



INSTITUTO LATINO-AMERICANO DE
TECNOLOGIA, INFRAESTRUTURA E
TERRITÓRIO (ILATIT)

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
INTERDISCIPLINAR EM ENERGIA E
SUSTENTABILIDADE

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL
BIOCATALÍTICO DE FUNGOS
ENDOFÍTICOS DE PLANTAS NATIVAS DO
OESTE PARANAENSE**

Maria Gabriela Azevedo Barros

Foz do Iguaçu

2025



INSTITUTO LATINO-AMERICANO DE
TECNOLOGIA, INFRAESTRUTURA E
TERRITÓRIO (ILATIT)

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
INTERDISCIPLINAR EM ENERGIA E
SUSTENTABILIDADE

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL BIOCATALÍTICO DE FUNGOS ENDOFÍTICOS DE PLANTAS NATIVAS DO OESTE PARANAENSE

Maria Gabriela Azevedo Barros

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interdisciplinar em Energia e Sustentabilidade do Instituto Latino-Americano de Tecnologia, Infraestrutura e Território da Universidade Federal da Integração Latino-Americana, como requisito para a obtenção do título de Doutora em Energia e Sustentabilidade.

Área de concentração: Energia e Sustentabilidade.

Orientadora: Profa. Dra. Caroline da Costa Silva Gonçalves

Coorientadora: Profa. Dra. Julia Ronzella Ottoni

Foz do Iguaçu

2025

Catálogo elaborado pelo Setor de Tratamento da Informação
Catálogo de Publicação na Fonte. UNILA - BIBLIOTECA LATINO-AMERICANA - CENTRAL

B277

Barros, Maria Gabriela Azevedo.

Avaliação do potencial biocatalítico de Fungos Endofíticos de plantas nativas do oeste paranaense / Maria Gabriela Azevedo Barros. - Foz do Iguaçu, 2025.

190 f.: il.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal da Integração Latino-Americana, Instituto Latino Americano de Tecnologia, Infraestrutura e Território, Pós-Graduação Interdisciplinar em Energia e Sustentabilidade. Foz do Iguaçu - PR, 2025.

Orientadora: Caroline da Costa Silva Gonçalves.

Coorientadora: Julia Ronzella Ottoni.


1. Enzimas. 2. Microrganismos. 3. Biotransformação. 4. Ibuprofeno. I. Gonçalves, Dra. Caroline da Costa Silva. II. Ottoni, Dra. Julia Ronzella. III. Título.

CDU 615.32


AValiação DO POTENCIAL BIOCATALÍTICO DE FUNGOS ENDOFÍTICOS DE PLANTAS NATIVAS DO OESTE PARANAENSE

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interdisciplinar em Energia e Sustentabilidade do Instituto Latino-Americano de Tecnologia, Infraestrutura e Território da Universidade Federal da Integração Latino-Americana, como requisito para a obtenção do título de Doutora em Energia e Sustentabilidade.


BANCA EXAMINADORA

Documento assinado digitalmente
 **CAROLINE DA COSTA SILVA GONCALVES**
Data: 26/03/2025 18:04:20-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>


Orientadora: Profa. Dra. Caroline da Costa Silva Gonçalves
UNILA

Documento assinado digitalmente
 **JULIA RONZELLA OTTONI**
Data: 28/03/2025 13:18:10-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>


Coorientadora: Profa. Dra. Julia Ronzella Ottoni
UDC

Documento assinado digitalmente
 **MARCIANA PIERINA ULIANA MACHADO**
Data: 02/04/2025 15:24:36-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>


Profa. Dra. Marciana Pierina Uliana Machado
UNILA

Documento assinado digitalmente
 **RAFAELLA COSTA BONUGLI SANTOS**
Data: 28/03/2025 09:00:39-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Profa. Dra. Rafaella Costa Bonugli Santos
UNILA

Documento assinado digitalmente
 **SUZAN PANTAROTO DE VASCONCELLOS**
Data: 02/04/2025 19:08:39-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Profa. Dra. Suzan Pantaroto de Vasconcellos
UNIFFESP

Documento assinado digitalmente
 **ANDRE LUIZ MELEIRO PORTO**
Data: 02/04/2025 09:39:10-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. André Luiz Meleiro Porto
USP

Foz do Iguaçu, 14 de março de 2025.

*Dedico esse trabalho aos meus Pais, Luciana e Paulo; à Maria Camila, minha irmã; ao
Bruno, meu marido.*

Agradecimentos

Durante os 04 (quatro) anos de doutoramento, muita coisa aconteceu. Conheci muitas pessoas, cujas contribuições diretamente ou indiretamente foram importantes para essa tese. Entre elas, agradeço imensamente aos técnicos da UNILA, aqui representados pela Paula Santos, Carla Betim e Lisset Geigel. A técnica do laboratório de RMN Ana Carolina (UFPR). Agradeço, ainda, aos meus colegas de programa.

Agradeço ao Refúgio Biológico Bela Vista e à engenheira Veridiana Araújo Alves da Costa Pereira pelas amostras vegetais e auxílio na coleta.

Agradeço à empresa Pró-Análise Produtos Laboratoriais pela doação de placas da *Craplast*, que possibilitaram a realização do ensaio da enzima manganês peroxidase.

Agradeço à PRPPG, ao programa de Pós-graduação Interdisciplinar em Energia e Sustentabilidade (PPGIES) e à Fundação Araucária pela oportunidade e custeio deste projeto. À Universidade Dinâmica Cataratas (UDC), o meu agradecimento pelo espaço e uso dos equipamentos. Agradeço à CAPES e ao CNPq pela concessão das bolsas de estudos que recebi durante esse período.

Aos colegas de grupo, Luísa Sierra, Brandon Ospina, Luís Guilherme, Kauana Weirich, especialmente, à Gabrielli Ribeiro, cujos questionamentos, como minha IC, me levaram a muitas reflexões sobre esse trabalho. Também agradeço à Rosane Grignet, cuja parceria foi essencial para o resultado da pesquisa.

Agradeço também aos professores que me receberam tão bem em seus laboratórios, Anita Marsaioli (UNICAMP), Marcela Boroski, Rafaella Bonugli, Andersson Barison e Kahlil Salome (UFPR) e ao Vinícius Lemart. À banca que gentilmente aceitou avaliar este trabalho, e cujas considerações levaram a reflexões e melhorias.

Aos meus co-orientadores, Michel Passarini e Júlia Ottoni, obrigada pela paciência e ensinamentos. À minha orientadora, Caroline Gonçalves, sem palavras para agradecer tudo que fez, pela paciência, os ensinamentos, as correções, os projetos paralelos, os incentivos, obrigada por ter me recebido de modo tão aberto.

E o que dizer aos amigos e familiares, que entenderam a minha ausência e incentivaram a minha jornada. Aos meus avós, Vovó Margarida, Vovó Lô, Vovô Nelson e Vovô Zé. E especialmente aos meus pais, Luciana e Paulo Barros, aos meus irmãos Bruno e Paulo, aos meus sobrinhos Antonella, Alice, José Paulo, Letícia e Lívia. À minha irmã Maria Camila, por sempre estar ao meu lado, apoiando e incentivando meus estudos e revisando meus textos. Por fim, agradeço ao Bruno R. Gris, que me apoiou, me incentivou durante todo o desenvolvimento deste trabalho.

"Quiero inventar el mar de cada día."(Pablo Neruda, 1964)

BARROS, Maria Gabriela Azevedo. AVALIAÇÃO DO POTENCIAL BIOCATALÍTICO DE FUNGOS ENDOFÍTICOS DE PLANTAS NATIVAS DO OESTE PARANAENSE. 14 de março de 2025. 190 folhas. Tese (Doutorado) - Universidade Federal da Integração Latino-Americana, Foz do Iguaçu- PR, Brasil.

Resumo

O aumento da população mundial e do consumo traz uma série de desequilíbrios ambientais, impactando as futuras gerações. Com a finalidade de diminuir esses danos, rumo a um desenvolvimento mais sustentável, foram propostas diversas metas e boas práticas, por exemplo, a agenda 2030 pela Organização das Nações Unidas (ONU). Partindo do ideal de minimização dos danos ambientais relacionados aos processos industriais e a aplicação os princípios da química verde, o presente trabalho busca prospectar atividades enzimáticas em fungos endofíticos isolados de plantas nativas do oeste paranaense para biotransformação de fármacos. Desta forma, foi realizado o isolamento de 39 fungos oriundos da árvore *Cabralea canjerana* e 130 da *Guarea kunthiana*. Os fungos isolados foram separados em grupos de acordo com as características morfológicas, e, em uma triagem inicial, para avaliar a tolerância dos fungos à exposição de fármacos, 10 das 53 morfo-espécies avaliadas apresentaram resultados acima de 20 % em pelo menos um dos 6 tratamentos, sendo assim, consideradas promissoras, 3 da *C. canjerana* e 7 da *G. kunthiana*. A identificação dos fungos promissores foi realizada por biologia molecular pelo método Sanger, utilizando a amplificação nas regiões de ITS1 e ITS4, indicando que dos 10 fungos selecionados previamente, 8 eram ascomicetos, e 2 eram do tipo basidiomicetos. Posteriormente, os isolados selecionados foram submetidos a triagem enzimática. Os resultados obtidos mostram que os isolados possuem um perfil enzimático diverso; com as cepas isoladas da *C. canjerana* foram melhores para atividade potencial das oxidases - Lac, MnP e LiP. Ao passo que os da *G. kunthiana* apresentaram um perfil mais amplo, com destaque para o isolado *Colletotrichum* sp. mgk_C3_9 que se mostrou ativo para a maioria dos ensaios enzimáticos, e seletivo no ensaio de lacase com o naftol, no qual oxidou apenas o β -naftol. Por fim, o fármaco ibuprofeno foi submetido à reação de biotransformação, sendo que o fungo *Colletotrichum* sp. mgk_C3_9 promoveu a conversão de 55,7 % do fármaco em 2-hidroxi-ibuprofeno após 96 h de reação, confirmando o potencial biocatalítico do fungo avaliado. De modo geral, os fungos investigados apresentaram resultados promissores para enzimas oxigenases e lipases. Este trabalho contribui para a prospecção de novos biocatalisadores e reforça a importância da biodiversidade microbiana regional na busca por soluções inovadoras e ambientalmente responsáveis para a indústria, contribuindo com o desenvolvimento da agenda 2030.

Palavras-chaves: Enzimas; Microrganismos; Biotransformação; Ibuprofeno.

BARROS, Maria Gabriela Azevedo. EVALUATION OF BIOCATALYTIC POTENTIAL IN ENDOPHYTIC FUNGUS OF WEST PARANÁ NATIVE PLANTS. March, 14 of 2025. 190 pages. Thesis (PhD) - Universidade Federal da Integração Latino-Americana, Foz do Iguaçu- PR, Brasil.

Abstract

The increase in the world population and consumption brings a series of environmental imbalances, impacting future generations. With the aim of reducing these damages, towards more sustainable development, several goals and good practices have been proposed, for example, the 2030 Agenda by the United Nations (UN). Starting from the ideal of minimizing environmental damage related to industrial processes and the application of green chemistry principles, the present work seeks to explore enzymatic activities in endophytic fungi isolated from native plants of western Paraná for drug biotransformation. Thus, 39 fungi were isolated from the tree *Cabralea canjerana* and 130 from *Guarea kunthiana*. The isolated fungi were separated into groups according to morphological characteristics, and, in an initial screening to assess the tolerance of fungi to drug exposure, 10 of the 53 evaluated morpho-species showed results above 20% in at least one of the 6 treatments, thus being considered promising, 3 from *C. canjerana* and 7 from *G. kunthiana*. The identification of promising fungi was carried out by molecular biology using the Sanger method, utilizing amplification in the ITS1 and ITS4 regions, indicating that of the 10 fungi previously selected, 8 were ascomycetes, and 2 were basidiomycetes. Subsequently, the selected isolates were subjected to enzymatic screening. The results obtained show that the isolates have a diverse enzymatic profile; with strains isolated from *C. canjerana* being better for potential oxidase activity - Lac, MnP, and LiP. Whereas those from 'G. kunthiana' presented a broader profile, with emphasis on the isolate *Colletotrichum* sp. mgk_C3_9 which was active for most enzymatic assays, and selective in the laccase assay with naphthol, where it oxidized only β -naphthol. Finally, the drug ibuprofen was subjected to a biotransformation reaction, with the fungus *Colletotrichum* sp. mgk_C3_9 promoting the conversion of 55.7% of the drug into 2-hydroxy-ibuprofen after 96 h of reaction, confirming the biocatalytic potential of the evaluated fungus. Overall, the investigated fungi showed promising results for oxidase and lipase enzymes. This work contributes to the exploration of new biocatalysts and reinforces the importance of regional microbial biodiversity in the search for innovative and environmentally responsible solutions for the industry, contributing to the development of the 2030 agenda.

Key-words: Enzymes. Microorganisms. Biotransformation. Ibuprofen.

BARROS, Maria Gabriela Azevedo. EVALUACIÓN DEL POTENCIAL DE BIOCATALISIS EN HONGOS ENDÓFITOS DE PLANTAS NATIVAS DEL OESTE DE PARANÁ. 14 de marzo de 2025. 190 páginas. Tesis (PhD) - Universidade Federal da Integração Latino-Americana, Foz do Iguaçu- PR, Brasil.

Resumen

El aumento de la población mundial y el consumo trae una serie de desequilibrios ambientales que afectan a las futuras generaciones. Con el objetivo de reducir estos daños hacia un desarrollo más sostenible, se han propuesto varias metas y buenas prácticas, por ejemplo, la Agenda 2030 de las Naciones Unidas (ONU). Partiendo del ideal de minimizar los daños ambientales relacionados con los procesos industriales y la aplicación de los principios de la química verde, el presente trabajo busca explorar las actividades enzimáticas en hongos endofíticos aislados de plantas nativas del oeste de Paraná para la biotransformación de fármacos. Así, se aislaron 39 hongos del árbol *Cabralea canjerana* y 130 de *Guarea kunthiana*. Los hongos aislados se separaron en grupos según características morfológicas y, en un cribado inicial para evaluar la tolerancia de los hongos a la exposición de fármacos, 10 de las 53 morfo-especies evaluadas mostraron resultados por encima del 20 % en al menos uno de los 6 tratamientos, siendo consideradas prometedoras, 3 de *C. canjerana* y 7 de *G. kunthiana*. La identificación de los hongos prometedores se llevó a cabo mediante biología molecular utilizando el método Sanger, utilizando la amplificación en las regiones ITS1 e ITS4, indicando que de los 10 hongos previamente seleccionados, 8 eran ascomicetos y 2 eran basidiomicetos. Posteriormente, los aislados seleccionados fueron sometidos a cribado enzimático. Los resultados obtenidos muestran que los aislados tienen un perfil enzimático diverso; con cepas aisladas de *C. canjerana* siendo mejores para la actividad potencial de oxidasa - Lac, MnP y LiP. Mientras que los de *G. kunthiana* presentaron un perfil más amplio, con énfasis en el aislado *Colletotrichum* sp. mgk_C3_9 que fue activo para la mayoría de los ensayos enzimáticos y selectivo en el ensayo de lacasa con naftol, donde oxidó solo el β -naftol. Finalmente, el fármaco ibuprofeno fue sometido a una reacción de biotransformación con el hongo *Colletotrichum* sp. mgk_C3_9 promoviendo la conversión del 55.7 % del fármaco en 2-hidroxi-ibuprofeno después de 96 horas de reacción, confirmando el potencial biocatalítico del hongo evaluado. En general, los hongos investigados mostraron resultados prometedores para las enzimas oxidasa y lipasa. Este trabajo contribuye a la exploración de nuevos biocatalizadores y refuerza la importancia de la biodiversidad microbiana regional en la búsqueda de soluciones innovadoras y ambientalmente responsables para la industria, contribuyendo al desarrollo de la agenda 2030.

Palabras clave: Enzimas. Microorganismos. Biotransformación. Ibuprofeno.

Lista de ilustrações

Figura 1 – Os 17 objetivos para o desenvolvimento sustentável propostos pela ONU	33
Figura 2 – Rotas biocatalíticas para obtenção da (<i>S</i>)-Pregabalina (Pfizer®) com o uso de enzimas: a – Hidrólise – rearranjo - hidrólise. b – hidrogenação exaustiva. c – enriquecimento enantiomérico. d – Epimerização seguida de redução. CALB, <i>Candida antarctica</i> lipase B; e.e., excesso enantiomérico; ERED, ene redutase; OPR1, 12-oxofitodienoato redutase 1.	34
Figura 3 – Fluxograma norteador da organização do presente trabalho	39
Figura 4 – Complexidade estrutural dos metabólitos isolados de fungos endofíticos a. Vimblastina e b. Taxol.	43
Figura 5 – Exemplo da diversidade estrutural da família Meliaceae a.Limonoíde e b.Sesquiterpeno.	47
Figura 6 – Triterpeno isolado da <i>C.canjerana</i> em extrato metanólico.	50
Figura 7 – a. Folhas de <i>Cabarela canjerana</i> , b. Árvore <i>C. canjerana</i> , c. Folhas de <i>Guarea kunthiana</i> , d. Árvore <i>G. kunthiana</i>	51
Figura 8 – Estruturas químicas dos diferentes fármacos utilizados no teste de susceptibilidade.	52
Figura 9 – Esquema ilustrativo do processamento dos fungos para obtenção do DNA para identificação molecular.	55
Figura 10 – Conversão racêmica do Ibuprofeno no isômero <i>S</i> por <i>C. rugosa</i>	71
Figura 11 – Esquema de atividade da ADH aplicada a síntese da atorvastatina cálcica.	72
Figura 12 – Esquema ilustrativo dos mecanismos de catálise por oxidases a.LiP, b. MnP, c. Lac.	73
Figura 13 – Conjugação da rodamina-B com os resíduos de ácido graxo.	75
Figura 14 – Sonda para prospecção de epóxido-hidrolase, em vermelho o grupo de proteção, que sofrerá ação da enzima, formando o diol que reagirá com o BSA sofrendo na sequência uma β -eliminação espontânea, liberando o ânion rusofurina, que passará a emitir fluorescência.	76
Figura 15 – Sondas fluorogênicas esterase (1), lipase (2), epóxido-hidrolase (3), diol (4) produto das sondas 1 a 3, monooxigenase cíclica (BVMO2) (5), lactona (6) produto da reação de Bayer-Village da sonda 5, éster (7) formado pela oxigenação da sonda 8, sonda para monooxigenase acíclica (BVMO1)(8); diol (10) formado pela reação da epóxido-hidrolase no composto 9, epóxido vicinal (9).	78
Figura 16 – Placas consideradas positivas a.Lacase (2-naftol), b.Lacase (1-naftol), c.Lipase, d.Celulase.	82
Figura 17 – Atividade enzimática por sonda para o <i>A. rigidiusculamgk_A3_3</i>	88

Figura 18 – Atividade enzimática por sonda para o <i>Alternaria</i> sp. mgk_C3_9.	89
Figura 19 – Perfil enzimático para o <i>Albonectria rigidiuscula</i> mgk_A3_15.	90
Figura 20 – Perfil enzimático avaliado por sondas para o <i>Fusarium</i> sp. mgk_B1_1.	90
Figura 21 – Biotransformação da bromexina a ambroxol ((<i>E</i>)-4-hidroxi-dimetilbromexina) por fungos <i>Cunninghamella</i> spp.	97
Figura 22 – Hidroxilação da Risperidona por <i>C. elegans</i>	98
Figura 23 – Biotransformação do Resveratrol em Pterostilbeno, em caldo batata dextrose	99
Figura 24 – Produtos da biotransformação da progesterona por <i>P. citrinum</i> e <i>Talaromyces</i> sp.	99
Figura 25 – Resolução enantiomérica da amina 1,2,3,4-tetra-hidro-1-naftilamina em (<i>R</i>)-1,2,3,4-tetra-hidro-1-naftilamina	100
Figura 26 – Resumo esquemático do experimento de biotransformação do Ibuprofeno.	105
Figura 27 – Resumo esquemático do <i>QuEChERS</i>	106
Figura 28 – Comparativo dos espectros de IV para o fármaco ibuprofeno comercial e recristalizado, com destaque dos grupos funcionais identificados.	109
Figura 29 – Espectro de ¹ H obtidos em CDCl ₃ , com 8 scans, em 400 MHz (Bruker® AVANCE I 400).	110
Figura 30 – Espectro de ¹ H em CDCl ₃ com TMS0 0,1 %, com 48 scans, em 200 MHz para o fármaco ibuprofeno recristalizado	111
Figura 31 – Espectro de ¹ H em CDCl ₃ com TMS0 0,1 %, com 8 scans, em 400 MHz para o fármaco ibuprofeno comercial	112
Figura 32 – Estrutura química do Ibuprofeno com numeração de carbonos em vermelho.	113
Figura 33 – Espectro de ¹³ C obtidos em CDCl ₃ , em 100 MHz (Bruker® AVANCE I 400).	114
Figura 34 – Espectro de ¹³ C obtidos em CDCl ₃ , em 100 MHz para a amostra de ibuprofeno recristalizado	115
Figura 35 – Espectro de ¹³ C obtidos em CDCl ₃ , em 100 MHz para a amostra de ibuprofeno comercial	116
Figura 36 – Cromatograma para o <i>Alternaria</i> sp. mgk_C3_9 em diferentes tempos de catálise, a. 2 h; b. 24 h; c. 96 h.	118
Figura 37 – Cromatograma para <i>Albonectria rigidiuscula</i> mgk_A3_15 no tempo inicial e final da reação, a. 72 h e b. 96 h;.	118
Figura 38 – Espectros de ¹³ C para os diferentes tempos de reação do fungo <i>Alternaria</i> sp. mgk_C3_9 em relação ao ibuprofeno. Em 100 MHz.	119
Figura 39 – Comparativo entre os espectros de hidrogênio da reação com o ibuprofeno e o controle do fungo <i>Alternaria</i> sp. mgk_C3_9. Em 200 MHz.	120

Figura 40 – Principais picos no cromatograma de UPLC/MS para o fungo <i>Alternaria</i> sp. mgk_C3_9	121
Figura 41 – Espectro de fragmentação de massas do composto majoritário produzido pelo fungo <i>Alternaria</i> sp. mgk_C3_9, em modo negativo de ionização	121
Figura 42 – Espectro de ^{13}C obtidos em CDCl_3 , em 100 MHz para a amostra resultante de 96 h de biotransformação do ibuprofeno pelo fungo <i>Alternaria</i> sp. mgk_C3_9.	122
Figura 43 – Hidroxilação da cadeia lateral do Ibuprofeno resultante da reação de biotransformação pelo fungo <i>Alternaria</i> sp. mgk_C3_9.	123
Figura 44 – Fragmentação em modo negativo de ionização para o composto majoritário formado na reação de biotransformação do Ibuprofeno pelo fungo <i>Albonectria rigidiuscula</i> mgk_A3_15.	124
Figura 45 – Árvore filogenética para o mcc_A3_5 gerada no MEGA11 com 1000 <i>bootstresps</i> usando o método K2 de probabilidade, e Cluster W para o alinhamento	160
Figura 46 – Árvore filogenética para o fungo mcc_A5_3, gerada no MEGA11 com 1000 <i>bootstresps</i> usando o método K2 de probabilidade, e MUSCLE para o alinhamento	161
Figura 47 – Árvore filogenética para o fungo mgk_C3_9, gerada no MEGA11 com 1000 <i>bootstresps</i> usando o método K2 de probabilidade, e <i>MUSCLE</i> para o alinhamento	163
Figura 48 – Árvore filogenética para o fungos do gênero <i>Fusarium</i> e <i>Albonectria</i> , gerada no MEGA11 com 1000 <i>bootstresps</i> usando o método K2+G de probabilidade, e <i>Cluster W</i> para o alinhamento	164
Figura 49 – Árvore filogenética para o fungo mgk_A5_5, gerada no MEGA11 com 1000 <i>bootstresps</i> usando o método K2 de probabilidade, e <i>Cluster W</i> para o alinhamento	165
Figura 50 – Árvore filogenética para os fungo mgk_C4_2 e mgk_B1_3, gerada no MEGA11 com 1000 <i>bootstresps</i> usando o método K2+I de probabilidade e <i>Cluster W</i> para o alinhamento	166
Figura 51 – Gráficos das médias com desvio padrão para o Ensaio de TTC resultados absorvância da amostra - absorvância do controle, observados em 450 nm.	167
Figura 52 – Espectro de ^1H obtidos em CDCl_3 , 128 scans, em 200 MHz (Bruker [®] DPX 200) para a reação do mgk_C3_9 em 96 h janela espectral de 0 a 12 ppm.	184
Figura 53 – Espectro de ^{13}C obtidos em CDCl_3 , em 100 MHz (Bruker [®] AVANCE I 400) para a reação do mgk_C3_9 em 96 h.	185

Figura 54 – Espectro de ^1H obtidos em CDCl_3 , 128 scans, em 200 MHz (Bruker [®] DPX 200) para a reação do mgk_C3_9 em 96 h, com integração completa, ampliado, janela espectral de 0 a 8 ppm.	186
Figura 55 – Espectro de de ^1H obtidos em CDCl_3 , em 400 MHz, com integração, Bruker [®] AVANCE I 400, 48 scans	187
Figura 56 – Espectro da fragmentação de massas para o ibuprofeno, controle para reação de biotransformação	190

