 4. Resultados obtidos do delineamento experimental.....	44
Tabela 5. Efeitos das variáveis obtidos através da análise do delineamento experimental.....	45
Tabela 6. Estudo da quantificação de (-)-hinoquinina no processo de biotransformação em biorreator.....	59

Lista de Abreviaturas e símbolos

CB	(-)-cubebina
HQ	(-)-hinoquinina
<i>A.niger</i>	<i>Aspergillus niger</i>
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta eficiência
CCDC	Cromatografia Camada Delgada Comparativa
UV/VIS	Ultra Violeta Visível
DMSO	Dimetilsulfóxido
ACN	Acetonitrila
PDB	Potato Dextrose Broth
PDA	Potato Dextrose Ágar
[]	Concentração

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	13
1.1. (-)- Cubebina e (-)-Hinoquinina	13
1.2. Biotransformação e evolução dos bioprocessos.....	15
1.3. <i>Aspergillus niger</i>	19
1.4. Cultivo de células em biorreatores.....	20
2. OBJETIVO	22
2.1. Objetivo geral	22
2.2. Objetivos específicos.....	23
3. MATERIAL E MÉTODOS	23
3.1. (-)- cubebina e <i>A.niger</i>	23
3.2. Equipamentos e matérias primas utilizadas nos processos de biotransformação.....	23
3.3. Equacionamento.....	23
3.3.1. Cálculo do grau de conversão.....	23
3.3.2. Cálculo da produtividade máxima.....	24
3.4. Estoque da linhagem de <i>A.niger</i> e padronização do inoculo.....	24
3.5. 3.5. Avaliação de diferentes meios de cultura.	24
3.6. Ensaio antimicrobianos do <i>A. niger</i> na presença de (-)-cubebina	25
3.6.1. MIC (Concentração inibitória mínima da (-)- cubebina).....	25
3.6.2. Ensaio antimicrobiano frascos agitados.....	26
3.7. Reações de Biotransformação testando diferentes condições de cultivo	26
3.8. Delineamento Experimental	28
3.9. Experimento em Biorreator.....	28
3.10. Condições analíticas.....	29
3.10.1. Quantificação da biomassa.....	29
3.10.2. Quantificação da (-)- hinoquinina.....	30
3.10.3. Análises em CLAE.....	30
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	31
4.1. Estudos sobre as condições de cultivo	31

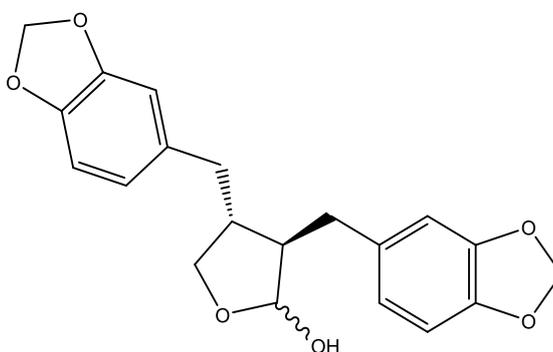
4.1.1.	Padronização dos esporos	31
4.1.2.	Curvas de crescimento e avaliação dos parâmetros cinéticos dos meios de cultura	32
4.2.	Curva de Calibração para quantificação de (-)- hinoquinina.....	33
4.3.	Ensaio de toxicidade da (-)- cubebina ao fungo <i>A.niger</i>	34
4.3.1	Ensaio de toxicidade em placa.....	34
4.3.2	Ensaio de toxicidade em frascos agitados.....	34
4.4.	Reações de Biotransformação testando diferentes condições.....	39
4.5.	Delineamento Experimental	44
4.6	Produção da (-)- hinoquinina em biorreator.....	52
5.	CONCLUSÕES	63
6.	REFERÊNCIAS	64

1. INTRODUÇÃO

1.1. (-)- Cubebina e (-)-Hinoquinina

A (-)-cubebina (CB; **Figura 1**) é uma lignana dibenzilbutirolactólica de ocorrência em várias famílias de plantas, porém devido a grande concentração deste metabólito nas sementes de *Piper cubeba* (Família Piperaceae) atualmente o seu isolamento é realizado basicamente desta espécie vegetal (REZENDE, 2012). Esta molécula se apresenta como uma substância cristalina que consiste de uma mistura de dois epímeros.

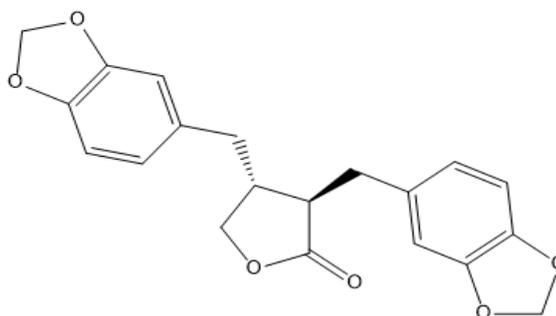
Figura 1: Estrutura da (-)-cubebina



Nas últimas décadas, diversos trabalhos têm sido realizados para investigação das atividades biológicas da CB, das quais já foram descritas: tripanocida (BASTOS et al., 1999), analgésica e anti-inflamatória (BASTOS et al., 2001), Leishmanicida (BODIWALA et al., 2007), atividade antimicrobiana (SILVA et al., 2009) e mais recente, como agente vasodilatador na terapia de disfunção Erétil (Patente número JP 2012-545026- Correspondente ao PCT/BR2009/000433).

Diante destas atividades biológicas relevantes que esta molécula apresenta, diversas modificações estruturais foram realizadas no esqueleto químico da CB, a fim de obter novos derivados. Dos análogos já obtidos e biologicamente investigados, pode-se destacar a (-)-hinoquinina (**Figura 2**).

A (-)-hinoquinina (HQ; **Figura 2**) é uma lignana dibenzilbutirolactona que pode ser obtida pela síntese parcial da (-)-cubebina (DE SOUZA et al., 2005). Nos últimos anos, assim como a (-)-cubebina, atividades biológicas de várias lignanas foram estudadas em profundidade, e um destaque tem sido dado a (-)-hinoquinina que está emergindo como um novo composto interessante (CUNHA et al., 2012).

Figura 2. Estrutura da (-)-Hinoquinina

A HQ tem apresentado atividades biológicas interessantes como: Antiinflamatória (DA SILVA et al., 2005), Tripanocida (DE SOUZA et al., 2005; SARAIVA et al., 2007), Antitumoral (HIRATA et al., 2007), antimicrobiana (SILVA et al., 2009).

Das atividades biológicas descritas acima, destaca-se a atividade tripanocida contra o *Trypanosoma cruzi*, o agente etiológico da doença de Chagas.

A doença de Chagas é uma doença negligenciada que afeta cerca de 6 a 7 milhões de pessoas na América Latina (WHO, 2017). É caracterizada por ter uma evolução crônica, sistêmica e debilitante. Atualmente, existem dois fármacos que são utilizados para o tratamento desta doença, são eles: Benznidazol e o Nifurtimox, porém causam efeitos colaterais de grande significância.

Estudos *in vitro* demonstraram que a HQ apresenta efeito tripanocida frente as formas amastigotas (fase intracelular) e epimastigotas do parasita *Trypanosoma cruzi* sendo que, 0,5 μM apresentou maior atividade do que o benznidazol e nas demais concentrações avaliadas (2,0, 8,0 e 32,0 μM) apresentou atividade similar (DE SOUZA et al., 2005).

Um estudo *in vivo* demonstrou que a HQ foi mais eficiente que o fármaco Benznidazol que é utilizado na terapêutica, reduzindo a parasitemia nos animais que foram infectados em aproximadamente 70% enquanto benznidazol na mesma concentração e forma de tratamento reduziu apenas 29% (SARAIVA et al., 2007). A HQ também não foi considerada tóxica quanto ao valor IC50 de citotoxicidade sobre células LLCMK2, podendo se tornar uma droga segura e eficaz no tratamento da Doença de Chagas (ESPERANDIM et al., 2013). Estes resultados demonstram o potencial tripanocida desta molécula cujo processo de obtenção e atividade farmacológica foram patenteados no Brasil

(PI 0201237-5 INPI), com reconhecimento de países como os EUA (depósito de patente número US 7.317.114 B2).

Como dito anteriormente, a HQ pode ser obtida a partir da síntese parcial da CB onde nota-se um bom rendimento (DE SOUZA et al., 2005; ESPERANDIM et al., 2012). Porém há a desvantagem na obtenção desta molécula por este processo devido ao uso de um catalizador oxidante seletivo, o PCC (Clorocromato de Piridínio), que é um reagente tóxico que contém cromo e que apresenta possível potencial cancerígeno e é contaminante da água e do solo (COREY; SUGGS, 1975; ANDRADE et al., 2009).

Outro procedimento realizado para obtenção da HQ a partir da oxidação da CB visando minimizar a utilização e produção de compostos tóxicos foi a aplicação de um material que mimetiza as enzimas citocromo P-450 que é constituído de ferro-tetrafenilporfirina imobilizada em alumina utilizando os oxidantes iodossilbenzeno e peróxido de hidrogênio (ANDRADE et al., 2009). Embora este procedimento seja menos tóxico quando comparado á oxidação por PCC, há a utilização de ACN, que é um solvente orgânico teratogênico e que apresenta toxicidade por via respiratória produzindo metabólitos pelo fígado como o cianeto e provavelmente ácido fórmico e formaldeído (WHO, 1993). Além disso, apesar do uso deste sistema apresentar uma boa atividade catalítica, este não atinge níveis necessários para utilização industrial. Desta forma, os catalisadores metaloporfirínicos possuem maior potencial de aplicação na química e em estudos biomiméticos para investigação de mecanismos (FARIA, 2004).

Um estudo realizado com a biotransformação da CB utilizando fungos do gênero *Aspergillus* (*A. terreus* e *A. niger*), demonstrou pela primeira vez a obtenção da HQ através de um processo biotecnológico (ARRUDA, 2017). Neste estudo o rendimento obtido demonstrou-se baixo, porém muito promissor devido ao fato que o processo de obtenção da HQ por biotransformação pode trazer diversas vantagens, uma vez que é ecologicamente correto e se otimizado, o processo poderá ser economicamente viável.

1.2. Biotransformação e evolução dos bioprocessos

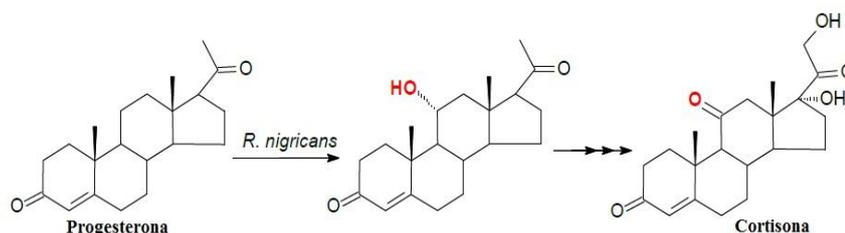
Com a finalidade de se obter novas moléculas que possam ser ainda mais promissoras para o desenvolvimento de novos medicamentos, substâncias que são extraídas de plantas geralmente são modificadas estruturalmente através de métodos químicos tradicionais ou processos biotecnológicos (AMBRÓSIO et al., 2006; NEWMAN, 2008).

A biotransformação de produtos naturais por microrganismos é um método biotecnológico eficaz para produção de novos compostos de bioativos (MIYAZAWA, 2001). Exemplos de sucesso já foram relatados para diversas classes químicas de compostos oriundos do metabolismo secundário dos vegetais como os terpenos, alcaloides, flavonoides e as lignanas e diversas atividades biológicas já foram reportadas (RATHBONE; BRUCE, 2002; VERZA et al., 2009; PORTO et al., 2013; CAO et al., 2015; XU, 2015).

O processo de biotransformação se difere das fermentações onde a substância é completamente sintetizada por determinado microrganismo através de diversas rotas metabólicas. Logo, a biotransformação é o uso de sistemas biológicos para promover transformações químicas em substratos não naturais gerando novos produtos (HANSON, 2017).

As primeiras tentativas utilizando esta técnica foram com os esteroides, onde a indústria farmacêutica enfrentava o desafio para produzir a cortisona a partir da progesterona, na funcionalização do C-11 do núcleo esteroidal. Apesar de poder ser feita por métodos químicos, esta funcionalização requeria várias etapas e produzia baixos rendimentos com altos custos. Portanto, através da biotransformação utilizando o fungo filamentosso *Rhizopus arrhizus* foi possível a funcionalização do C-11 através da hidroxilação neste carbono. Assim, foi possível a produção da cortisona em larga escala e o processo foi patenteado em 1952 (MURRAY; PETERSON, 1952).

Figura 3: Exemplo da obtenção de cortisona pela biotransformação da progesterona pelo fungo *Rhizopus arrhizus*.

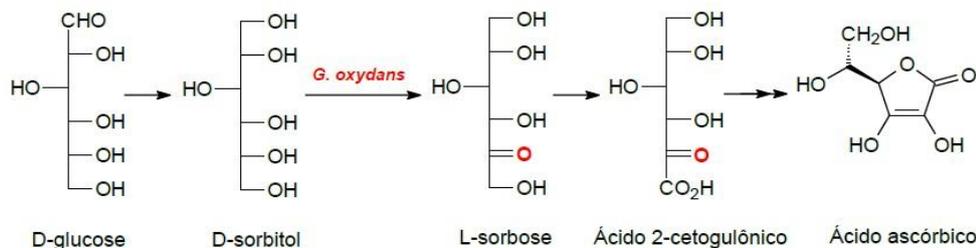


Fonte: Oliveira; Oliveira, 2012.

A produção de ácido ascórbico (Vitamina C) também já foi relatada por processo biotecnológico que envolveu uma etapa de oxidação seletiva de uma das hidroxilas do D-sorbitol levando à L-sorbose (**Figura 4**). Esta etapa foi catalisada por *Gluconobacter*

oxydans, constituindo ótimo exemplo de reação oxidativa regioseletiva que é difícil de ser realizada com oxidantes comuns. Este processo foi desenvolvido e patenteado por Tadeus Reichstein em 1941 (REICHSTEIN, 1941).

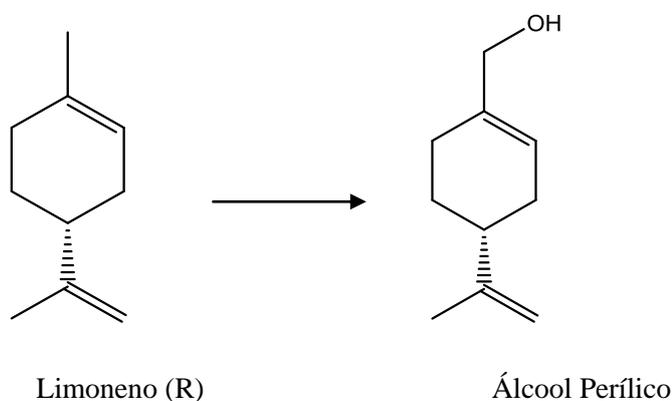
Figura 4: Reação da obtenção do ácido ascórbico por *Gluconobacter oxydans*



Fonte: Oliveira; Oliveira, 2012.

Outro exemplo que pode ser demonstrado é do álcool perfílico, um monoterpreno que inibe a proliferação de células cancerígenas do pulmão (XU et al., 2004), câncer pancreático (MATOS et al., 2008) entre outras atividades que despertam o interesse nesta molécula. Devido à semelhança estrutural com o limoneno (**Figura 5**), este monoterpreno tem sido utilizado como matéria-prima para a obtenção do álcool perfílico. A oxidação regioseletiva, necessária para a obtenção do álcool, é difícil de ser realizada por via química. Através de processo biotecnológico, o limoneno foi convertido no álcool perfílico pelo *Fusarium verticilloides* (DE OLIVEIRA; STRAPASSON, 2000).

Figura 5: Obtenção do álcool perfílico pela hidroxilação do limoneno por *Fusarium verticilloides*.



Fonte: Oliveira; Oliveira, 2012.

Os exemplos demonstrados acima evidenciam o quanto os processos biotecnológicos são de grande interesse para a indústria químico-farmacêutica que passou a investir e desenvolver processos para a obtenção de substâncias bioativas. A base teórica da utilização de microrganismos para obtenção de substâncias de interesse se deve ao fato da grande diversidade e o potencial enzimático que estes possuem. Um grupo de enzimas chamadas de citocromo P450 presentes nos mamíferos, também foram descobertas em uma variedade de bactérias e fungos. Essas enzimas nos mamíferos são responsáveis pela detoxificação de drogas com intuito de torná-las mais polares para serem excretadas ou ainda gerar novos metabólitos com maior atividade (PERVAIZ et al., 2013). Vários microrganismos realizam oxidação de substratos de maneira análoga às realizadas em mamíferos (AZERAD, 1999). Por este motivo os microrganismos têm sido utilizados como modelos para imitar as reações metabólicas dos mamíferos e, portanto, esta diversidade e flexibilidade da ação enzimática é que permite a utilização de microrganismos na modificação de compostos orgânicos.

Comparado aos processos químicos, a biotransformação apresenta algumas vantagens relevantes devido ao fato das enzimas presentes nos microrganismos serem de natureza complexa e específica, estas catalisam as reações que oferecem produtos com excelente regioespecificidade (ataca especificamente o seu substrato na posição onde ocorre a reação) e estereoseletividade (PERVAIZ et al., 2013; ZAFAR et al., 2016). O método possui manutenção simples e barata de meios de cultura, são tradicionalmente conduzidos em sistemas aquosos, possui capacidade de conduzir as reações em condições normais de temperatura e pressão e não há necessidade de proteger outros grupos funcionais (PATEL, 2002).

Ademais, considerando a necessidade de um contínuo desenvolvimento econômico, social e ambiental sustentável, há um forte apelo ante as indústrias em relação a fatores ambientais, econômicos e uso de fontes renováveis na obtenção de matérias-primas químicas (OLIVEIRA; MANTOVANI, 2009). Essa nova conduta química visa à diminuição de resíduos e efluentes tóxicos, sendo conhecido como a “Química Verde”, tal como o processo de biotransformação é classificado (CHOUDHARY et al., 2005; ZHANG et al., 2008; MEYER; TURNER, 2009), visto que não há uso de reagentes tóxicos no processo de obtenção de novas moléculas. Portanto, a biotransformação é uma ferramenta tecnológica atrativa e apresenta-se como alternativa interessante na obtenção de moléculas com potencial farmacológico.

1.3. *Aspergillus niger*

Aspergillus niger, é um fungo filamentosso aeróbio que cresce sobre uma grande variedade de substratos, sendo uma espécie bem conhecida que tem grande interesse industrial. Este fungo é usado em diversos processos biotecnológicos para produzir alimentos fermentados, aromatizantes e ácidos orgânicos, bem como enzimas, incluindo fitases, glucoamilases, xilanases, proteases, lipases, α -galactosidases, polygalacturonases e pectinases (KRISHNA, 2005; COUTO; SANROMÁN, 2006). Seu uso na biorremediação tem sido muito discutido visto que este microrganismo é capaz de degradar poluentes presentes no meio ambiente como, por exemplo, metais pesados e hidrocarbonetos (SEPPER et.al, 2012; GUZAR et.al, 2017). Além disso, fungos filamentosos como o *A. niger*, tem alcançado considerável destaque na literatura científica devido a sua utilização em biotransformações de compostos orgânicos catalisando diversas reações e obtendo uma grande diversidade de novas moléculas (PARSHIKOV; SHUTERLAND, 2014).

De uma maneira geral, o sistema enzimático do fungo é capaz de catalisar uma variedade de reações. As reações mais comuns que os fungos podem promover são: oxidação, desidrogenação, hidroxilação redução, epoxidação, o-demetilação, o-dealquilação, o-metilação, glicosilação, entre outras (SRISILAM; VEERESHAM, 2003; PORTO et al., 2013; SEVERIANO et al., 2013).

Fungos do gênero *Aspergillus* podem hidroxilar seletivamente carbonos quimicamente não reativos, incluindo relatos deste tipo de reação em vários esqueletos químicos (CHOUDHARY et al., 2005; HARIDY et al., 2006; CHOU et al., 2008; CHOU et al., 2009; MARQUINA et al., 2009; PORTO et al., 2013; SEVERIANO et al., 2013). Além disso, é capaz de desidrogenar grupamentos hidroxila de compostos orgânicos de inúmeras classes de compostos provenientes do metabolismo secundário vegetal, levando à formação de carbonila nesta posição (AL-ABOUDI et al., 2009; ARECHE et al., 2011; LU et al., 2013; PARSHIKOV; SUTHERLAND, 2014; CHEN et al., 2015).