Lista de tabelas

Tabela 1 – Crescimento celular fúngico na presença dos fármacos selecionados expressos em porcentagem (%) em relação ao controle positivo.	60
Tabela 2 – Resultados dos testes enzimáticos qualitativos para os melhores fungos.	81
Tabela 3 – Resultados para Lignina Peroxidase sendo o Álcool Veratílico o substrato enzimático.	83
Tabela 4 – Resultados para Manganês Peroxidase utilizando o complexo Mn_3^{+} -malonato como substrato enzimático.	85
Tabela 5 – Resultados para Lacase utilizando ABTS como substrato enzimático .	86
Tabela 6 – Perfil enzimático para as enzimas, em função dos substratos: lipase, com a sonda LiP1; epóxido-hidrolase com as sondas EPH1 e EPH2; Bayer-Village mono-oxigenase, com os substratos BVMO1 e BVMO2; e esterase, com a sonda Est1	91
Tabela 7 – Metabólitos formados na biotransformação do ibuprofeno por fungos .	101
Tabela 8 – Diluição utilizada para ensaio de citotoxicidade do ibuprofeno, a concentração final do fármaco na placa e os controles.	104
Tabela 9 – Deslocamentos espectrais de RMN para 1H em ppm das amostras de ibuprofeno em relação a literatura.	113
Tabela 10 – Deslocamentos espectrais de RMN para ^{13}C em ppm das amostras de ibuprofeno em relação a literatura, em 100 MHz.	117
Tabela 11 – Taxa de inibição do ibuprofeno em relação a cepas selecionadas.	117
Tabela 12 – Deslocamentos espectrais de RMN para 1H (200 MHz) e ^{13}C (100 MHz) em ppm das amostras de ibuprofeno em relação ao 2-hidroxi-ibuprofeno	123
Tabela 13 – Tabela de identificação para os isolados de interesse <i>C. canjerana</i> . . .	159
Tabela 14 – Tabela de identificação para os isolados de interesse <i>G. kunthiana</i> . . .	162
Tabela 15 – Tratamentos do ensaio TTC (Absorbância amostra - Absorbância do controle), valores média e desvio padrão	168
Tabela 16 – Perfil enzimático por sondas para o mcc_A3_5	172
Tabela 17 – Perfil enzimático avaliado por sondas para o mgk_C3_9	173
Tabela 18 – Perfil enzimático por sondas para o mgk_C4_2	174
Tabela 19 – Perfil enzimático avaliado por sondas para o mgk_B1_3	175
Tabela 20 – Perfil enzimático por sondas para o mgk_B1_1	176
Tabela 21 – Perfil enzimático por sondas para o mgk_A5_5	177
Tabela 22 – Perfil enzimático por sondas para o <i>Albonectria rigidiuscula</i> mgk_A3_15	178
Tabela 23 – Perfil enzimático por sondas para o mgk_A3_3	179
Tabela 24 – Perfil enzimático por sondas para o mcc_A4_9	180
Tabela 25 – Perfil enzimático por sondas para o mcc_A5_3	181

Lista de Quadros

4.1	Exemplos de Espécies da família Meliaceae com relatos de atividade etno- botânica.	46
5.1	Medicamentos utilizados no avaliação de suscetibilidade preliminar.	53
6.1	Identificação molecular e caracterização morfológica dos fungos endofíticos promissores para <i>Cabrelea canjerana</i>	60
6.2	Identificação e caracterização morfológica dos fungos endofítico promisso- res para <i>G. kunthiana</i>	62
7.1	Classificação geral de enzimas e suas atividades catalíticas.	70
B.1	Código dos isolados para árvore <i>C. canjerana</i>	157
B.2	Código dos isolados para árvore <i>G. kunthiana</i>	158

Lista de abreviaturas e siglas

AA	Aminoácidos
AA2	Enzimas auxiliares do tipo 2
ABTS	Ácido 2,20-azino-bis (3-etilbenzotiazoline-6-sulfônico)
ADH	Álcool desidrogenase
BSA	Bovine Serum Albumine
B.O.D	Demanda Bioquímica de Oxigênio
BVMO	Baeyer-Villiger Mono-oxigenase
CDCl ₃	Clorofórmio deuterado
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
<i>e.e</i>	Excesso enantiomérico
Est	Esterases
EPH	Epóxido-hidrolase
Lac	Lacase
LiP	Lignina Peroxidase
MnP	Manganês Peroxidase
MeOH	Metanol
(NAD(P)H)	Dinucleotídeo Nicotinamida Adenina
ODS	Objetivos para o Desenvolvimento Sustentável
ONU	Organização das Nações Unidas
PA	Grau analítico
PDA	Ágar Batata Dextrose
RFU	Unidades de Fluorescência Relativa
SUS	Sistema Único de Saúde

TTC Cloreto de 2,3,5-Trifeniltetrazólio

TMS Tetrametilsilano

Sumário

I	CONTEXTUALIZAÇÃO	31
1	INTRODUÇÃO	33
2	OBJETIVOS	37
3	ORGANIZAÇÃO DO TRABALHO	39
II	DA ESPÉCIE BOTÂNICA AOS FUNGOS ENDOFÍTICOS	41
4	ESPÉCIE BOTÂNICA E FUNGOS ENDOFÍTICOS	43
4.1	Fungos endofíticos	43
4.2	A escolha da Família botânica	44
4.2.1	Família Meliaceae	45
4.2.1.1	Fungos endofíticos isolados da família Meliaceae	47
4.2.1.2	O gênero Guarea	48
4.2.1.3	O gênero Cabralea	49
4.3	Objetivos	50
5	METODOLOGIA	51
5.1	Coleta	51
5.1.1	Metodologia para isolamento e preservação	51
5.1.2	Teste de suscetibilidade preliminar para seleção das cepas	52
5.2	Identificação	54
5.2.1	Identificação morfológica	54
5.2.2	Identificação molecular	54
5.2.2.1	Extração de DNA	54
5.2.2.2	Amplificação de DNA	56
5.2.2.3	Sequenciamento	56
5.2.2.4	Identificação	56
6	RESULTADOS E DISCUSSÃO	59
6.1	Coleta das plantas e o isolamento dos microrganismos	59
6.2	Seleção das cepas	59
6.3	Identificação dos fungos	59
6.4	Conclusão parcial	64

III	AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES ENZIMÁTICAS	67
7	FUNGOS ENDOFÍTICOS E PROSPECÇÃO ENZIMÁTICA	69
7.1	Fungos produtores de enzima	69
7.2	Enzimas	70
7.2.0.1	Ensaio de triagem enzimática	74
7.3	Objetivos	76
8	METODOLOGIA	77
8.1	Ensaio enzimático em placa de Petri	77
8.2	Avaliação das atividades enzimáticas utilizando sondas fluorogênicas	77
8.3	Avaliação quantitativa de enzimas extracelular por extrato enzimático	79
9	RESULTADOS E DISCUSSÃO: TRIAGENS ENZIMÁTICAS	81
9.1	Ensaio em placa	81
9.2	Ensaio por extrato enzimático	82
9.3	Ensaio miniaturizado por sondas fluorogênicas	87
10	CONCLUSÃO DOS ENSAIO DE ATIVIDADE ENZIMÁTICA	93
IV	REAÇÕES DE BIOTRANSFORMAÇÃO	95
11	BIOTRANSFORMAÇÃO	97
11.1	Biotransformações mediadas por fungos	97
11.1.1	Biotransformações mediadas por fungos endofíticos	98
11.2	Biotransformação do Ibuprofeno	100
11.3	Objetivos	101
12	METODOLOGIA	103
12.1	Controle de qualidade fármaco	103
12.1.1	Recristalização	103
12.1.2	Ponto de Fusão	103
12.1.3	Infra-vermelho	103
12.1.4	Ressonância magnética nuclear	103
12.2	Ensaio de citotoxicidade do ibuprofeno	104
12.3	Reação de biotransformação do Ibuprofeno	105
12.3.1	Extração	106
12.3.2	Análise química dos compostos formados	107
12.3.2.1	Cromatografia líquida de Alta Eficiência (HPLC)	107
12.3.2.2	Ressonância Magnética Nuclear (RMN)	107

12.3.2.3	Cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada ao espectrômetro de massas (UPLC-MS/MS)	107
13	RESULTADOS E DISCUSSÃO	109
13.1	Controle de qualidade fármaco	109
13.2	Ensaio de citotoxicidade do ibuprofeno	117
13.3	Avaliação da Biotransformação do Ibuprofeno	118
13.3.1	RMN e LC/MS do <i>Alternaria</i> sp. mgk_C3_9	119
13.3.2	LC/MS para <i>Albonectria rigidiuscula</i> mgk_A3_15	124
14	CONCLUSÃO	125
	Referências	129
	 APÊNDICES	 151
	APÊNDICE A – REAGENTES E SOLUÇÕES	153
A.1	Tampão Fosfato	153
A.2	Tampão Borato	153
A.3	Tampão Citrato	153
A.4	Tampão Malonato	153
A.5	Tampão Acetato	154
A.6	Solução de Fármacos	154
A.7	Meio de cultura – mínimo com glicose	154
A.8	Meio de cultura basal com ureia	154
A.9	Meio Czpack	155
A.10	Meio Muller-Hilton	155
A.11	Solução Salina 0,85 %	155
A.12	Tampão de extração do DNA	155
	APÊNDICE B – CÓDIGOS DOS ISOLADOS	157
	APÊNDICE C – IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DAS CEPAS PROMISSORAS	159
	APÊNDICE D – DADOS ESTATÍSTICOS DO TESTE DE SUS- CEPTIBILIDADE CELULAR	167
	APÊNDICE E – TABELAS COM OS DADOS ESTATÍSTICOS DOS ENSAIOS ENZIMÁTICOS REALIZADOS	171

APÊNDICE F – ESPECTROS DE RMN	183
APÊNDICE G – ESPECTROS DE MASSAS IBUPROFENO	189

Parte I

Contextualização

1 Introdução

Com o surgimento da civilização moderna e o vertiginoso crescimento populacional das últimas décadas, que atingiu a marca de 8 bilhões de habitantes, somados ao alto consumo de recursos naturais, tornou-se uma preocupação global a garantia da qualidade de vida das próximas gerações. Neste sentido, foram propostos 17 objetivos para o desenvolvimento sustentável (ODS) dentro da Agenda 2030 pela Organização Mundial das Nações Unidas (ONU) (Gorvett, 2022; ONU, 2023, 2015). Na figura 1 são apresentados os ODS.



Figura 1 – Os 17 objetivos para o desenvolvimento sustentável propostos pela ONU

Fonte: ONU, 2015.

Dentre os ODS propostos, são válidos de destaque no âmbito deste projeto o ODS3 - bem-estar e saúde; o ODS9 - indústria, inovação e infraestrutura; e o ODS12 - consumo e produção responsáveis que, junto aos 12 princípios da química verde, trazem luz sobre a importância do desenvolvimento de metodologias mais sustentáveis para a produção de insumos químicos, entre eles os fármacos (Chen, T.-L. *et al.* 2020; Veleva; Cue; Todorova, 2017)

A indústria química provê uma diversificada gama de produtos à sociedade, que vai de combustíveis a medicamentos, sendo responsável pelo consumo de diferentes recursos naturais, tornando-a ponto central na nova e necessária revolução industrial sustentável (Mohan; Katakojwala, 2021). Contudo, para que haja uma mudança de cenário e, de fato, se atinja à sustentabilidade, é preciso integrar diferentes áreas do conhecimento, como a biotecnologia e a química (Chen, T.-L. *et al.* 2020; Marques *et al.* 2020; Mohan; Katakojwala, 2021).

Em uma produção convencional de fármacos, o volume de resíduos varia entre 25 a 100 Kg por Kg de substância produzida, sendo, portanto, necessário um replanejamento e otimização do processo para que haja uma adequação aos preceitos do desenvolvimento sustentável (Veleva; Cue; Todorova, 2017; Chen, T.-L. *et al.* 2020; Marques *et al.* 2020; Mohan; Katakojwala, 2021).

Dentre as estratégias para melhoria dos processos, a utilização de rotas biocatalíticas desponta como uma das mais promissoras, propiciando o aumento do rendimento, uma melhora no balanço de massas e redução do uso de solventes. A Pfizer[®], por exemplo, reduziu o *e*-fator¹ para a produção do antipsicótico pregabalina (Lyrica[®]) de 89 para 9, ao incluir uma etapa enzimática na síntese deste fármaco (Figura 2) (Devine *et al.* 2018; Veleva; Cue; Todorova, 2017).

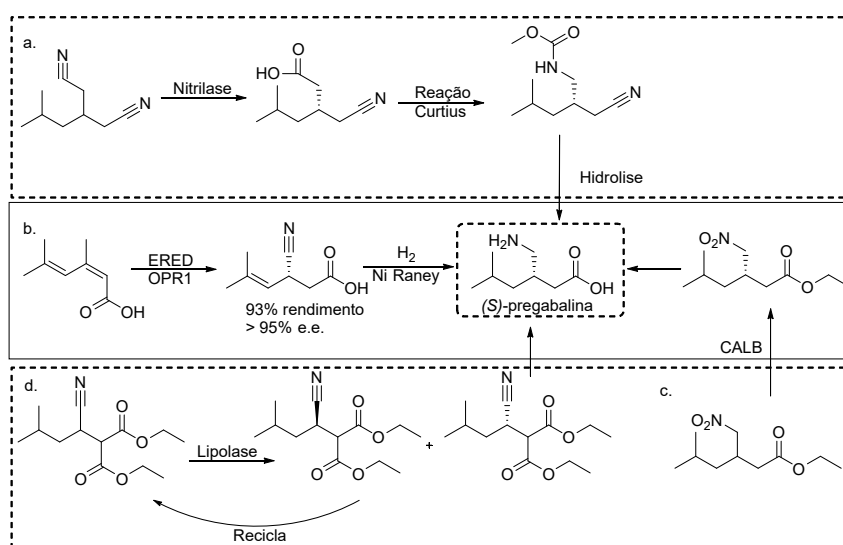


Figura 2 – Rotas biocatalíticas para obtenção da (S)-Pregabalina (Pfizer[®]) com o uso de enzimas: a – Hidrólise – rearranjo - hidrólise. b – hidrogenação exaustiva. c – enriquecimento enantiomérico. d – Epimerização seguida de redução. CALB, *Candida antarctica* lipase B; e.e., excesso enantiomérico; ERED, ene redutase; OPR1, 12-oxofitodienoato redutase 1.

Fonte: Adaptado Devine *et al.*, 2018.

O advento da biocatálise nos últimos anos foi exponencial; diversos fatores contribuíram para isso, seja a engenharia genética, a redução dos custos de identificação molecular, as novas tecnologias de imobilização, permitindo o uso das enzimas em mais de um ciclo, entre outros (Truppo, 2017). O emprego de biocatalisadores em cascata e a especificidade das reações a serem realizadas, a exemplo da rota biossintética para o fármaco pregabalina, elucidam a eficiência dos processos biotecnológicos na indústria e a necessidade da busca por enzimas capazes de sanar as mais diversas necessidades do setor produtivo (Gonçalves; Lima *et al.* 2019; Truppo, 2017).

As enzimas produzidas por microrganismos apresentam vantagens significativas em relação às de origem vegetal ou animal, como maior estabilidade e atividade (Anbu *et al.* 2017). Além disso, a facilidade de manipulação em laboratório, a alta taxa metabólica, que reduz o tempo necessário para o início das reações de biotransformação, torna os microrganismos uma alternativa altamente viável (Singh, 2017; Singh, R. *et al.* 2016).

¹ O *e*-fator (fator ambiental), indicador criado para medir o impacto no meio ambiente dos processos industriais farmacêuticos, considera o volume de resíduos gerados no processo e, quanto menor o valor do índice, mais eficiente foi o processo

Essas características ressaltam a relevância da prospecção de microrganismos capazes de sintetizar enzimas com propriedades de interesse biotecnológico. Nesse contexto, explorar recursos microbianos provenientes de diferentes ambientes é uma estratégia promissora para a busca de novos biocatalisadores (Gonçalves; Lima *et al.* 2019).

Adicionalmente, 50% dos fármacos hoje disponíveis são quirais, que, devido aos elevados custos associados à síntese enantiosseletiva e à separação dos enantiômeros, comumente são comercializados em mistura racêmica, o que muitas vezes diminui sua efetividade terapêutica, sendo necessária a administração de doses maiores para compensação (Albuquerque; Gaitani; Oliveira, 2015; Evans; Bagnall; Kasprzyk-Hordern, 2017; Marques *et al.* 2020). Como alternativa, o emprego de enzimas microbianas, tais como as produzidas por fungos filamentosos, pode colaborar para o desenvolvimento de rotas enantiosseletivas, mais baratas e eficientes do que as rotas de síntese clássicas (Palaric *et al.* 2019).

Soma-se, ainda, o fato de que o estudo da microbiologia mostrou que a interação dos fungos endofíticos - encontrados no tecido de plantas ou animais invertebrados - com o hospedeiro está associada à produção de compostos bioativos e, por vezes, à metabolização de agentes patogênicos (Borges *et al.* 2009; Toghueo; Boyom, 2019). Assim, a investigação destes microrganismos visando à potencial aplicação deles em processos de biotransformação de fármacos pode trazer resultados inéditos e promissores quanto aos produtos de suas atividades biológicas, bem como para estudos de farmacocinética e toxicidade de diversas moléculas, por sua mimetização do sistema citocromo P450 (CYP450), sem o uso de animais, uma vez que mamíferos e os fungos apresentam similaridade no complexo da CYP450, e que este é responsável pela metabolização de muitos fármacos em humanos (Borges *et al.* 2009; Dube; Kumar, 2017; He *et al.* 2022).

O uso da biotecnologia trouxe maior competitividade ao setor e as indústrias farmacêuticas que investiram em bioprocessos obtiveram melhores resultados financeiros (Fukuyama; Matousek; Tzeremes, 2023). Isso porque o emprego de enzimas na indústria farmacêutica pode reduzir o tempo de desenvolvimento de novos fármacos significativamente, uma vez que, em muitos casos, a síntese é um dos fatores limitantes. Além disso, as enzimas, frequentemente enantiosseletivas, podem reduzir etapas nesse processo. Seu poder catalítico, na faixa de 10^{12} , contribui para aumentar a velocidade das reações (Veleva; Cue; Todorova, 2017; Truppo, 2017; Faber, 2000). Deste modo, a investigação de fungos endofíticos com esta capacidade pode auxiliar na busca pelo desenvolvimento sustentável, possibilitando o melhor aproveitamento dos recursos e a otimização de processos.

2 Objetivos

Prospectar o potencial enzimático de fungos endofíticos isolados de *Guarea kunthiana* e *Cabranea canjerana* frente à biotransformação de fármacos.

Neste sentido, foram propostos os seguintes objetivos específicos: isolar fungos endofíticos das espécies nativas; avaliar as atividades enzimáticas dos isolados; avaliar o potencial de biotransformação de fármacos pelos fungos selecionados; e identificar os fungos que apresentaram maior potencial enzimático.

3 Organização do trabalho

O presente trabalho foi dividido em quatro partes; a organização é apresentada no Fluxograma a seguir (Figura 3).

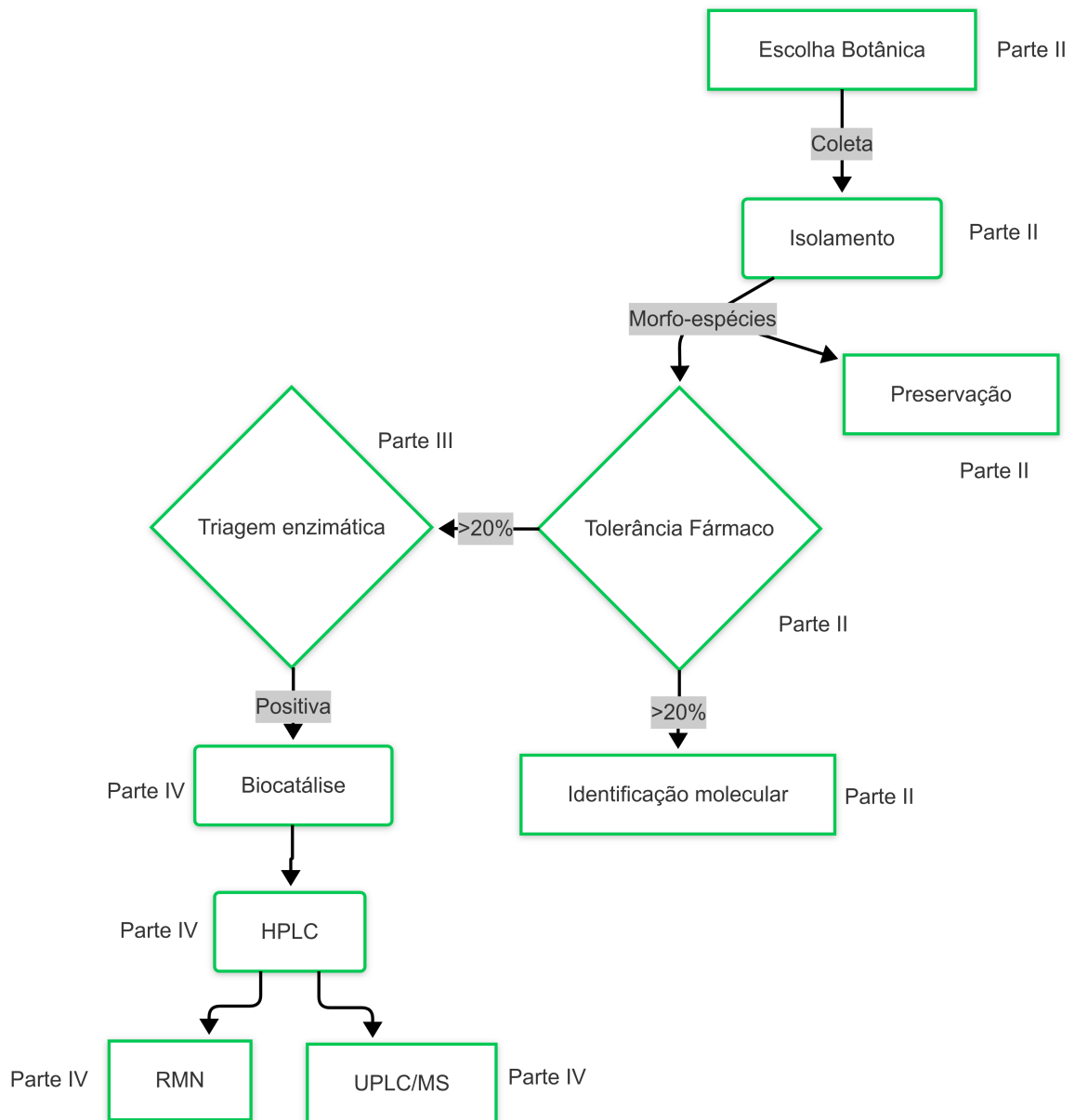


Figura 3 – Fluxograma norteador da organização do presente trabalho

Fonte: Autora, 2025.

Parte II

Da espécie botânica aos fungos endofíticos

4 Espécie botânica e Fungos endofíticos

4.1 Fungos endofíticos

O uso de produtos naturais para o tratamento de doenças acompanha o desenvolvimento das civilizações. Plantas, fungos e animais são utilizados na medicina tradicional de vários povos e são fontes de diferentes compostos bioativos (Cragg; Newman, 2001; Newman; Cragg, 2020). Tal conhecimento é considerado como base para uma exploração técnico-científica na busca de compostos para a solução de doenças e outras necessidades da sociedade, corroborando para um desenvolvimento mais sustentável (Bohlin *et al.* 2010; Tiwari; Bae, 2022).

Nesse contexto, e com o desenvolvimento da biotecnologia nas últimas décadas, os microrganismos passaram a ter uma importância crescente, atingindo as mais diversas áreas do conhecimento. Sua gama de aplicações vai desde o auxílio a uma produção mais eficiente e sustentável de alimentos até a busca por fontes limpas de energia (Babu; Sarma, 2019; Bhattacharyya; Goswami; Bhattacharyya, 2016).

O interesse em especial pelos fungos é mais recente na história do uso de produtos naturais. Este grupo microbiano ganhou notoriedade em 1929, quando o antibiótico penicilina foi isolado do fungo *Penicillium notatum*, tornando-se um importante aliado da medicina durante a Segunda Guerra Mundial (Cragg; Newman, 2001). Nas décadas seguintes, com o crescente interesse da indústria química, surgiram muitos outros estudos no campo medicinal resultando em novos antibióticos, antiparasitários e até mesmo anti-neoplásicos de origem fúngica. Os importantes antitumorais taxol, vimblastina (Figura 4) e vincristina, por exemplo, inicialmente haviam sido identificados como sendo produzidos por plantas, no entanto são oriundos de fungos endofíticos. Tais descobertas destacam os microrganismos como fontes de compostos bioativos (Hopkins *et al.* 2007; Tadych; White, 2019; Vasundhara; Reddy; Kumar, 2019; Tiwari; Bae, 2022).

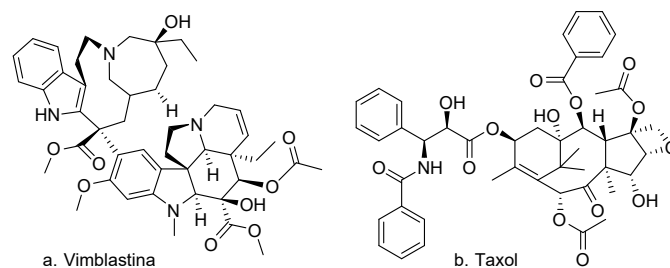


Figura 4 – Complexidade estrutural dos metabólitos isolados de fungos endofíticos a. Vimblastina e b. Taxol.

Estima-se que existam aproximadamente 1,5 milhões de espécies de fungos, porém, apenas cerca de 10 % foram descritas, novos estudos sugerem uma evolução não uniforme do genoma das espécies de mesmo taxon (Hawksworth, 2012; Sota *et al.* 2013; Merényi *et al.* 2023). Com distribuição ubíqua, os fungos habitam as mais diversas e adversas partes do planeta, tendo como principais grupos ecológicos os extremófilos, fungos de solo, aquáticos, macrofungos, microfungos de plantas (endofíticos e epifíticos) e os liquenizados (Chamberg; Valencia, 2016; Mueller; Schmit, 2007).

Os fungos endofíticos vivem em tecidos de plantas em um regime de mutualismo, recebendo nutrientes da planta hospedeira, enquanto fornecem metabólitos que irão contribuir para o desenvolvimento do hospedeiro (Vasundhara; Reddy; Kumar, 2019; Tiwari; Bae, 2022).

Contudo, a linha que separa o fitopatógeno do endofítico é tênue. Isso porque, em condições adversas de nutrição, ou mesmo no processo de colonização da planta, podemos ter que os antes benignos fungos possam levar ao surgimento de doenças, por exemplo, a cancrose da pinha *Annona squamosa* causada pelo fungo *Albonectria rigidiuscula* (Oliveira, F. C. *et al.* 2017; Mehta; Meena; Nagda, 2022; Sudha *et al.* 2016).

Ademais, a patogenicidade dos fungos endofíticos está associada à expressão ou não de genes, fazendo com que dentro da espécie ainda seja possível encontrar cultivares mais ou menos agressivos em decorrência da expressão de determinadas enzimas (Naveen *et al.* 2021; Queiroz *et al.* 2019).

Vale salientar que o local de coleta da planta hospedeira pode influenciar de forma significativa os compostos encontrados e os fungos associados (Toghueo; Boyom, 2019; Větrovský *et al.* 2019). Assim, presume-se que a expressão enzimática também é afetada, já que a presença de enzimas está ligada ao metabolismo dos microrganismos, fato que pode ser observado no estudo sobre a biotransformação de terpenos por *Trametes elegans* (Spreng.) Fr. isolado da *Otoba gracilipes* (Myristicaceae), apresentou resultados diferentes do *T. elegans* (Spreng.) Fr. isolado do tronco na região de Antioquia (Colômbia) que sob as mesmas condições reacionais (Jaramillo *et al.* 2020).

Há duas classes de endofíticos: a classe 1, que engloba os organismos associados a plantas não vasculares e insetos, e a classe 2, denominada *Non-clavicipitaceous*, caracterizada pela associação com plantas vasculares (Khiralla, 2016), sendo que esta última representa o foco de interesse do presente projeto.

4.2 A escolha da Família botânica

Este tópico tem como objetivo elucidar a escolha das plantas que foram objeto de investigação inicial sobre sua microbiota.

Deste modo, em 2020 iniciou-se uma revisão sobre famílias botânicas que pudessem ser interessantes para investigação da microbiota. Como ponto de partida, a etnobotânica foi fundamental. A família Meliaceae foi a escolhida por sua importância, que será descrita neste capítulo, e também por terem sido encontrados poucos estudos referentes à microbiota.

Face ao exposto, buscou-se no banco de dados do Sistema de informação sobre a Biodiversidade Brasileira (SiBBr) pelos depósitos do herbário Evaldo Buttura da UNILA, plantas que fossem nativas da região e pertencentes à Meliaceae. Nesta busca, destacou-se as espécies *Guarea macrophylla* (camboatá), *Guarea kunthiana* (peloteira), *Cabrela canjerana* (cedro-canjerana) e *Trichilia elegans* (pau-de-ervilha) (SiBBr, 2020).

Por fim, os estudos prosseguiram com as *Guarea kunthiana* e *Cabrela canjerana*, as quais não havia relatos sobre sua microbiota, e pela disponibilidade de coleta.

4.2.1 Família Meliaceae

A família Meliaceae tem uma ampla distribuição, sendo encontrada nos continentes Africano, Asiático e nas Américas Central e do Sul. Somente no Brasil esta família é representada por mais de 100 espécies, com vasta amplitude territorial, indo desde a Amazônia até a região Sul (Pandini *et al.* 2017; Pennington; Clarkson, 2013).

Relatos etnobotânicos sobre esta família mostram potenciais diversos, de tratamento de doenças sexualmente transmissíveis a uso como analgésicos, passando pelo uso em rituais religiosos e na agricultura como biopesticida. No Quadro 4.1 é apresentado um breve resumo, com algumas espécies de Meliaceae e suas aplicações na medicina tradicional. Em uma revisão do uso popular de plantas dessa família na África do Sul foram indicadas mais de 80 aplicações (Oyedeji-Amusa; Sadgrove; Wyk, 2021).

Quadro 4.1 – Exemplos de Espécies da família Meliaceae com relatos de atividade etnobotânica.

Espécie	Uso medicinal	Região / País	Referência
<i>Cedrela fissilis</i> Vell.	anti-séptico	Nordeste, Brasil	(Teixeira; Melo; De, 2006)
	infecções fúngicas conhecidas como pano-branco, escara e depurativo	Sudeste, Brasil	(Fagundes; Oliveira; Souza, 2017)
<i>Carapa guianensis</i> Aubl	reumatismo, dor de garganta, tosse, luxação	Norte, Brasil	(Mesquita <i>et al.</i> 2020)
	gripe, tosse, diarreia, febre, antibiótico, luxação	Norte, Brasil	(Vásquez; Mendonça; Noda, 2014)
<i>C. procera</i> D.C.	inflamação de garganta e batidas	Norte, Brasil	(Mesquita <i>et al.</i> 2020)
<i>Lansium domesticum</i>	malária	Indonésia	(Rudiyansyah <i>et al.</i> 2019)
<i>Khaya senegalensi</i>	malária	Nigéria	(Ndana, 2016)
<i>Azadirachata indica</i> A. Juss	Diabetes, gengivite periodontia, problemas de pele e gastrointestinais, repelente, malária	Índia subcontinental	(Sujarwo <i>et al.</i> 2016)
	Diabetes, dores de cabeça, diurético, problemas gastrointestinais	Bali, Indonésia	
	Diabetes	Nordeste, Brasil	(Silva <i>et al.</i> 2015)

Fonte: Autora, 2025.

Em um outro estudo, desta vez com a *Azadirachata indica* A. Juss, foi realizado um comparativo entre a etnobotânica de Bali na Indonésia e da Índia subcontinental, sendo observado uma variabilidade entre os usos desta planta e os povos ancestrais da região, os autores atribuíram as diferenças entre as populações ao grau de influência da medicina *Ayurveda*¹ (Sujarwo *et al.* 2016). No Brasil, esta espécie também é utilizada para diabetes, doenças gastrointestinais e dores de cabeça (Silva *et al.* 2015).

Investigações fitoquímicas apontam uma vasta capacidade quimiossintética para esta família botânica, tendo relatos de produção dos metabólitos secundários: esteroides, terpenos, limonoídes e cumarinas (Pandini *et al.* 2017; Lago; Roque, 2009; Júnior, 2003).

¹ Medicina tradicional do povo Indiano

A classe dos limonóides se destaca, sendo reportados mais de 200 compostos (Fan *et al.* 2022). Destacam-se os estudos com a madeira de *Guarea macrophylla* que apresentou diversos terpenoides e também derivados do sosterol (Lago; Roque, 2009); e o estudo com as folhas da *Carapa procera* que permitiu o isolamento do composto 5,6-De-hidro-7-deacetoxi-7-oxogeduino (Figura 5a) com atividade anti-câncer, superiores ao do taxol (Dioum *et al.* 2016).

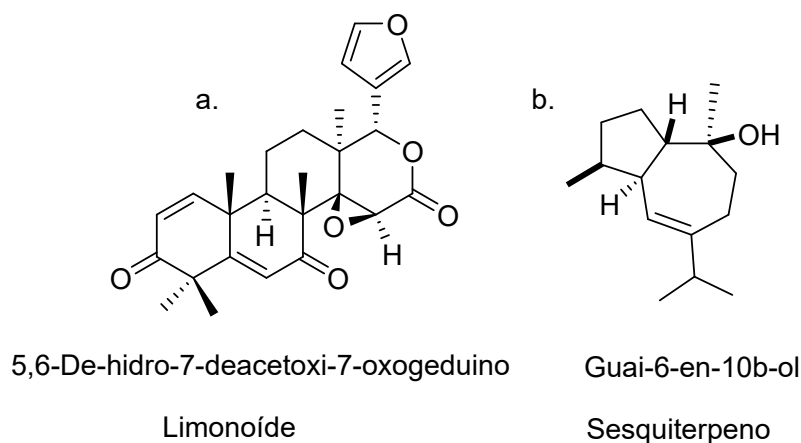


Figura 5 – Exemplo da diversidade estrutural da família Meliaceae a.Limonóide e b.Sesquiterpeno.

Fonte: Adaptado de Dioum *et al.*, 2016, Lago; Roque, 2009.

4.2.1.1 Fungos endofíticos isolados da família Meliaceae

A produção de metabólitos secundários pelas plantas está intimamente ligada a estímulos ambientais, e a presença de microrganismos endofíticos, como fungos (Teoh, 2016). Diante das aplicações desta família, e da comprovada diversidade química de seus metabólitos secundários (Fan *et al.* 2022), estudos com os fungos endofíticos isolados de espécies da família Meliaceae têm sido conduzidos por diferentes grupos de pesquisa, em países como Brasil, Indonésia e Nigéria.

Em uma investigação para conhecer o perfil de fungos associados a planta medicinal africana *Khaya senegalensi*, foram isoladas 126 cepas distintas, o gênero *Rhizoctonia* foi o mais abundante (Ndana, 2016).

Em outro estudo, desta vez realizado no Brasil, com a Meliaceae amazônica *Carapa guianensis*, mais de 150 espécies de fungos endofíticos foram isolados, dos quais 20 foram submetidos à extração de seus compostos em etanol, os quais foram utilizados nos ensaios biológicos. São válidas de destaque a espécie *Pilidiella wangiensis*, que demonstrou atividade antimicrobiana; as espécies *Diaporthe cf. mayteni* e *Endomelanconiopsis endophytica*, que apresentaram ação antiprotozoária; e a espécie *Phomopsis subordinaria*, que se mostrou ativa contra a *Candida albicans* (ATCC 60193); sendo ainda que outras espécies apresentam potencial antiviral (Ferreira *et al.* 2015).

Destaca-se também os estudos realizados por Rhoden e colaboradores com a *Trichilia elegans*, coletada no estado do Paraná, onde encontraram 97 espécies diferentes de fungos endofíticos. O extrato bruto das cepas das espécies *Cordyceps memorabilis*; *Phomopsis longicolla* e a *Dothideomycete* sp., apresentaram atividade antibacteriana (Rhoden *et al.* 2012; Rhoden, 2012).

Os metabólitos secundários produzidos por fungos endofíticos isolados de Meliaceae são objeto de estudos, como por exemplo o estudo realizado na Indonésia com a planta medicinal *Lansium domesticum* onde fungos da família Xylariaceae foram identificados como os produtores de novas moléculas de arugosinas (Rudiyansyah *et al.* 2019). No Brasil o fungo *Penicillium* sp. isolado da *Melia azedarach* foi relatado como produtor de meroterpenos, que apresentaram atividade bacteriostática frente a *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Bacillus* sp. (Santos; Rodrigues-Fo, 2002, 2003).

4.2.1.2 O gênero *Guarea*

O gênero *Guarea* é um dos principais da família Meliaceae, contemplando 69 espécies (Pennington; Clarkson, 2013). Estudos fitoquímicos com o gênero indicam que os sesquiterpenos, que são compostos derivados do isopreno com 15 carbonos em sua cadeia principal, são os principais metabólitos secundários produzidos por este gênero (Safriansyah *et al.* 2022).

Contudo, poucos estudos analisaram os fungos endofíticos destas plantas. O estudo realizado por Gamboa e colaboradores (2001) em Porto Rico com a espécie *Guarea guidonia*, coletada em áreas de floresta e em áreas mais antropizadas, demonstrou uma maior diversidade de isolados de fungos endofíticos na área mais preservada; sendo *Phomopsis* o gênero mais abundante, seguido por *Colletotrichum* (Gamboa; Bayman, 2001). Já em outro estudo com endofíticos, também da *G. guidonia*, encontrou maior abundância de espécies pertencentes ao gênero *Phomopsis*, seguido por espécies de *Phyllosticta* spp. (Gamboa Gaitan *et al.* 2005).

A espécie selecionada do gênero *Guarea* foi a *G. kunthiana* A. Juss. (Meliaceae), a qual apresenta as sinonímias *G. pohlii* e *G. simplicifolia*. Tem distribuição geográfica ampla, é chamada popularmente de cedro bravo, jitó, peloteira e carrapeta. Em estudos com o extrato de suas folhas mostraram atividades leishmanicida (Lima, 2006), larvicida (Sarmiento *et al.* 2016), antiparasitária (Pereira, 2016), carrapaticida (Silva Barbosa, 2012) e antioxidante e antimicrobiana (Pandini *et al.* 2017).

A *G. kunthiana* apresenta como características botânicas: folhas com raque canaliculada, e folíolos opostos, de formato elíptico ou em lança, o ápice atenuado ou cuspidado. A nervação é eucamptódroma, e a face abaxial pode ser glabra ou pubescente, com gema terminal presente. Já a inflorescência ocorre de forma axilar ou ramiflora. As flores pos-

suem cálice com indumento estrigoso na face externa, corola com pré-floração valvar e a face externa apresenta-se com indumento estrigoso, piloso ou pubescente. O tubo estaminal tem face externa glabra ou estrigosa, enquanto o ovário é glabro, com dois óvulos por lóculo. Os frutos são elipsoides, globosos ou obovóides, com ápice arredondado, textura lisa e indumento glabro (Flores, 2020).

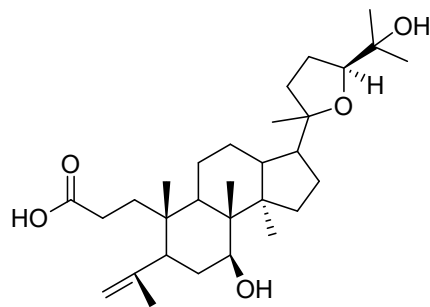
4.2.1.3 O gênero *Cabralea*

O gênero *Cabralea* tem estrutura particular, com apenas uma espécie, a *Cabralea canjerana* (Oliveira Melo; Franceschinelli, 2016). Possui distribuição ampla, da Costa Rica a Argentina, e é um importante gênero para recomposição vegetal de áreas degradadas da Mata Atlântica. Sua madeira é resistente a organismos xilófilos sendo muito utilizada para móveis e construção civil, possuindo alto valor de mercado. Com coloração avermelhada, a madeira também é empregada na indústria têxtil para tingimento (Felippi; Araújo; Longhi, 2015). Já do ponto de vista medicinal, a casca é empregada pelos indígenas do Mato Grosso do Sul para o tratamento de problemas na pele (Bueno *et al.* 2005). A espécie *C. canjerana* (Vell.) Mart. popularmente é chamada de canjerana (Felippi; Araújo; Longhi, 2015).

A planta tem como características botânicas ser hermafrodita. Os ramos jovens apresentam indumento variável, podendo ser puberulosos, pubescentes, velutinosos ou vilosos, com lenticelas às vezes presentes. As folhas geralmente são paripinadas, raramente imparipinadas, medindo 10-80 cm de comprimento, com pecíolo semiterete e ráquis terete, ambos apresentando indumento variável. Os folíolos, opostos ou subopostos, geralmente oblongos, apresentam base assimétrica e ápice atenuado ou acuminado, podendo ter superfícies superiores glabras ou pubescentes, frequentemente com excrescências crateriformes e papilas vermelhas minúsculas. As flores, bissexuais ou unissexuais, formam inflorescências axilares ou agrupadas, com cálice pateliforme e pétalas livres. O tubo estaminal possui 9-12 apêndices alternando com anteras, e o ovário semi-inferior é pubescente, com lóculos contendo óvulos superpostos. A cápsula é globosa ou elipsoidal, com valvas contendo 1-2 sementes envolvidas parcialmente por um arilódio carnoso (GARDENS, 2024).

Estudos fitoquímicos mostram uma diversidade metabólica para *Cabralea canjerana*; por exemplo, da madeira, a partir de extrações em hexano, diclorometano e metanol, foram isolados diferentes triterpenos (Figura 6) espécie (Campos Braga *et al.* 2006). A prospecção de atividade para os extratos obtidos de sementes em acetato de etila foi efetiva no combate a moscas da fruta (*Anastrepha fraterculus*) (Magrini, Flaviane Eva *et al.* 2014). Em outro estudo, a aplicação de extrato alcoólico e em acetato de etila das sementes de *C. canjerana* mostrou-se eficiente para o combate da praga *Spodoptera frugiperda*, impedindo o desenvolvimento das larvas, este nematoide costuma atacar as lavouras de feijão e algodão, o estudo ainda indica que a presença de triterpenos como os responsáveis

pela atividade (Magrini, Flaviane E. *et al.* 2015).



ácido 20S,24S-epoxi-7β,25-di-hidroxi-3,4-secodammar-4(28)-en-3-oíco

Figura 6 – Triterpeno isolado da *C. canjerana* em extrato metanólico.

Fonte: Adaptado de Campos Braga *et al.*, 2006.

4.3 Objetivos

Esta etapa do trabalho teve como objetivo selecionar espécies vegetais regionais relevantes e pouco estudadas, isolamento de fungos endofíticos e a identificação, bem como a seleção das cepas a serem estudadas nas próximas etapas.

5 Metodologia

5.1 Coleta

A coleta das espécies vegetais de interesse foi realizada no 22 de maio de 2021, no início da tarde no refúgio biológico Bela Vista, área de recuperação ambiental mantida pela Usina Hidroelétrica Itaipu Binacional, no município de Foz do Iguaçu. Os pontos de coleta foram registrados pelo *Google Maps*, para *Guarea kunthiana* foram obtidas as seguintes coordenadas: P1. 25°26'57.3"S 54°33'13.0"W, P2. 25°26'56.4"S 55°33'14.7"W, P3. 25°26'56.3"S 54°33'15.0"W, P4. 25°26'57.4"S 54°33'12.9"W. O exemplar de *Cabrelea canjerana* foi coletado no ponto 25°26'56.4"S 54°33'12.8"W. Na figura 7 é amostrada as plantas coletadas.

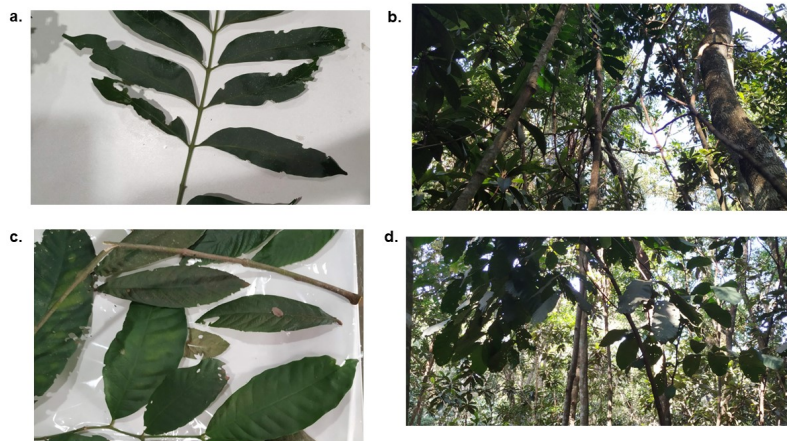


Figura 7 – a. Folhas de *Cabarela canjerana*, b. Árvore *C. canjerana*, c. Folhas de *Guarea kunthiana*, d. Árvore *G. kunthiana*

Fonte: Autora, 2025.

5.1.1 Metodologia para isolamento e preservação

Para o isolamento dos fungos endofíticos, folhas e galhos das espécies selecionadas e de aspecto saudável foram coletados e acondicionados em sacos plásticos limpos e vedados para transporte. Posteriormente, os materiais foram lavados em água corrente para remoção de sujidades superficiais, em sequência embebidos em solução de hipoclorito de sódio, NaClO, a 5 % por 5 minutos, em seguida colocados em álcool 70 % por 5 minutos, e por fim, lavados em água deionizada estéril duas vezes para a devida assepsia (Rhoden *et al.* 2012).

Com auxílio de um bisturi estéril, as folhas e galhos foram cortados em pedaços de aproximadamente 5 mm de comprimento (Gamboa; Bayman, 2001), e dez (10) fragmentos foram acomodados em placas de Petri com 90 mm de diâmetro, com meio PDA (água batata dextrose) e cloranfenicol ($0,07 \text{ g.L}^{-1}$) para o desenvolvimento de microrganismos endofíticos. As placas foram mantidas a $28 \text{ }^\circ\text{C}$ em estufa B.O.D por 48 h a 120 h.

Para a *G. kunthiana*, foram processadas cinco folhas de três árvores, além de um (1) fruto. Já da *C. cabrelea*, foram processadas cinco folhas de uma árvore.

Para controle da assepsia do material, foram inoculados $100 \text{ }\mu\text{L}$ da água residual do último enxágue do processo de lavagem das folhas em placa de Petri com PDA, incubadas por igual período ao das amostras.

O plaqueamento em PDA foi repetido até a obtenção de isolados fúngicos, que foram separados de acordo com a morfologia das culturas. Os microrganismos obtidos foram preservados em solução de glicerol a 20 % em água e armazenados em freezer a $-80 \text{ }^\circ\text{C}$, em duplicata.

5.1.2 Teste de suscetibilidade preliminar para seleção das cepas

A seleção dos fármacos foi feita de acordo com o emprego deles no Sistema Único de Saúde (SUS) no município de Foz do Iguaçu - PR, no período de 2017 a 2020 (PMFI, 2017), pertencentes a 5 classes terapêuticas, conforme Quadro 5.1. As estruturas químicas dos fármacos utilizados são apresentadas na Figura 8.

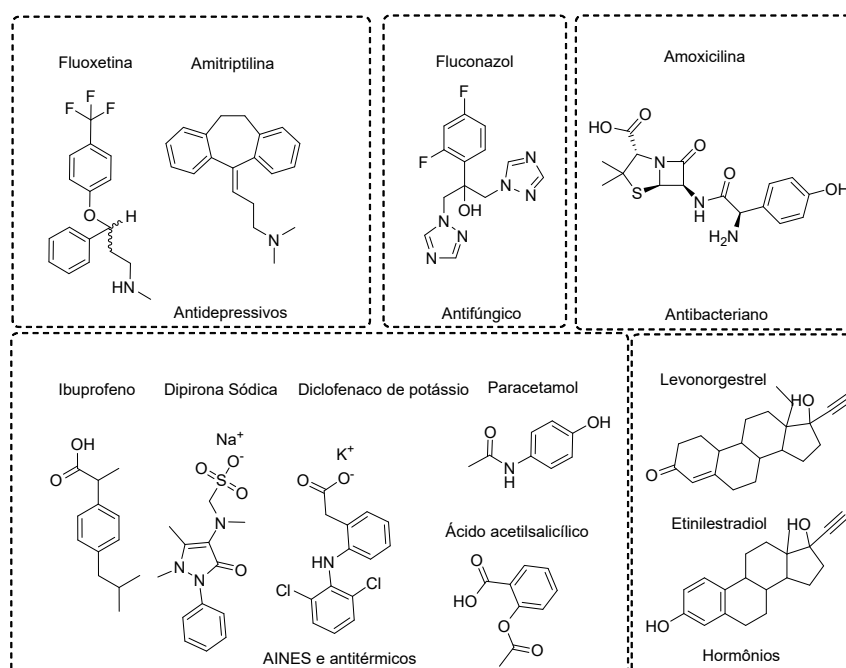


Figura 8 – Estruturas químicas dos diferentes fármacos utilizados no teste de susceptibilidade.

Quadro 5.1 – Medicamentos utilizados no avaliação de suscetibilidade preliminar.

Fármaco e Dosagem	Forma Farmacêutica	Classe terapêutica	Laboratório
Paracetamol (500 mg)	Comprimido	antitérmicos e analgésico	Hipolabor Farmacêutica
Ácido acetilsalicílico (AAS) (100 mg)	Comprimido	antitérmicos e analgésico	Medicamentos Custódia
Dipirona sódica monohidratada (500 mg)	Comprimido	antitérmicos e analgésico	Prati Donaduzzi
Ibuprofeno (600 mg)	Comprimido	anti-inflamatórios não esteroides (AINES)	Prati Donaduzzi
Diclofenaco sódico (100 mg)	Comprimido	anti-inflamatórios não esteroides (AINES)	EMS
Cloridrato de amitriptilina (25 mg)	Cápsula	antidepressivos	EMS
Cloridrato de fluoxetina (20)	Cápsula	antidepressivos	TEUTO
Etinilestradiol(30 mcg) e Levonorgestrel (150 mcg)	Comprimido	hormônios	União Química
Amoxicilina (500 mg)	Cápsula	antimicrobianos (anti-biótico)	Teuto
Fluconazol (150 mg)	Comprimido	antimicrobianos (anti-fúngico)	EMS

Fonte: Autora, 2025.