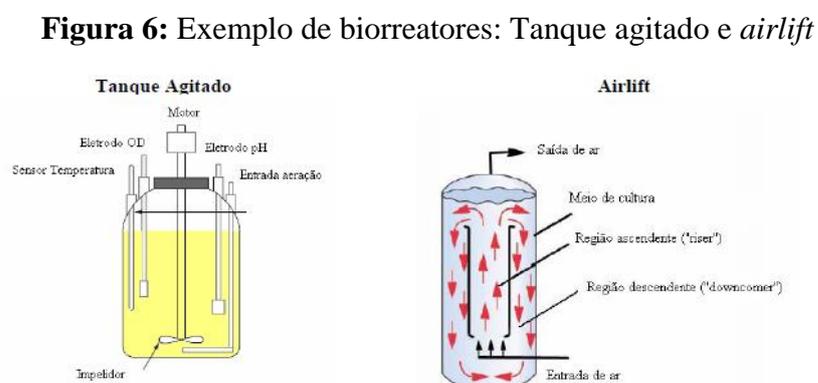
Em relação a biotransformação de lignanas por *A. niger*, diversos autores demonstram a habilidade deste fungo em promover reações específicas obtendo moléculas de grande interesse como a biotransformação do composto deoxipodofilotoxina obtendo a podofilotoxina que possui importante atividade antitumoral, por uma reação de hidroxilação promovida pelo fungo *A.niger* (MIYAZAWA, 2001). Também já foi relatado a biotransformação da (\pm)-eudesmina para obtenção do (-)-pinoresinol que possui

relevante atividade inflamatória (DURING et al., 2012) pela O-Desmetilação regioselectiva nas posições do carbono 4'- e 4'' (KASAHARA et al., 1997). Outra biotransformação com *A.niger* já relatada é da lignana (+)-magnolina, onde obteve-se os compostos: (+)-de-O metilmagnolina e (+)-de-O-metil-5'-hidroximagnolina, aumentando a variedade de estruturas (MIYAZAWA et al., 1993; MIYAZAWA, 2001). Pode-se destacar também a biotransformação da (-)- cubebina por *A. niger* para obtenção da (-)- hinoquinina como já mencionado neste trabalho, uma molécula de grande interesse farmacológico que pela primeira vez foi publicado a obtenção da mesma através de processo biotecnológico (ARRUDA et al., 2017).

Um passo essencial para a produção biotecnológica do composto desejado é a transferência de processos biossintéticos em pequena escala (em frascos agitados) para biorreatores a fim de se produzir um rendimento maior do produto e ainda monitorar parâmetros importantes como: pH, concentração de oxigênio dissolvido, temperatura e frequência de agitação.

1.4. Cultivo de células em biorreatores

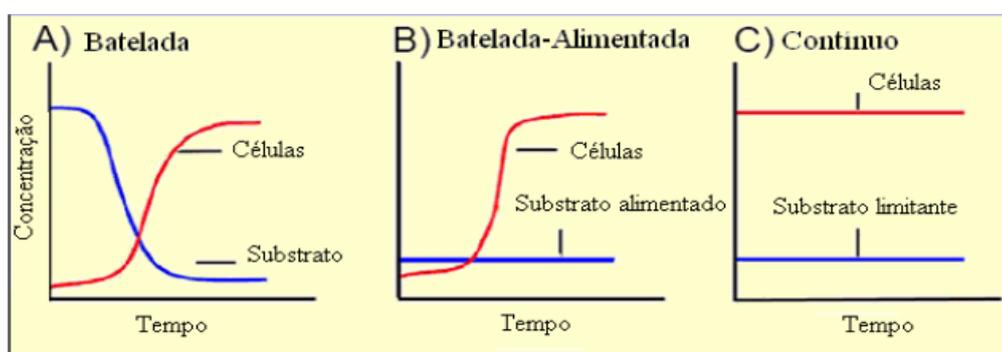
A transferência de processos em pequena escala para biorreatores, para manter o potencial de produção das culturas de células, nem sempre é simples. Os microrganismos quando cultivados em suspensão podem ser transferidos mais facilmente da pequena escala para biorreatores com diferentes configurações. Para cultivos com células suspensas utilizam-se principalmente biorreatores do tipo tanque agitado, com ou sem algum esquema de separação de células, e em vários casos colunas de bolhas e reatores “airlift”, como mostrado na **Figura 6** (BUTLER, 2004)



Fonte: (BUTLER, 2004)

Após a escolha da configuração do reator, é importante analisar qual o melhor tipo de processo para o cultivo da linhagem e produção da molécula de interesse. O tipo de processo está relacionado à forma de condução do biorreator e, podem ser: descontínuo (batelada), descontínuo alimentado (batelada alimentada) ou contínuo. A Figura 7 mostra os perfis típicos das cinéticas de crescimento celular e de substrato residual ao longo da fermentação nos diferentes modos de operação.

Figura 7: Perfis de concentração de células e de substratos em processos realizados em biorreator com diferentes tipos de operação.



Fonte: SCHMIDELL et al., 2001

Os processos em modo descontínuo são técnicas mais simples, baixo custo, e geralmente utilizados de maneira estratégica para aumentar a escala de produção. Neste tipo de ensaio o biorreator é preenchido com o meio de cultura e então inoculado com células. Durante o cultivo não há suprimento de nutrientes ao meio, com exceção de oxigênio através da aeração devido à sua baixa solubilidade no meio de cultura. Apesar deste tipo de cultura ser limitado devido à exaustão de nutrientes principais ou acúmulo de subprodutos tóxicos, o cultivo em batelada, se iniciado com um meio de cultura adequadamente formulado, pode resultar ótimos rendimentos com mínimo custo (VAUGH, 1999).

O processo em batelada alimentada tem como ideia principal suplementar o meio com nutrientes durante o cultivo visando aumentar a quantidade de células viáveis no meio e, conseqüentemente, um maior rendimento celular. Nesse tipo de cultivo, os nutrientes limitantes são adicionados ao meio durante o curso da fermentação. Além disso, diferentemente do processo contínuo, o meio de cultura do processo não é retirado, ocorrendo gradualmente acúmulo de metabólitos. Os nutrientes adicionados ao processo

deverão ser ajustados para que não ocorra uma formação de metabólitos que seja inibitório para o crescimento celular ou até mesmo causem morte celular (SCHMIDELL et al., 2001).

Por fim, nos cultivos em processo contínuo, meio estéril é adicionado continuamente ao biorreator com remoção simultânea de um volume igual de meio contendo células e metabólitos. Este modo de alimentação prolonga o cultivo e permite que uma maior produtividade seja alcançada. No entanto, há dificuldades de manutenção de condições de assepsia por longos períodos de tempo e possibilidades de ocorrência de mutações genéticas espontâneas (SCHMIDELL et al., 2001).

Nos últimos anos, várias estratégias têm sido desenvolvidas para síntese de compostos secundários a partir de cultivos microbianos. Uma delas está relacionada com a produção destes compostos em dois estágios de processo, no qual o primeiro estágio se designa especialmente à produção ou acúmulo de biomassa e o segundo a síntese efetiva do metabólito.

Dos tipos de biorreatores citados acima, o biorreator de tanque agitado é o mais utilizado em processos biotecnológicos, podendo fornecer bons resultados para uma grande gama de bioprocessos (PEREIRA JR et al., 2008). Este tipo de reator permite a aeração e agitação, elementos essenciais que suprem a demanda de oxigênio que alguns microrganismos exigem como, por exemplo, o fungo *A.niger*.

Diversos trabalhos evidenciam a facilidade de manipulação do *A. niger* em biorreatores de tanque agitado para produção e/ou bioconversão de compostos bioativos como a produção de ácido cítrico, que é utilizado principalmente como antioxidante, acidulante e flavorizante (PAPAGIANNI; MATTEYKRISTIANSEN, 1998), o ácido glucônico produtos utilizados em indústrias farmacêutica, alimentar, têxtil (ZNAD; MARKOSBALES, 2004), produção de enzimas como a β -glucosidase (ABDELLA et al., 2016) e na biotransformação do (+)- limoneno para obtenção de vários novos derivados (GARCÍA-CARNELLI et al., 2014).

2. OBJETIVO

2.1. Objetivo geral

O objetivo principal do presente trabalho foi encontrar uma condição de cultivo de *A. niger* que seja favorável a biotransformação da (-)-cubebina em (-)-hinoquinina, visando o aumento da concentração, rendimento e produtividade dessa molécula de interesse

2.2. Objetivos específicos

- ✓ Realizar cultivos em frascos a fim de conhecer os parâmetros cinéticos das células;
- ✓ Avaliar a capacidade de biotransformação da (-)- cubebina em (-)-hinoquinina em diferentes condições de cultivo;
- ✓ Avaliar o melhor momento para adicionar a (-)-cubebina no meio de cultivo;
- ✓ Realizar um delineamento experimental a fim de se investigar condições de estresse propícias para a biotransformação;
- ✓ Realizar cultivo em biorreator para biotransformação da CB em HQ utilizando a melhor condição encontrada em frascos.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. (-)- cubebina e *A.niger*

A linhagem do fungo filamentososo *A. niger* ATCC11414 utilizada neste trabalho foi fornecida pelo Departamento de Engenharia Química da Escola Politécnica da Universidade de São Paulo (USP).

A (-)- cubebina foi fornecida em colaboração com o Prof. Dr. Sérgio Ricardo Ambrósio da Universidade de Franca.

3.2. Equipamentos e matérias primas utilizadas nos processos de biotransformação

Os processos de biotransformação foram realizados utilizando-se uma mesa agitadora orbital refrigerada (*shaker*) (Lab.Companion® modelo IS- 971) e um biorreator mecanicamente agitado da marca New Brunswick Scientific™ modelo CelliGen® 310. Os meios de cultura e substratos utilizados foram da marca Difco™ e Synth®. Os reagentes utilizados para monitoramento da biotransformação foram da marca J.T Baker® Grau HPLC e Synth® .

3.3. Equacionamento

3.3.1. Cálculo do grau de conversão:

$$\frac{\text{Rendimento teórico x 100\%}}{\text{Rendimento real}} = \% \text{ conversão}$$

3.3.2. Cálculo da produtividade máxima:

$$\frac{\text{Concentração máxima HQ (mg/L)}}{\text{Tempo (dias)}} = \text{mg.L/dia}$$

3.4. Estoque da linhagem de *A.niger* e padronização do inóculo

Para o estoque do banco de células, *A. niger* foi inoculado em meio sólido PDA 3,9% em Erlenmeyer contendo 100 mL de meio, incubados à 30°C por 7 dias para obtenção dos esporos. Após este período, adicionou-se 100 mL de solução salina à 0,9 % aos esporos. Foram transferidos 1 mL desta solução de esporos para 100 microtubos contendo 1 mL de solução de glicerol 20% (v/v) em proporções iguais resultando suspensão de células em glicerol a 10% (v/v). Os microtubos contendo os esporos e o glicerol foram armazenados em ultrafreezer a uma temperatura de -80°C, para a realização de todos os experimentos.

Para determinar a quantidade de esporos após o repique para o banco de células, inoculou-se 1 mL da solução de *A. niger* do estoque em meio sólido PDA 3,9% incubados à 30°C por 7 dias. Em seguida, os esporos foram recolhidos e filtrados com solução salina 0,9% para obtenção da solução de conídios (designação de esporos). Após a filtração, 1 mL da solução filtrada foi diluída 10 vezes em solução salina para então efetuar a contagem do número de conídios formados em suspensão. A contagem dos esporos foi realizada por uma câmara de Neubauer. Foi feita uma média dos quadrantes contados em triplicata e através do cálculo: (nº total de células contadas/ nº de quadrantes x fator de diluição x 10.000) obteve-se a quantidade de conídios por mL.

3.5. Avaliação de diferentes meios de cultura.

O conhecimento da curva cinética de crescimento e formação do produto desejado é uma etapa fundamental para o entendimento e dimensionamento de um processo biotecnológico.

Os ensaios para obtenção de dados para a construção da curva de crescimento foram realizados a fim de se obter os parâmetros cinéticos e conseqüentemente definir o melhor meio de crescimento para esta linhagem nos ensaios posteriores. Os parâmetros e variáveis adotados para a escolha do meio foram: produção de células em suspensão e

concentração máxima celular. Para isso, *A. niger* foi cultivado em 4 meios de culturas diferentes que estão dispostos na **Tabela 1**.

Tabela 1. Meios de cultura testados para construção da curva de crescimento do fungo *A. niger*.

Meios de cultura	Composição
Meio 1	PDB Potato Dextrose Broth 24 g /L ;
Meio 2	Glicose 10 g /L , Peptona 5 g/L , K ₂ PO ₄ 5g/L, Extrato de levedura 5g/L, Glicerol 5 mL/L , NaCl 5g/L;
Meio 3	Glicose 20 g/L, extrato de levedura 10 g /L, extrato de malte 10 g/L;
Meio 4	Pó de milho 0,25%, Glicose 1,0 % , Farinha de aveia 1,0 % , Pasta de tomate 4,0%, CaCl ₂ 1% e 10,0 mL/L de solução com traços de elementos (Jackson et al., 1993).

Os experimentos foram realizados em *shaker* a 200 rpm, 30°C e as culturas foram mantidas por um período de 135 horas. A Biomassa foi quantificada de acordo com item **3.10.1**.

3.6. Ensaio antimicrobianos do *A. niger* na presença de (-)-cubebina

3.6.1. MIC (Concentração inibitória mínima da (-)- cubebina).

Este ensaio foi realizado para se avaliar a concentração inibitória da CB nas culturas de *A. niger*, a fim de determinar a concentração ideal a ser usada nos processos. A CB foi fornecida em colaboração com o Prof. Dr. Sérgio Ricardo Ambrósio da Universidade de Franca e o isolamento, feito pelo grupo de pesquisa desta mesma universidade. O ensaio foi feito de acordo com o método de referência de sensibilidade a antifúngicos M-38-A do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2002).

As soluções de conídios foram preparadas a partir de placas de *A. niger* crescidas por sete dias a 30°C. As colônias foram retiradas da placa com uma espátula estéril e transferidas para um tubo plástico contendo cerca de 10 mL de solução salina 0,9%. A solução foi filtrada em funil com lã de vidro e sua absorbância foi aferida em espectrofotômetro para uma densidade óptica de 0,125-0,155 em um comprimento de onda de 530 nm. Essa suspensão foi diluída 1:50 em meio PDB.

O teste foi realizado em triplicatas em placas de 96 poços em fundo “U” onde controles de crescimento (meio de cultura e fungo) e esterilidade (meio de cultura e droga) foram incluídos. As faixas de concentrações testadas de CB foram: 1,95 µg/mL a 1000 µg/mL. Os testes foram incubados à 30°C por 7 dias. Após 7 dias, para confirmação dos resultados preparou-se placas de Petri contendo meio de cultura PDA e foram inoculados 100 µL das concentrações testadas. As placas foram incubadas em estufas à 30°C por mais sete dias para confirmar se houve ou não crescimento de colônias do fungo.

3.6.2. Ensaio antimicrobiano frascos agitados

Este ensaio foi realizado para verificar a sensibilidade do fungo *A. niger* em meio de cultura líquido sob agitação na presença de (-)-cubebina. Além disso, verificar também a capacidade de biotransformação da linhagem adquirida para os experimentos deste projeto, e do meio de cultura escolhido. Para isso, inocularam-se esporos de *A. niger* em meio de cultura PDB e, a (-)-cubebina foi adicionada no momento da inoculação do fungo nas concentrações 200 400 600 800 e 1000 mg/L, determinadas de acordo com os dados obtidos nos ensaios em placa de 96 poços de forma estática. Alíquotas a cada 48 horas foram retiradas por um período de 18 dias para análise em CLAE sob condições descritas nos itens **3.10.2** e **3.10.3**.

3.7. Reações de Biotransformação testando diferentes condições de cultivo

Considerando que, a literatura dispõe de diversas metodologias para investigação da biotransformação fúngica de compostos orgânicos e que, as condições ideais de cultivo em que o fungo *A. niger* torna-se capaz de promover a bioconversão de CB em HQ ainda não foram pré-estabelecidas, a proposta do ensaio foi investigar em quais condições de estresse ou em que momento o fungo *A. niger* é capaz de promover as reações de biotransformação. Para isso, a adição de (-)-cubebina foi realizada em quatro diferentes condições. Os ensaios foram realizados em Erlenmeyers de 500 mL, com 100

mL de volume de trabalho. A temperatura no *shaker* foi de 30°C e a frequência de agitação de 200 rpm. Em todas as condições, a concentração de (-)-cubebina adicionada foi de 200 mg/L solubilizada em DMSO. As condições determinadas foram as seguintes:

Condição 1: Na fase estacionária do fungo no mesmo meio de cultura utilizado no crescimento, ou seja, o fungo foi cultivado em meio PDB e após atingir a sua fase estacionária (determinada em ensaios anteriores), foi feita a adição da (-)-cubebina.

Condição 2: No meio de cultivo sem a presença das células. Para isso, o fungo foi cultivado em meio PDB, e no início da fase de declínio foi feita filtração a vácuo para retirada das células. Em seguida, a (-)-cubebina foi adicionada neste meio fermentado. Este ensaio foi realizado para verificar se a biotransformação ocorre por ação de enzimas que estão presentes no meio fermentado, ou seja, enzimas que foram produzidas de forma extracelular pelo fungo em uma situação de estresse (por isso a necessidade de retirar as células somente no início da fase de declínio).

Condição 3: Meio Czapek Dox sem a presença de células. A composição deste meio é 3,0 % de sacarose, 0,2 % de NaNO₃, 0,1 % de K₂HPO₄, 0,05 % de MgSO₄.7H₂O, 0,05 % de KCl e 0,001 % de FeSO₄.7H₂O, pH 7,3. O cultivo foi realizado no meio de crescimento pré-estabelecido anteriormente (PDB) e após alcançar a máxima produção de biomassa, esta foi separada por filtração e adicionada ao meio Czapek Dox. Após 24 horas neste meio, a biomassa presente neste meio foi retirada por filtração a vácuo e então a cubebina foi adicionada somente ao meio fermentado.

Condição 4: No meio Czapek Dox na presença de células. O cultivo foi realizado no meio de crescimento pré-estabelecido anteriormente (PDB) e após alcançar a máxima produção de biomassa, esta foi separada por filtração e adicionada ao meio Czapek Dox cuja composição está descrito acima.

A (-)-cubebina, então, foi adicionada após 24 horas neste meio, reproduzindo o que foi realizado por Arruda et al., (2017). O monitoramento da conversão e as condições utilizadas em CLAE foram realizados de acordo com os itens **3.10.2** e **3.10.3**.

3.8. Delineamento Experimental

A partir da melhor condição estabelecida no item 3.7., foi proposto um delineamento experimental em dois níveis (máximo e mínimo) com o objetivo de analisar a influência de variáveis no meio de cultura a fim se obter uma maior concentração de HQ e assim, melhorar o processo. Os tratamentos foram dispostos a um esquema fatorial de $2^k = 2^3 = 8$ experimentos combinados que pode ser demonstrado na **Tabela 2**. As variáveis analisadas e os seus níveis máximo e mínimo foram respectivamente: pH (6; 8), Concentração de sacarose (10 g/L; 30 g/L), Concentração do substrato (-)- cubebina (100 mg/L; 200 mg/L).

Para este experimento, esporos de *A. niger* foram cultivados em meio PDB, e após atingir a concentração máxima de células (75 horas) a massa micelial obtida foi filtrada a vácuo e então foi adicionada no meio Czapek Dox sob as condições propostas descritas na **Tabela 2**. Após 18 dias de incubação (tempo determinado em ensaios anteriores para conversão da CB em HQ), alíquotas foram retiradas de cada tratamento para análise em CLAE conforme descrito nos itens 3.10.2 e 3.10.3.

Tabela 2. Variáveis e condições do delineamento experimental proposto para obtenção de uma maior concentração de (-)- hinoquinina.

Nº de Experimentos	pH	[] Substrato	
		[] Sacarose g/L	(-)-cubebina mg/L
1	6	10 g/L	100 mg/L
2	6	10 g/L	200 mg/L
3	6	30 g/L	100 mg/L
4	6	30 g/L	200 mg/L
5	8	10 g/L	100 mg/L
6	8	10 g/L	200 mg/L
7	8	30 g/L	100 mg/L
8	8	30 g/L	200 mg/L

Os dados foram tabelados e tratados pelo software Statistica 8, da Statsoft, para estudo dos efeitos das variáveis pH, [] Sacarose, [] CB.

3.9. Experimento em Biorreator

O experimento em biorreator foi realizado com o intuito de testar a melhor condição encontrada nos experimentos em *shaker*, mais especificamente, a determinada no delineamento experimental. O biorreator de 3,5 L de capacidade foi utilizado com um volume útil de 2 L, equipado com um eletrodo de pH e de oxigênio dissolvido, previamente calibrados. A temperatura foi mantida a 30°C, frequência de agitação de 200 rpm e a vazão de ar igual a 0,12 SLPM (litro padrão por minuto).

O inóculo foi preparado em *shaker* e após a máxima produção de células em meio PDB (75 horas) a biomassa obtida foi filtrada e transferida para o biorreator. Em seguida, alíquotas de 5 mL foram retiradas a cada 24 horas do biorreator para a quantificação da biomassa.

Após determinar o momento da adição da cubebina, o pH foi ajustado para 6 com solução de NaOH (1M) e o processo de biotransformação foi monitorado pelo período de 20 dias. Para o monitoramento da conversão, alíquotas de 5 mL foram retiradas do biorreator de 48 em 48 horas sob as condições descritas nos itens **3.10.2** e **3.10.3**.

Durante o experimento em biorreator, foi mantido paralelamente um controle em *shaker* para comprovar que a concentração obtida do produto não era decorrente de oxidações provocadas pelo meio de cultura aquoso tampouco se tratava de um metabólito especial do fungo. Esse ensaio controle foi preparado frascos em duplicata contendo: (Fungo, meio de cultura e DMSO). Alíquotas aleatórias foram retiradas e analisadas por CLAE (**43.10.2** e **3.10.3.**).

3.10. Condições analíticas

3.10.1 Quantificação da biomassa

Para a quantificação da biomassa seca, um volume de 5 mL da amostra foi filtrado à vácuo utilizando papel de filtro previamente seco e pesado. A secagem completa do papel (com e sem células) foi feita em micro-ondas a uma potência de 180 W por 15 min. A diferença entre as massas correspondeu ao peso em massa de células retidas no papel de filtro.

Em suma, a razão entre a massa encontrada e o volume de amostra filtrado resultou a concentração celular total em gramas de massa seca por litro (g/L) (OLSSON; NIELSEN, 1997).

3.10.2. Quantificação da (-)- hinoquinina

Para o monitoramento analítico da bioconversão da CB em HQ, amostras de 1 mL foram coletadas e particionadas com 1 mL de acetato de etila (3x) numa extração consecutiva que originou no final uma fração orgânica de 3 mL. As frações orgânicas foram levadas á estufa para evaporação e em seguida foram ressuspensas com ACTN para análise por CLAE.

Para a quantificação da HQ foi construído uma curva de calibração com padrão autêntico de (-)- hinoquinina a partir de concentrações conhecidas. Preparou-se uma solução mãe na concentração de 200 mg/L e assim, foi feito a diluição para obter as seguintes concentrações: 160 mg/L; 120 mg/L; 80 mg/L e 40 mg/L. Obteve-se uma curva de calibração para quantificação dos processos em frascos agitados e outra curva nos processos em biorreator visto que, após as análises das amostras em frascos agitados sugeriu-se a mudança da condição analítica para uma melhor resolução dos picos de interesse nas análises do experimento em biorreator. As curvas de calibração foram obtidas através do software Excell®.

3.10.3. Análises por CLAE

As análises em CLAE foram realizadas nas seguintes condições: Cromatógrafo da marca SHIMADZU® com detector de arranjo de diodos modelo SPD-M10A, coluna Phenomenex® C18 de 250x460 mm de diâmetro. A fase móvel utilizada foi acetonitrila (Merck® LiChrosolv®) / H₂O + ácido acético 0,1%, na proporção 6: 4 de modo isocrático. O comprimento de onda foi analisado em 206 nm, vazão da fase móvel igual a 1 mL por minuto, volume de amostra injetado 20 µL e tempo de análise 20 minutos. Como mencionado acima, para uma melhor resolução dos picos de interesse nas análises do experimento em biorreator, a fase móvel foi ajustada para 7:3 acetonitrila (Merck® LiChrosolv®) / H₂O, ácido acético 0,1% em um comprimento de onda 235 nm. Todos os dados foram processados pelo software LC-Solution Multi-PDA.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

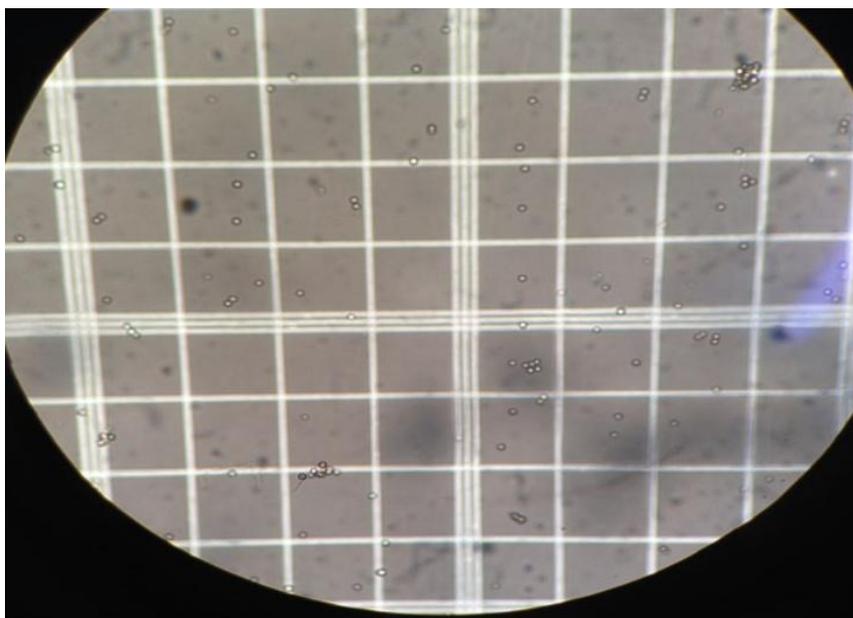
4.1. Estudos sobre as condições de cultivo

4.1.1. Padronização do inóculo

Através do cálculo da quantidade de conídios: (n° total de células contadas/ n° de quadrantes x fator de diluição x 10.000), obteve-se o valor de $4,8 \times 10^6$ conídios/ml.

A solução de conídios analisada demonstrou morfologia adequada, com células bem separadas e definidas (Figura 8).

Figura 8. Contagem dos esporos de *Aspergillus niger* em câmara de Neubauer

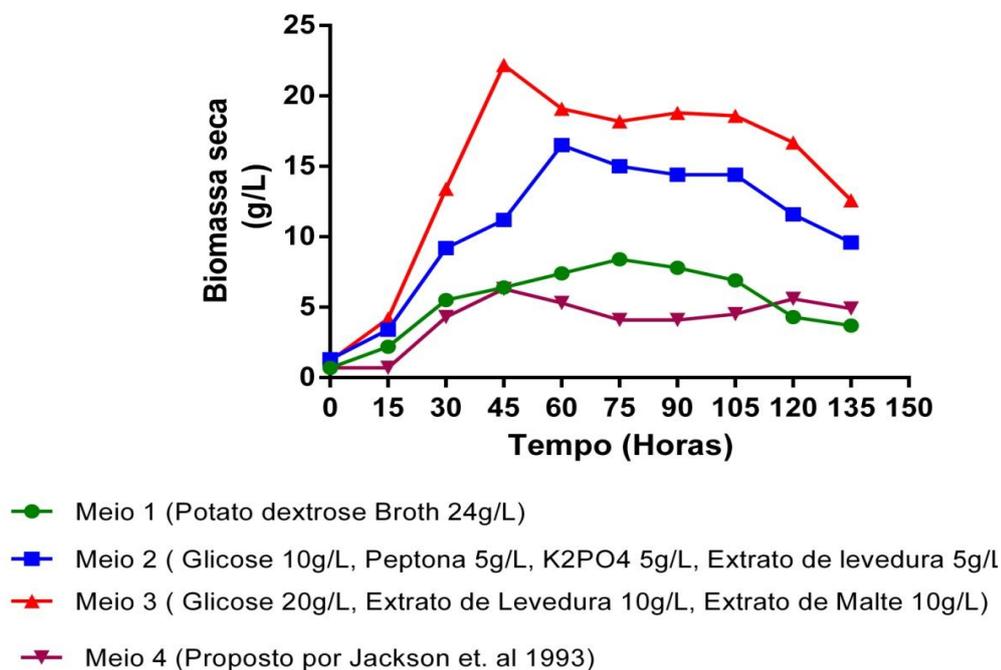


Fonte: Arquivo pessoal Daniele de S. Eugenio

4.1.2. Curvas de crescimento e avaliação dos parâmetros cinéticos do fungo *A. niger* nos meios de cultura testados.

Com os resultados obtidos, foi possível construir uma curva cinética de crescimento do fungo *Aspergillus niger* para cada meio testado. A **Figura 9** representa a quantidade (g/L) de biomassa obtida nos diferentes meios de cultura em função do tempo.

Figura 9. Cinética de crescimento do fungo *Aspergillus niger* em quatro meios de cultura diferentes.



O fungo cultivado no Meio 1 apresentou uma máxima concentração celular de 8,4 g/L em 75 horas, e foi observado que as células fúngicas cresceram livres (em suspensão), neste meio. A concentração de biomassa alcançada no Meio 2 foi de 16,5 g/L em 60 horas. Neste meio, observou-se que as células cresceram na forma de grumos (aderidas entre si). O Meio 3 apresentou uma máxima concentração celular de 22,2 g/L em 45 horas. Neste meio também foi observado células fúngicas que cresceram aderidas entre si. O meio 4 proposto por Jackson e colaboradores (1993) foi o mais instável nas medidas, provavelmente devido a seus componentes sólidos que não se dissolveram totalmente no meio.

As formas de crescimento morfológico em diferentes meios de cultura podem ter efeito considerável no desempenho do biorreator principalmente do tipo tanque agitado. Células em suspensão resultam melhor aproveitamento em relação à transferência de oxigênio, homogeneização e transporte de nutrientes (PAPAGIANNI; MOO-YOUNG, 2002). Produtos como ácido cítrico e as fermentações para obtenção de penicilina evidenciam a importância da morfologia para fungos filamentosos manipulados em biorreator para alcançar o desempenho máximo na obtenção destes compostos (PAPAGIANNI et. al., 1998; JUSTEN et. al., 1998).

Do ponto de vista de produção industrial em biorreatores, os meios 2 e 3 não se mostraram adequados, uma vez que pode-se observar um caldo viscoso com formação de micélio denso. Desta maneira, com base nos meios de culturas testados, o meio PDB é o mais indicado, pois favoreceu o crescimento de células em suspensão, fator importante nos ensaios em biorreator.

4.2. Curva de Calibração para quantificação de (-)- hinoquinina

A partir da média das áreas obtidas nos cromatogramas para cada concentração de (-)- hinoquinina, foi possível a construção das curvas de calibração dos experimentos em frascos (**Figura 10**) e nos experimentos em biorreator (**Figura 11**) o que possibilitou também a obtenção da equação da reta e o valor do coeficiente de correlação linear(r).

Figura 10. Curva de calibração construída para quantificação de (-)- hinoquinina

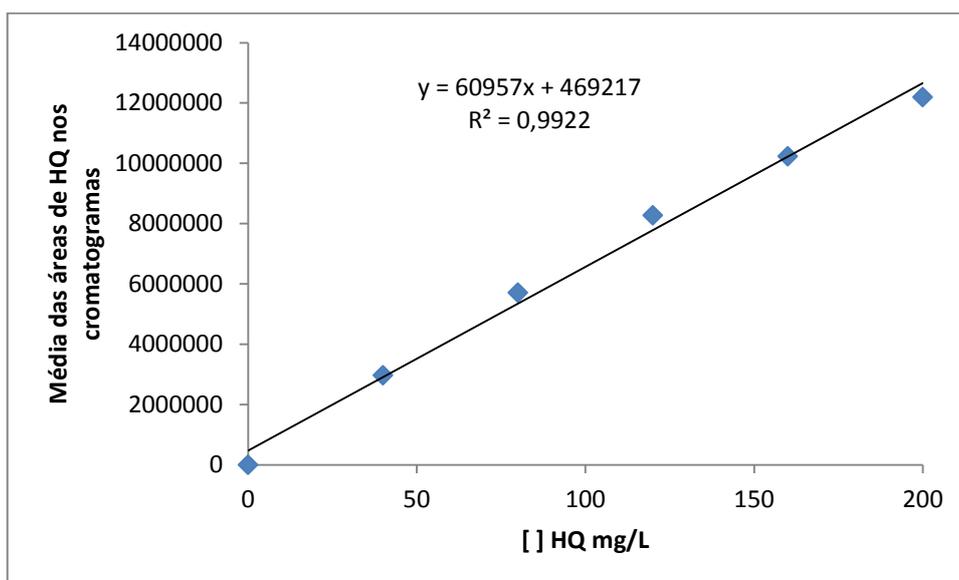
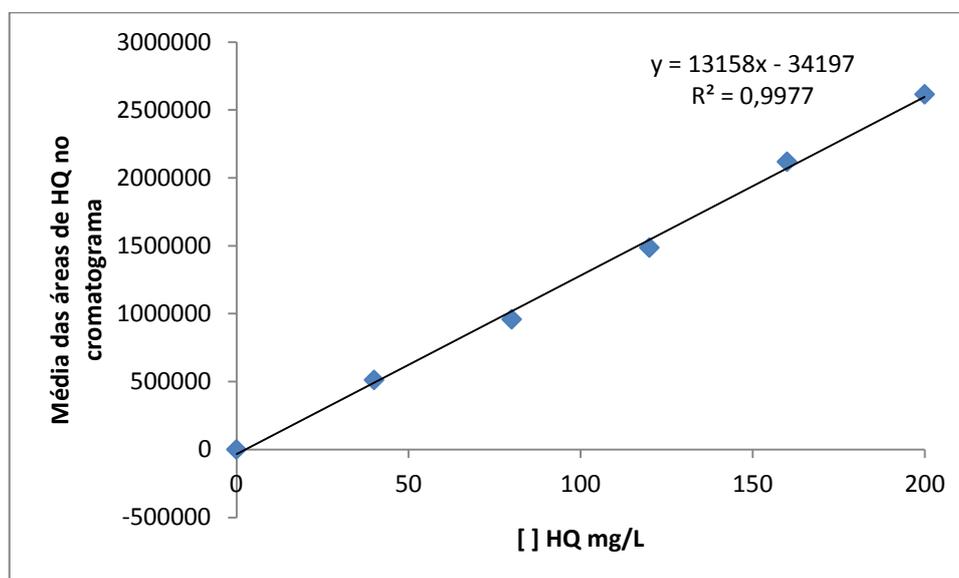


Figura 11 . Curva de calibração construída para quantificação de (-)- hinoquinina



4.3. Ensaios de toxicidade da (-)- cubebina ao fungo *A.niger*

4.3.1 Ensaios de toxicidade em placa

Após o período de incubação da placa, observou-se que nos poços onde se testou a esterilidade da droga (meio de cultura e droga), não houve crescimento microbiano e no controle de crescimento (meio de cultura e fungo) observou-se a presença de colônias do fungo confirmando, portanto, que os controles utilizados apresentaram-se positivos para este teste. Nos poços contendo a (-)-cubebina e o fungo *A. niger* nas faixas de concentrações utilizadas (1,95 µg/mL a 1000 µg/mL) não houve inibição do crescimento fúngico em todos os poços analisados em comparação com os controles. A inibição também não foi observada quando as soluções dos poços foram plaqueadas, indicando que a (-)-cubebina não é tóxica ao *A. niger* nas concentrações testadas. Sendo assim, pode ser usada nas faixas de concentração analisadas.

4.3.2. Ensaio de toxicidade em frascos agitados

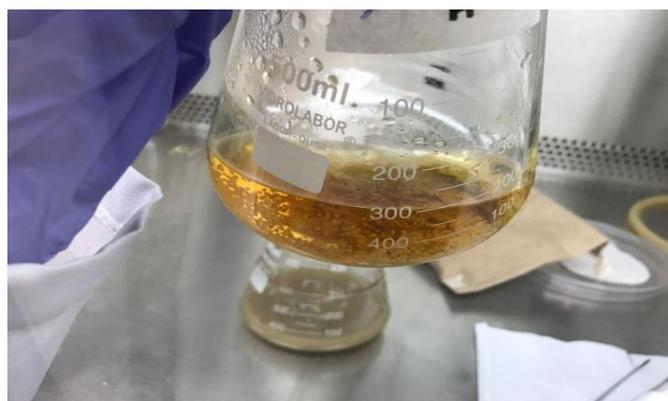
Neste ensaio, observou-se de forma qualitativa que a cultura de *A. niger* quando inoculada juntamente com a CB, a massa micelial do fungo se desenvolveu normalmente. Porém, apresentou morfologia diferente de quando o fungo é inoculado somente no meio PDB para obtenção da massa micelial. As **Figuras 12 e 13** demonstram essa diferença.

Figura 12. *A.niger* cultivados em PDB juntamente com a (-)-cubebina



Fonte: Arquivo pessoal Daniele de S. Eugenio

Figura 13. *A. niger* cultivado em meio PDB



Fonte: Arquivo pessoal Daniele de S. Eugenio

Alguns autores relatam que a atividade das enzimas utilizadas para a biossíntese de metabólitos secundários, assim como para a realização dos processos de biotransformação, podem ser amplificadas durante fase estacionária de crescimento (FINKELSTEIN & BALL, 1992). Para avaliar se a transformação da CB também só ocorreria nesta fase de crescimento, foi realizado experimento e a adição do composto foi feita no mesmo momento da inoculação do fungo, baseados na metodologia utilizada na bioconversão da artemisinina em 5-hidroartemisinina por *Euroditium amstelodami* e *Aspergillus niger* (PARSHIKOV et al., 2006). Os resultados indicam, como pode-se observar através da **Figura 13**, que a adição da CB no início do processo favoreceu o crescimento das células

aderidas entre em si em todas as concentrações de CB adicionadas. Ou seja, este método não favoreceu o crescimento de células em suspensão.

Apesar deste fato, observou-se neste ensaio que as amostras quando comparadas ao padrão de HQ (**Figura 14**) demonstraram que, a partir de 6 dias de incubação, houve a produção desta substância reportando a capacidade de biotransformação da linhagem adquirida neste trabalho. Além disso, demonstra que o meio PDB é adequado para bioconverter CB em HQ.

As **Figuras 15, 16, 17, 18 e 19** apresentam os cromatogramas obtidos após 6 dias de incubação nas concentrações 200, 400, 600, 800 e 1000 mg/L respectivamente.