Os fungos endofíticos foram cultivados em meio mínimo acrescidos de $0,5 \text{ g.L}^{-1}$ de glicose, enriquecidos com solução dos fármacos em uma concentração final de 10 mg.L^{-1} , incubados por 48 h em *shaker* sob agitação orbital (150 rpm) a 28°C (Ivshina *et al.* 2019). Para tal, foram utilizados tubos de ensaio com tampa de 10 mL, com 3 mL de meio e 1 disco de 6 mm de diâmetro (inóculo) e $600 \mu\text{L}$ da solução de fármaco. O controle positivo consistiu na incubação de 1 disco de 6 mm de diâmetro de cada fungo recém crescido, com 3 mL de meio em tubo de 10 mL, sendo as mesmas condições de temperatura e agitação que as amostras testadas.

Após esse período, adicionou-se $300 \mu\text{L}$ de uma solução aquosa de cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio (TTC) (0,5 %), que na presença de células viáveis é convertido em formazana, que por sua vez é detectado em $\lambda = 450 \text{ nm}$ no UV; e incubou-se por 2 h em *shaker* com agitação de 150 rpm a 28°C . Para a leitura, o sobrenadante das amostras e do controle positivo foram transferidos para a microplaca de fundo chato (Kasvi[®]) de 96 poços, e a absorbância foi determinada em leitor de microplacas (Celer[®] modelo Polaris) em um comprimento de onda de 450 nm (Moussa *et al.* 2013). Como controle negativo, o meio mínimo, o fármaco e o TTC.

Para definir a porcentagem (%) de susceptibilidade considerou-se que o controle

positivo era igual ao crescimento máximo; os valores da absorbância do controle negativo foram descontados de todas as amostras. Por fim, aplicou a equação 5.1:

$$\text{tolerância}\% = \frac{\bar{x} \cdot 100}{\bar{c}p} \quad (5.1)$$

Onde \bar{x} é a média dos valores de absorbância das amostras já subtraídos do controle negativo, e $\bar{c}p$ é a média dos valores de absorbância encontrados para o controle positivo.

5.2 Identificação

5.2.1 Identificação morfológica

Para identificação morfológica, foram preparados os microcultivos com adaptações ao método da ANVISA. Os fungos foram reativados em placas de Petri com meio PDA por 7 dias a 28°C em B.O.D. Posteriormente, foram inoculados em meio extrato de malte líquido, incubados em *shaker* sob agitação orbital (150 rpm) a 28°C por 7 dias. Por fim, foram inoculados 50 μL do meio com fungo em lâmina com meio PDA e recobertos com a lamínula, incubados por 7 dias a 28°C. Ao final, as lâminas foram coradas utilizando azul de algodão com lactofenol (Êxodo Científica®), a leitura foi realizada em microscópio óptico (Primostar 3 - Zeiss®) para observação das estruturas morfológicas: hifas, conidióforo e de reprodução - conídios (ANVISA, 2022).

5.2.2 Identificação molecular

Esta etapa foi realizada em colaboração com a Professora Dra. Rafaella Costa Bonugli Santos do Laboratório de Bioquímica e Microbiologia - LABIMIC (UNILA).

5.2.2.1 Extração de DNA

A extração do DNA (Ácido desoxirribonucleico) foi feita pelo método fenol-clorofórmio. Onde os isolados recém crescidos por 7 dias em 10 mL de PDA em estufa B.O.D a 28°C. O micélio foi transferido para um microtubo de centrífuga e lavado com água ultrapura estéril. Posteriormente, adicionou-se 50 μL tampão de extração (SDS 1% EDTA 25 mmol.L^{-1} e Tris-HCl 200 mmol.L^{-1} em pH 8.0) e triturado com auxílio de um bastão de plástico. Completou-se o volume com 1 mL tampão de extração e incubou-se em banho-maria a 65 °C por 20 minutos. Centrifugou-se a 14000 rpm por 10 minutos a 4 °C. Então, transferiu-se 800 μL do sobrenadante para um microtubo de 2 mL e adicionou 800 μL de fenol, após homogeneização suave, centrifugou-se a 14000 rpm por 5 minutos a 4 °C. Transferiu-se 600 μL do sobrenadante para um microtubo e adicionou-se 300 μL de

fenol e 300 μL de clorofórmio, e novamente levou-se a centrifuga por 5 minutos a 14000 rpm e 4 $^{\circ}\text{C}$. Um volume de 400 μL do sobrenadante foi transferido para um microtubo de 2 mL e completado o volume com 400 μL de clorofórmio. Por fim, a amostra foi novamente centrifugada a 14000 rpm por 10 minutos a 4 $^{\circ}\text{C}$. O sobrenadante foi transferido para um tubo de centrifuga de 1,5 mL, adicionou-se 600 μL de isopropanol homogeneizado e deixou-se por 15 minutos em temperatura ambiente, posteriormente foi centrifugado a 14000 rpm por 8 minutos a 4 $^{\circ}\text{C}$. Na sequência, descartou-se o sobrenadante e adicionou-se 400 μL etanol 70 % gelado, e centrifugou-se a 14000 rpm por 5 minutos a 4 $^{\circ}\text{C}$, deixando evaporar por 24 h. O *pellet* formado foi suspenso em 30 μL de água ultrapura esterilizada em autoclave e armazenado no freezer a -8 $^{\circ}\text{C}$ (Rueda *et al.* 2020). A figura 9 ilustra de modo esquemático o procedimento realizado para extração e sequenciamento do DNA.

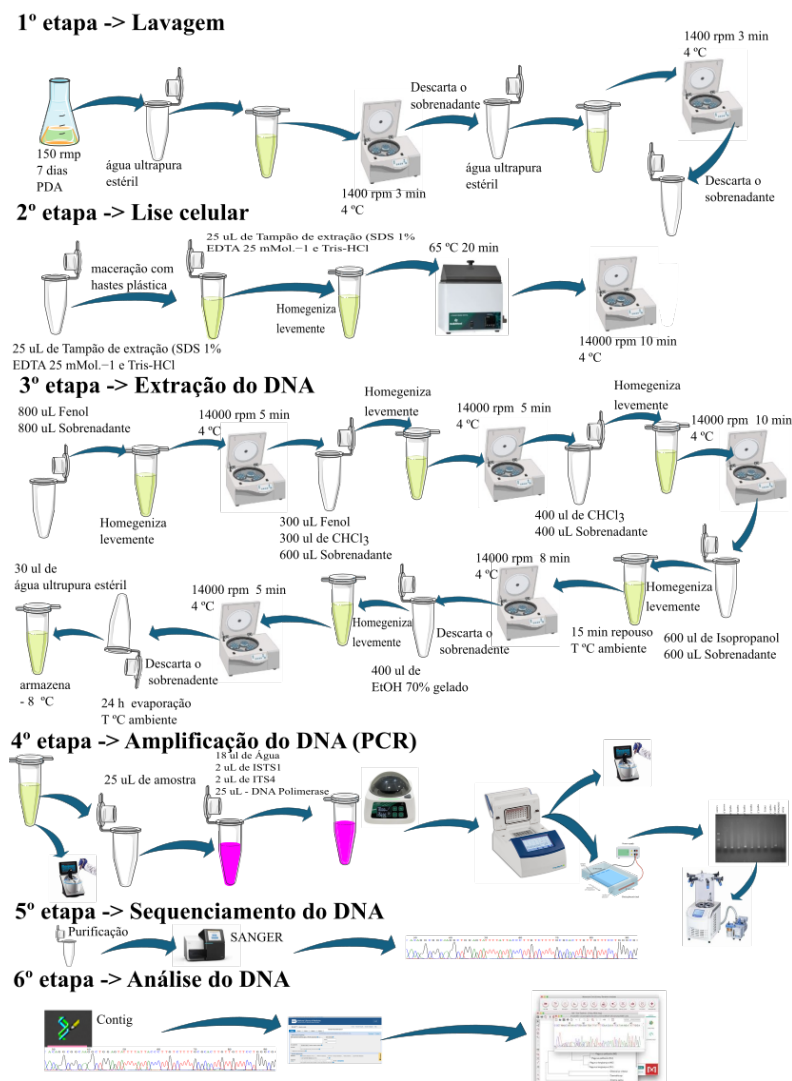


Figura 9 – Esquema ilustrativo do processamento dos fungos para obtenção do DNA para identificação molecular.

5.2.2.2 Amplificação de DNA

Para amplificação do DNA, foi adicionada a enzima polimerase HOT START TAG DNA (Classfive enzyme[®]) de acordo com as especificações do fabricante. Posteriormente, foram adicionados os *Primer forward* ITS1 TCCGTAGGTGAACCTGCGG e *Primer reverse* ITS4 TCCTCCGCTTATTGATATGC (White *et al.* 1990). No termociclador (Touch - Thermal Cycle T960), foi feito um sistema de 30 ciclos iniciado a 94 °C por 1 minuto, 55 °C por 1 minuto, 72 °C por 1 minuto, referente às etapas de desnaturação, anelagem, alongamento, respectivamente. Além de um ciclo inicial de 94 °C por 2 minutos e um a 72 °C por 10 minutos para garantir a completa desnaturação do DNA. Posteriormente, foi realizada a quantificação do DNA por *Nanodrop One C* (Thermo-Fisher Scientific[®]). Realizou-se ainda a eletroforese com gel de agarose 1,2%. Para execução da eletroforese usou-se tampão TAE 1% (200 mL de TRIS-HCl + 200 mL de EDTA), e corrente 90 mV por 90 min (Loccus[®] LPS300 - com a cuba LHC 13X15). Como controle usou-se o KASVI[®] 100bp DNA *leader* RTU. A leitura do gel foi feita em cabine de fotodocumentação com transiluminador de luz ultra-violeta (Loccus[®] - L-PIX EX).

5.2.2.3 Sequenciamento

As amostras foram purificadas com *ExoSAP-ITTM* e sequenciadas pelo método Sanger no equipamento AB 3500 *Genetic Analyzer* pela empresa ACTgene.

5.2.2.4 Identificação

As sequências obtidas foram ajustadas no *BioEdit Sequence Alignment Editor*[®] versão 7.2.5. Então foram comparadas com as armazenadas no banco de dados do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI), por meio da ferramenta de bioinformática *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST), a qual identifica semelhanças entre as sequências de interesse e as já depositadas no banco de dados. Para uma precisão da análise, foram consideradas apenas as sequências com percentual de similaridade superior a 98 %, que significa uma alta coincidência entre as sequências armazenadas e as obtidas experimentalmente, resultando em uma maior confiança na identificação do organismo.

Após esta etapa de busca no BLAST, as sequências selecionadas por similaridade foram alinhadas com as obtidas experimentalmente no programa MEGA (*Molecular Evolutionary Genetics Analysis*), versão 11.0.13, o qual alinha com precisão diversas sequências, o que é sumário para verificar as associações evolutivas entre os organismos estudados e os já descritos (Kumar; Stecher *et al.* 2018).

Posteriormente, as sequências alinhadas foram submetidas à análise estatística para definição do melhor modelo para obtenção da árvore filogenética, que é uma representação gráfica das relações evolutivas entre organismos de interesse, baseada na similaridade

das respectivas sequências de DNA. Para uma melhor robustez das análises, fez-se o uso do método *Phylogeny Bootstrap*, o qual confirma a confiabilidade dos ramos da árvore através de replicações aleatórias, sendo realizadas 1000 vezes. Tal processo é importante para a verificação com maior precisão das distâncias evolutivas entre os diferentes fungos avaliados, permitindo uma interpretação robusta das relações filogenéticas e provável classificação taxonômica.

6 Resultados e discussão

6.1 Coleta das plantas e o isolamento dos microrganismos

Após a coleta, o isolamento foi realizado no laboratório de Biotecnologia Ambiental da UNILA. Foram isolados 38 fungos de *C. canjerana* e 131 de *G. kunthiana*, os quais foram classificados em 24 morfo-tipos. Até o presente momento, não foram encontrados relatos de investigação da micobiota endofítica para as espécies *G. kunthiana* e *C. canjerana*.

6.2 Seleção das cepas

A tolerância dos isolados aos fármacos selecionados (Quadro 5.1) foi avaliada utilizando-se o cloreto de trifeniltetrazólio (TTC), um indicador de atividade metabólica, que permite o monitoramento da atividade celular após o tratamento com o fármaco, já que as células viáveis convertem o TTC em formazana, que emite coloração avermelhada em λ 450 nm no UV-Vis. Para esta etapa, foram selecionados ao menos um exemplar de cada morfo-tipo, totalizando 53 morfo-espécies estudadas, das quais 18 mostraram-se tolerantes a todos os fármacos avaliados. Observou-se também que mais fungos conseguiram crescer na presença de Fluoxetina (26), antitêrmicos (24), amoxicilina (23), hormônios (21), amitriptilina (18) e fluconazol (16). Os resultados para o fluconazol, um antifúngico do tipo azóis com largo espectro de ação, corroboram com o crescente número de registros de cepas resistentes a este antifúngico descritos na literatura (Lee; Robbins; Cowen, 2023; Escribano; Guinea, 2022; Morschhäuser, 2016).

No total, 10 fungos que apresentaram um crescimento acima de 20 %, conforme equação 5.1, nas condições dos ensaios em pelo menos um tratamento foram selecionados para estudos de atividade enzimática, conforme observa-se na tabela 1. Destacam-se as cepas mcc_A5_3 e mgk_B1_3 que apresentaram crescimento superior a 20 % e 17 % em relação ao controle para todos os fármacos avaliados, respectivamente.

6.3 Identificação dos fungos

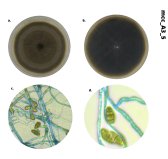
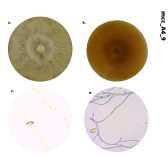
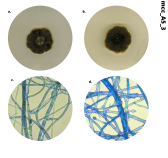
As cepas que foram consideradas promissoras após triagem inicial pelo TTC foram submetidas à identificação molecular pelo método de SANGER. Nos Quadros 6.1 e 6.2 observa-se, em resumo, os resultados obtidos e as características micro e macroscópicas em PDA das cepas de interesse. No anexo C é possível verificar as árvores filogenéticas obtidas e as porcentagens de similaridade com as cepas do *Blast*.

Tabela 1 – Crescimento celular fúngico na presença dos fármacos selecionados expressos em porcentagem (%) em relação ao controle positivo.

Fungo	Crescimento celular % por tratamento					
	Hormônios	Fluoxetina	Amitriptilina	Fluconazol	Amoxicilina	Antitérmicos
mcc_A3_5	11,33	27,85	8,06	13,23	8,06	23,27
mcc_A5_3	26,93	33,6	35,33	23,56	35,33	22,67
mcc_A4_9	20,83	36,33	13,8	13,47	13,8	25,2
mgk_A3_3	0	23,87	19,3	22,1	19,3	13,56
mgk_A3_15	0	1,13	28,63	0	28,63	5,63
mgk_A5_5	18,85	10,54	4,98	13,51	4,98	46,71
mgk_B1_1	0	5,26	48,87	18,73	48,87	12,23
mgk_B1_3	27,36	30,37	17,33	18,8	17,33	33,4
mgk_C4_2	20,1	6,57	45,5	1,6	45,5	6,37
mgk_C3_9	0	0	1,77	0,9	1,77	27,13

Fonte: Autora, 2025.

Quadro 6.1 – Identificação molecular e caracterização morfológica dos fungos endofíticos promissores para *Cabrelea canjerana*.

Isolado	Morfologia	Perfil micro e macroscópico em PDA	Identificação molecular
mcc_A3_5	Colônia circular com bordas uniforme, micélios marrom, textura aveluda, sulcos radiais do centro para meio. Esporos ovais, com secções e de coloração marrom; presença de hifas coradas em azul		<i>Curvularia</i> sp.
mcc_A4_9	Colônia com coloração dos micélios amarela nas bordas, no centro faixa circular branca e ponto central amarelado; verso marrom acastanhado, micélios com aspecto de plumas. Sem detecção de esporos, hifas hialinas		não identificado
mcc_A5_3	Colônia com bordas irregulares arredondadas, micélios marrom, sulcos radiais do centro para meio. Presença de hifas coradas em azul		<i>Dothiorella</i> sp.

Fonte: Autora, 2025.

O gênero do *Curvularia* (filo: Ascomycota; classe: Dothideomycetes; ordem: Pleosporales; família: Pleosporaceae), o qual o isolado mcc_A3_5 pertence, possui mais de 200 espécies relatadas. Na literatura, este gênero já foi descrito como endofítico e fito-

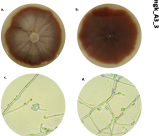
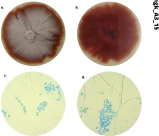
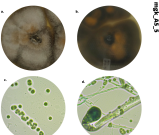
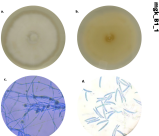
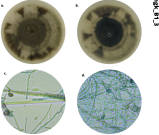
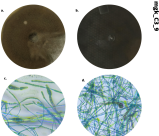
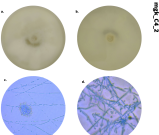
patógeno natural; além de ser responsável pela produção de diversos compostos naturais com atividade biológica, como terpenos e alcaloides; e de enzimas como celulase, lacase e peroxidase (Mehta; Meena; Nagda, 2022).

O isolado mcc_A5_3 foi identificado como pertencente ao gênero *Dothiorella* (filo: Ascomycota; classe: Dothideomycetes; ordem: Botryosphaerales; família: Botryosphaeriaceae), que são tipicamente associados a doenças em plantas cítricas, sendo que o ataque ocorre de modo oportunista em plantas com fissuras e/ou desnutridas (Belair *et al.* 2022). Outros estudos mostram o potencial medicinal de metabólitos secundários deste gênero, por exemplo, dois compostos com atividade antimicrobiana foram obtidos a partir do fungo endofítico *Dothiorella* sp. ML002 isolado da planta *Xylocarpus granatum* (Dankyira *et al.* 2022). Adicionalmente, 4 análogos a 6-metilpiridiona, conhecidos por sua fitotoxicidade, foram isolados do *Dothiorella sarmentorum* (Salvatore *et al.* 2023). Também é relatado potencial enzimático diversificado para o gênero, destacando atividades para celulase, lipase e lacase (Esteves *et al.* 2014).

Os fungos mgk_A3_3 e mgk_A3_15 foram identificados como pertencentes a mesma espécie, a *Albonectria rigidiuscula* (filo: Ascomycota; classe: Sordariomycetes; ordem: Hypocreales; família: Nectriaceae), que é o taxon atual para *Fusarium decemcellulare*, de acordo com Mycobank ². Os relatos de isolamento mostram ser um fungo que habita regiões tropicais além da China e que pode causar diversas doenças em plantas. São atribuídos à espécie a síntese de 4 metabólitos pirrolidinonas, denominados rigidiusculamidas A - D, onde A e B apresentam potencial citotóxico (Li *et al.* 2009). Já o estudo de voláteis produzidos pela espécie, isolada dos ramos de *Psidium guajava* doente, indicou a presença de 3-metilbutanol, 2-metilbutanol, γ -muuroleno e acetato de nerolidol (Oliveira, F. C. *et al.* 2017).

² Para maiores informações acesse: [text\(https://www.mycobank.org\)](https://www.mycobank.org)

Quadro 6.2 – Identificação e caracterização morfológica dos fungos endofítico promissores para *G. kunthiana*.

Isolado	Morfologia	Perfil micro e macroscópio em PDA	Identificação molecular
mgk_A3_3	Colônia circular com bordas irregulares, cultura com micélios branco na parte superior da placa e rosa nas bordas no verso, sulcos radiais do centro para a borda. Esporos ovais, alongados, coradas em azul; hifas hialinas		<i>Albonectria rigidiuscula</i>
mgk_A3_15	Colônia circular com bordas irregulares, cultura com micélios branco na parte superior da placa e rosa nas bordas no verso, sulcos radiais do centro para a borda. Esporos ovais, alongados, coradas em azul; hifas hialina		<i>Albonectria rigidiuscula</i>
mgk_A5_5	Colônia irregular, cultura com micélios branco na parte superior da placa e levemente marrom avermelhado no verso, com bordas escuras, textura aveluda. Esporos esféricos, com secções circulares e de coloração verde; presença de hifas hialinas		<i>Colletotrichum</i> sp.
mgk_B1_1	Colônia circular com bordas uniforme, cultura com micélios branco na parte superior da placa e levemente amarelo no verso, textura algodão. Esporos falciforme com secções, coradas em azul		<i>Fusarium</i> sp.
mgk_B1_3	Colônia com alternância de coloração dos micélios branco e preto, com o centro em preto. Sem detecção de esporos		<i>Rigidoporus</i> sp.
mgk_C3_9	Colônia micélios marrom, textura camurça. Esporos alongados apresentando uma ponta mais larga e segmentada de corada com azul de algodão		<i>Alternaria</i> sp.
mgk_C4_2	Colônia branca, uniforme, com aspecto de algodão (a,b). Hifas hialinas (c), esporos em bastonete corados de verde (c,d)		<i>Bjerkandera</i> sp.

Fonte: Autora, 2025.

Como sendo do gênero *Fusarium* (filo: Ascomycota; classe: Sordariomycetes; ordem: Hypocreales; família: Nectriaceae) foi identificado o isolado mgk_B1_1. Entre os fungos endofíticos, o gênero *Fusarium* é o mais abundante (Ahmed *et al.* 2023). Por outro lado, é conhecido como sendo um dos principais fitopatógenos de sementes como milho, causando prejuízo à agroindústria. Adicionalmente, a ingestão de alimentos com a presença de micotoxinas produzidas por este gênero pode resultar em sintomas como dor de cabeça, vômito e diarreia (Ibrahim *et al.* 2021; Doshi; Šerá, 2023). Outro problema encontrado é a resistência a fungicidas que as espécies descritas para este gênero têm apresentado (Doshi; Šerá, 2023). Por outro lado, a biotecnologia vem investigando e aproveitando a capacidade enzimática destes fungos na produção de insumos de maior valor agregado, como o uso de enzimas lignolíticas para produção de biocombustível (Pessoa *et al.* 2017). Ademais, corantes e compostos bioativos foram encontrados em espécies do gênero (Pessoa *et al.* 2017; Ibrahim *et al.* 2021; Ahmed *et al.* 2023).

O mgk_A5_5 pertence a espécies classificadas como *Colletotrichum* (filo: Ascomycota; classe: Sordariomycetes; ordem: Glomerellales; família: Glomerellaceae), que são fungos endofíticos ou fitopatógenos oportunistas, podendo causar doenças em diferentes culturas desde café até o mamão. Diversos estudos mostram aplicações biotecnológicas e os metabólitos produzidos por este gênero. Destaca-se a síntese do composto escopolamina e de seu precursor hiosciamina, produzido pelo *C. incarnatum* isolado da planta *Datura metel* L. (Krishnamurthy; Naik, 2017). Outro destaque é o uso da enzima L-asparaginase isolada do fungo endofítico *C. gloeosporioides* que demonstrou atividade antitumoral (Yap; Lee; Ting, 2022). Outros estudos, por exemplo, relatam a capacidade de biotransformação de terpenos e também esteroides por fungos endofíticos do gênero, e lipases isoladas do *Colletotrichum gloeosporioides* foram utilizadas na conversão de gordura animal e óleos vegetais em ômega 3,6 e 9. (Sande *et al.* 2017).

O isolado mgk_B1_3 foi identificado como pertencente ao gênero *Rigidoporus* (filo: Basidiomycota; classe: Agaricomycetes; ordem: Polyporales; família: Meripilaceae). Os *Rigidoporus* são conhecidos por serem causadores da doença de podridão branca na seringueira (*Hevea brasiliensis*), a qual leva à morte da planta (Maiden *et al.* 2022). Diferentes atividades biológicas dos metabólitos secundários destes fungos são relatadas, incluindo atividade antitumoral, anticoagulante e imuno-protetiva (Bhambri *et al.* 2022; Richard; Guillot; Bolton, 1997), além do uso dos epóxi-polissacarídeos como antioxidante (Jia *et al.* 2018), apresentam ainda boa atividade de lacase e álcool desidrogenase (Ken *et al.* 2016; Cambria *et al.* 2010).

O fungo mgk_C3_9 pertence ao gênero *Alternaria* (filo: Ascomycota; classe: Dothideomycetes; ordem: Pleosporales; família: Pleosporaceae), assim como os demais fungos endofíticos, também é causador de doenças em várias culturas (Lawrence; Rotondo; Gannibal, 2015). Do ponto de vista biotecnológico, se mostra promissor na produção

de metabólitos secundários com atividade antimicrobiana (Elghaffar *et al.* 2022; Fanele; Ndlovu, 2023).

O isolado mgk_C4_2 foi identificado como membro do gênero *Bjerkandera* (filo: Basidiomycota; classe: Agaricomycetes; ordem: Polyporales; família: Meripilaceae), é conhecido como fungo decompositor, não associado como fitopatógeno. O potencial enzimático é grande para o gênero, principalmente quando se trata de enzimas lignolíticas (Hernández-Bueno *et al.* 2021; Baik *et al.* 2021). Estudos sobre atividade biológica sugerem alto potencial antioxidante (Oliveira, C. F. d. *et al.* 2022) e fungicida, como agente de controle em lavouras (Chen, Y. *et al.* 2021).

Em comparação aos relatos referentes a fungos endofíticos encontrados na família Meliaceae, que já foram descritos, por exemplo, o *Curvularia* e *Trichoderma*, isolados da espécie *Guarea guidonia*, originária de Porto Rico (Gamboa; Bayman, 2001); de *Cladosporium* em folhas da *Khaya senegalense*, originária da Nigéria (Ndana, 2016). E de *Aspergillus*, *Fusarium* e *Trichoderma* isolados da árvore amazônica *Carapa guianensis* (Ferreira *et al.* 2015) e no Brasil é relatado o *Penicillium* sp. isolado da *Melia azedarach* (Santos; Rodrigues-Fo., 2003), os resultados obtidos indicam uma diversidade complementar ao já relatado.

6.4 Conclusão parcial

Para o presente trabalho foram selecionadas 2 (duas) espécies vegetais nativas do oeste paranaense pertencentes à família Meliaceae, *i.e.* *Guarea kunthiana* A. Juss e *Cabralea canjerana* (Vell.) Mart..

O ensaio de TTC mostrou a capacidade das cepas em tolerar diversas classes terapêuticas. Deste modo, acredita-se no potencial enzimático dos isolados para biotransformar fármacos.

Os resultados da identificação das espécies destacam a frágil distinção entre fungos endofíticos e fitopatógenos, uma vez que o gênero dos isolados é frequentemente associado a doenças na literatura.

Na literatura, os gêneros dos fungos isolados e identificados mostram características para aplicações biotecnológicas, como produção de enzimas, o que justifica a prospecção enzimática das cepas isoladas para confirmar e conhecer melhor sobre o material obtido, uma vez que o local de coleta e a origem dos isolados, bem como as diferentes linhagens, podem influenciar na sua atividade biotecnológica.

Ressalta a escassez de estudos sobre o potencial enzimático dos fungos endofíticos provenientes de plantas na região Foz do Iguaçu, deste modo, o presente projeto se apresenta como o primeiro nessa linha com plantas da região, associando recursos regionais e

processos sustentáveis para a biotransformação de fármacos.

Parte III

Avaliação das atividades enzimáticas

7 Fungos endofíticos e prospecção enzimática

7.1 Fungos produtores de enzima

Estudos envolvendo especificamente os fungos endofíticos sugerem que estes podem auxiliar na biorremediação dos gases do efeito estufa (Iqbal; Nelson; McCulley, 2012), de metais tóxicos (Pietro-Souza *et al.* 2020) e de resíduos plásticos (Silva, K. R. I. DA, 2009). Já na área industrial, esses microrganismos podem ser utilizados na biorremediação de solventes orgânicos, como benzeno (Prenafeta-Boldú; Summerbell; Hoog, 2006) e de matéria orgânica, como por exemplo, materiais lignolíticos (Rana *et al.* 2019); na biotransformação de moléculas aplicadas à indústria química e farmacêutica (Singh, 2017; Abdelraheem *et al.* 2019). Tais estudos enfatizam a importância dos fungos endofíticos para um desenvolvimento sustentável.

Muitas dessas aplicações dos fungos estão associadas à produção de diferentes enzimas, como lipases, amilases termoestáveis, proteases, oxirredutases, entre outras, que podem ser utilizadas como biocatalisadores em diferentes tipos de reações. Estas enzimas podem participar das biotransformações de moléculas complexas, como as de alguns fármacos, e de compostos mais simples e, muitas vezes, levando ao desenvolvimento de processos de menor toxicidade para o meio ambiente (Caracciolo; Topp; Grenni, 2015; Prenafeta-Boldú; Summerbell; Hoog, 2006).

Exemplos de enzimas isoladas de fungos endofíticos são muitos, mas, sucintamente, destaca-se a celulase isolada do fungo *Curvularia kusanoi*, que é estável em pH alcalinos (Vázquez *et al.* 2019). Lipase, endoglucanases e xilanases isoladas de *Fusarium* spp. foram aplicadas à produção de biocombustíveis, demonstrando o potencial biotecnológico destas enzimas (Pessoa *et al.* 2017).

Em outro estudo, Batista e colaboradores (2022) demonstraram o potencial hidrolítico de enzimas produzidas por fungos isolados do açaí (*Euterpe precatoria*). O fungo *Colletotrichum* sp. S1 demonstrou potencial para produção de celulase (15,76 U.mL⁻¹) e o *Penicillium* sp. L3 na produção de amilase (30,96 U.mL⁻¹); o estudo enfatizou que o pH ótimo de produção foi 8,0 e a temperatura 45 °C (Batista *et al.* 2022).

A diversidade enzimática também é destaque nos fungos endofíticos, isolados de plantas medicinais mexicanas, as cepas *Corynespora cassiicola*, *Hypoxyylon investiens*, *Xylaria* e *Xylariaceae* mostraram atividade para lacase, celulase, amilase e lipase (Toghueo; Zabalgogazcoa *et al.* 2017).

7.2 Enzimas

Enzimas são, em sua maioria, proteínas funcionalizadas que apresentam entre 100 a 400 aminoácidos (AA), o tamanho está ligado à estabilidade do seu sítio catalítico, que deve ser protegido. A presença de metais, como cobre, é comum e estes contribuem para a disposição tridimensional dos AA, que vão ser os responsáveis pela interação com o substrato (Nelson DAVID L., 2019). A desprotonação dos AA no centro catalítico da enzima é importante para ligações com o substrato. Assim, o pH é de suma importância para a manutenção da atividade enzimática (Faber, 2000).

As enzimas podem ser classificadas de acordo com o tipo de reação que estas mediam, como as oxirredutases monooxigenases, oxidases, as lacases e peroxidases, hidrolases, além das liases, isomerases, ligases e translocases (Quadro 7.1) (Faber, 2000; Wu; Rapoport, 2021). As enzimas também podem ser classificadas de acordo com a localização, como intracelulares (encontradas dentro da célula) e extracelulares (excretadas pela célula) (Gonçalves; Fonseca, 2018; Humphreys, 2018).

Quadro 7.1 – Classificação geral de enzimas e suas atividades catalíticas.

Classe	Atividade
Oxirredutases	Oxigenação C–H, C–C, C=C; remoção ou adição de H ou equivalente
Transferases	Transfere os grupos aldeídos, cetonas, acil, açúcares
Hidrolases	Hidrolisam para formação de ésteres, amidas, lactonas, lactamas, epóxidos, nitrilas, anidridos, glicosídeos e organolídeos
Liasas	Adição-eliminação de pequenas moléculas em C=C, C=N, C=O
Isomerases	Isomerização como racemização, epimerização ou rearranjo
Ligases	Formação-quebra de C=O, C–S, C–N, C–C com quebra concomitante de trifosfato (ATP)
Translocases	catalisam o movimento de íons ou pequenas moléculas (aminoácidos) através de membranas

Fonte: Adaptado de Faber, 2000; Wu e Rapoport, 2021.

As lipases, ou triacilglicerol hidrolases, estão entre as enzimas mais utilizadas nos processos industriais, desde a produção de biodiesel até a síntese de fármacos (Humphreys, 2018). Algumas lipases isoladas de *Candida* sp. apresentaram uma alta estereospecificidade ($E > 100$), produzindo álcoois e acetatos enantioméricos puros (Siódmiak *et al.* 2015; Melais; Aribi-Zouiouèche; Riant, 2016). Flores e colaboradores, por exemplo, utilizaram uma lipase isolada da *C. rugosa* na conversão enantiosseletiva do ibuprofeno em *S*-ibuprofeno, com *e.e* de 99,2 % após purificação (Figura 10) (Chavez-Flores; Salvador, 2012).

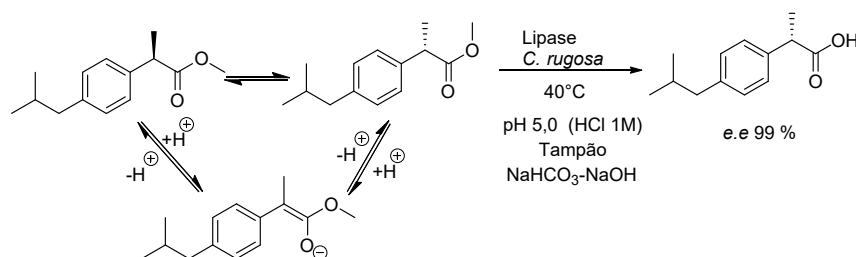


Figura 10 – Conversão racêmica do Ibuprofeno no isômero *S* por *C. rugosa*.

Fonte: Adaptado Chavez-Flores et al., 2012.

As esterases (Est), também chamadas de carboxil-éster hidrolases, se diferenciam das lipases pela preferência na posição do éster hidrolisado, que deve estar próximo ao centro quiral, e pelo tamanho da cadeia, onde as esterases possuem maior afinidade por cadeias mais curtas (≤ 8 carbonos) (Barzkar *et al.* 2021; Humphreys, 2018; Faber, 2000). Já do ponto de vista cinético, observa-se a regra de *Kazlauskas*, que as lipases têm preferência por isômeros *R*, enquanto as esterases hidrolisam preferencialmente ésteres de configuração *S* (Melais; Aribi-Zouioueche; Riant, 2016; Humphreys, 2018).

Outro tipo importante de hidrolases são as Epóxido-hidrolases (EPH), que catalisam reações de abertura de anéis do tipo oxirano levando à formação do diol vicinal correspondente. De larga aplicação na indústria, estas enzimas são utilizadas na síntese de diferentes fármacos, como antibióticos e anti-HIV, além da fabricação de polímeros 'verdes' na indústria química (Kamble; Yadav, 2018; Kotik; Archelas; Wohlgemuth, 2012).

As flavoproteínas Mono-oxigenases são enzimas estritamente intracelulares que necessitam para atuação de O₂ e de cofatores, como o fosfato de dinucleotídeo nicotinamida adenina (NAD(P)H). Dentre as reações mediadas por estas enzimas temos epoxidação; sulfonação - por oxigenação eletrofílica e adição do tipo Baeyer-Villiger - por oxigenação nucleofílica, formando éster ou cetonas, e lactonas, sendo no caso chamadas de Baeyer-Villiger Mono-oxigenase (BVMOs). As mono-oxigenases apresentam grande importância para a síntese dos chamados *building blocks*, que são pequenas moléculas utilizadas na síntese de estruturas mais complexas (Zhang *et al.* 2023; Winkler; Schrittwieser; Kroutil, 2021; Willrodt *et al.* 2020).

Álcool desidrogenases (ADH), assim como as BVMOs precisam de co-fatores para poderem atuar. Com ampla aplicação em diferentes setores da indústria química, estas enzimas catalisam reações reversíveis de redução de carbonilas (Mourelle-Insua *et al.* 2019). Uma aplicação interessante é a produção de MeOH verde a partir do CO₂, sendo várias vias possíveis (Marpani; Pinelo; Meyer, 2017). Por exemplo, na rota proposta por Marques Netto e colaboradores (2017), a reação em cascata envolvendo as enzimas formato desidrogenase (FDH), glutamato desidrogenase (GDH) e a formaldeído desidrogenase (FaldH)

em sistema de imobilização de enzimas sob pressão, o rendimento chegou a próximo de 100 %, sendo a disponibilidade de cofatores um limitante (Marques Netto; Andrade; Toma, 2017). Já na indústria farmacêutica as ADHs foram utilizadas na síntese da atorvastatina cálcica, como ilustrado na Figura 11 (Winkler; Schrittwieser; Kroutil, 2021).

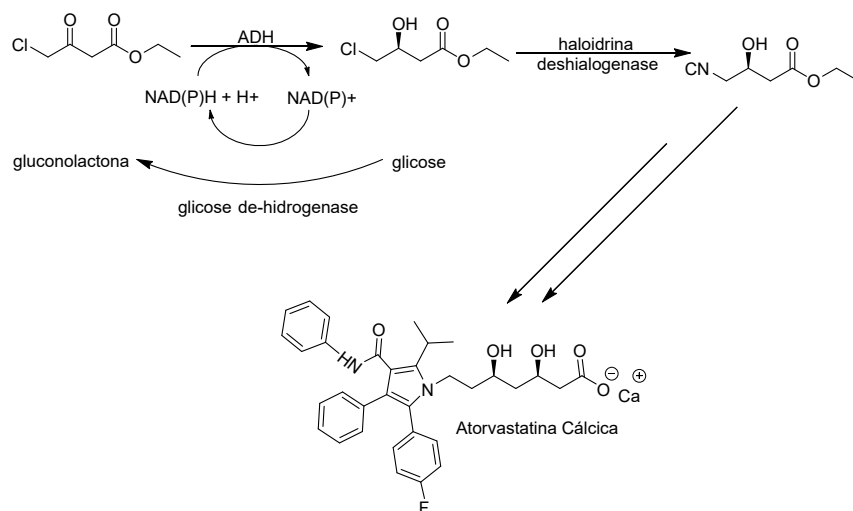


Figura 11 – Esquema de atividade da ADH aplicada a síntese da atorvastatina cálcica.

Fonte: Adaptado de Winkler *et al.*, 2021.

Oxirredutases extracelulares englobam as lacases, e peroxidases - Lignina (LiP), manganês (MnP) e manganês-lignina (VP) - que são enzimas que apresentam diferentes aplicações industriais, como o emprego destas na síntese de flavorizantes mediadas por LiP e MnP, a decomposição de resíduos lignolíticos da indústria papeleira e na produção de bioetanol (Plácido; Capareda, 2015).

A LiP em especial tem estrutura diversa, e alto potencial redutor atrelado à distância dos aminoácidos Trp (triptofano) - Trp¹⁷¹ - com o grupo heme (Bernini *et al.* 2012). O pH ótimo da LiP está entre 3 e 4,5; além disso, a quantidade de H₂O₂ também deve ser observada, já que o excesso pode levar ao bloqueio da atividade enzimática. Devido ao alto poder catalítico, ela apresenta a capacidade de metabolizar aromáticos fenólicos ou não da lignina, independentes de mediadores. Na Figura 12.a é apresentado de modo esquemático os estados de oxidação enzimática durante o processo catalítico (Biko; Viljoen-Bloom; Zyl, 2020; Wang; Yao; Su, 2018). Segundo a classificação enzimática CaZy³, as Peroxidases pertencem à família de enzimas auxiliares do tipo 2 (AA2), possuem um grupo heme em sua estrutura e usam o peróxido de hidrogênio (H₂O₂) como acceptor de elétrons (Levasseur *et al.* 2013).

As MnP apresentam-se em um conjunto de isoenzimas que catalisam a degradação de lignina e compostos recalcitrantes como corantes (Kumar; Arora, 2022). Os AA identificados em seu bolsão diferem-se do apresentado na LiP, não sendo encontrado o

³ Para maiores informações sobre o sistema de classificação CaZy acesse: [text\(http://www.cazy.org\)](http://www.cazy.org)

Trp¹⁷¹. E junto ao grupo heme, coordenado pelos resíduos de aminoácido Glu³⁵, Glu³⁹ e Asp¹⁷⁹ é encontrado o Mn²⁺, responsável pela doação de elétrons e que é oxidado para Mn³⁺ no processo catalítico. A concentração de Mn²⁺ no meio influencia a atividade enzimática devendo ficar abaixo de 100 μ M (Sundaramoorthy *et al.* 1994; Wong, 2008), e o pH ótimo fica entre 3,5 e 9,0 (Kumar; Arora, 2022). Conforme o ilustrado na Figura 12.b, o mecanismo enzimático da MnP se assemelha ao da LiP, contudo, na MnP, o íon de manganês é o responsável por trocar elétrons com o substrato (Kumar; Chandra, 2020).

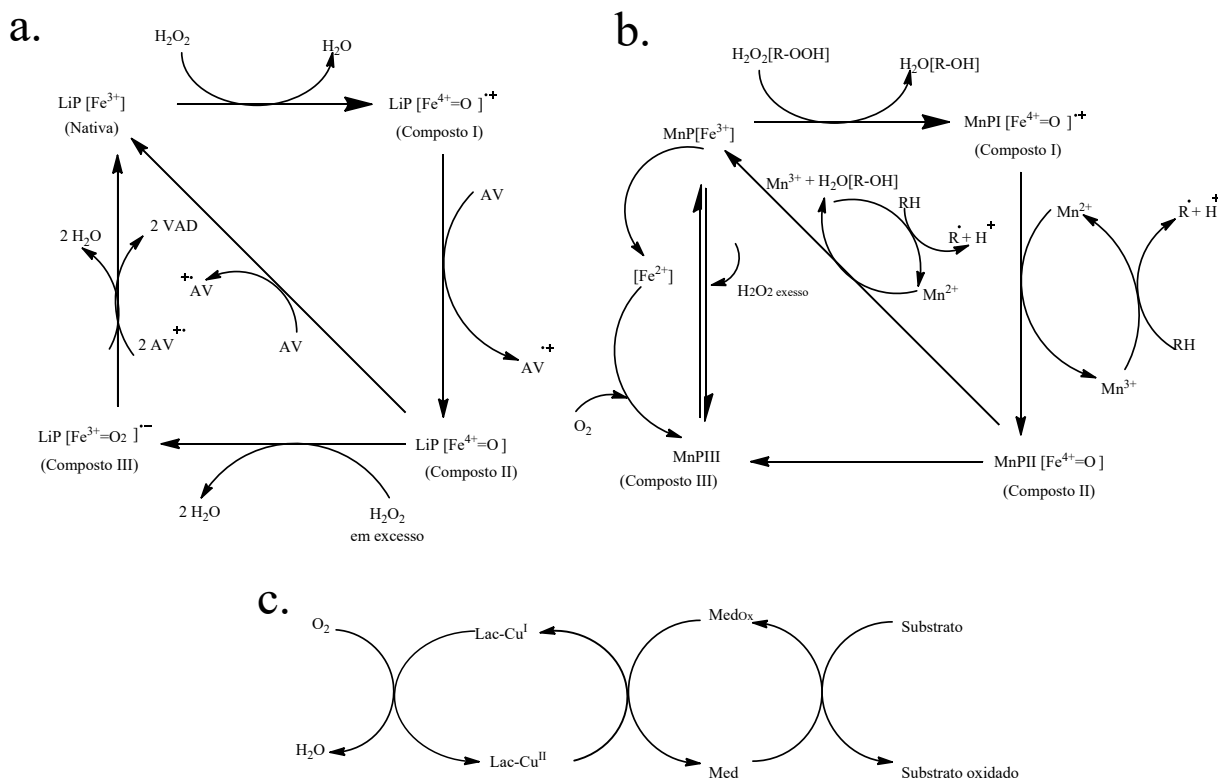


Figura 12 – Esquema ilustrativo dos mecanismos de catálise por oxidases a. LiP, b. MnP, c. Lac.

Fonte: Adaptado de Kumar e Chandra, 2020.

As lacases (Lac) são valorizadas na química verde por liberarem apenas água como subproduto da reação e por estarem envolvidas na biodegradação de compostos recalcitrantes, como corantes e pesticidas, na síntese orgânica e na produção de biossensores. Estas enzimas podem catalisar reações de acoplamento oxidativo, como reações de adição do tipo Michael, reações Diels-Alder e oxigenação (Cardullo; Muccilli; Tringali, 2022; Kumar; Chandra, 2020; Rodríguez-Couto, 2019; Upadhyay; Shrivastava; Agrawal, 2016).

As Lac são oxidases multicobre, classificadas em três tipos de acordo com a faixa de onda pelas quais são detectadas em espectroscopia de ressonância paramagnética (EPR): branca (sem detecção), amarela (600 nm) e azul (640 nm). A lacase isolada de *Trametes versicolor*, considerada a padrão, possui quatro átomos de cobre (Cu²⁺) e é conhecida como azul. (Cardullo; Muccilli; Tringali, 2022; Agrawal; Verma, 2020). Já a

lacase branca (tipo II) contém três íons Cu^{2+} e um íon Fe^{2+} . Por fim, a lacase amarela (tipo III) possui dois centros de íons Cu^{2+} (Agrawal; Verma, 2020; Zhao *et al.* 2012; Palmieri *et al.* 1997). As faixas de pH e temperatura ideais para as reações variam entre os subtipos, sendo mais amplas para os tipos II e III. Além disso, estes biocatalisadores não requerem mediadores para o processo de oxidação, conferindo vantagens sobre o tipo I (Agrawal; Verma, 2020).

Na literatura é possível observar que nas vias de biotransformação para os fármacos utilizados no teste de susceptibilidade preliminar (Figura 8) é comum a presença de enzimas promotoras de reação oxi-redução, em especial de mono-oxigenases, lacase e peroxidases, pela presença de álcoois, fenóis e aminas (Buß *et al.* 2016; Grignet *et al.* 2022). Sendo assim, estas são classes enzimáticas importantes a serem triadas no âmbito deste estudo.

7.2.0.1 Ensaios de triagem enzimática

Conhecer as enzimas ou o perfil enzimático de um microrganismo é importante quando se busca aplicações biotecnológicas, permitindo a predição e desenvolvimento de rotas biotecnológicas para a produção de novos produtos e biotransformação de moléculas. Diversos métodos estão disponíveis para se avaliar o perfil enzimático, desde os moleculares, que indicam a presença de genes que sintetizam as proteínas desejadas em análises de DNA, até os mais simples, baseados em alterações colorimétricas em decorrência dos processos enzimáticos. A depender da técnica, é possível utilizar células íntegras do microrganismo, extrato enzimático ou enzimas isoladas (Reymond; Fluxà; Maillard, 2008; Gonçalves; Marsaioli, 2014; Sarnaik *et al.* 2020).

Os testes em placas de Petri são amplamente utilizados para verificar a presença de diversas enzimas, como lipase, lacase, celulase, protease, entre outras. Muitas dessas técnicas baseiam-se na mudança de coloração do meio, consequência da atividade enzimática sobre o substrato. Por exemplo, a lacase provoca o surgimento de uma coloração escura ao redor da colônia devido à formação de precipitado resultante da oxidação enzimática do substrato, que pode ser o guaiacol, 1-naftol ou 2-naftol (Toghueo; Zabalgozcoa *et al.* 2017; Bratkovskaja; Vidziunaite; Kulys, 2004).

Já os ensaios em placas de Petri para celulas e proteases possuem como indicativo a formação de halos incolores no entorno das colônias (Sazci; Erenler; Radford, 1986; Silva, C. P. DA, 2012). Para a lipase, o teste com Rodamina-B é o mais tradicional; na presença da enzima, forma-se um complexo entre os ácidos graxos liberados após hidrólise enzimática do substrato e a Rodamina-B, que emite fluorescência quando exposto à luz UV-364 nm. A Figura 13 ilustra essa reação (Narasimha; Kumar; Subramanyam, 2011; Silva, C. P. DA, 2012; Fiel *et al.* 2014).

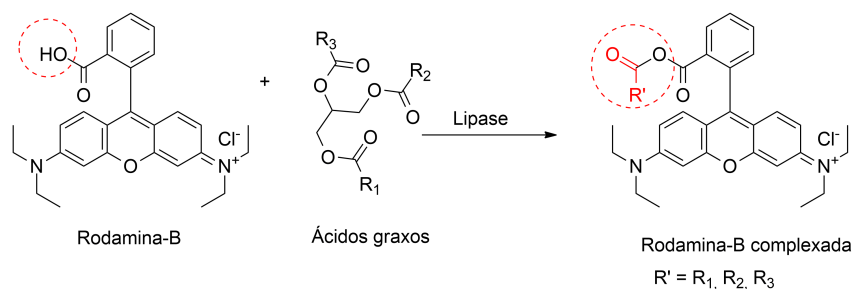


Figura 13 – Conjugação da rodamina-B com os resíduos de ácido graxo.

Fonte: Adaptado de Fiel *et al.*, 2014.

As vantagens dos testes em placa de Petri incluem o baixo custo e a simplicidade de aplicação. Como desvantagens, destacam-se o tempo necessário para a observação dos resultados, que varia de 4 a 7 dias; a limitação de substratos e, em geral, a impossibilidade de quantificação (Silva, C. P. DA, 2012; Neves Junior *et al.* 2020).

A triagem em ensaio miniaturizado permite a análise de grandes quantidades de amostra rapidamente, com o uso de microplacas de 96 ou 384 poços, possibilitando a triagem de mais de 1000 enzimas em um único dia. Em relação aos ensaios em placas de Petri, ainda apresenta a vantagem de ser quantitativo. Inicialmente, a técnica era destinada a enzimas já isoladas, mas aprimoramentos da técnica viabilizaram o uso de microrganismos íntegros, o que trouxe vantagens adicionais, em relação ao tempo e custo necessário para o isolamento de enzimas (Reymond; Fluxà; Maillard, 2008; Gonçalves; Marsaioli, 2014).

Outra vantagem que este tipo de ensaio apresenta é a possibilidade de estudos cinéticos das reações biocatalíticas, pela observação da cinética com que o microrganismo converte os substratos em um produto, podendo ser monitoradas em espectrômetros de fluorescência ou ultravioleta (Johannes; Woodyer; Zhao, 2005; Reymond; Fluxà; Maillard, 2008; Gonçalves; Marsaioli, 2014). Contudo, a técnica ainda apresenta desvantagens, como a ocorrência de falsos negativos devido à especificidade do substrato. Para contornar esse problema, o desenvolvimento de sondas é importante; para tal, o uso de diferentes cromóforos e grupos de proteção deve ser avaliado (Reymond; Fluxà; Maillard, 2008; Gonçalves; Marsaioli, 2014; Buß *et al.* 2016; Sato *et al.* 2024).

O mascaramento da fluorescência de compostos como rodamina, fluoresceína, umbeliferona entre outros, é uma estratégia bastante utilizada na formulação de sondas para triagem. Para tal, o fluoróforo modificado voltará a emitir sinal de fluorescência característico do original após a reação catalisada pela enzima-alvo. Neste sentido, a escolha destes grupos de proteção é quem vai limitar a ação das enzimas, permitindo que estas sejam caracterizadas pelo tipo de reação (Gonçalves; Marsaioli, 2014; Chen, 2006; Sato *et al.* 2024). O esquema da Figura 14 ilustra o mecanismo de uma sonda para epóxido-hidrolase baseada na rusofurina (Lima *et al.* 2017).