Figura 14. Cromatograma do Padrão autêntico de (-)- Hinoquinina

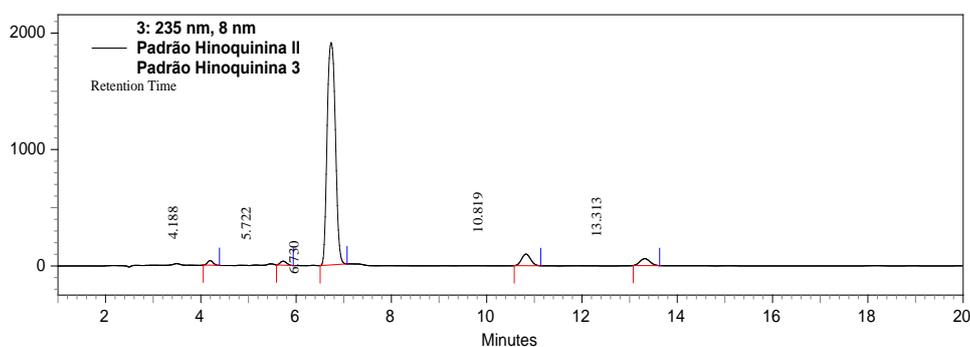


Figura 15. Cromatograma do 6º dia de biotransformação na concentração de 200 mg/L de (-)-cubebina

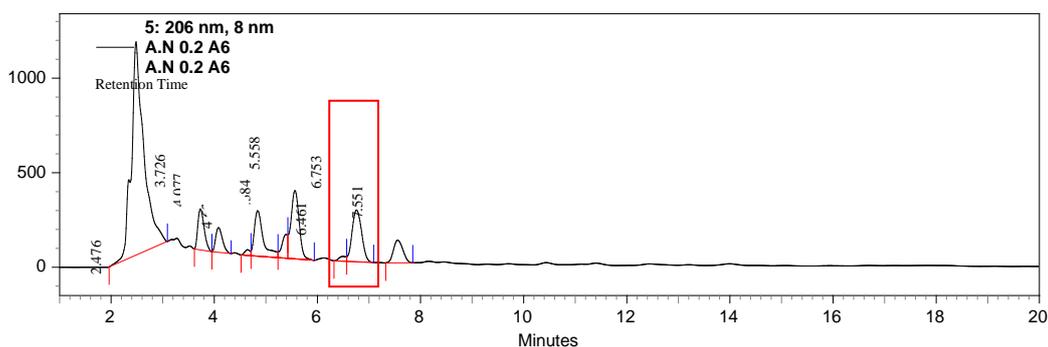


Figura 16. Cromatograma do 6º dia de incubação na concentração de 400 mg/L de (-)-cubebina

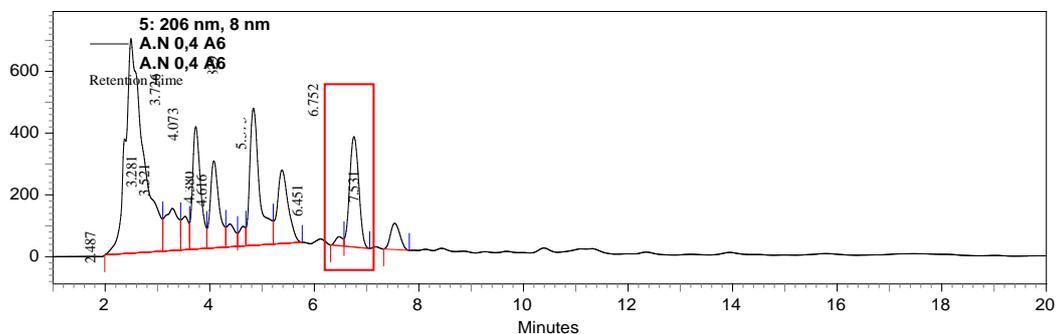


Figura 17. Cromatograma do 6º dia de incubação na concentração de 600 mg/L de (-)-cubebina

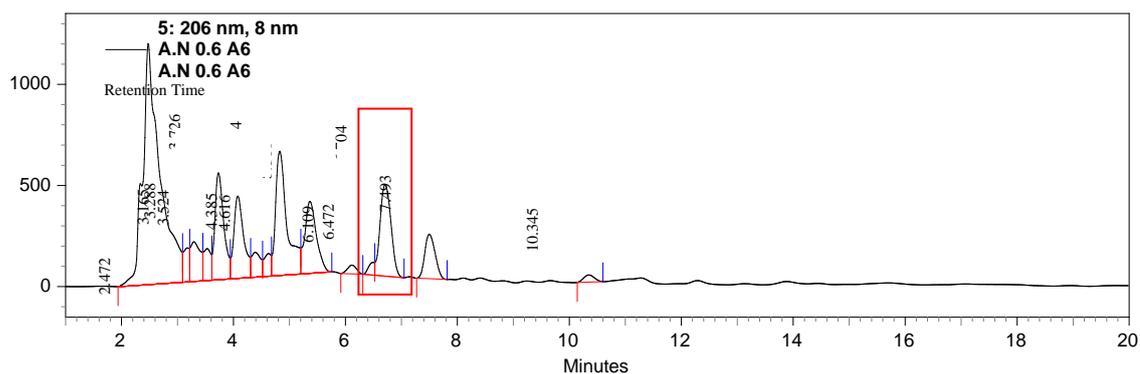


Figura 18. Cromatograma do 6º dia de biotransformação na concentração de 800 mg/L de (-)-cubebina

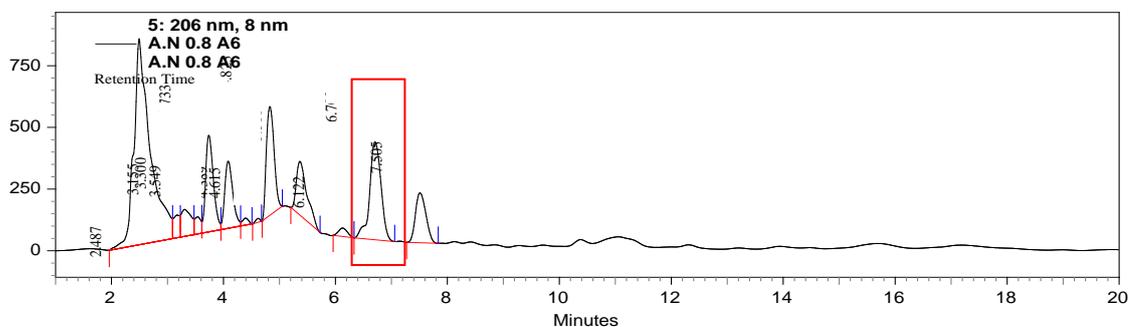
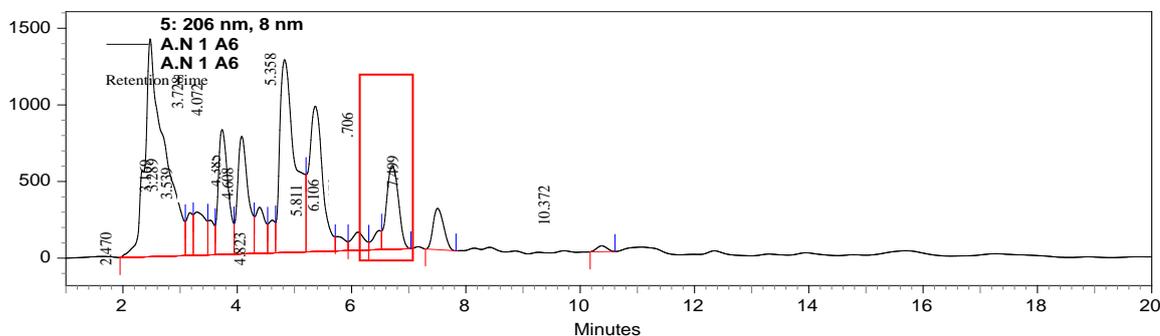
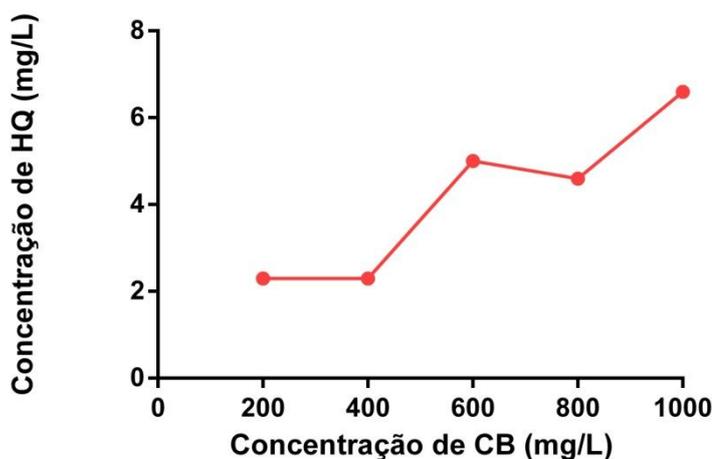


Figura 19. Cromatograma do 6º dia de incubação na concentração de 1000 mg/L de (-)-cubebina



De acordo com cromatogramas obtidos, construiu-se um gráfico (**Figura 20**) onde pode-se observar que quanto maior a concentração de CB adicionada, maior a concentração de HQ.

Figura 20. Gráfico da concentração de HQ obtida a partir de diferentes concentrações de HQ adicionadas após 6 dias de incubação.



A quantidade disponível de (-)- cubebina para realização deste trabalho era limitada, sendo assim optou-se pela utilização da concentração de 200 mg/L nos processos seguintes. Ressalta-se que havendo disponibilidade para uma possível continuação deste trabalho, seria de extrema importância utilizar concentrações maiores de CB a fim de obter maior rendimento de HQ de acordo com os resultados obtidos neste experimento.

4.4. Reações de Biotransformação testando diferentes condições

Através dos resultados das análises por CLAE foi possível observar a formação de HQ nos seguintes cultivos: CB adicionada na fase estacionária do fungo (Condição 1) e, biomassa transferida para meio Czapek Dox (Condição 4). Não houve produção de HQ nas condições 2 e 3 as quais a CB havia sido adicionada somente no meio fermentado. Este fato pode indicar que a conversão não ocorre por enzimas produzidas pelo fungo *A. niger* de forma extracelular, uma vez que mesmo após alcançar sua máxima produção de células e passar por condições de estresse, não foi observada a produção de HQ no meio sem as células fúngicas.

No cultivo onde a CB foi adicionada na fase estacionária do fungo (Condição 1), foi observada a presença de HQ somente no 14º e 16º dia, conforme mostrado nas **Figuras 19 e 20**. Considerando que a ultima alíquota que foi possível ser analisada em CLAE para esta condição foi a do 16º dia, foi calculado a produtividade máxima de HQ obtida que gerou um valor de 0,07 mg.L/dia através do cálculo descrito no item **3.3.3**.

Figura 21: Cromatograma do 14º dia do processo em que a cubebina foi adicionada na fase estacionária do fungo *A.niger*

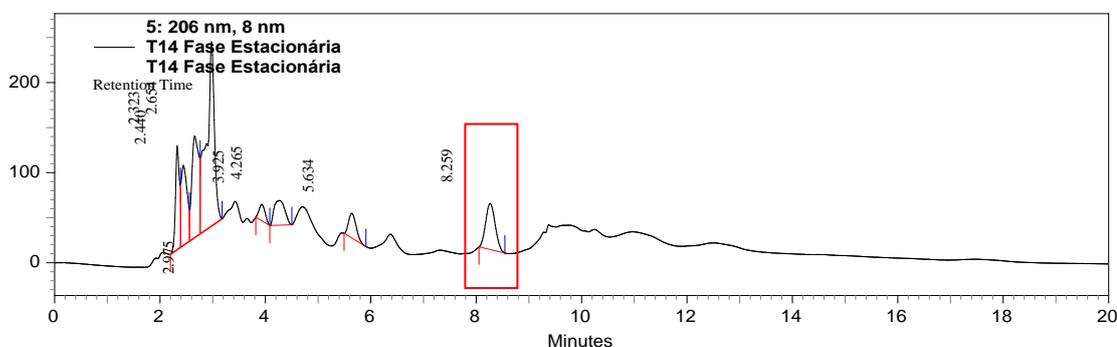
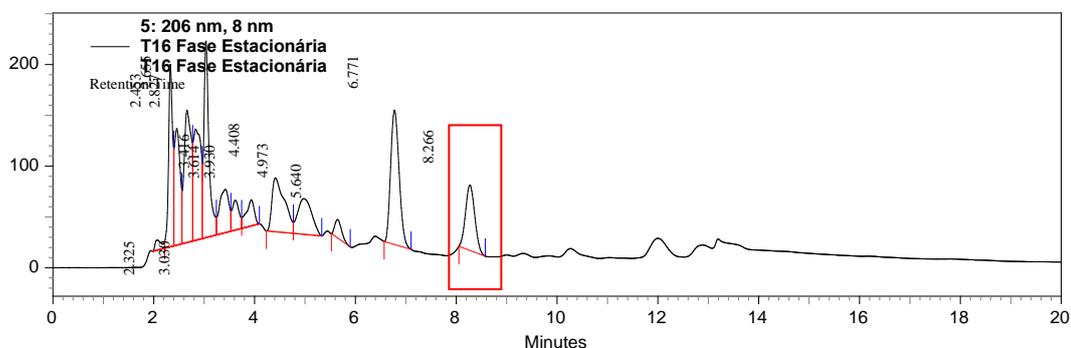


Figura 22: Cromatograma do 16º dia do processo em que a cubebina foi adicionada na fase estacionária do fungo *A.niger*



Os cromatogramas obtidos do processo em que a CB foi adicionada no meio Czapek Dox na presença das células (Condição 4) são mostrados nas **Figuras ,24,25,26,27 e 28**. Pode-se observar que somente a partir do 8º dia de incubação nota-se a presença de HQ (8.2 min). Não foi possível a análise da alíquota do 16º dia, visto que ao verificá-la em CLAE ocorreu falha impossibilitando a obtenção do cromatograma. A **Figura 23** representa o tempo zero onde apenas havia a presença de (-)- cubebina, observa-se que esta apresenta dois picos no cromatograma o que se deve a epimerização que ocorre naturalmente com essa substância (PASCOLI, 2006).

Figura 23. Cromatograma do Tempo zero da biotransformação em Meio Czapek Dox

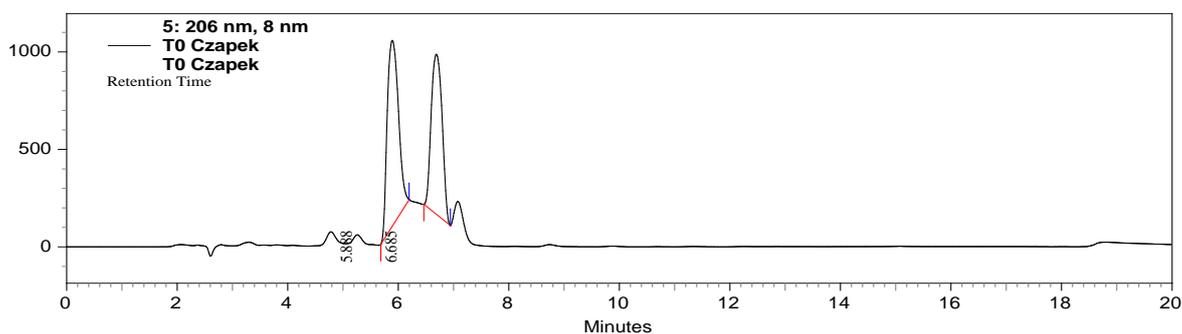


Figura 24. Cromatograma do 8º dia de biotransformação em Meio Czapek Dox

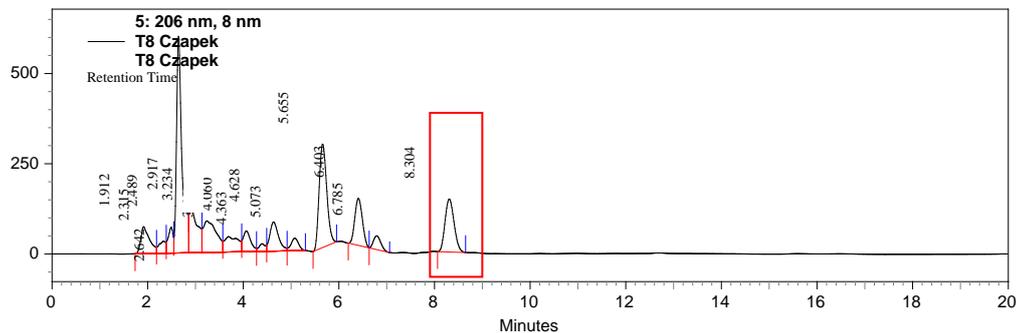


Figura 25. Cromatograma do 12º dia de biotransformação em Meio Czapek Dox

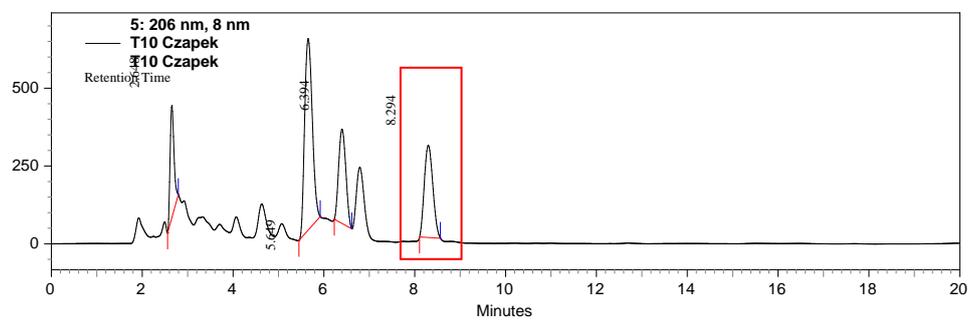


Figura 26. Cromatograma do 12º dia de biotransformação em Meio Czapek Dox

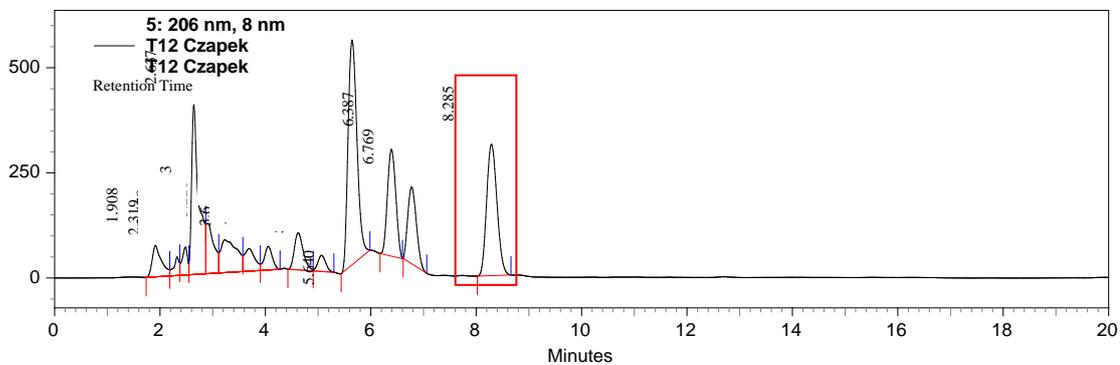
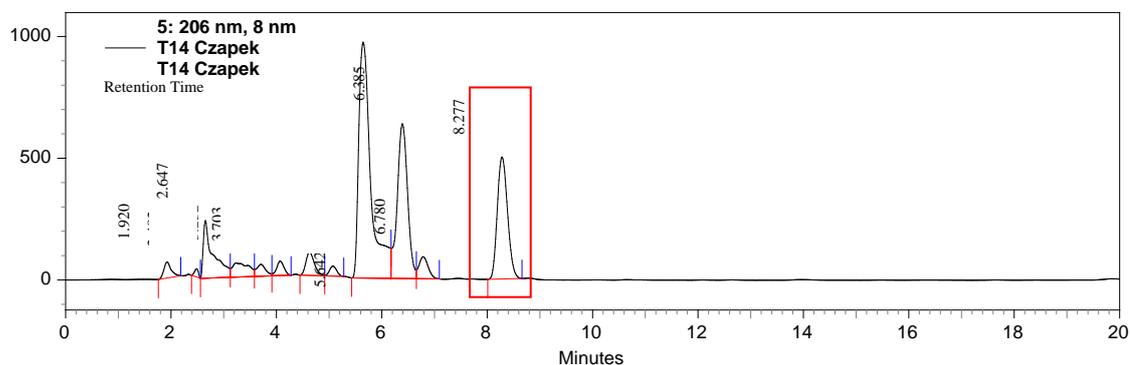
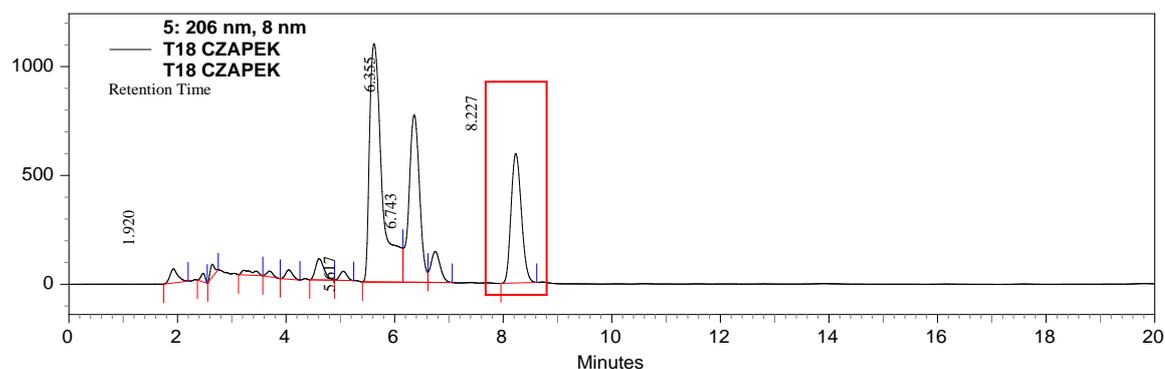


Figura 27. Cromatograma do 14º dia de biotransformação em Meio Czapek Dox**Figura 28.** Cromatograma do extrato bruto do 18º dia de biotransformação em Meio Czapek Dox

Através dos cromatogramas obtidos, foi possível a quantificação da HQ durante os dias de incubação do fungo *A.niger* em meio Czapek Dox. A **Tabela 3** demonstra os resultados obtidos da concentração de HQ a partir do 8º dia de biotransformação.

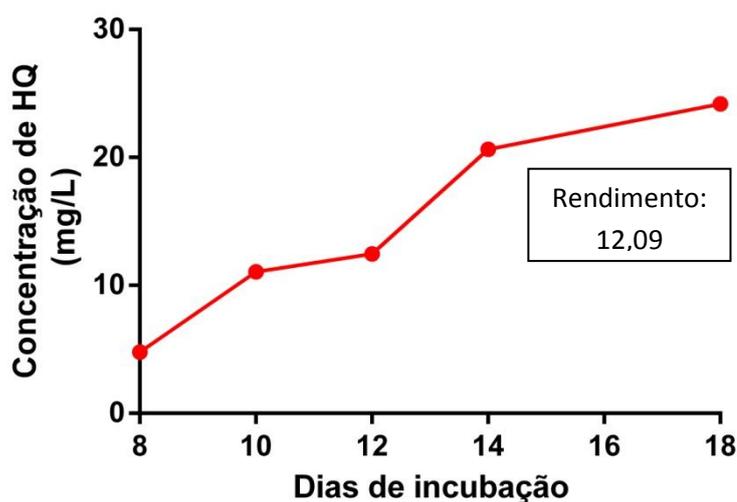
Tabela 3. Quantificação da HQ e cálculo de rendimento ao longo do tempo de transformação, em meio Czapek Dox.

Tempo de biotransformação (dias)	[] de (-)- hinoquinina (mg/L)	Rendimento (%)
8	4,78	2,39
10	11,06	5,53
12	12,47	6,23
14	20,64	10,32
18	24,19	12,09

A partir da concentração de HQ obtida nos dias de biotransformação, foi possível também calcular o grau de conversão através do cálculo descrito no item 3.3.1.

Considerando que, a concentração obtida de HQ no 18º dia foi de 24,19 mg/L e quantidade de CB adicionada foi de 200 mg/L o rendimento desta conversão em frascos foi de: 12,09 %. De acordo com o cálculo descrito no item 3.3.2., a produtividade máxima foi calculada (18º dia), obtendo-se um valor de 1,34 mg.L/dia de HQ. A **Figura 29** apresenta o gráfico da concentração de HQ em função do tempo e o rendimento obtido no ultimo dia de biotransformação.

Figura 29. Gráfico da concentração de (-)-hinoquinina em função do tempo obtida de biotransformação em frascos.



O cultivo no qual a biomassa foi transferida para o meio Czapek Dox tornou-se mais interessante, visto que nesta condição a produtividade de HQ foi maior quando comparada a Condição 1. O meio Czapek Dox utilizado nesta biotransformação foi inicialmente proposto por Friedrich Johann Franz Czapek e é composto dos sais orgânicos: 0,1% de K_2HPO_4 , 0,05 % de $MgSO_4$, 0,05 % de KCl e 0,001 % de $FeSO_4$ e sacarose. Além disso, Arthur Wayland Dox propôs a adição de Nitrato de sódio (0,2% de $NaNO_3$) fornecendo uma fonte de nitrogênio orgânico.

A literatura relata o uso deste meio em diversas reações de biotransformação como a conversão da sacarose em 5-hidroxi-2-hidroximetil-y -pirona por *Aspergillus flavus* (FERREIRA et al., 2010), a biotransformação do ent-8(14),15-pimaradieno para obtenção

de 5 novos diterpenos através fungo *Aspergillus ochraceus* (PORTO et al., 2013) e na biotransformação do ácido ent-pimaradienoico por *Aspergillus niger* (SEVERIANO et al., 2013). Nestes dois últimos casos, o processo de biotransformação foi realizado em dois estágios, no qual o primeiro estágio se designou à produção biomassa utilizando meios de cultura rico em nutrientes, e o segundo a síntese efetiva de novas moléculas utilizando o meio Czapek Dox.

Essa metodologia combinada aos processos de otimização proposto para este trabalho, como a realização de um delineamento experimental e a biotransformação em biorreator, pode se tornar interessante para obtenção da HQ visando alto rendimento.

4.5. Delineamento Experimental

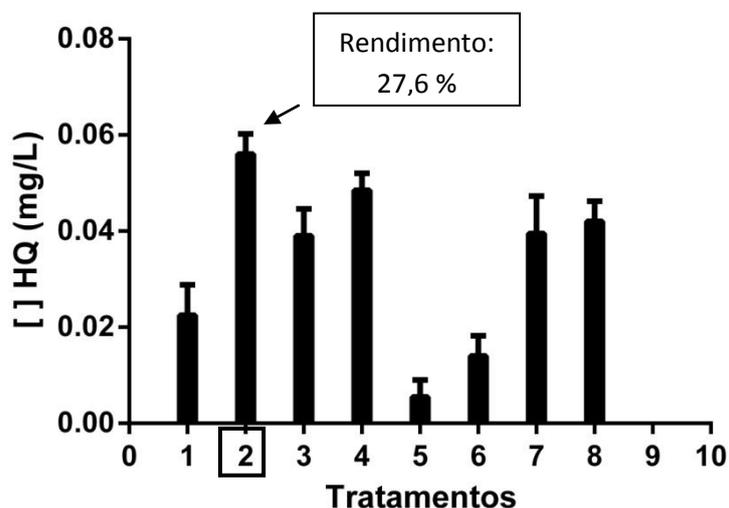
Os resultados deste experimento estão apresentados na **Tabela 4**, que demonstra a quantidade de HQ (mg/L) e o rendimento que foi obtido de acordo com os tratamentos propostos:

Tabela 4. Resultados obtidos do delineamento experimental no meio Czapek Dox

Tratamentos	pH	[] Sacarose	[] (-)-cubebina mg/L	[] (-)-hinoquinina mg/L	Rendimento (%)
1	6	10	100	21	10,7
2	6	10	200	55	27,6
3	6	30	100	38	19,1
4	6	30	200	47	23,7
5	8	10	100	5	2,6
6	8	10	200	13	6,7
7	8	30	100	39	19,4
8	8	30	200	40	20,1

A **Figura 30** representa de uma maneira mais clara o gráfico das concentrações de HQ obtidas para cada tratamento proposto:

Figura 30. Gráfico da concentração de HQ de acordo com cada tratamento do delineamento experimental



Pode se observar que no tratamento 2 no qual o pH foi ajustado para 6, a concentração de sacarose 10 g/L e a concentração de CB 200 mg/L, foi obtido uma concentração de 56mg/L de HQ com um rendimento de 27,6%. O rendimento obtido foi maior quando comparado ao processo anteriormente realizado em frascos onde a concentração de sacarose do meio Czapek Dox foi 30 g/L e pH 7,3 no qual foi de 12,09%. Quando realizado o teste ANOVA no software Statistica obteve-se os seguintes resultados:

Tabela 5: Efeitos das variáveis obtidos através da análise do delineamento experimental

	MS	p value
(1) pH	1056,250	0,0002
(2) []S	1260,250	0,0001
(3) [] CB	729,000	0,0008
1 by 2	702,250	0,0009
1 by 3	256,000	0,0145
2 by 3	225,000	0,0195
1*2*3	81,000	0,1185

Na **Tabela 5**, a coluna (MS) apresenta os quadrados médios sequenciais que medem o quanto a variação de um termo ou de um modelo explica, sendo possível concluir que há uma associação estatisticamente significativa entre as variáveis. Analisando as variáveis isoladamente, podemos observar que a maior interação observada foi a concentração de Sacarose ([] S) com um valor de 1260,250 seguido do pH e da [] de (-) cubebina ([] CB). Em relação à análise entre uma variável com a outra, pode-se observar que, a interação mais significativa foi entre as variáveis pH e [] S (1 by 2) com um valor MS de 702,250.

As influências entre as variáveis foram analisadas separadamente. Nas **Figuras 31 e 32** estão apresentadas respectivamente a superfície de resposta e a superfície de contorno das variáveis que tiveram mais influência neste ensaio que são: [] Sacarose no meio e o pH. As legendas no canto direito do gráfico 3D representam a máxima concentração de HQ ($\mu\text{g/mL}$) que pode ser obtida de acordo com cada situação proposta.

Figura 31: Superfície de resposta da [] de HQ em $\mu\text{g/mL}$ a partir da [] de Sacarose no meio Czapek Dox e pH

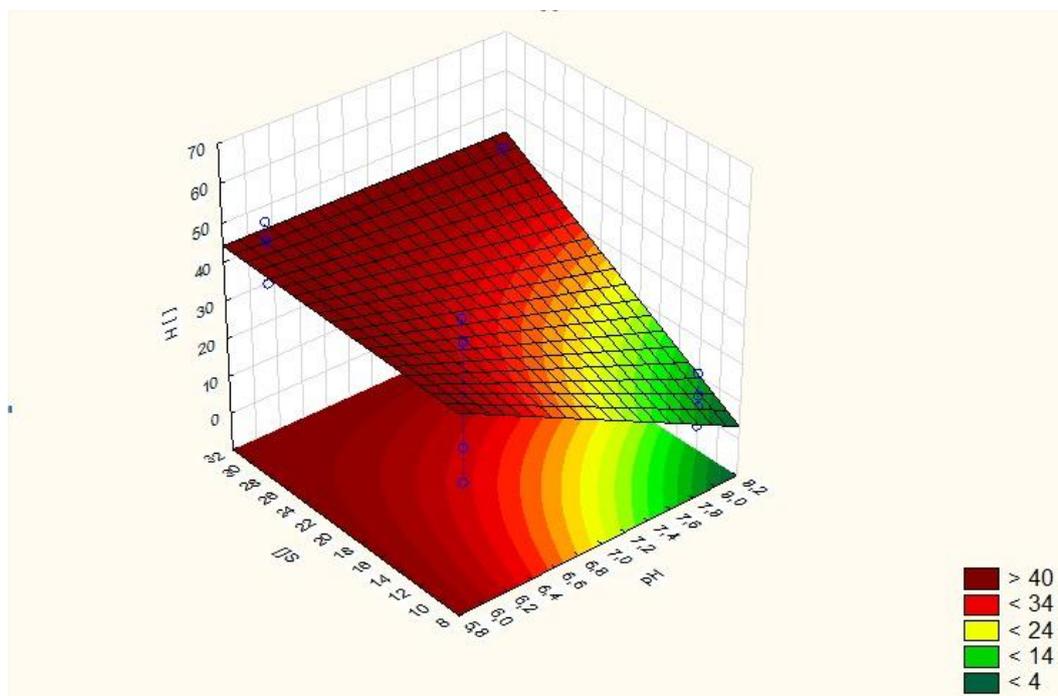
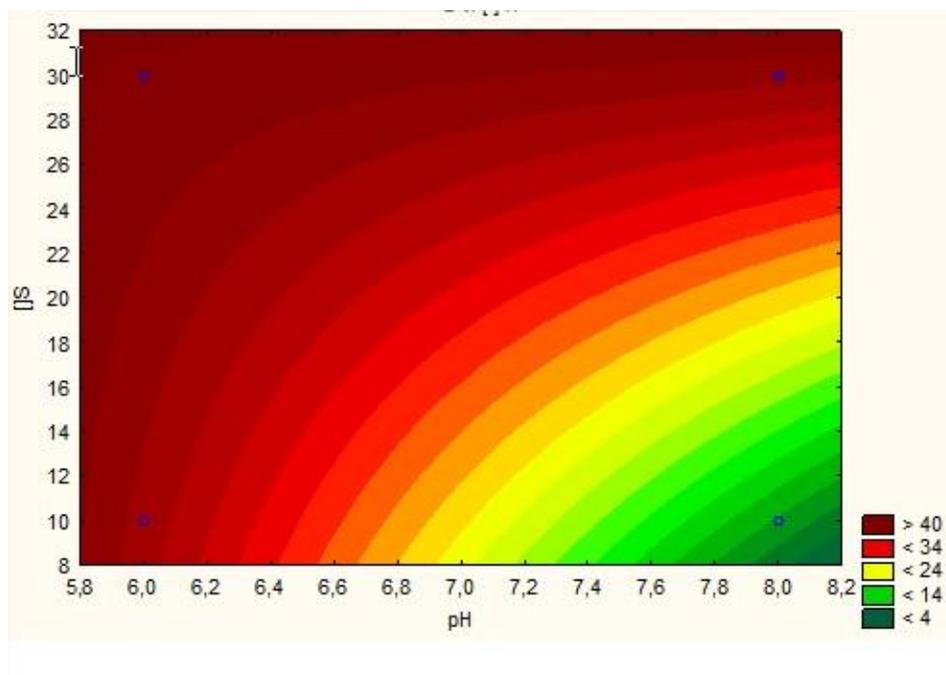


Figura 32: Superfície de contorno representando a [] de HQ em $\mu\text{g/mL}$ a partir da [] de Sacarose no meio Czapek Dox e pH.

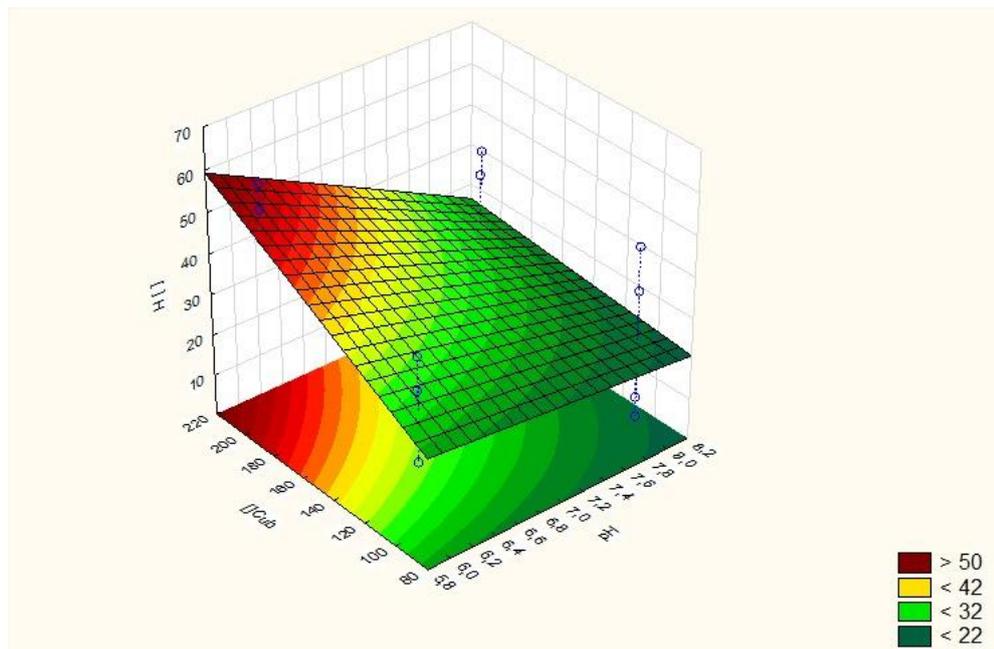


Apesar da quantificação, ter indicado que a condição 2 onde se utilizou 10 g/L de Sacarose foi a que produziu uma maior concentração de HQ, o tratamento estatístico que analisou a influências das variáveis testadas apontou que, quanto maior a concentração de sacarose no meio, ou seja no seu nível máximo que foi testado (30 g/L) maior a concentração de HQ obtida, como pode ser observado nas **Figuras 31 e 32**. O pH 6 ótimo se manteve tanto na concentração de 10 g/L quanto na de 30 g/L de sacarose.

Os resultados obtidos no ensaio com 10 g/L de sacarose, apesar de não ser o ponto ótimo, se encontra nas faixas de concentração máxima para obtenção de HQ (partes mais escuras da superfície do gráfico).

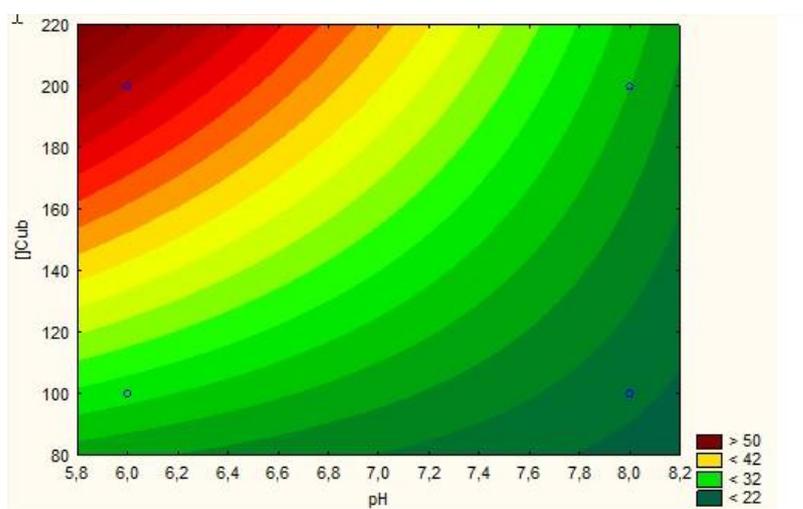
Foi analisado também a influência das variáveis [] CB e pH. De acordo com a Tabela 5, a influência entre essas duas variáveis foi relativamente baixa. A **Figura 33** representa esta interação.

Figura 33: Superfície de resposta da [] de HQ em $\mu\text{g/mL}$ a partir da [] de CB e pH



Como pode se observar, quanto maior a concentração de CB adicionada maior a concentração de HQ obtida. Isto já era esperado visto que, maiores concentrações de substrato, consequentemente haverá maiores concentrações de produto (desde que não haja inibição). Analisando as interações das duas variáveis, a concentração de CB interfere mais no processo que o pH. Isto pode ser melhor visualizado na superfície de contorno apresentada na **Figura 34**.

Figura 34: Superfície de contorno representando a [] de HQ mg/L a partir da [] de CB e pH.



As variáveis [] de CB e [] de Sacarose no meio foram, de acordo com a **Tabela 5** as variáveis que tiveram menor influência uma com a outra. As **Figuras 35 e 36** apresentam a superfície de resposta e a superfície de contorno no estudo destas duas variáveis. Assim como demonstrado nos gráficos acima, concentrações maiores de CB e concentrações maiores de Sacarose geram maiores concentrações de HQ.