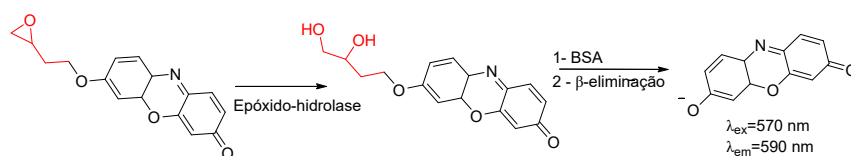


Figura 14 – Sonda para prospecção de epóxido-hidrolase, em vermelho o grupo de proteção, que sofrerá ação da enzima, formando o diol que reagirá com o BSA sofrendo na sequência uma β -eliminação espontânea, liberando o ânion rufosurina, que passará a emitir fluorescência.

Fonte: Adaptado de Lima *et al.*, 2017.

Os compostos fluorescentes apresentam a característica de absorver em determinados comprimentos de onda, que levam a uma excitação eletrônica nas camadas de menor energia, que é refletida pela emissão de uma radiação eletromagnética em um alto comprimento de onda, fazendo com que a técnica de análise de fluorescência seja altamente sensível, permitindo a detecção em baixas concentrações de substrato (Gumbleton, 2005; Gosch; Rigler, 2005).

Ainda é válido ressaltar que a estabilidade dos substratos nas condições de trabalho em relação a temperatura e pH devem ser considerados, já que eles podem deslocar os λ de excitação e emissão do composto fluorescente, ou interferir nas reações de oxi-redução de cromóforos (Chen, 2006; Buß *et al.* 2016; Gosch; Rigler, 2005).

7.3 Objetivos

Nesta etapa, o objetivo foi conhecer o perfil enzimático das cepas selecionadas anteriormente. E selecionar as cepas mais promissoras enzimaticamente para as reações de biotransformação.

8 Metodologia

8.1 Ensaios enzimáticos em placa de Petri

Os 10 fungos que foram selecionados no teste de suscetibilidade preliminar com TTC foram inoculados em placas de Petri com 9 cm de diâmetro em discos de 6 mm com PDA por 7 dias em B.O.D a 28 °C para reativação.

Para os ensaios de atividade de celulase utilizou-se o meio ágar GYP (0,5 g.L⁻¹ de peptona, 0,1 g.L⁻¹ de extrato de levedura, e 10 g.L⁻¹ de glicose) enriquecido com 0,5 % de carboxi-metilcelulose sódica. As placas foram mantidas em B.O.D a 28 °C por 7 dias. Após esse período de crescimento, 3 mL de solução aquosa de 0,2 % de vermelho do Congo foram acrescentadas à placa, as quais foram mantidas em repouso por 15 minutos. Posteriormente, as placas foram lavadas com a solução aquosa de NaCl a 1 mol.L⁻¹ (Toghueo; Zabalgogezcoa *et al.* 2017). A observação de um halo claro (branco) indica a presença de celulase (Sazci; Erenler; Radford, 1986).

Para lacases, foram realizados dois ensaios diferentes, utilizando meio GYP, enriquecido com 0,05 g.L⁻¹ de 1-naftol ou de 2-naftol, para avaliar uma possível seletividade na posição a ser oxidada (Toghueo; Zabalgogezcoa *et al.* 2017). A presença de lacase é identificada pela formação de um composto insolúvel e a mudança de coloração da solução, decorrentes da clivagem enzimática e oxidação do substrato, que forma um precipitado escuro azul-preto na colônia (Bratkovskaja; Vidziunaite; Kulys, 2004).

A prospecção de lipases foi realizada pelo método da rodamina-B (Oliveira, A. *et al.* 2013), a composição do meio para 1 litro foi sulfato de magnésio hepta-hidratado (MgSO₄ · 7 H₂O) 0,2 g, fosfato de potássio monobásico (KH₂PO₄) 0,1 g, cloreto de sódio (NaCl) 0,1 g, extrato de levedura 0,4 g, fosfato de potássio bibásico (K₂HPO₄) 0,4 g, 10 ml de azeite de oliva (Galo), *tween* 80 0,01 %, ágar 20 g e rodamina-B 0,001 %. Tem como princípio a formação do complexo entre os ácidos graxos livres como a rodamina-B, tendo uma emissão alaranjada em 364 nm, os ácidos graxos são formados em decorrência da clivagem enzimática dos grupos éster dos triacilgliceróis (Narasimha; Kumar; Subramanyam, 2011).

8.2 Avaliação das atividades enzimáticas utilizando sondas fluorogênicas

Os testes de oxigenases e das hidrolases esterase, lipase e epoxidases foram realizados por sondas fluorogênicas derivadas da umbeliferona, em placa de 96 poços (fundo

chato) (Olen[®]) (Lima *et al.* 2017; Silva, C. P. DA, 2012). Para a avaliação por sondas fluorogênicas foram selecionadas 6. Duas mono-oxigenases (BVMO1 e BVMO2), 1 Lipase (Lip1), 1 para esterase (EST1), e duas para epóxido-hidrolase (EPH1 e EPH2). As referidas sondas foram obtidas junto ao grupo de pesquisa da Prof^a Dr^a Anita J. Marsaioli - Pesquisa em Síntese Orgânica, Biocatálise, RMN e Ecologia Química - UNICAMP, Campinas - SP.

Na triagem enzimática por sondas, estas são os substratos para as enzimas. Na presença das enzimas lipase, esterase e epóxido-hidrolases, as sondas Lip1 (2), Est1 (1), e EPH1 (3) e EPH2 (9) vão sofrer hidrólise, liberando seus respectivos produtos, conforme ilustrado na Figura 15. Em seguida, os dióis formados são clivados por oxidação com NaIO₄ e, após uma reação de β -eliminação promovida pelo BSA, têm-se a liberação do ânion umbeliferona, que é o fluoróforo observado na leitura. No caso das sondas BVMO1 (8) e BVMO2 (5), após a oxidação feita pela enzima, as cetonas e lactonas formadas também liberam o ânion umbeliferona pela β -eliminação promovida pelo BSA (Silva, C. P. DA, 2012; Chen, 2006; Lima *et al.* 2017).

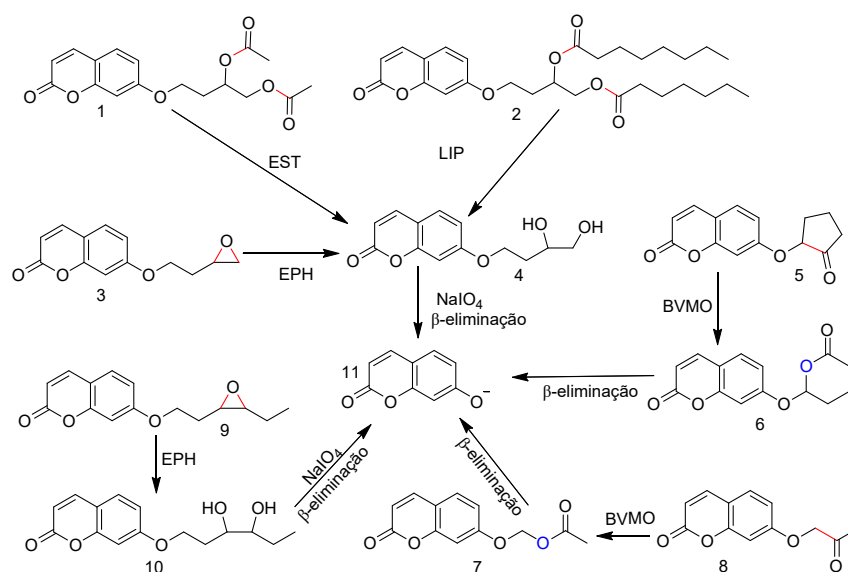


Figura 15 – Sondas fluorogênicas esterase (1), lipase (2), epóxido-hidrolase (3), diol (4) produto das sondas 1 a 3, monooxigenase cíclica (BVMO2) (5), lactona (6) produto da reação de Bayer-Village da sonda 5, éster (7) formado pela oxidação da sonda 8, sonda para monooxigenase acíclica (BVMO1)(8); diol (10) formado pela reação da epóxido-hidrolase no composto 9, epóxido vicinal (9).

Fonte: Autora, 2025.

As cepas selecionadas foram previamente inoculadas em placa de Petri com meio PDA por 7 dias, a 28 °C em estufa B.O.D. Na sequência, com auxílio de alça estéril o micélio foi transferido para um tubo *Falcon* e pesado, sendo acrescido volume de tampão borato pH = 8,8 suficiente para que a concentração da solução obtida fosse de 1 g.L⁻¹, homogenizada em vórtex (Nova instrument[®]) com pérolas de vidro. O ensaio consistiu no acréscimo de 100 μ L de solução de micélio fúngico na concentração de 1 g.L⁻¹ em tampão

borato (pH 8,8); 10 μL da solução da sonda fluorogênica (2 mmol.L^{-1} em acetonitrila/água 1:1); 80 μL de solução de BSA (*bovine serum albumine*) (2,0 g.L^{-1} em tampão borato (pH 8,8)); e 10 μL de solução aquosa de NaIO_4 (20 mmol.L^{-1}). Para o controle negativo, foram adicionados 100 μL de solução tampão borato (pH 8,8); 10 μL da solução de sonda fluorogênica (2 mmol.L^{-1} em acetonitrila/água 1:1); 80 μL de solução de BSA (2,0 g.L^{-1} em tampão borato (pH 8,8)); e 10 μL da solução aquosa de NaIO_4 (20 mmol.L^{-1}). Já como controle positivo foram adicionados ao poço da microplaca 100 μL de solução do fungo na concentração de 1 g.L^{-1} em tampão borato (pH 8,8); 10 μL da solução do produto da sonda fluorogênica (2 mmol.L^{-1} em acetonitrila/água 1:1); 80 μL da solução de BSA (2,0 g.L^{-1} em tampão borato (pH 8,8)); e 10 μL da solução aquosa de NaIO_4 (20 mmol.L^{-1}). A leitura foi realizada no equipamento *FlashScan530* (AnalytikJena[®]) no comprimento de onda $\lambda_{ex} = 360 \text{ nm}$ e $\lambda_{em} = 460 \text{ nm}$. O branco consistiu no fungo com tampão borato (pH 8,8). O ensaio foi monitorado por 24 h, e realizado em quadruplicada, enquanto os controles positivo e negativo foram realizados em duplicata.

Para o cálculo da porcentagem de conversão da sonda foi utilizada a equação 8.1, onde \bar{x} é a média da leitura em unidades de fluorescência relativa (RFU) da amostra, \bar{y} é a média para o RFU do controle negativo, e \bar{z} representa os valores médios de RFU encontrados para o controle positivo. A atividade enzimática é expressa em porcentagem (%) pela taxa de conversão da sonda nos respectivos produtos.

$$\text{Conversão \%} = \frac{(\bar{x} \text{ RFU}) - (\bar{y} \text{ RFU})}{\bar{z} \text{ RFU}} \times 100 \quad (8.1)$$

8.3 Avaliação quantitativa de enzimas extracelular por extrato enzimático

Para avaliação das enzimas lacase (Lac), lignina e manganês peroxidase (LiP e MnP respectivamente) utilizou-se metodologia adaptada de Rueda e colaboradores (2020). Em um Erlenmeyer de 125 mL contendo meio basal ureia (12 mL) e palha de arroz (2,5 g) foram adicionados 1 mg de micélio fúngico. E incubados modo estático em B.O.D a 28°C por um período de 7, 15, 30 dias (Rueda *et al.* 2020). Após esses períodos foram acrescidos 10 mL tampão fosfato pH 7,0 (Lim; Lee; Kang, 2013) e a mistura resultante incubada em *shaker* a 28 °C e 150 rpm por 24 h. Adicionalmente foi preparada uma amostra denominada tempo zero, em que os fungos foram inoculados no meio basal ureia e palha de arroz acrescidos do tampão fosfato pH 7,0, com as mesmas proporções já citadas, contudo incubados diretamente no *shaker* a 28 °C e 150 rpm por 24 h. Para o branco foi preparado um Erlenmeyer de 125 mL contendo meio basal ureia (12 mL) e palha de arroz (2,5 g) sem a adição do fungo (Rueda *et al.* 2020).

O material foi, na sequência, transferido para tubos do tipo Falcon de 50 mL, e

centrifugado por duas vezes a 4500 rpm por 20 minutos (centrífuga Combate, CELM[®]). O sobrenadante foi filtrado em papel filtro analítico e armazenado a -20 °C, posteriormente liofilizado nas seguintes condições: pressão 45000 uHg, -45 °C por 30 h no liofilizador SL-4049 (Solab[®]) (Rueda *et al.* 2020).

A partir do extrato enzimático obtido da fermentação em palha de arroz, foram avaliadas as enzimas lacase, lignina peroxidase e manganês peroxidase. Inicialmente, foi preparada uma solução de 2 mg.mL⁻¹ em tampão acetato com pH 4,5. As leituras ocorreram em um comprimento de onda específico para cada enzima no leitor de placas *FlashScan530* (AnalytikJena[®]). As reações foram monitoradas por 5 minutos. A atividade enzimática foi expressa em Unidades enzimáticas (U) dada em $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{L}^{-1}$. Para o cálculo da atividade enzimática, foi aplicada equação 8.2, onde V_t é o volume total da reação, 0,2 mL, para todos os ensaios realizados, V_s é o volume da amostra, D_f é o fator de correção da diluição, t é o tempo da reação em minutos, e ε é o coeficiente de extinção ($\text{M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$) (Agrawal; Verma, 2019).

$$U \cdot L^{-1} = \frac{\Delta\text{Abs} \cdot V_t \cdot D_f \cdot 10^{-6}}{\varepsilon \cdot V_s \cdot t} \quad (8.2)$$

A avaliação da atividade de lacase foi feita pelo método oxidação do ácido 2,20-azino-bis (3-etilbenzotiazoline-6-sulfônico) (ABTS) (1,8 mmol.L⁻¹), (*SigmaAldrich*[®]), o qual resulta em diferentes intensidades de azul-verde, dependendo da quantidade oxidada. Em microplaca de 96 poços (Olen[®]), foram acrescentados 40 μL de extrato enzimático ressuspenso; 150 μL de tampão acetato pH 4,5; 10 μL de ABTS. Observada por espectroscopia de UV-vis a 420 nm. O valor $\varepsilon_{\lambda=420\text{nm}} = 36000 \text{ cm}^{-1}$, e o volume da amostra de 0,04 mL (Agrawal; Verma, 2019; Rueda *et al.* 2020).

Para avaliação da enzima Manganês peroxidase, a formação do complexo Mn³⁺-malonato na presença de H₂O₂ gera alteração que pode ser acompanhada por espectroscopia de UV-vis a 270 nm (Wariishi; Valli; Gold, 1992). Em microplaca de 96 poços (Craplast[®]), foram adicionados 20 μL de extrato enzimático ressuspendido; 100 μL de tampão citrato pH 4,5; 40 μL de tampão malonato de sódio com MnSO₄ (0,5 mmol.L⁻¹); e 40 μL da solução de H₂O₂ a 8 mmol.L⁻¹. Para este o valor $\varepsilon_{\lambda=270\text{nm}} = 11590 \text{ cm}^{-1}$, e o volume da amostra de 0,02 mL (Rueda *et al.* 2020; Järvinen *et al.* 2012).

Para avaliação da enzima Lignina peroxidase, a metodologia utilizada foi a da oxidação do álcool veratril (VA) em veratraldeído, que passa de incolor para amarelo. Em microplaca de 96 poços (Olen[®]), foram acrescentados 20 μL de extrato enzimático ressuspendido; 100 μL de tampão citrato pH 3,0; 40 μL de VA; e 40 μL da solução de H₂O₂ a 8 mmol.L⁻¹. As leituras da absorbância foram realizadas em $\lambda = 310 \text{ nm}$. Para esta, o valor $\varepsilon_{\lambda=310\text{nm}} = 9300 \text{ cm}^{-1}$, e o volume da amostra de 0,02 mL (Rueda *et al.* 2020; Khindaria; Yamazaki; Aust, 1995).

9 Resultados e discussão: Triagens enzimáticas

O potencial enzimático das cepas selecionadas foi avaliado por extrato enzimático, sondas fluorescentes e em placa.

9.1 Ensaio em placa

Os resultados para os ensaios em placa de Petri foram compilados na Tabela 2, onde verifica-se que os fungos apresentaram ao menos duas classes de enzimas ativas. O isolado *Rigidoporus* sp. mgk_B1_3, que é um fungo de podridão branca, apresentou atividade para todas as enzimas triadas neste ensaio, corroboram com os relatos sobre o gênero descrito na literatura, para enzimas lignolíticas (Cambria *et al.* 2010). Na Figura 16 é possível verificar exemplos do que foi considerado positivo.

Tabela 2 – Resultados dos testes enzimáticos qualitativos para os melhores fungos.

Fungo	Tratamento			
	Celulase	Lacase (1-naftol)	Lacase (2-naftol)	Lipase
<i>Curvularia</i> sp. mcc_A3_5	-	+	+	+
<i>Dothiorella</i> sp. mcc_A5_3	+	+	-	+
mcc_A4_9	-	+	+	+
<i>A. rigidiuscula</i> mgk_A3_3	+	*	+	+
<i>A. rigidiuscula</i> mgk_A3_15	+	+	-	+
<i>Colletotrichum</i> sp. mgk_A5_5	-	+	*	+
<i>Fusarium</i> sp. mgk_B1_1	+	-	-	+
<i>Rigidoporus</i> sp. mgk_B1_3	+	+	+	+
<i>Bjerkandera</i> sp. mgk_C4_2	-	-	+	+
<i>Alternaria</i> sp. mgk_C3_9	+	-	+	+

(+) positivo, (-) negativo, e (*) inconclusivo

Fonte: Autora, 2025.

Todos os fungos apresentaram atividade lipolítica, mas apenas 6 isolados foram ativos nos ensaios para celulase, conforme se observa na Tabela 2.

Já em relação ao ensaio para as oxidases, os resultados para *Dothiorella* sp. mcc_A5_3, *Alternaria* sp. mgk_C3_9, *Colletotrichum* sp. mgk_A5_5, *Albonectria rigidiuscula* mgk_A3_3, *Albonectria rigidiuscula* mgk_A3_15 e *Bjerkandera* sp. mgk_C4_2 sugerem uma possível seletividade em relação à posição a ser oxidada, o que se evidenciou pelos resultados positivos em apenas um dos testes (1 ou 2-naftol). Dos 10 fungos avaliados,

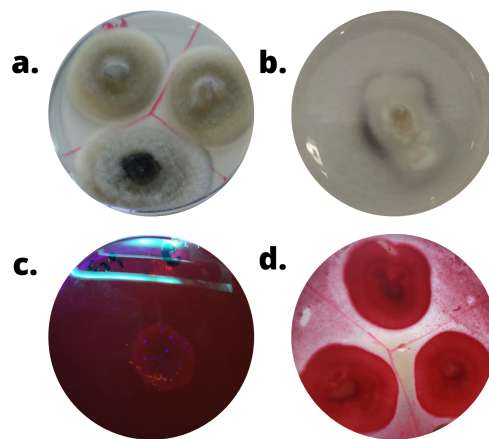


Figura 16 – Placas consideradas positivas a.Lacase (2-naftol), b.Lacase (1-naftol), c.Lipase, d.Celulase.

Fonte: Autora, 2025.

apenas 3 isolados (*Rigidoporus* sp. mgk_B1_3, mcc_A4_9, *Curvularia* sp. mcc_A3_5) não foram seletivos, oxidando ambos os isômeros.

9.2 Ensaio por extrato enzimático

Nas tabelas a seguir são observados os resultados compilados para os ensaios com extrato enzimático obtidos dos micélios para a avaliação das enzimas oxidases: lignina peroxidase (Tabela 3), manganês peroxidase (Tabela 4) e lacase (Tabela 5).

Tabela 3 – Resultados para Lignina Peroxidase sendo o Álcool Veratílico o substrato enzimático.

Amostras	Lignina Peroxidase em U.L ⁻¹			
	t1	t2	t3	t4
<i>Curvularia</i> sp. mcc_A3_5	108,36 ± 8,93	19,93 ± 0,25	15,20 ± 1,80	190,80 ± 23,94
<i>Dothiorella</i> sp. mcc_A5_3	51,18 ± 2,38	0,00 ± 0,00	31,76 ± 3,64	68,82 ± 4,26
mcc_A4_9	125,59 ± 2,98	41,58 ± 4,01	40,72 ± 0,79	44,44 ± 5,74
<i>Albonectria rigidiuscula</i> mgk_A3_3	142,39 ± 12,77	57,34 ± 3,76	26,88 ± 6,08	55,56 ± 4,25
<i>Albonectria rigidiuscula</i> mgk_A3_15	181,58 ± 23,50	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	213,91 ± 9,66
<i>Colletotrichum</i> sp. mgk_A5_5	0,00 ± 0,00	205,62 ± 5,72	229,36 ± 6,89	246,17 ± 23,74
<i>Fusarium</i> sp. mgk_B1_1	76,99 ± 5,02	25,52 ± 3,72	362,72 ± 19,87	51,03 ± 3,43
<i>Rigidoporus</i> sp. mgk_B1_3	90,97 ± 4,39	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
<i>Alternaria</i> sp. mgk_C3_9	0,00 ± 0,00	7,24 ± 1,97	182,34 ± 14,32	7,88 ± 1,93
<i>Bjerkandera</i> sp. mgk_C4_2	40,12 ± 14,30	0,00 ± 0,00	65,23 ± 3,09	134,52 ± 12,57

Fonte: Autora, 2025.

Para as oxidases extracelulares, enzimas que são liberadas no meio, não sendo necessário a absorção do substrato pelo fungo para a metabolização, destaca-se a atividade enzimática da enzima LiP do isolado *Fusarium* sp. mgk_B1_1, que, com 15 dias de incubação, apresentou atividade equivalente a 362,72 U.L⁻¹. O *A. rigidiuscula* mgk_A3_15, que demonstrou 2 picos para LiP, o primeiro em 24 h (181,58 U.L⁻¹), e o máximo em 30 dias (213,91 U.L⁻¹). Já o *Colletotrichum* sp. mgk_A5_5, teve uma atividade de LiP crescente no período avaliado, chegando ao seu máximo de 246,17 U.L⁻¹ em 30 dias de incubação.

Com base nos dados apresentados nas Tabelas 5, 3 e 4, que mostram os resultados dos ensaios com extrato enzimático, observa-se que o meio com palha de arroz favoreceu a produção das enzimas LiP e MnP em detrimento da Lac. Embora os 10 fungos tenham exibido atividade para as três enzimas avaliadas, a lignina peroxidase apresentou maior expressão. Esses resultados podem ter sido influenciados não apenas pelo substrato utilizado, mas também pelo pH do meio, a relação carbono-nitrogênio e pela temperatura (Rueda *et al.* 2020; Lim; Lee; Kang, 2013; Singh, P. *et al.* 2013).

Em um estudo realizado por Song e colaboradores (2022) com fungos endofíticos da *Taxillus chinensis* (DC.), 6 fungos foram avaliados para atividade de oxidases LiP, MnP e Lac. Após 7 dias foi observado o máximo de produção para as enzimas avaliadas, que para a lacase foi 177 U.mL⁻¹ pelo fungo *Pestalotiopsis* sp.; o isolado *Colletotrichum* sp. foi o melhor produtor de MnP com 11,6 U.mL⁻¹; e para LiP o isolado que mais se destacou foi o *D. phaseolorum* com 6,64 U.mL⁻¹ para LiP. O meio de cultivo utilizado foi o farelo de trigo, que neste caso favoreceu a produção de Lac, os autores ainda ressaltam que a produção enzimática não foi constante, e para lignina peroxidase apresentou uma tendência cíclica (Song *et al.* 2022).

Tabela 4 – Resultados para Manganês Peroxidase utilizando o complexo Mn_3^+ -malonato como substrato enzimático.

Amostras	Manganês Peroxidase em U.L ⁻¹ .			
	t1	t2	t3	t4
<i>Curvularia</i> sp. mcc_A3_5	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	14,04 ± 1,94	0,00 ± 0,00
<i>Dothiorella</i> sp. mcc_A5_3	25,40 ± 3,36	6,73 ± 0,49	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
mcc_A4_9	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	19,33 ± 0,49	0,00 ± 0,00
textitAlbonectria rigidiuscula mgk_A3_3	26,52 ± 1,59	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
<i>Albonectria rigidiuscula</i> mgk_A3_15	0,00 ± 0,00	20,88 ± 0,72	8,71 ± 1,66	7,60 ± 1,02
<i>Colletotrichum</i> sp. mgk_A5_5	51,04 ± 1,78	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
<i>Fusarium</i> sp. mgk_B1_1	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	8,28 ± 0,31	29,64 ± 2,09
<i>Rigidoporus</i> sp. mgk_B1_3	58,28 ± 6,38	22,86 ± 2,47	6,84 ± 1,62	0,00 ± 0,00
<i>Alternaria</i> sp. mgk_C3_9	4,95 ± 2,20	0,00 ± 0,00	35,59 ± 4,34	0,00 ± 0,00
<i>Bjerkandera</i> sp. mgk_C4_2	0,00 ± 0,00	34,57 ± 1,31	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00

Fonte: Autora, 2025.