Figura 35: Superfície de resposta da [] de HQ em mg/L a partir da [] de CB e [] Sacarose no meio Czapek Dox

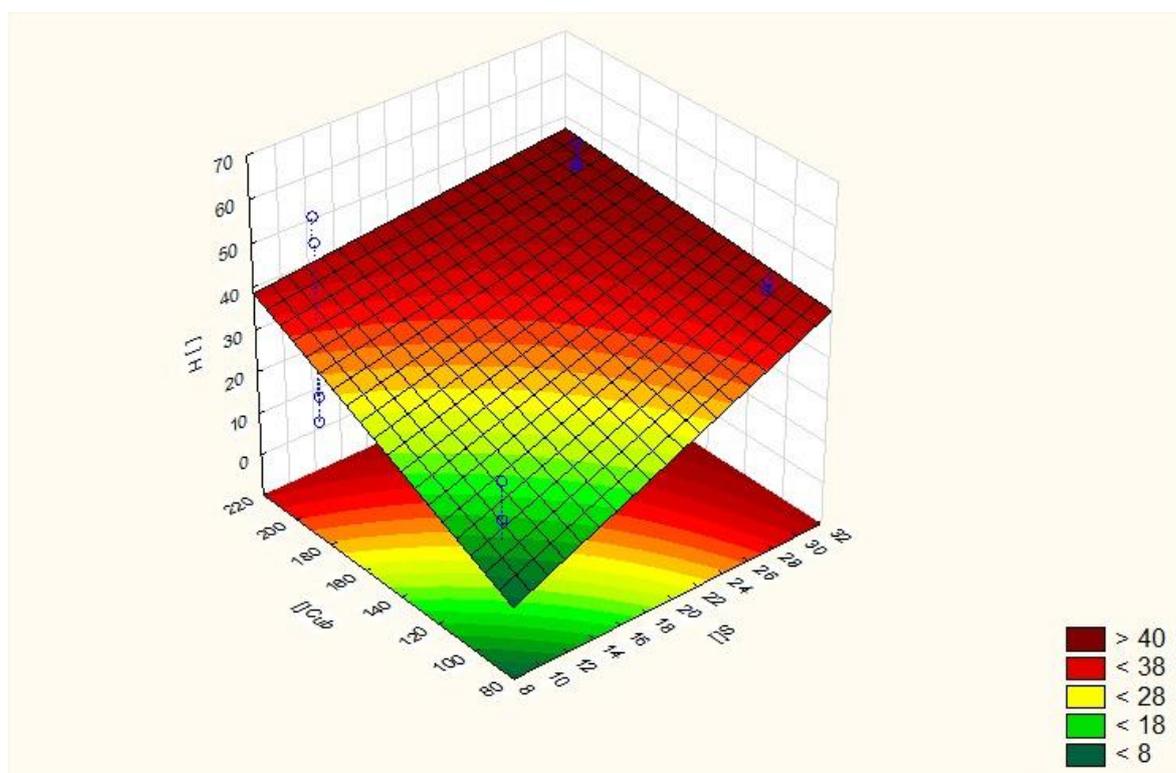
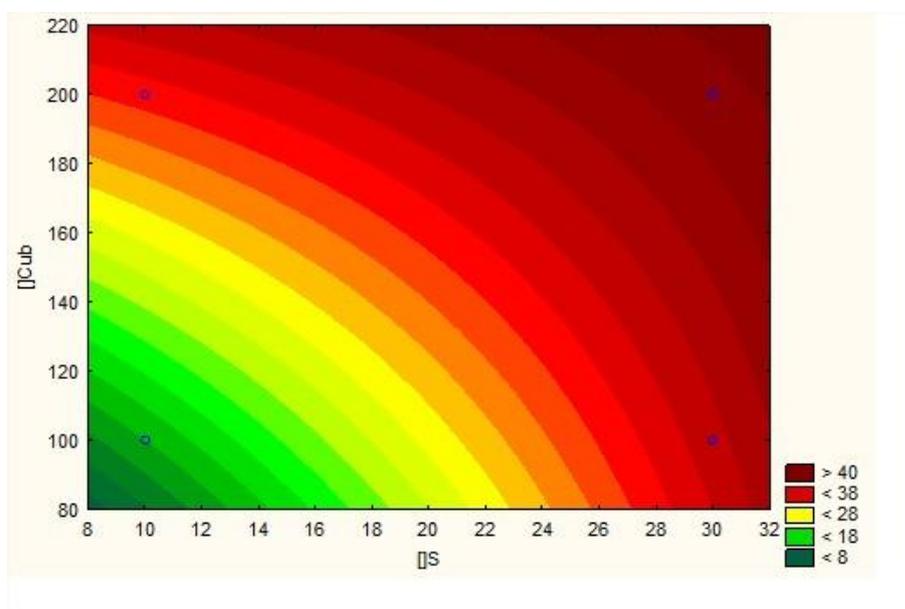


Figura 36: Superfície de contorno representando a [] de HQ em mg/L a partir da [] de CB e [] Sacarose no meio Czapek Dox.



A partir das superfícies de resposta e de contorno apresentadas nas **Figuras 31 a 36**, fica mais claro perceber que a [] de sacarose é a variável que mais influencia no processo de obtenção da HQ. E como pode ser observado, a condição ótima dentre os intervalos testados seria a utilização de 30g/L de sacarose, pH 6, [] de CB 200 mg/L.

Devido ao tempo limitado para os ensaios em biorreator na realização deste trabalho a condição 2 onde a concentração de sacarose foi de 10 g/L , pH 6, [] de CB 200 mg/L foi a que foi reproduzida baseando nos resultados da quantificação visto que, software para o tratamento estatístico não estava disponível no momento das análises dos resultados do delineamento experimental. Ainda nesta condição o rendimento obtido foi muito maior que o já obtido na literatura. Considerando, que há a possibilidade de reproduzir em biorreator nas condições ótimas analisadas, o rendimento pode ser tornar ainda mais promissor.

Os fatores avaliados neste delineamento (pH, [] sacarose, [] substrato) podem influenciar a capacidade de conversão da (-)- cubebina em (-)- hinoquinina .

O pH é um parâmetro importante para o crescimento e metabolismo de microrganismos. Este fator pode afetar o consumo de nutrientes, a morfologia celular e até

mesmo a atividade enzimática que é de extrema importância durante o processo de biotransformação (ZHU; NI; HUANG, 2010).

CHATTERJEE; BHATTACHARYYA (2001) relatam em seu estudo como a biotransformação do (-)- limoneno por *Pseudomonas putida* para obtenção de vários derivados pode ser influenciada, pelo pH, onde faixas entre 3,0 e 7,0 foram analisadas e os resultados demonstraram em que o microrganismo possuiu uma atividade ótima no pH 5. Ainda neste estudo, avaliou-se a concentração do substrato na biotransformação, onde pode-se verificar que linhagem é resistente a uma concentração de limoneno de 0,2% (v/v), sendo que na concentração de 0,5% (v/v) os rendimentos sofreram uma redução significativa.

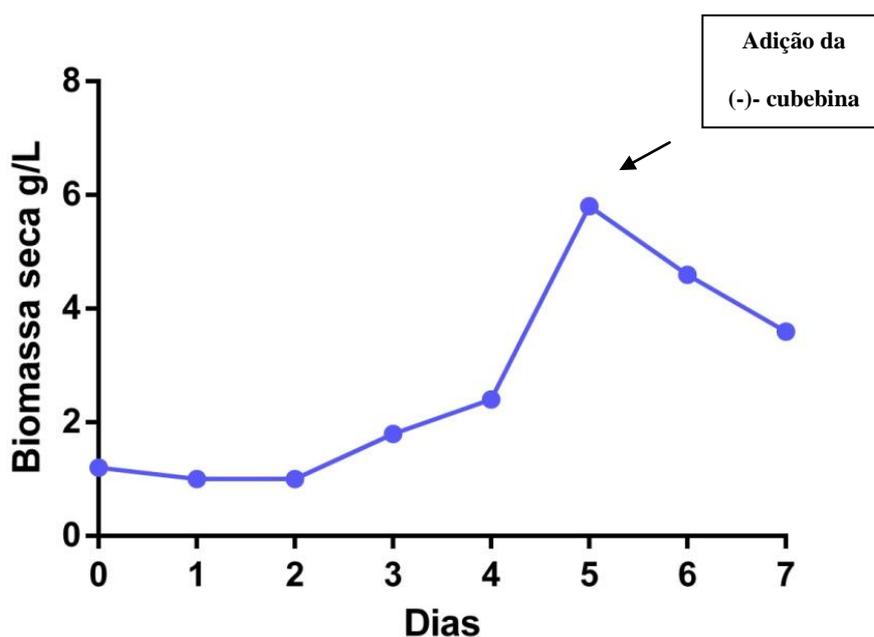
A composição do meio também geralmente exibe um importante papel nos processos de biotransformação, sendo um dos principais fatores responsáveis por alterações no rendimento. BICAS, et al. (2008) relatou em seu estudo da otimização da produção de *R* - (+) - α -terpineol pela biotransformação do *R* - (+) - limoneno que a utilização de fontes de carbono como extrato de levedura (rico em nutrientes) apresentou efeito negativo dificultando o processo de biotransformação para obtenção do produto desejado. Sendo assim, em alguns casos, grandes quantidades de fonte carbono podem influenciar nos processos visto que desta forma o microrganismo se encontra em uma situação ideal com nutrientes, retardando então o estresse metabólico e conseqüentemente, o processo de conversão. Porém, quando se trata de reações como a desidrogenação, a quantidade de glicose pode ter influência contrária a demonstrada no trabalho citado acima, pois em concentrações mais baixas, a atividade da desidrogenase pode ser baixa. Sallam et. al, (1995), demonstra em seu trabalho com biotransformações de esteróides que a melhor concentração de glicose para a ocorrência de desidrogenação na estrutura da 19-Nortestosterona foi de 10 g/L . Em concentrações baixas de glicose, menor quantidade dos estrogênios foram produzidos. Este fato pode ser comparado aos resultados obtidos neste trabalho, onde maiores concentrações de sacarose adicionadas no meio Czapek Dox apresentou maiores quantidades de HQ.

Com os resultados obtidos no delineamento experimental, mais especificamente a quantificação, reproduziu-se em biorreator, as condições do tratamento 2 (pH 6; [] sacarose 10 g/L ; [] (-)- cubebina 200 mg/L).

4.6. Produção da (-)- hinoquinina em biorreator

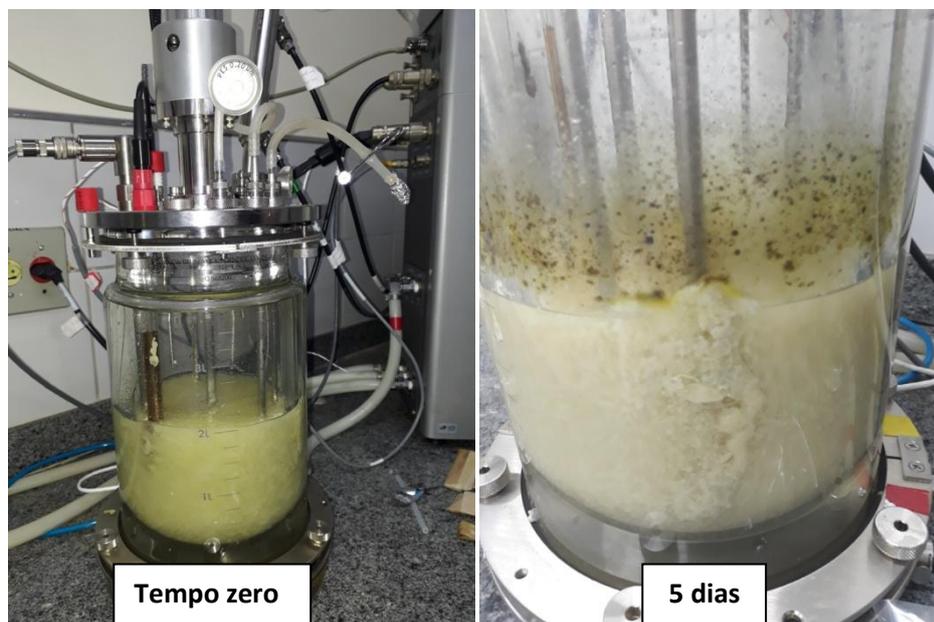
A cinética de crescimento do fungo *A.niger* no meio Czapek Dox modificado (selecionado como meio de biotransformação) foi construída, conforme **Figura 37**.

Figura 37. Gráfico da concentração de Biomassa ao longo do tempo no biorreator



Notou-se que mesmo limitando a fonte de carbono (sacarose) no meio, o fungo cresceu consideravelmente sendo que a concentração máxima de células obtida foi de 5,8g/L no 5º dia de incubação. Neste período, notou-se a dificuldade de homogeneização do meio de cultura no biorreator devido a grande quantidade de células presente, o que pode ter dificultado a retirada da alíquota para quantificação da biomassa que provavelmente estaria maior que 5,8 g/L. Neste momento, adicionou-se a CB uma vez que neste dia o fungo alcançou uma densidade celular alta e possivelmente nesta fase já se encontrava em uma situação de estresse, isto ficou claro na **Figura 38** onde se demonstra a diferença morfológica desde o momento da transferência das células crescidas em *shaker* (tempo zero) e após 5 dias de incubação.

Figura 38. *Aspergillus niger* em meio Czapek Dox modificado no tempo zero e após 5 dias de incubação



Fonte: Arquivo pessoal Daniele de S. Eugenio

O monitoramento da bioconversão foi realizado a partir do momento em que a CB foi adicionada. Observou-se que no 4º dia de biotransformação houve a presença do composto desejado e, após o 12º dia a CB já não estava mais presente no extrato, isto pode ser observado claramente nas **Figuras 42 a 50**.

Devido a mudança da condição analítica em CLAE para este experimento os tempos de retenção da CB e HQ mudaram (**Figuras 39 e 40** respectivamente).

Figura 39. Cromatograma do padrão de CB

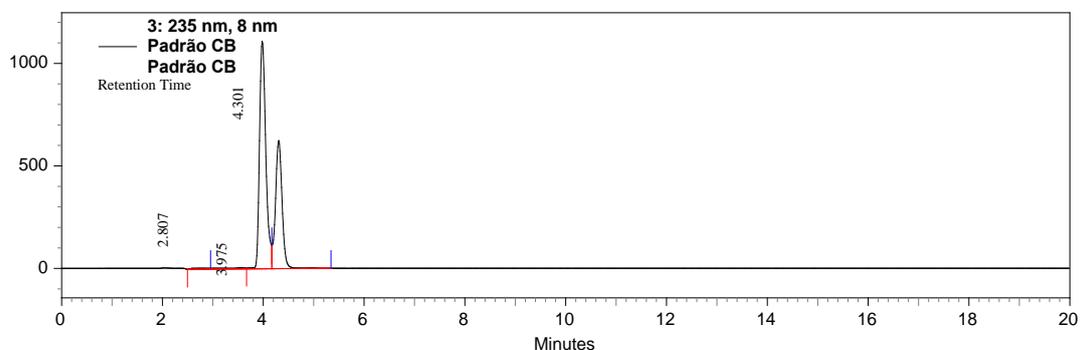


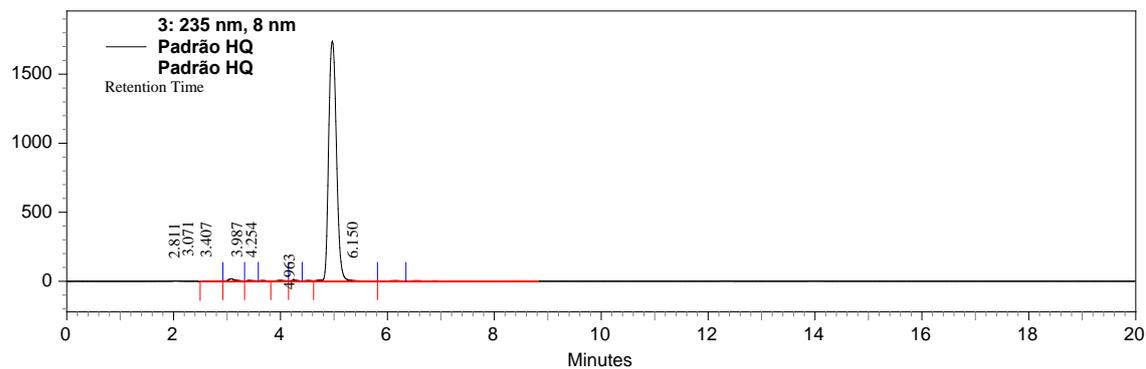
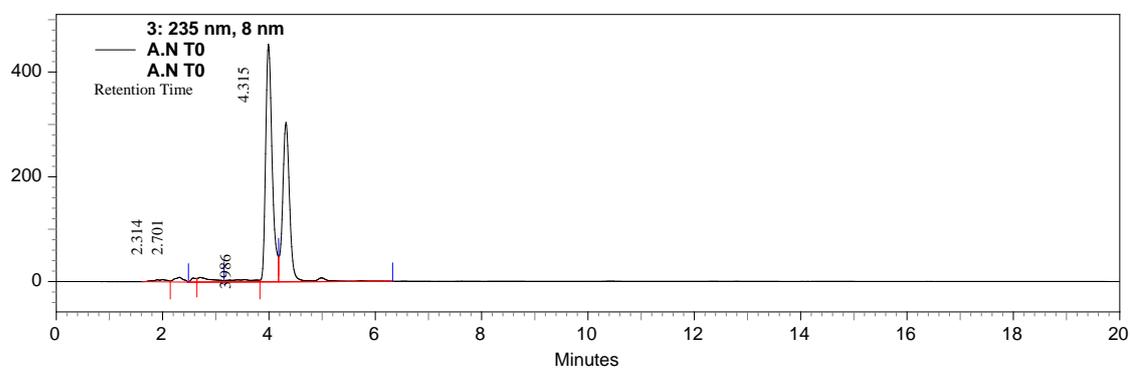
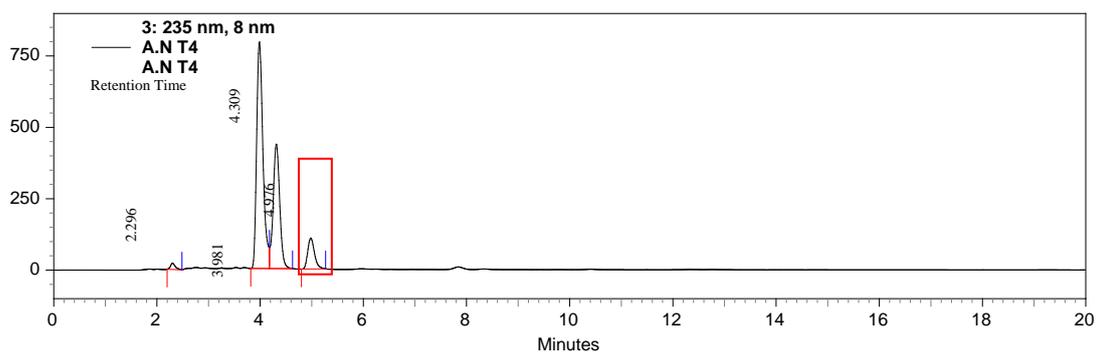
Figura 40. Cromatograma do padrão de HQ**Figura 41.** Cromatograma do tempo zero da biotransformação em biorreator**Figura 42.** Cromatograma do 4º dia de biotransformação em biorreator

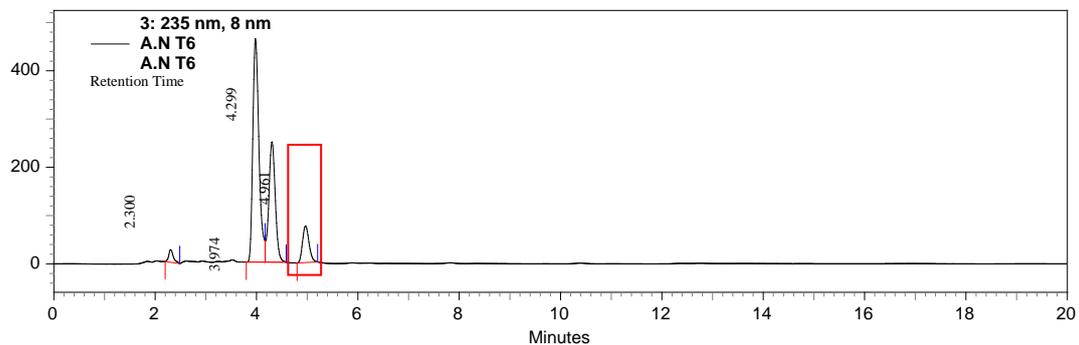
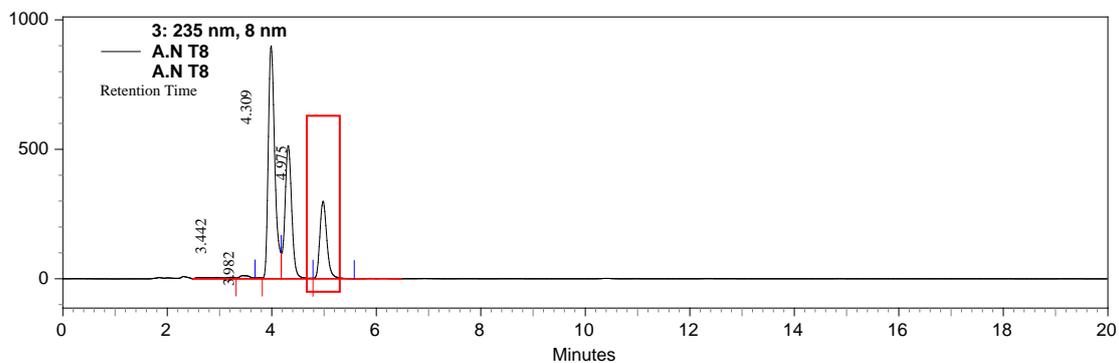
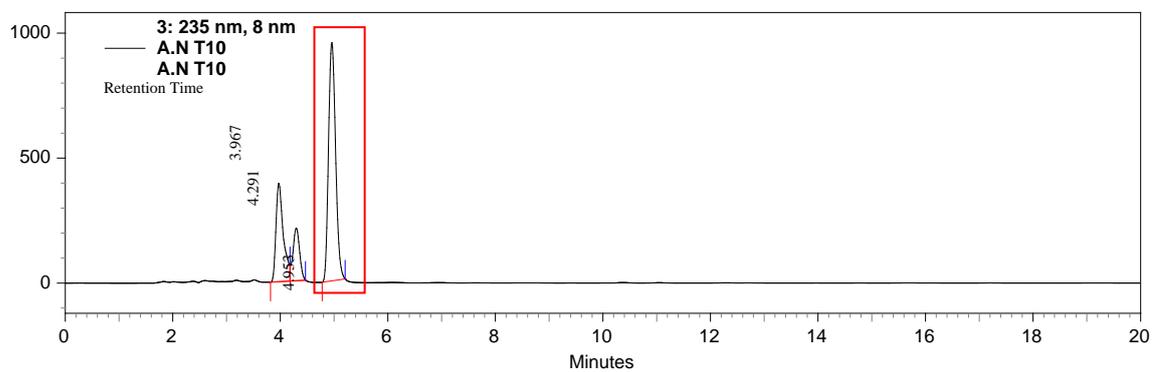
Figura 43. Cromatograma do 6º dia de biotransformação em biorreator**Figura 44.** Cromatograma do 8º dia de biotransformação em biorreator**Figura 45.** Cromatograma do 10º dia de biotransformação em biorreator

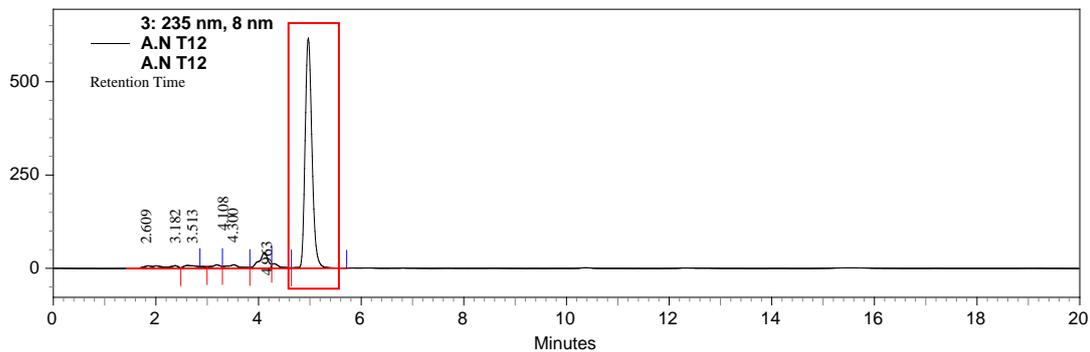
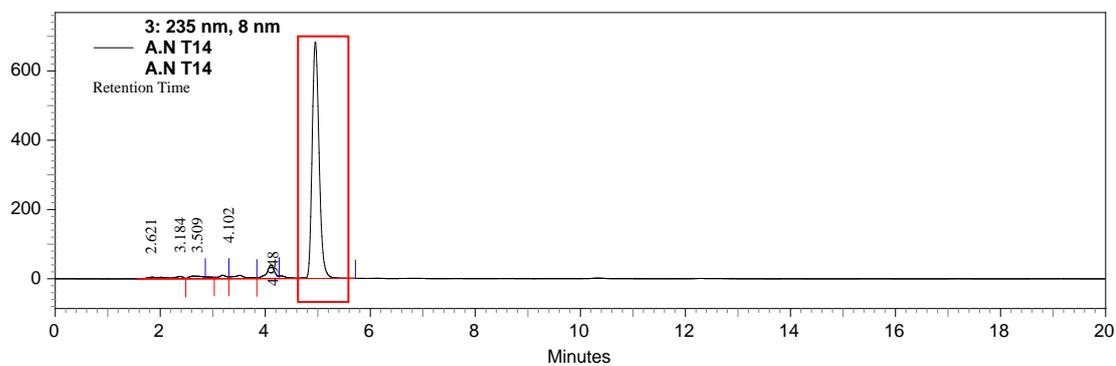
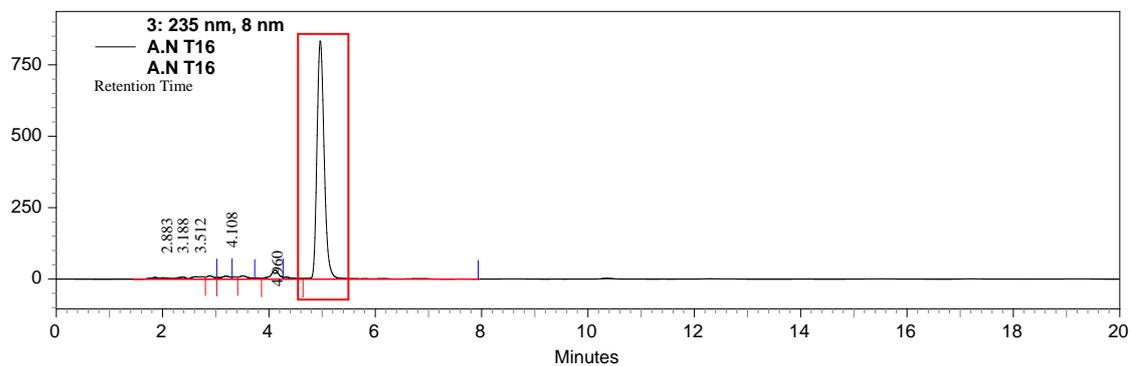
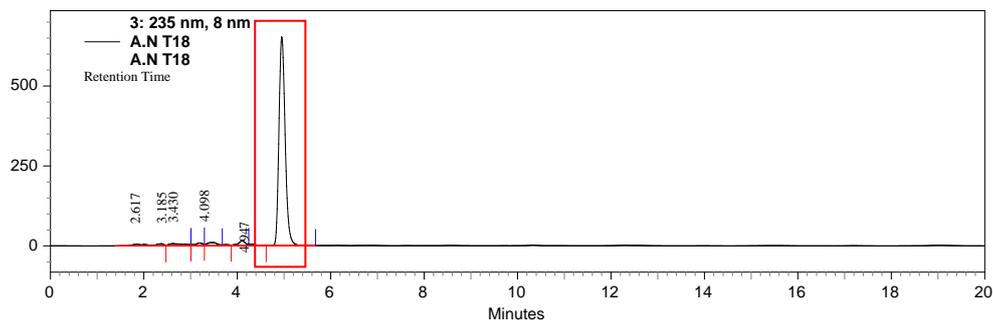
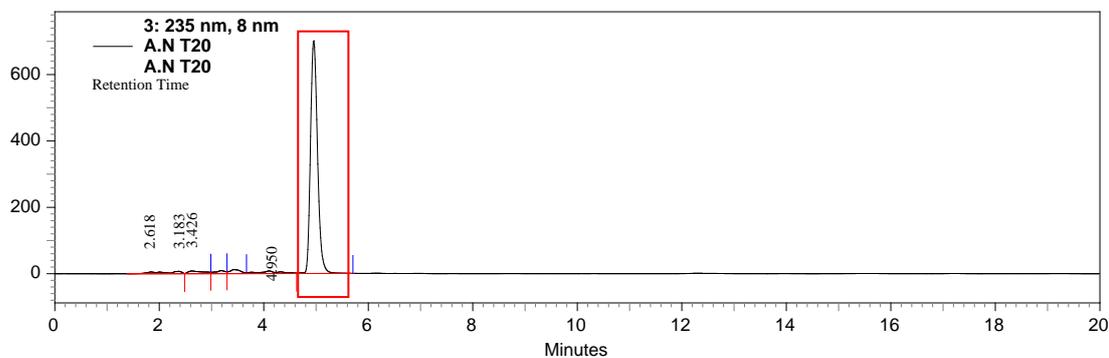
Figura 46. Cromatograma do 12º dia de biotransformação em biorreator**Figura 47.** Cromatograma do 14º dia de biotransformação em biorreator**Figura 48.** Cromatograma do 16º dia de biotransformação em biorreator

Figura 49. Cromatograma do 18º dia de biotransformação em biorreator**Figura 50.** Cromatograma do 20º dia de biotransformação em biorreator

Os controles que foram mantidos em *shaker* durante o processo de biotransformação em biorreator confirmaram que não houve a produção de HQ. Os cromatogramas do controle das amostras aleatórias que foram retiradas estão apresentados nas Figuras abaixo 51, 52 e 53.

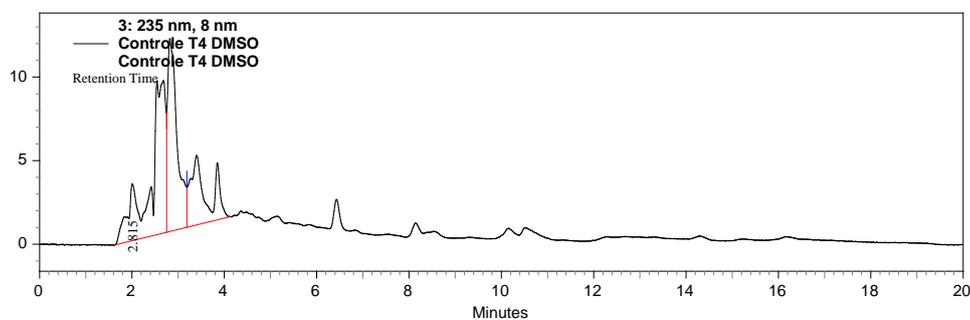
Figura 51. Cromatograma do controle (Fungo, meio, DMSO) após 4 dias de incubação

Figura 52. Cromatograma do controle (Fungo, meio, DMSO) após 8 dias de incubação

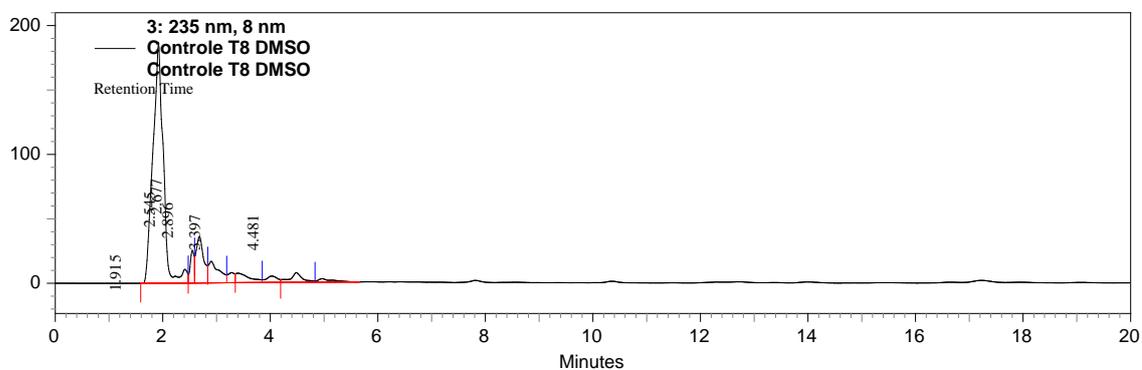
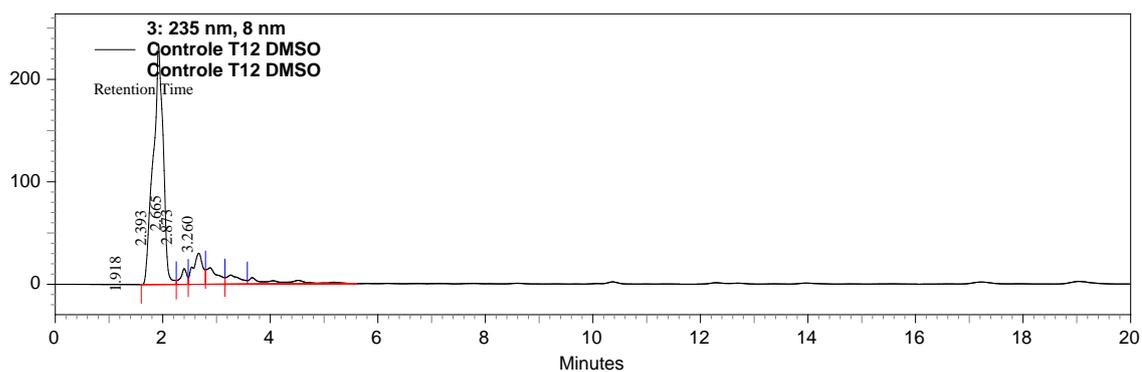


Figura 53. Cromatograma do controle (Fungo, meio, DMSO) após 12 dias de incubação



A partir dos cromatogramas obtidos da biotransformação em biorreator a quantificação da HQ foi feita e o rendimento foi calculado através do cálculo descrito no item (3.3.2). A **Tabela 6** apresenta os valores das concentrações de HQ encontradas nas alíquotas que foram retiradas de 48 em 48 horas até o 20º dia de incubação e os rendimentos obtidos para cada um desses dias.

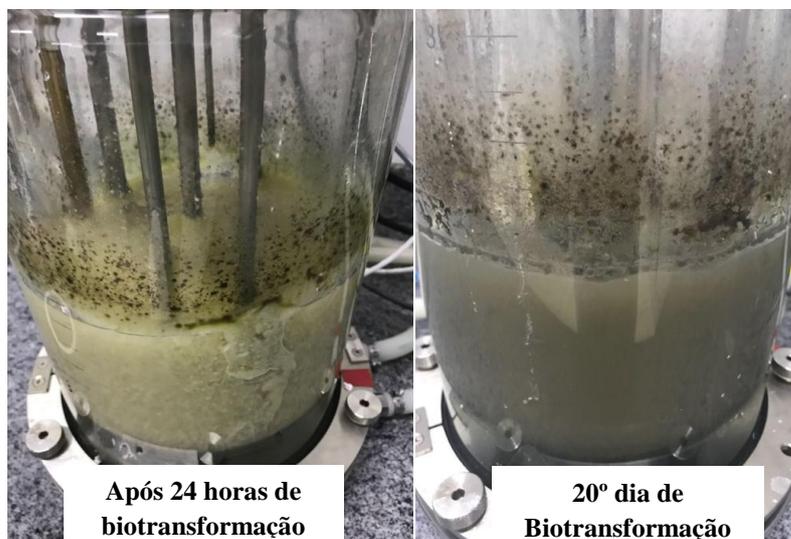
Tabela 6. Estudo da quantificação de (-)-hinoquinina no processo de biotransformação em biorreator.

Dias de Biotransformação em biorreator	Concentração de (-)- hinoquinina obtida (mg/L)	Rendimento (%)
4	15,52	7,76
6	10,79	5,39
8	43,13	21,56
10	133,04	66,52
12	87,34	43,67
14	96,15	48,08
16	120,78	60,39
18	92,18	46,09
20	100,09	50,05

Considerando que a quantidade de CB adicionada foi 200 mg/L e quantidade de HQ obtida no ultimo dia de biotransformação foi de 100,09 mg/L o rendimento da conversão em biorreator foi de 50,05 %. A produtividade máxima também foi calculada neste dia (3.3.2) obtendo- se um valor de 5,00 mg.L/dia.

Pode-se observar que, comparado aos processos de biotransformação realizado em frascos, a quantidade de HQ obtida não foi aumentando gradualmente obtendo concentrações que oscilaram para mais e menos conforme os dias. Pode se sugerir que este fato tenha ocorrido por um erro de amostragem visto que, as alíquotas que eram retiradas no biorreator passavam por uma tubulação, e mesmo que uma quantidade considerável tenha sido desprezada, a fração retirada não nos garantia que a alíquota correspondesse ao exato dia, isto foi mais evidente principalmente nas duas primeiras alíquotas em que a cultura do fungo estava mais densa. A partir do 4º dia de biotransformação observou-se que as células foram se desintegrando, provavelmente devido à falta de nutrientes. A **Figura 54** mostra a diferença morfológica das culturas após 24 horas da adição da CB e no último dia de biotransformação (20º dia).

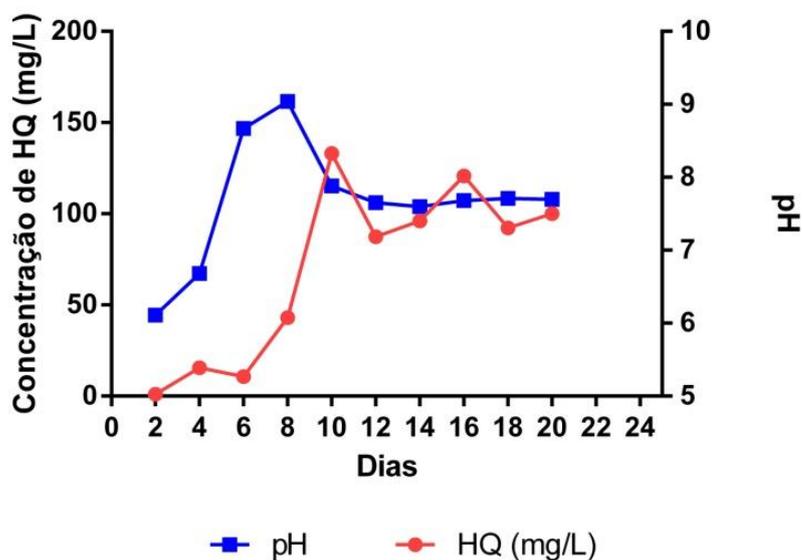
Figura 54. *A.niger* em biorreator após 24 horas da adição de CB e no 20° dia de biotransformação



Fonte: Arquivo pessoal Daniele de S. Eugenio

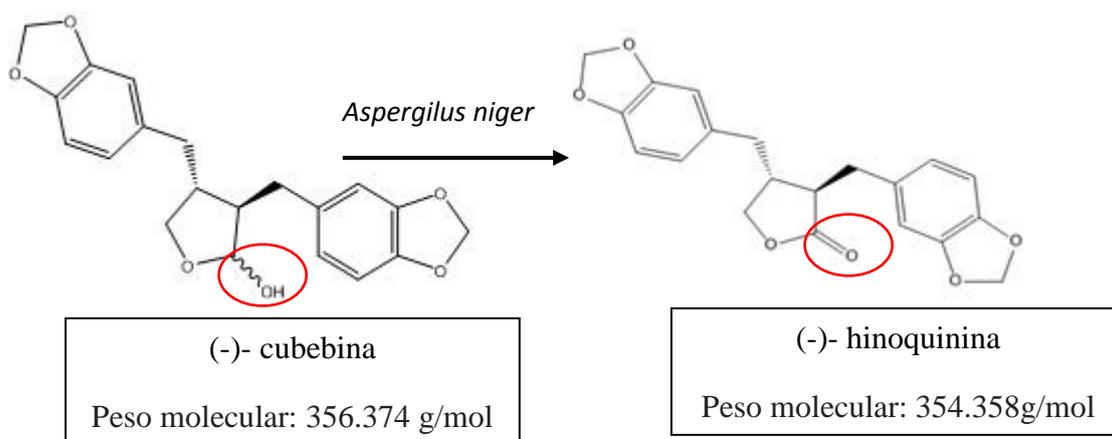
Os parâmetros como temperatura e frequência de agitação se mantiveram constantes à 30° C e 200 rpm respectivamente durante todos os dias de biotransformação, já o pH que foi ajustado para 6 antes da adição da CB foi aumentando até o 8° dia de biotransformação chegando a um ponto máximo de 9,04, logo após foi diminuindo e se mantendo na faixa entre 7,00 e 8,00. A **Figura 55** permite uma visualização mais clara do experimento de produção da HQ em biorreator:

Figura 55. Gráfico da concentração de HQ e monitoramento do pH em função do tempo no biorreator



Foi relatado pela primeira vez neste trabalho, a obtenção de HQ através de um processo biotecnológico utilizando um biorreator. A obtenção da molécula de interesse pelo fungo *A.niger* reafirma a capacidade deste organismo em promover reações de desidrogenação em hidroxilas de compostos orgânicos, culminando na formação de carbonila nesta posição. A desidrogenação ocorrida na conversão da CB em HQ pode ser sugerida envolvendo enzimas livres, dependentes do cofator NADH (YING, 2006). A **Figura 56** representa um esquema desta conversão.