Tabela 5 – Resultados para Lacase utilizando ABTS como substrato enzimático

Amostras	Lacase em U.L ⁻¹			
	t1	t2	t3	t4
<i>Curvularia</i> sp. mcc_A3_5	16,33 ± 0,16	25,26 ± 1,06	2,55 ± 0,23	14,00 ± 0,69
<i>Dothiorella</i> sp. mcc_A5_3	1,44 ± 0,13	5,75 ± 0,19	2,93 ± 0,14	7,74 ± 0,87
mcc_A4_9	0,00 ± 0,00	17,19 ± 1,67	2,29 ± 0,25	1,24 ± 0,22
<i>Albonectria rigidiuscula</i> mgk_A3_3	12,15 ± 0,87	5,93 ± 1,04	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
<i>Albonectria rigidiuscula</i> mgk_A3_15	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	5,89 ± 0,33	15,61 ± 0,37
<i>Colletotrichum</i> sp. mgk_A5_5	0,00 ± 0,00	17,09 ± 1,16	22,68 ± 0,74	12,18 ± 0,30
<i>Fusarium</i> sp. mgk_B1_1	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	4,00 ± 0,81	4,06 ± 0,51
<i>Rigidoporus</i> sp. mgk_B1_3	12,11 ± 0,52	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	9,44 ± 1,47
<i>Alternaria</i> sp. mgk_C3_9	0,00 ± 0,00	9,13 ± 0,30	1,45 ± 0,52	0,00 ± 0,00
<i>Bjerkandera</i> sp. mgk_C4_2	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	8,20 ± 0,11	3,62 ± 0,63

Fonte: Autora, 2025.

Em outro estudo, o fungo *Dictyopanus* sp. LMB4 teve seu máximo de 22,3 U.L⁻¹ para lacase após 30 dias de incubação a 25 °C, sem agitação em meio de fermentação em estado sólido baseado em bagaço de palma. Contudo, quando adicionado indutores (0,5 mmol.L⁻¹ Cu⁺), e ajustada a relação carbono-nitrogênio do meio, o mesmo fungo atingiu a produção máxima de 267,6 U.L⁻¹. Para LiP e MnP os fungos avaliados não mostraram atividade (Rueda *et al.* 2020).

Ao se comparar estes resultados encontrados para os fungos avaliados no presente trabalho onde o melhor para Lac foi 25,16 U.L⁻¹ após 7 dias de incubação (*Curvularia* sp. mcc_A3_5), e MnP 58,28 U.L⁻¹ 24 h (*Rigidoporus* sp. mgk_B1_3) em 24 h, e LiP 362,72 U.L⁻¹ em 15 dias (*Fusarium* sp. mgk_B1_1), verifica-se que os fungos apresentados possuem potencial biotecnológico para aplicação de oxidases.

Corroborando com o potencial do *Curvularia* sp. mcc_A3_5, um estudo com o *Curvularia lunata* em teste de lacase por guaiacol apresentou uma atividade enzimática equivalente a 0,11 U.mL⁻¹, sendo o máximo obtido no sexto dia de incubação. A aplicação em condições otimizadas de pré-tratamento biológico (32 °C, 65 % de umidade e 23 dias de incubação) com este isolado resultou em um aumento na produção de biogás em 28 % a partir dos resíduos de milho (Yadav; Vivekanand, 2020).

Em estudos realizados por Dao e colaboradores (2021) com o fungo *Rigidoporus* sp. partindo da avaliação do DNA, foi confirmada a presença de MnP em seu genoma (Dao *et al.* 2021). Um estudo com *Rigidoporus lignosus* isolou lacase e MnP, e avaliou essas enzimas na solubilização do lignina, com resultados que sugerem sinergismo entre estas enzimas (6 %, 6,4 % e 21 % respectivamente) (Galliano *et al.* 1991). Estes estudos com o *Rigidoporus* sp., corroboram para justificar a alta atividade do isolado *Rigidoporus* sp. mgk_B1_3 para MnP.

A expressão de LiP para o gênero *Fusarium* parece ser pouco estudada. Um estudo com *Fusarium solani* não a detectou. E, em relação a outras fenol oxidases, foram encontrados baixos teores de MnP (Saparrat *et al.* 2000). Já para lacase, estudos aplicados a processos biotecnológicos vem se mostrando promissores para o *F. incarnatum* LD-3 e *F. solani* MAS2 (Pessôa *et al.* 2017). Deste modo, o resultado encontrado para o isolado *Fusarium* sp. mgk_B1_1) para atividade de LiP é relevante.

9.3 Ensaios miniaturizados por Sondas fluorogênicas

Na tabela 6 são apresentados os resultados obtidos nas primeiras 24 h do ensaio, considerando-se os tempos de 1 h, 6 h, 12 h, e 24. Os dados completos são apresentados no Anexo E. Ressalta-se que os valores apresentados foram normalizados pelo controle da sonda.

Em relação à triagem enzimática por sondas, considerando o limite de detecção da técnica com $\geq 5\%$ (Silva, C. P. DA, 2012), todos os 10 fungos apresentaram uma boa taxa de conversão para a sonda BVMO2, mostrando capacidade de oxigenação de cadeias cíclicas formando lactonas; no entanto, apenas 3 apresentaram para as sondas BVMO1, ou seja, capazes de promover a formação de cetonas; e para a hidrólise de ésteres com a sonda Est1; 4 fungos demonstraram capacidade lipolítica com a sonda Lip1; 2 mostraram capacidade hidrolítica para epóxidos terminais com a sonda EPH1; e 1 apresentou a capacidade de hidrolisar epóxidos com cadeia vicinal, pela sonda EPH2.

Destaca-se o isolado *mcc_A4_9*, que foi selecionado no teste de tolerância aos fármacos por ter tolerado todos os grupos, e que converteu 100% da sonda BVMO2 após 1 h de reação. Enquanto para esterase, o máximo foi igual a 34,7% em 24 h de conversão da EST1, e devido à ausência de atividade para a sonda Lip1, presume-se que há uma preferência por ésteres de cadeia curta.

O *Albonectria rigidiuscula* *mgk_A3_3* apresentou um perfil diversificado no ensaio preliminar de tolerância aos fármacos, não crescendo apenas em hormônios, e quanto à triagem por sondas, o resultado também se mostrou variado, não sendo observado atividade apenas para a sonda EST1. Destaca-se as atividades para Lipase que após 3 h do início da incubação já era possível observar sua atividade, e atingiu seu máximo em 24 h (56,4%) (Figura 17), ou seja, apresentando preferência para ésteres de cadeia longa, uma vez que não foi detectada atividade para esterase. A enzima de Baeyer-Villiger monooxigenase também apresentou sua melhor taxa de conversão em 24 h para a sonda BVMO1 (25,7%), enquanto a taxa de conversão da sonda BVMO2, foi constante próxima de 80%. Apesar de ter sido notada atividade para as epóxido-hidrolases, essas ficaram no limite de detecção da técnica.

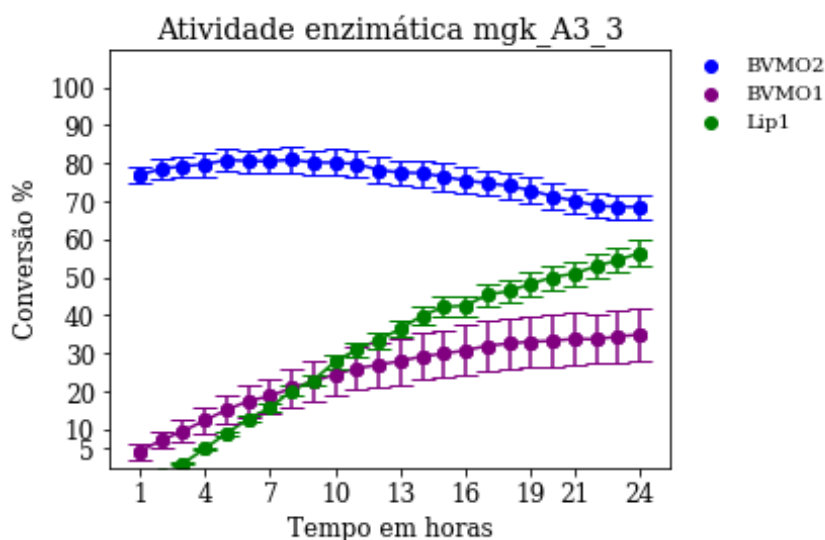


Figura 17 – Atividade enzimática por sonda para o *A. rigidiuscula* *mgk_A3_3*.

A cepa de *Alternaria* sp. mgk_C3_9 apresentou crescimento significativo apenas para os antitérmicos e AINES, entretanto, demonstrou uma expressiva produção enzimática no ensaio com sondas fluorescentes (Figura 18). Sendo que para as sondas Lip1, Est1 e EPH1 começou a apresentar uma taxa de conversão com 2 h de reação, atingindo um máximo de 60 %, 52 % e 35,6 % em 24 h respectivamente, para EPH2 a taxa máxima de conversão que foi de 32,4 % também ocorreu em 24 h de reação, assim como para BVMO1 que atingiu os 8,8 % em 24 h, enquanto a BVMO2 manteve sua atividade próxima de 60 % durante todo o período avaliado.

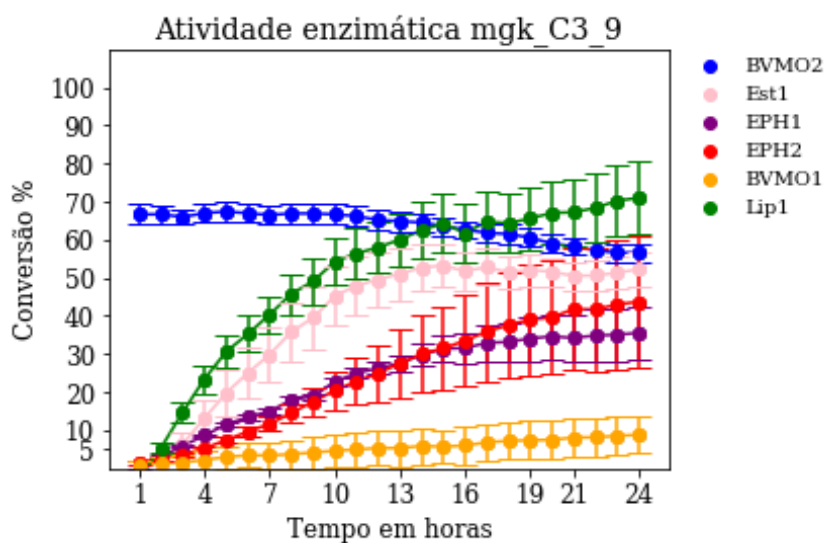


Figura 18 – Atividade enzimática por sonda para o *Alternaria* sp. mgk_C3_9.

Fonte: Autora, 2025.

Já o *Albonectria rigidiuscula* mgk_A3_15, que não se mostrou tolerante para com os hormônios e fluconazol, e que apresentou um crescimento expressivo apenas para amitriptilina, revelou um perfil enzimático na avaliação por sondas diversificado, excetuando-se pela esterase e epóxido-hidrolase vicinal. Sendo que para lipase começou a apresentar uma taxa de conversão da sonda Lip1 com 3 h de reação, atingindo um máximo de 41,7 % em 24 h. Para a epóxido-hidrolase avaliada com a sonda EPH1 o auge de conversão ocorreu em 24 h, com uma taxa de 8,98 %. Em relação as mono-oxigenases, a conversão da sonda BVMO1 apresentou seu máximo após 18 h de incubação, atingindo 19,9 %, enquanto a conversão da BVMO2 manteve sua atividade próxima de 80 % durante todo o período avaliado, sendo seu máximo igual a 80,5 % atingido em 5 h de reação (Figura 19).

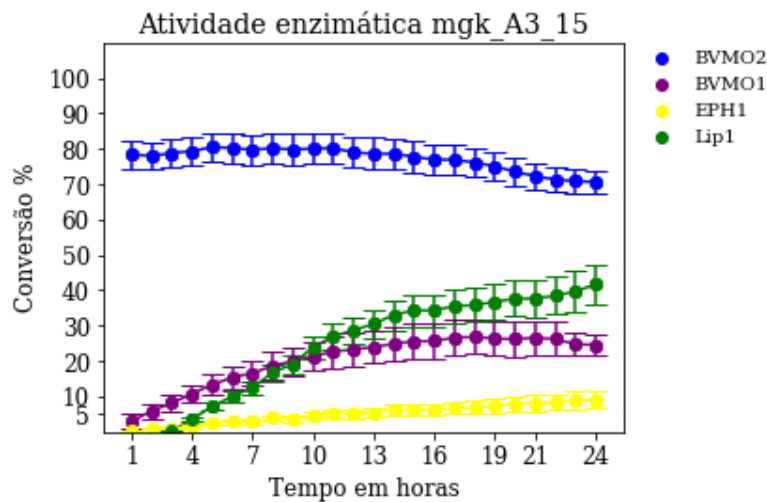


Figura 19 – Perfil enzimático para o *Albonectria rigidiuscula* mgk_A3_15.

Fonte: Autora, 2025.

Na avaliação enzimática por sondas, o *Fusarium* sp. mgk_B1_1 apresentou resultado positivo para as oxidases intracelulares, com uma taxa de conversão para a sonda BVMO2 - a qual se mostrou constante em aproximadamente 80,0 %. Para lipase, tanto em placa como na avaliação por sondas, o resultado foi positivo, sendo a conversão iniciada após 2 h de reação, convertendo até 43 % da Lip1 em 24 h (Figura 20).

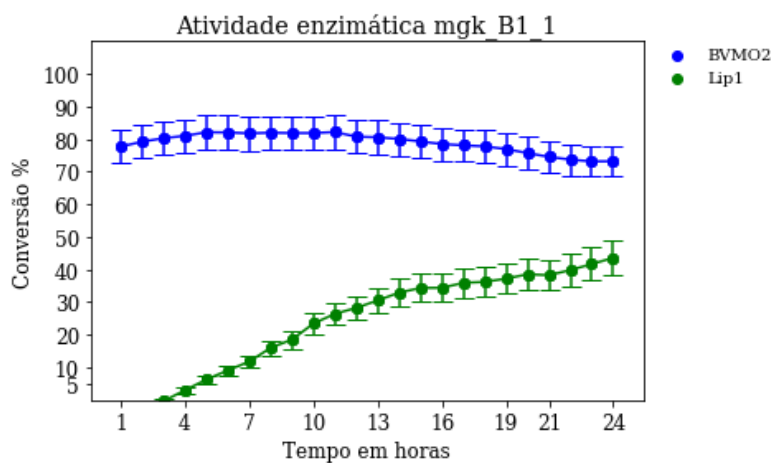


Figura 20 – Perfil enzimático avaliado por sondas para o *Fusarium* sp. mgk_B1_1.

Fonte: Autora, 2025.

Tabela 6 – Perfil enzimático para as enzimas, em função dos substratos: lipase, com a sonda Lip1; epóxido-hidrolase com as sondas EPH1 e EPH2; Bayer-Village mono-oxigenase, com os substratos BVMO1 e BVMO2; e esterase, com a sonda Est1

Fungo	Tempo em Horas	Conversão enzimática dos substratos em % RFU					
		Lip1	Est1	EPH1	BVMO2	BVMO1	EPH2
<i>Curvularia</i> sp. mcc_A3_5	1	0,24	0,17	0	100,00	0	0
	6	0	0	0	35,35	0	0
	12	0	0,76	0	17,48	0	0
	24	0	1,88	0	3,21	0	0
<i>Dothiorella</i> sp. mcc_A5_3	1	0,18	0,34	0	100,00	0	0
	6	0	0,02	0	40,17	0	0
	12	1,06	1,32	0	21,03	0	0
	24	3,89	4,01	0	7,77	0	0
mcc_A4_9	1	0,12	0,69	0	100,00	0	0
	6	0	4,64	0	35,82	0	0
	12	0	14,78	0	17,61	0	0
	24	0,42	34,68	0	4,33	0	0
<i>A. rigidiuscula</i> mgk_A3_3	1	0	0	0	76,87	2,90	0
	6	12,73	0	0	80,56	12,95	0,57
	12	33,52	0	0,24	78,19	19,96	0,58
	24	56,40	0	1,68	68,49	25,69	0,41
<i>A. rigidiuscula</i> mgk_A3_15	1	0	0	0,24	78,43	2,05	0
	6	10,03	0	2,88	80,19	11,46	0,32
	12	28,69	0	5,02	79,00	17,27	0,60
	24	41,66	0	8,98	70,59	17,98	0,93
<i>Colletotrichum</i> sp. mgk_A5_5	1	0,18	0,85	0	100,22	0	0
	6	0	0,42	0	49,20	0	0
	12	1,00	1,58	0	28,99	0	0
	24	2,72	3,63	0	15,00	0	0
<i>Fusarium</i> sp. mgk_B1_1	1	0	0	0	77,70	0,29	0
	6	9,11	0	0	82,03	2,58	0,15
	12	28,26	0	0	80,74	3,45	0,23
	24	43,59	0	0,99	73,19	3,30	0
<i>Rigidoporus</i> sp. mgk_B1_3	1	0,24	0,33	0	100,00	0	0
	6	0	0,48	0	31,74	0	0
	12	0,08	2,56	0	14,87	0	0
	24	0,23	6,91	0	1,30	0	0
<i>Alternaria</i> sp. mgk_C3_9	1	0	0	0	66,63	0,71	1,57
	6	35,29	25,04	13,47	66,93	3,48	9,66
	12	58,02	49,56	26,29	65,18	5,35	24,97
	24	70,98	52,30	35,59	56,64	8,85	43,71
<i>Bjerkandera</i> sp. mgk_C4_2	1	0,19	2,41	0	100,00	0	0
	6	0	1,60	0	55,57	0	0
	12	0,02	2,11	0	34,17	0	0
	24	0	2,40	0	19,69	0	0

10 Conclusão dos ensaio de atividade enzimática

Nesta etapa foram submetidos a triagem enzimática 10 fungos que haviam apresentado boa tolerância pelo teste com TTC aos fármacos. Os quais mostraram diversidade enzimática, em especial para enzimas do tipo oxi-redutases e hidrolíticas.

No modelo proposto de avaliação, o fármaco foi uma das únicas fontes de carbono que os microrganismos possuíam, sendo a degradação destes uma necessidade de sobrevivência, o que possivelmente favoreceu a seleção de microrganismos produtores de oxidases.

Os resultados da prospecção enzimática demonstram que os isolados avaliados podem vir a contribuir com um desenvolvimento mais sustentável dentro do proposto pelos ODS.

Em face ao exposto, e observando as limitações das triagens enzimáticas realizadas, foram selecionados para dar continuidade ao trabalho os isolados *Albonectria rigidiuscula* mgk_A3_15 e *Alternaria* sp. mgk_C3_9 devido à diversidade enzimática. E pelo perfil de tolerância aos fármacos, sugere-se ainda avaliar as reações de biotransformação dos fungos com o fármaco ibuprofeno, o qual é amplamente utilizado na clínica, é de fácil aquisição.

Parte IV

Reações de Biotransformação

11 Biotransformação

11.1 Biotransformações mediadas por fungos

Dentre as biotransformações, destaca-se no âmbito deste projeto a que envolve modificações estruturais em compostos de interesse, como fármacos, por exemplo, para a obtenção de novas estruturas (Singh, 2017). Neste processo são envolvidas reações tais como hidroxilação, sulfonação, oxidação, desracemização, redução enantiosseletivas de cetonas, entre outras (Borges *et al.* 2009). Uma característica interessante da biotransformação mediada por fungos é a manutenção do grupo farmacofórico original, o que é importante para a manutenção da atividade, alterando apenas fatores complementares, como a adição de uma nova função orgânica na estrutura, e a polaridade, que, por consequência, pode acarretar uma melhor relação estrutura-atividade do fármaco (Singh, 2017; Palaric *et al.* 2019).

A exemplo desses processos, o pró-fármaco bromexina foi convertido em ambroxol por espécies do gênero *Cunninghamella* spp. (NCIM689, NCIM 691, NCIM 687), sendo possível a formação de quatro isômeros, sendo os majoritários (*E*)-4-hidroxi-dimetilbromexina (Figura 21) e (*E*)-3-hidroxi-dimetilbromexina, e os minoritários (*Z*)-4-hidroxi-dimetilbromexina e (*Z*)-3-hidroxi-dimetilbromexina (Dube; Kumar, 2017). Outro exemplo é o da sapogenina Neoruscogenina, composto responsável pela atividade biológica da *Ruscus aculeatus* usada no tratamento de insuficiência venosa crônica, que foi biotransformada pelo fungo endofítico *Alternaria eureka* isolado da *Astragalus angustifolius* em diferentes compostos, os quais apresentam características similares aos produtos de metabolização pelo complexo enzimático do citocromo P450 (Özçinar *et al.* 2018). Esses exemplos apontam para a possibilidade de estudos farmacocinéticos alternativos, sem o uso de animais e para novas vias de síntese orgânica.

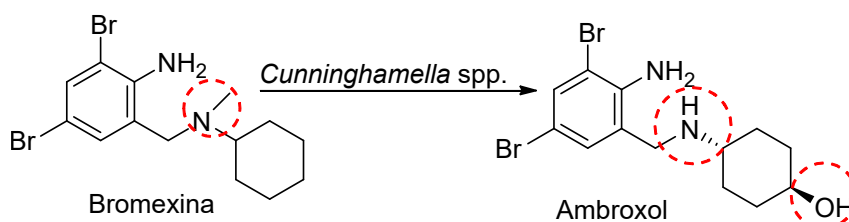


Figura 21 – Biotransformação da bromexina a ambroxol ((*E*)-4-hidroxi-dimetilbromexina) por fungos *Cunninghamella* spp.

Fonte: Adaptado Dube; Kumar, 2017.

Como comentado anteriormente, a síntese de compostos que possuem centro de quiralidade é, comumente, muito difícil e dispendiosa, como exemplo da aplicação de

fungos para melhora do processo de desracemização, tem-se o caso do fármaco Zopiclona (Imovane®), um hipnótico produzido em mistura racêmica. Em estudo com fungos do gênero *Cunninghamella* spp., a Zopiclona foi biotransformada em sua forma mais ativa, a (+)-(*S*)-*N*-Des-Zopiclona, com 38 % de excesso enantiomérico (*e.e*) após 240 h (10 dias) de incubação (Albuquerque; Gaitani; Oliveira, 2015).

O antipsicótico risperidona tem como forma ativa o composto 9-hidroxisperidona, porém na síntese convencional, também pode ocorrer a formação do 7-hidroxisperidona, proveniente da hidroxilação em C-7. Pensando na funcionalização da risperidona, o fungo filamentoso *Cunninghamella elegans* (NRRL 1393 ATCC 10028B) foi avaliado, e mostrou ser capaz de hidroxilar seletivamente em C-9, apresentando um ótimo resultado na síntese enantiosseletiva, formando (+)-9-hidroxisperidona com 100 % de excesso enantiomérico (Figura 22) (Bocato *et al.* 2012).

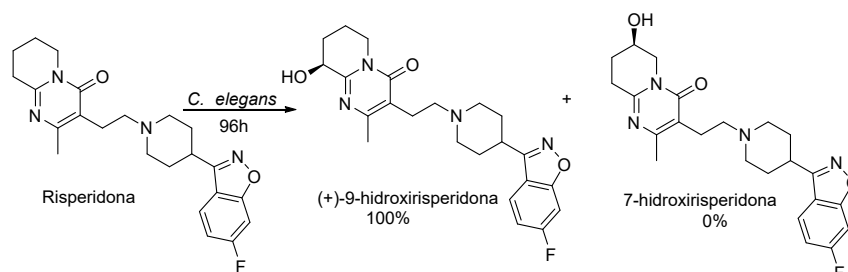


Figura 22 – Hidroxilação da Risperidona por *C. elegans*.

Fonte: Adaptado Bocato *et al.*, 2012.

11.1.1 Biotransformações mediadas por fungos endofíticos

A busca por moléculas mais ativas e estáveis é uma preocupação constante da indústria farmacêutica. O resveratrol, um importante antioxidante produzido por fungos endofíticos presentes na casca da uva, pode ser modificado para melhorar suas propriedades. A metilação das hidroxilas do resveratrol resulta no pterostilbeno (*trans*-3,5-dimetoxi-4'-hidroxistilbeno), uma molécula mais hidrofóbica, que possui melhor absorção, maior tempo de meia-vida e um potencial farmacológico mais elevado. Em um estudo envolvendo o fungo endofítico *Penicillium* sp. F5, isolado da planta medicinal chinesa *Polygonum cuspidatum*, foi observada a conversão de 6 % do resveratrol em pterostilbeno, conforme ilustrado na Figura 23 (Xu *et al.* 2020).

A derivatização de compostos é uma estratégia valiosa para a formação de *building blocks* químicos. Nesse contexto, a biotransformação da progesterona por fungos endofíticos tem-se mostrado uma abordagem promissora para a prospecção de novos esteroides bioativos. Estudos recentes demonstraram que a biotransformação da progesterona pelos fungos *Penicillium citrinum* e *Talaromyces* sp., isolados das folhas de *Handroanthus impetiginosus*, é particularmente eficiente. O *P. citrinum* converteu 93 % da progesterona em

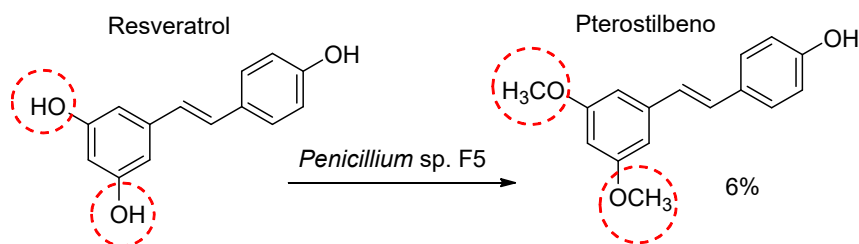


Figura 23 – Biotransformação do Resveratrol em Pterostilbeno, em caldo batata dextrose

Fonte: Adaptado Xu *et al.*, 2020.