Figura 56. Esquema da conversão da (-)- cubebina em (-)- hinoquinina por *A.niger*



O rendimento de 50,05 % obtido em biorreator se torna muito promissor quando comparado aos processos realizados em frascos assim como reproduzido neste trabalho, e também no estudo realizado por ARRUDA, et al. 2017 no qual o rendimento foi de 14%. Ficou evidente que, o delineamento experimental proposto influenciou no resultado, permitindo um maior rendimento de HQ e conseqüentemente ainda maior em biorreator onde o volume de trabalho foi mais alto. O estudo em biorreator ainda permitiu o monitoramento de parâmetros importantes como pH, temperatura, agitação e aeração, que são difíceis de serem controlados em frascos.

Quando comparado aos métodos químicos já existentes de obtenção de HQ, a semissíntese a partir da CB utilizando catalisador clorocromato de piridínio (PCC), tem um rendimento de 98%, porém como já citado, possui a desvantagem da utilização do reagente tóxico Crômio IV, que além de carcinogênico é contaminante de solo e água. O outro método que foi relatado na literatura visando a diminuição do uso de agentes tóxicos foi a utilização um material híbrido que mimetiza enzimas do citocromo P-450 para oxidar compostos orgânicos, quando utilizado o peróxido de hidrogênio para oxidar a CB, obteve-se um rendimento de 100% e quando foi utilizado o iodosilbenzeno para essa mesma

função obteve-se 70%, porém há a desvantagem do uso de uma grande quantidade de ACTN e ainda, comparado ao processo biotecnológico, não se torna economicamente viável.

As condições de otimização para obtenção da HQ por biotransformação fúngica podem ainda ser mais explorados em biorreator e parâmetros como temperatura, frequência de agitação, taxa de aeração que não foram analisados neste trabalho poderão ser analisados em faixas mais amplas em um planejamento fatorial rotacional em vários níveis. Além disso, estratégias podem ser incluídas para o aumento do rendimento assim como diversos trabalho de otimização relatam.

Zhao et al. (2012) discutiu em seu trabalho a utilização de co-substratos como surfactantes para facilitar a entrada do substrato no interior da célula do microrganismo, aumentando assim a concentração do produto final (ZHAO et al., 2012). Na otimização da conversão de 19-nortestosterona à estrona e estradiol, a suplementação do meio de biotransformação com ATP e algumas coenzimas redutoras levou o aumento da quantidade de estrona e estradiol (SALLAM et al., 1995). Fontes de carbono foram alteradas em diversos trabalhos de otimização, e alguns relatam a utilização somente do substrato como única fonte de carbono utilizando meios minerais (soluções salinas) ou tampões exclusivamente aplicados como meio de cultura (SPEELMANS et al., 1998; TAN et al., 1998; MARÓSTICA Jr; PASTORE, 2007).

Uma perspectiva futura deste trabalho seria a avaliação de outros parâmetros e estratégias que podem ainda serem explorados para obtenção da HQ em biorreator. Além disso, seria de extrema importância um estudo genético, identificando sequências do genoma da linhagem utilizada, que pode permitir investigações importantes neste sistema microbiano.

Ressalta-se neste trabalho a importância da obtenção de moléculas com grande interesse farmacológico como a HQ através de métodos biotecnológicos que minimizem a utilização de reagentes químicos tóxicos.

5. CONCLUSÕES

As principais conclusões deste trabalho foram:

- A linhagem *A. niger* ATCC11414 adotada para esta pesquisa é capaz de biotransformar a (-)-cubebina em (-)-hinoquinina, promovendo uma reação de desidrogenação.
- Foi possível analisar que a (-)- hinoquinina pode ser produzida em diferentes condições de cultivo, sendo que a melhor condição entre as testadas foi transferência de células para o meio Czapek Dox.
- Através do delineamento experimental realizado, foi possível reproduzir em biorreator na condição em que o pH= 6 , [] de sacarose= 10 g/L e [] de CB= 200 mg/L obtendo-se um rendimento de 50,05 % de HQ. Rendimento ainda não encontrado na literatura.
- As análises estatísticas permitiram compreender que as variáveis testadas no delineamento que mais interfeririam no processo foi o pH e a [] de sacarose, que permitiu também uma visualização clara do ponto ótimo de produção de HQ.
- Além disso, os ensaios em biorreator permitiu o monitoramento de parâmetros que facilitarão ensaios futuros.

6. REFERÊNCIAS

- AL-ABOUDI, A. et al. Biotransformation of methyl cholate by *Aspergillus niger*. **Steroids**, v.74, p.483–486, 2009.
- ALBUQUERQUE, S. et al. **Cubebina, lignana dibenzilbutirolactólica, seus derivados semi-sintéticos e sintéticos, bem como outras lignanas e neolignanas como agente vasodilatador na terapia da disfunção erétil**. BR nº WO2011075801 A1, JP 2012-545026, 21 dez. 2009, 30 jun. 2011.
- AMBROSIO, S. R. et al. Kaurane and pimarane-type diterpenes from the *Viguiera* species inhibit vascular smooth muscle contractility. **Life Sciences**, v.79, p.925–933, 2006.
- ANDRADE, L. N. et al. Synthesis of (-)-hinokinin by oxidation of (-)-cubebin catalyzed by biomimetic metalloporphyrin catalytic systems. **Catalysis Communications**, v.10, p.669–672, 2009.
- ARECHE, C. et al. Biotransformation of Stypotriol triacetate by *Aspergillus niger*. **Journal of Molecular Structure**, v.998, p.167–170, 2011.
- ARRUDA, C. et al. Biotransformation of (-)-cubebin by *Aspergillus spp.* into (-)-hinokinin and (-)-parabenzlactone, and their evaluation against oral pathogenic bacteria. **Natural Product Research**, p.1-14, 2017.
- AZERAD, R. Microbial Models for Drug Metabolism. **Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology**. v.63, p.169-218, 1999.
- BASTOS, J. K. et al. Anti-inflammatory activity of cubebin, a lignan from the leaves of *Zanthoxylum naranjillo* Griseb. **Journal of Ethnopharmacology**, v.75, p.279–282, 2001.
- BASTOS, J. K.; ALBUQUERQUE, S.; SILVA, M. L. A. Evaluation of the trypanocidal activity of lignans isolated from the leaves of *Zanthoxylum naranjillo*. **Planta Medica**, v.65, p.541–544, 1999.
- BETIKU, E.; ADESINA, O. Statistical approach to the optimization of citric acid production using filamentous fungus *Aspergillus niger* grown on sweet potato starch hydrolyzate. **Biomass and Bioenergy**, v.55, p. 350-354, 2013.
- BICAS, J.L. et al. Optimization of R-(+)-*a*-terpineol production by the biotransformation of R-(+)-limonene. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v.35, p.1061-1070, 2008.
- BODIWALA, H. S. et al. Antileishmanial amides and lignans from *Piper cubeba* and *Piper retrofractum*. **Journal of Natural Medicines**, v.61, p.418–421, 2007.
- BUTLER, M. **Animal Cell Culture & Technology**, London, BIOS Scientific Publishers, 2004.
- CHATTERJEE, T.; BHATTACHARYYA, D.K. Biotransformation of limonene by *Pseudomonas putida*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.55, p. 541–546, 2001.

CHEN, G. et al. Biotransformation of 20(S)-protopanaxatriol by *Aspergillus niger* and the cytotoxicity of the resulting metabolites. **Phytochemistry Letters**, v.11, p.111–115, 2015.

CHOU, B. H. et al. Fungal transformation of isosteviol lactone and its biological evaluation for inhibiting the AP-1 transcription factor. **Phytochemistry**, v.70, p.759-764, 2009.

CHOU, B. H. et al. Microbial transformation of isosteviol lactone and evaluation of the transformation products on androgen response element. **Journal of Natural Products**, v.71, p.602-607, 2008.

CHOUDHARY, M. I. et al. Microbial transformations of gelomulide G: A member of the rare class of diterpene lactones. **Chemistry & Biodiversity**, v.2, p.1401-1408, 2005.

COREY, E. J.; SUGGS, J. W. Pyridinium chlorochromate: An eficiente reagente for oxidation of primary and secondary alcohols to carbonyl compounds. **Tetrahedron Letters**, v.16, n.31, p.2647-2650, 1975.

CUNHA, W. R. et al. **Lignans: Chemical and Biological Properties**. Croatia, Phytochemicals – A Global Perspective of Their Role in Nutrition and Health. p.213-234, 2012.

DA SILVA, R. et al. Synthesis and biological activity evaluation of lignan lactones derived from (–)-cubebin. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**. v.15, n.4, p.1033–1037, 2005.

DE OLIVEIRA, B. H.; STRAPASSON, R.A. Biotransformation of the monoterpene, limonene, by *Fusarium verticilloides*. **Brazilian Archives of Biology and Technology**. v.43, p.11-14, 2000.

DE SOUZA, V.A. et al. Trypanocidal activity of (–)-cubebin derivatives against free amastigote forms of *Trypanosoma cruzi*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v.15, n.2; p.303–307, 2005.

ELIAS, B. C.; SAID, S.; ALBUQUERQUE, S.; PUPO, M. T. The influence of culture conditions on the biosynthesis of secondary metabolites by *Penicillium verrucosum* Dierckx. **Microbiological Research**, v.161, p.273-280, 2006.

ESPERANDIM, V. R. et al. Evaluation of the in vivo therapeutic properties of (–)-cubebin and (–)-hinokinin against *Trypanosoma cruzi*. **Experimental Parasitology**, v.133, p.442–446, 2013.

ESPERANDIM, V. R. et al. *In vivo* infection by *Trypanosoma cruzi*: a morphometric study of tissue changes in mice. **Parasitology Research**, v.112, p.431–436, 2013.

FARIA, A.L. **Síntese, caracterização e atividade catalítica de novos catalisadores metaloporfirínicos suportados**. Dissertação de Mestrado. Universidade de São Paulo Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Ribeirão Preto-SP, 2004.

FERREIRA, N.R. et al. Biotransformation of sucrose into 5-hydroxy-2-hydroxymethyl- γ -pironone by *Aspergillus flavus*. **Annals of the Brazilian Academy of Sciences**. v.82, n. 3, p.569-576, 2010.

FINKELSTEIN, D. B.; BALL, C. **Biotechnology of filamentous fungi: technology and products**. Butterworth-Heinemann, 1992.

GADEN-JÚNIOR, E. L. **Fermentation process kinetics**. Biotechnology and Bioengineering, v. 6, p.629-635, 2000.

GARCÍA-CARNELLI, C. et al. Influence of Culture Conditions on the Biotransformation of (+)-Limonene by *Aspergillus niger*. **Zeitschrift für Naturforschung C**, v.69, p.61-67, 2014.

GULZAR, T. et al. Bioremediation of Synthetic and Industrial Effluents by *Aspergillus niger* Isolated from Contaminated Soil Following a Sequential Strategy. **Molecules**. v.22, n. 12, p.2244, 2017.

HARIDY, M. S. A.; AHMED, A. A.; DOE, M. Microbial transformation of two labdane diterpenes the main constituents of *Madia* species, by two fungi. **Phytochemistry**, v.67, p.1455-1459, 2006.

HIRATA N. et al. Mechanism of the melanogenesis stimulation activity of (–)-cubebin in murine B16 melanoma cells. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v.15, n.14, p.4897-4902, 2007.

HUANG, R. L. et al. Screening of 25 compounds isolated from *Phyllanthus* species for anti-human Hepatitis B virus in vitro. **Phytotherapy Research**, v.17, p.449–453, 2003.

JACKSON, M., et al. Calbistrins, novel antifungal agents produced by *Penicillium restrictum*. **Journal of Antibiotics**, v.46, p.34-38, 1983.

KASAHARA, H.; MIYAZAWA, M.; KAMEOKA, H. Enantioselective accumulation of (–)-pinoresinol through O-demethylation of (±)-eudesmin by *Aspergillus niger*. **Phytochemistry**, v.44, n.8, p.1479-1482, 1997.

KRISHNA, C. Solid-State Fermentation Systems—An Overview. **Critical Reviews in Biotechnology**, v.25, n.1-2, p.1-30, 2005.

LU, J. et al. Microbial transformation of cinobufotalin by *Alternaria alternate* AS 3.4578 and *Aspergillus niger* AS 3.739. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v.89, p.102-107, 2013.

MARÓSTICA Jr, M.R.; PASTORE, G.M. Production of R-(+)-aterpineol by the biotransformation of limonene from orange essential oil, using cassava waste water as medium. **Food Chemistry**, v.101, p.345–350, 2007.

MARQUINA, S. et al. Hydroxylation of the diterpenes ent-kaur-16-en-19-oic and ent-beyer-15-en-19-oic acids by the fungus *Aspergillus niger*. **Phytochemistry**, v.70, p.2017-2022, 2009.

MATOS, J. M. et al. A pilot study of perillyl alcohol in pancreatic cancer. **Journal of Surgical Research**. v.147, p.194-199, 2008.

MEYER, H. P.; TURNER, N. J. Biotechnological Manufacturing Options for Organic Chemistry. **Mini-Reviews in Organic Chemistry**, v.6, p.300-306, 2009.

MIYAZAWA, M. Biotransformation of Lignans and Neolignans. **Current Organic Chemistry**, v.5, p.975-986, 2001.

MIYAZAWA, M.; KASAHARA, H.; KAMEOKA, H. Biotransformation of Lignans: A Specific Microbial Oxidation of (+)-eudesmin and (+)-magnolin by *Aspergillus niger*. **Phytochemistry**, v.34, n.6, p.1501-1507, 1993.

MURRAY, H. C.; PETERSON, D. H. Oxygenation of steroids by Mucorales fungi. US2,602,769, 1952.

National Committee for Clinical Laboratory Standards. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Filamentous Fungi. Approved Standard M38-A. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, Pa, 2002.

NEWMAN, J. D. Natural products as leads to potential drugs: An old process or the new hope for drug discovery. **Journal of Medicinal Chemistry**, v.51, p.2589-99, 2008.

OLIVEIRA, K. B; OLIVEIRA, B. H. Obtenção De Substâncias Bioativas Através Da Biotransformação De Produtos Naturais. **Revista brasileira de Farmácia**, v.9, n.1, p. 89-99, 2012.

OLIVEIRA, L. G.; MANTOVANI S.M. Transformações biológicas: contribuições e perspectivas. **Química Nova**, v.32, p.742-756, 2009.

PAPAGIANNI, M.; MATTEY, M.; KRISTIANSEN, B. Citric acid production and morphology of *Aspergillus niger* as functions of the mixing intensity in a stirred tank and a tubular loop bioreactor. **Biochemical Engineering Journal**, v.2, n.3, p.197-205, 1998.

PAPAGIANNI, M.; MOO-YOUNG, M. Protease secretion in glucoamylase producer *Aspergillus niger* cultures: fungal morphology and inoculum effects. **Process Biochemistry**. v.37,p.1271-1278, 2002.

PARSHIKOV, I. A. et.al. Microbial transformation of artemisinin to 5-hydroxyartemisinin by *Eurotium amstelodami* and *Aspergillus niger*. **Phytochemistry**, v.33, p. 349-352, 2006.

PARSHIKOV, I. A.; SUTHERLAND, J. B. The use of *Aspergillus niger* cultures for biotransformation of terpenoids. **Process Biochemistry**, v.49, p.2086-2100, 2014.

PATEL, R. N. Microbial/enzymatic synthesis of chiral intermediates for pharmaceuticals. **Enzyme and Microbial Technology**, v.31, p.804-826, 2002.

PEREIRA JR, N.; BON, E.P.S.; FERRARA, M.A. **Tecnologia de bioprocessos**. Rio de Janeiro, Escola de Química/UFRJ, 2008.

- PERVAIZ, I. et al. Microbial biotransformation: a tool for drug designing. **Applied Biochemistry And Microbiology**, v.49, n.5, p.437-450, 2013.
- PORTO, T. S. et al. R. Pimarane-type Diterpenes Obtained by Biotransformation: Antimicrobial Properties Against Clinically Isolated Gram-positive Multidrug-resistant Bacteria. **Phytotherapy Research**, v.27, p.1502-1507, 2013.
- RATHBONE, D. A.; BRUCE, N. C. Microbial transformation of alkaloids. **Current Opinion in Microbiology**, v.5, p.274-281, 2002.
- REICHSTEIN, T. Process for the manufacture of levoascorbic acid. US2,265,121, 1941.
- REZENDE, A. A. A. **Estudo comparativo dos efeitos moduladores da (-)-cubebina sobre a mutagenicidade/recombinogenicidade induzida por diferentes agentes químicos**. Tese de doutorado. Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2012.
- SALLAM, L. A. et al. Bioconversion of 19-Nortestosterone by *Rhodococcus* sp. DSM 92-344. I: Optimization of Transformation Parameters. **Process Biochemistry**, v. 30, n. 1, p. 25-34, 1995.
- SARAIVA, J. et al. *In vitro* and *in vivo* activity of lignan lactones derivatives against *Trypanosoma cruzi*. **Parasitology Research**, v.100, p.791-795, 2007.
- SCHMIDELL, W. et al. **Biotecnologia Industrial**. São Paulo, Edgard Blücher Ltda, v.2, cap. 14, p.277-331, 2001.
- SEPEHR, M.N. et al. Removal of Cr (III) from tanning effluent by *Aspergillus niger* in airlift bioreactor. **Separation and Purification Technology**. v.96, p.256-262, 2012.
- SEVERIANO, M. E. et al. Biotransformation of ent-pimaradienoic acid by cell cultures of *Aspergillus niger*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v.21, p.5870-5875, 2013.
- SILVA, M. L. A. et al. Antimycobacterial activity of natural and semi-synthetic lignans. **Zeitschrift für Naturforschung C**, v.64, p.779-784, 2009.
- SILVA, M. L. A. et al. **Process to obtain dibenzylbutyrolactonic lignans, process to obtain synthetic derivatives from lignans bearing anti-Chagas chemoprophylactic and therapeutical activities**. US 7317114 B2, 25 mar. 2003, 08 jan. 2008.
- SPEELMANS, G.; BIJLSMA, A. EGGINK, G. Limonene bioconversion to high concentrations of a single and stable product, perillic acid, by a solvent resistant *Pseudomonas putida* strain. **Applied Microbiology and Biotechnology**. v.50, p.538-544, 1998.
- SRISILAM, K.; VEERESHAM, C. Biotransformation of drugs by microbial cultures for predicting mammalian drug metabolism. **Biotechnology Advances**, v.21, p.3-39, 2003.
- TAN, Q.; DAY, D.F., CADWALLADER, K.R. Bioconversion of (R)- (+)-limonene by *P. digitatum* (NRRL 1202). **Process Biochemistry**. v.33, p.29-37, 1998.

VAUGHN, J. **Insect cell culture, protein expression**, Encyclopedia of bioprocess technology p.1444-1457, 1999.

VERZA, M. et al. Biotransformation of a Tetrahydrofuran Lignan by the Endophytic Fungus *Phomopsis Sp.* **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v.20, n.1, p.195-200, 2009.

World health organization (Who). **Chagas disease (American trypanosomiasis)**, mar. 2017. Disponível em: <http://www.who.int/chagas/en/> Acessado em: 18 out.2017.

World Health Organization (Who). ENVIRONMENTAL HEALTH CRITERIA 154. ACETONITRILE, 1993. Disponível em:

<http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc154.htm> Acessado em: 14 nov.2017.

XU, M. et al. Microbial biotransformation of bioactive flavonoids. **Biotechnology Advances**, v.33, n.1, p. 214-123, 2015.

XU, M. et al. Perillyl alcohol-mediated inhibition of lung cancer cell line proliferation: potential mechanisms for its chemotherapeutic effects. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v.195, n.2, p.232-246, 2004.

ZAFAR, S.; AHMED, R.; KHAN, R. Biotransformation: a green and efficient way of antioxidant synthesis. **Free Radical Research**, v.50, n.9, p.939-948, 2016.

ZHANG, J. et al. Biotransformation of 20(S)-protopanaxatriol by *Mucor spinosus* and the cytotoxic structure activity relationships of the transformed products. **Phytochemistry**, v.68, p.2523-2530, 2007.

ZNAD, H.; MARKOS, J.; BALES, V. Production of gluconic acid from glucose by *Aspergillus niger*: growth and non-growth conditions. **Process Biochemistry**, v.39, n.11, p.1341-1345, 2004.