17 α -metiltestosterona, enquanto o *Talaromyces* sp. produziu quatro compostos diferentes, sendo o mais abundante a androst-4-ene-3,17-diona. A Figura 24 apresenta os compostos gerados e suas respectivas porcentagens de conversão, evidenciando o potencial desses fungos na produção de esteroides bioativos (Pereira dos Santos *et al.* 2022).

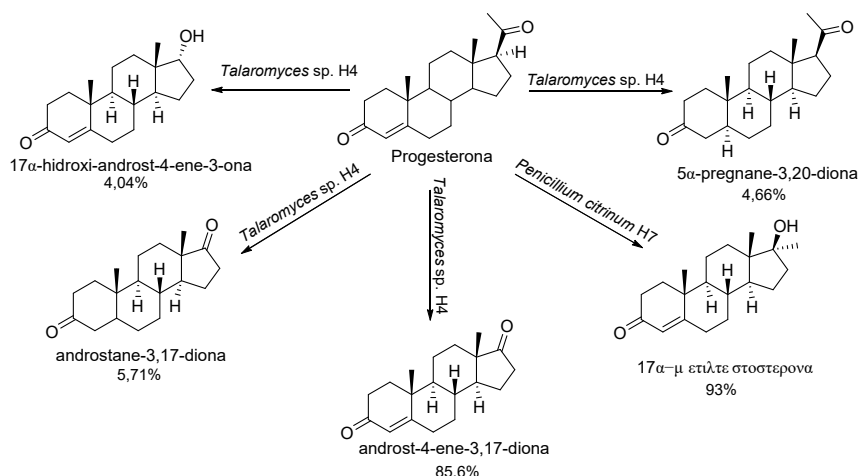


Figura 24 – Produtos da biotransformação da progesterona por *P. citrinum* e *Talaromyces* sp.

Fonte: Adaptado de Pereira dos Santos *et al.*, 2022.

A síntese de aminas quirais é importante para diferentes áreas, em especial na construção de *building blocks*. Um estudo com fungo endofítico *Alternaria arborescens*, isolado das folhas de *Humiria balsamifera* e *Tocoyena bullata*, se mostrou promissor na biotransformação enantiosseletivas da *rac*-1,2,3,4-tetra-hidro-1-naftilamina em (*R*)-1,2,3,4-tetra-hidro-1-naftilamina (Figura 25), com uma taxa de conversão de 48 % quando em batelada em 48 h, e 51 % quando em fluxo constante, o *e.e* foi de > 99 %. Tal resultado indicou a presença de enzimas transaminases, o meio de cultivo, casca de laranja, se mostrou um ótimo indutor para esta enzima, fornecendo os cofatores necessários (Pinheiro *et al.* 2023).

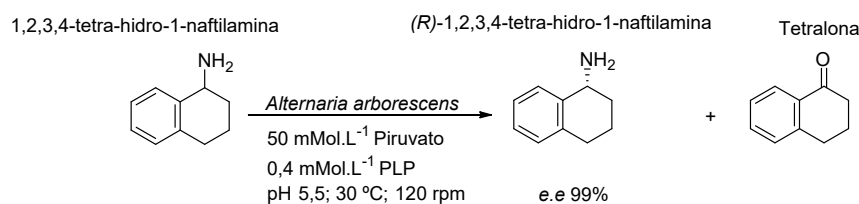


Figura 25 – Resolução enantiomérica da amina 1,2,3,4-tetra-hidro-1-naftilamina em (R)-1,2,3,4-tetra-hidro-1-naftilamina

Fonte: Adaptado de Pinheiro *et al.*, 2023

11.2 Biotransformação do Ibuprofeno

O ibuprofeno é um fármaco anti-inflamatório não esteroidal (AINES) de venda livre, utilizado no tratamento e auxílio de diversas doenças, como cólicas, febres, câncer e dores de cabeça. Seu mercado global é de 15 mil toneladas por ano (Peng *et al.* 2024; Ratnasari *et al.* 2024).

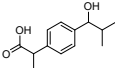
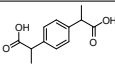
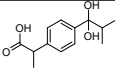
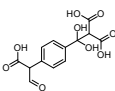
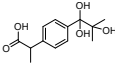
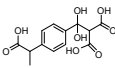
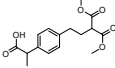
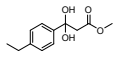

As reações de biotransformação do ibuprofeno por fungos mostram que enzimas de oxidação, como lacase e mono-oxigenases, são efetivas na modificação estrutural do fármaco, e não só, mas que a presença deste pode funcionar como indutor para a produção de enzimas como lacase (Bankole *et al.* 2020).

O fungo *Penicillium aurantiogriseum* 2AJS, mostrou-se promissor na biotransformação, capaz de modificar até 82 % do ibuprofeno, formando os seguintes metabólitos: hidróxi-ibuprofeno e ácido 2,3-di-hidroxsuccinico (Tabela 7); os autores atribuem o resultado à expressão de lacase (Suresh; Abraham, 2023).

O estudo com o fungo *Apiotrichum* sp. IB-1, indicou um pH ótimo de 7,0 para biotransformação do ibuprofeno (5 mg/L) em 48 h, foi possível observar a modificação em 96 %. E por espectrometria de massas, os autores identificaram 6 produtos formados, derivados de reações de oxidação. A Tabela 7 mostra os metabólitos e sua relação massa/carga (m/z) (Peng *et al.* 2024).

Os fungos endofíticos também mostram capacidade de modificação estrutural do ibuprofeno. As cepas de *Aspergillus niger*, *Aspergillus nidulans* e *Bipolaris tetramera* isoladas da planta medicinal *Plantago lanceolata*, reduziram de 100 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ para valores inferiores a 30 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, chegando inclusive a quantidades não detectáveis do fármaco, em um período inferior a um mês. Sendo o produto resultante o hidróxi-ibuprofeno (7) (Gonda *et al.* 2016).

Tabela 7 – Metabólitos formados na biotransformação do ibuprofeno por fungos

Composto	Estrutura química	m/z $[M - H]^-$	Referência
hidroxi- ibuprofeno		221	(Peng <i>et al.</i> 2024; Gonda <i>et al.</i> 2016; Kasonga; Kamika; Ngole-Jeme, 2022; Khan; Murphy, 2022; Suresh; Abraham, 2023; Wang; Liang <i>et al.</i> 2022)
Carboxi- ibuprofeno		235	(Peng <i>et al.</i> 2024)
Di-hidroxi- ibuprofeno		237	(Peng <i>et al.</i> 2024)
ácido 2-((4-(1-carboxi-2-oxoetil)fenil) di-hidroximetil)malônico		279	(Peng <i>et al.</i> 2024)
1,1,2-tri-hidroxi-ibuprofeno		253	(Peng <i>et al.</i> 2024; Wang; Liang <i>et al.</i> 2022)
ácido 2-((4-(1-carboxietil)fenil) di-hidroximetil)malônico		297	(Peng <i>et al.</i> 2024; Wang; Liang <i>et al.</i> 2022)
ácido 2-(4-(4-metoxi-3-(metoxicarbonil)-4-oxobutil)fenil)propanoico		305	(Peng <i>et al.</i> 2024)
metil-3-(4-etilfenil)-3,3-dihidroxi-propanoato		223	(Peng <i>et al.</i> 2024)
ácido 2,3-di-hidroxi-succinico		149	(Suresh; Abraham, 2023)

Fonte: Autora, 2025..

11.3 Objetivos

O objetivo desta etapa foi verificar o potencial de biotransformação do ibuprofeno pelos fungos selecionados na triagem enzimática em relação ao ibuprofeno.

12 Metodologia

12.1 Controle de qualidade fármaco

Esta etapa fez-se necessária para verificação do grau de pureza e purificação, uma vez que o fármaco utilizado para as próximas etapas foi adquirido em farmácia de manipulação da cidade de Foz do Iguaçu, Paraná, Floreasca (lote ALIBB0062020), sem excipientes.

12.1.1 Recristalização

A recristalização procedeu-se de acordo com a Farmacopeia Brasileira 6^a edição, na qual se dissolveu em 20 mL de acetona 500 mg do fármaco. A solução foi agitada e filtrada com auxílio de papel filtro analítico, e colocada para secar na capela em temperatura ambiente. O resíduo foi submetido aos ensaios seguintes para comparação com a forma adquirida ([ANVISA, 2019](#)).

12.1.2 Ponto de Fusão

O ponto de fusão foi aferido pelo PFM-II Digital (MS TECNOPON[®] Instrumentação), onde um capilar com a amostra foi submetido ao aquecimento. O ponto de fusão esperado para o fármaco é de 75 °C ([ANVISA, 2019](#)).

12.1.3 Infra-vermelho

O ensaio de infravermelho foi realizado no Laboratório Multiusuário Engenheira Enedina Alves Marques (UNILA), pela bolsista-técnica Luísa Parra Sierra, no equipamento FRONTIER MIR+SP10 SDT (Perkin Elmer[®]), com acessório para pastilha de brometo de potássio (KBr). Analisou-se as pastilhas em KBr, tanto do fármaco recristalizado como do comercial ([ANVISA, 2019](#); [Garrigues](#); [Galignani](#); [Delaguardia, 1993](#); [Andrioli *et al.* 2014](#)).

12.1.4 Ressonância magnética nuclear

Os espectros de RMN foram obtidos em setembro de 2024 no laboratório de Multiusuário de Ressonância Magnética Nuclear da Universidade Federal do Paraná (LabRMN), em colaboração com Professor Dr. Andersson Barison. Sendo que os espectros de hidrogênio (¹H) para o ibuprofeno comercial foram obtidos em 400 MHz (Bruker[®]

AVANCE I 400), enquanto para o ibuprofeno recristalizado os espectros de ^1H foram obtidos em 200 MHz (Bruker[®] DPX 200). Para ambos os espectros de carbono 13 (^{13}C) 100 MHz no Bruker[®] AVANCE I 400. Foi preparada uma amostra de 30 g.L^{-1} Ibuprofeno comercial em clorofórmio deuterado (CDCl_3), e 20 g.L^{-1} Ibuprofeno recristalizado em CDCl_3 . O número de *scans* para o hidrogênio foi 8, e para carbono 2k. Em todos os experimentos o CDCl_3 continha como padrão interno tetrametilsilano (TMS) 0,1 % (Sigma-Aldrich[®]). Os espectros foram processados e analisados no *software* Bruker TopSpin 4.1.4, com licença acadêmica.

12.2 Ensaio de citotoxicidade do ibuprofeno

A reativação das cepas fúngicas foi realizada em caldo batata dextrose por 4 dias em *shaker* orbital a 150 rpm e 28 °C. Realizou-se uma diluição inicial 1:10 do micélio fúngico recém crescido em solução salina 0,85 %, homogeneizou-se no vórtex; e realizou-se leitura em espectrofotômetro UV-vis a 530 nm (Weblabor modelo M51). As amostras foram diluídas em solução salina (NaCl 0,85 %) até ficarem em 0,5 na escala de McFarland (Kowalska-Krochmal; Dudek-Wicher, 2021).

Em microplaca de 96 poços, procedeu-se à incubação da solução fúngica em caldo Muller-Hilton e variada quantidade da solução de Ibuprofeno em DMSO, de modo a obter as seguintes concentrações finais de 10 a 200 mg.L^{-1} , conforme Tabela 8 (Kowalska-Krochmal; Dudek-Wicher, 2021; Moussa *et al.* 2013).

Tabela 8 – Diluição utilizada para ensaio de citotoxicidade do ibuprofeno, a concentração final do fármaco na placa e os controles.

Concentração final (mg.L^{-1})	V fármaco (μL)	V MH (μL)	V Fungo (μL)
10	1	179	20
30	3	177	20
50	5	175	20
80	8	172	20
100	10	170	20
150	15	1165	20
200	20	160	20
Branco	-	200	-
C+	-	180	20
C-	20	180	-
C DMSO*	20	160	20

*controle DMSO sem o fármaco.

Fonte: Autora, 2025.

A microplaca foi incubada em *shaker* orbital a 150 rpm e 28 °C por 48 horas, posteriormente a esse período foi adicionado em cada poço 20 μL de solução de TTC a

0,05 % e novamente incubada, desta vez por 2 h, ao final realizou-se a leitura a 450 nm no leitor de microplacas (Loccus[®] - LMR-96) (Moussa *et al.* 2013).

Para calcular a citotoxicidade em porcentagem foi utilizada a seguinte equação (Gudiña *et al.* 2010):

$$\% = \left(1 - \frac{\text{Amostra}}{\text{Controle}}\right) * 100 \quad (12.1)$$

12.3 Reação de biotransformação do Ibuprofeno

Os fungos foram inoculados em meio *Czepak* em *shaker* orbital a 150 rpm e 28 °C por 3 dias. Para biocatálise, transferiu-se 0,5 g deste inóculo inicial, para Erlenmeyer de 125 mL com 50 mL de tampão fosfato (pH 7,0) enriquecido com solução de ibuprofeno em DMSO, de modo a se obter uma concentração final de 100 mg.L⁻¹. O ensaio foi realizado em triplicata. A reação foi monitorada por 2h, 24h, 48h, 72h e 96h. Foram realizados controle negativo, que consistiu no fármaco e tampão, para avaliar possível degradação espontânea do ibuprofeno. E controle positivo - fungo e tampão, a fim de monitorar possíveis metabólitos do fungo. A reação ocorreu em *shaker* orbital a 150 rpm e 28 °C. Posteriormente, foram armazenadas em tubos Falcon de 50 mL em ultrafreezer a -80 °C, e liofilizadas por 24 horas a -88°C a uma pressão de 0,0944 mbar em liofilizador Alpha 2-4 LSCBasic (Christ[®]), conforme esquema apresentado na Figura 26 (Palaric *et al.* 2019).

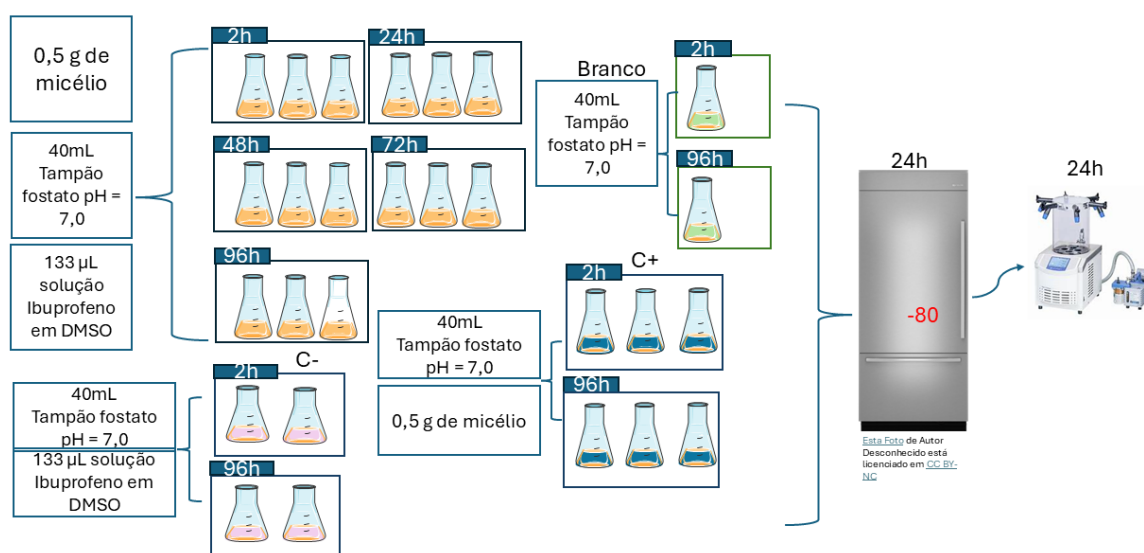


Figura 26 – Resumo esquemático do experimento de biotransformação do Ibuprofeno.

Fonte: Autora, 2025.

12.3.1 Extração

Nesta etapa, as triplicatas liofilizadas foram reunidas em um único tubo Falcon com a finalidade de aumentar a massa final dos compostos formados, e adicionou-se 10 mL de acetonitrila e 5 mL de água ultrapura, a amostra foi submetida a agitação no *Ultraturrax* (Ika®) por 3 minutos a 6000 rpm. Posteriormente, foi realizada a etapa de *salt-out*, onde foram adicionados 4 g $MgSO_4$, 1 g de NaCl e 1,5 g de acetato de sódio NaOAc. Essa mistura foi agitada no vórtex (NA3600 - NORTECIENTÍFICA®) por 1 minuto, e centrifugada por 15 minutos a 4000 rpm (Rontina 380 - Hettich Zentrifugen®) (Salvia *et al.* 2012; Gabardo *et al.* 2021).

Na sequência, realizou-se a etapa de purificação pela metodologia de *QuEChERS* (*Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, Safe*). Para isto, foram transferidos 2 mL para um tubo Falcon de 15 mL com 300 mg $MgSO_4$, como agente secante; 50 mg de PSA (amina primária secundária) (SigmaAdrech), que tem como objetivo reter as impurezas como açúcares e ácidos orgânicos; e 150 mg de sílica C18 (octadecilsilano) (SigmaAdrech), com a função de adsorver as impurezas lipídicas, homogenizada em vórtex (NA3600 - NORTECIENTÍFICA®) por 1 minuto, e centrifugada por 15 minutos a 4000 rpm (Hettich Zentrifugen®) (Gabardo *et al.* 2021).

Por fim, com auxílio de uma seringa de 5 mL e filtro de PFET 0,22 μm filtrou-se 1 mL do sobrenadante em um vial de 1,5 mL, e armazenou-se em freezer a -8 °C, para posterior análise por cromatografia. A Figura 27 apresenta de modo resumido o processo de extração e preparo da amostra para as análises subsequentes.

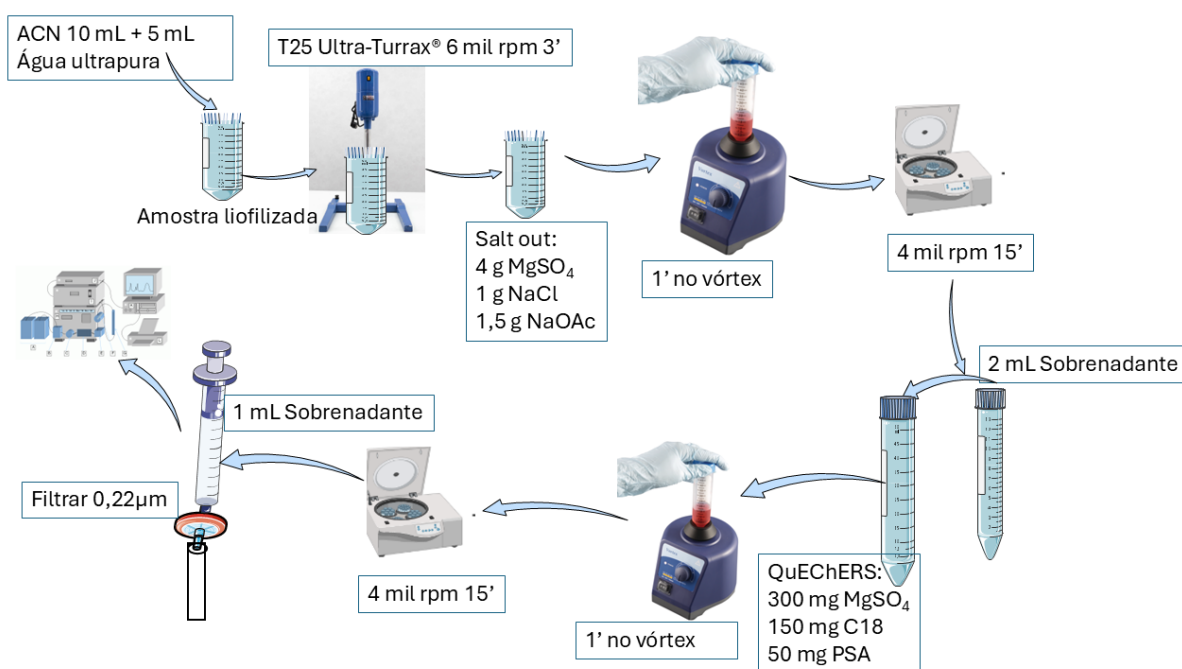


Figura 27 – Resumo esquemático do *QuEChERS*

12.3.2 Análise química dos compostos formados

12.3.2.1 Cromatografia líquida de Alta Eficiência (HPLC)

As amostras foram submetidas a análise cromatográfica no equipamento HPLC Dionex Ultimate3000 (Thermo Scientific®), como fase estacionária foi utilizada coluna própria para HPLC do tipo C18, que a qual tem 18 carbonos ligados ao grupo silano e apresenta característica apolar, nas dimensões 25 cm x 4,6 cm x 5 μ m da ACE®. O sistema de fase móvel foi 45:55 H₂O 0,01 % HCOOH : ACN, com fluxo de 1,5 mL.min⁻¹, por 15 minutos. O monitoramento ocorreu pelo detector de fluorescência no comprimento de onda λ_{ex} = 220 nm e λ_{em} = 290 nm, e por UV em λ = 220 nm (Phuong Truong, 2007; Bragança *et al.* 2012).

Para dosamento, foi preparada uma curva padrão de Ibuprofeno comercial (FLORESCEA (lote ALIBB0062020)), nas concentrações 50 mg.L⁻¹, 100 mg.L⁻¹, 150 mg.L⁻¹, 200 mg.L⁻¹, 250 mg.L⁻¹ e 300 mg.L⁻¹, a qual também foi purificada por *QuEChERS*. Ademais, fez-se uso do padrão interno (PI) benzofenona em todas as amostras e na curva. A concentração final da benzofenona foi de 50 g.L⁻¹, o qual é um parâmetro para as possíveis variações do equipamento.

12.3.2.2 Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

Os espectros de RMN foram obtidos em setembro de 2024 no LabRMN-UFPR. Sendo que os espectros de ¹H foram obtidos no equipamento 200 MHz (Bruker® DPX 200), e os espectros de ¹³C foram obtidos em 100 MHz (Bruker® AVANCE I 400). O número de *scans* variou de acordo com a concentração dos metabólitos na amostra. Todos os experimentos foram realizados em CDCl₃ com TMS 0,1 % (Sigma-Aldrich®). Os espectros foram processados e analisados no *software* Bruker TopSpin 4.1.4, com licença acadêmica.

12.3.2.3 Cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada ao espectrômetro de massas (UPLC-MS/MS)

Análise realizada no Laboratório Massas da Universidade Estadual de Maringá - COMCAP, sob responsabilidade do técnico Victor Machado Lippa, em dezembro de 2024.

Para injeção, as amostras foram ressuspensas em 1,0 mL de MeOH (LC-MS) e filtradas em filtro 0,22 μ m (PTFE).

As análises foram realizadas no equipamento UHPLC Shimadzu Nexera X2 acoplado ao espectrômetro de massas Q-ToF Bruker Impact II. A fase estacionária: coluna SB-C18 Agilent® (1,8 μ m x 2,1 x 150 mm), a temperatura da coluna foi mantida em 30 °C. O volume de injeção foi de 5 μ L, e a corrida de 25 minutos cada.

Foi realizado o modo de injeção negativo. A fase móvel foi isocrática 55:45 ACN

LC-MS (0,1 % ácido fórmico) e água ultrapura (0,1 % ácido fórmico), com o fluxo de 0,3 mL.min⁻¹.

Para calibração fez-se o uso de 20 μ L de formato de sódio (HCOONa). O método de análise usou uma faixa de 50-1500 (m/z) de massa; e uma taxa de amostragem de 7,00 Hz (análise quantitativa).

A energia de colisão foi testada em 7.0 eV na câmara de colisão. E a energia de íon no quadrupolo foi testada em 4.0 eV. A ionização foi feita por Eletrospray (ESI). A pressão do gás de nebulização foi otimizada em 9,0 L.min⁻¹. A temperatura da fonte de ionização foi mantida em 200 °C.

13 Resultados e discussão

13.1 Controle de qualidade fármaco

Ao avaliar o aspecto do fármaco ibuprofeno obtido comercialmente, observa-se concordância com a Farmacopeia, pó branco amorfo. A faixa de fusão para a amostra ficou igual a 74 °C a 74,5 °C, próxima à prevista (75 °C a 78 °C) (ANVISA, 2019). Já no espectro de IV, observa-se banda alargada na região de 3000 cm^{-1} , atribuída à hidroxila do ácido carboxílico (Pavia *et al.* 2015).

Após a recristalização, o fármaco apresentou-se de modo cristalino e levemente amarelado, o rendimento foi de 82,6 %. Sua faixa de fusão foi de 73,5 °C a 74,3 °C, ficando próxima do descrito, porém levemente abaixo. O espectro de IV (Figura 28) apresentou uma % de transmitância na região acima de 2500 cm^{-1} maior que a do ibuprofeno antes da recristalização, sendo possível, além da banda correspondente à hidroxila do ácido carboxílico, a observação da banda característica da ligação C-H do anel aromático com hibridização sp^3 que apresenta estiramentos simétricos e assimétricos. Próximo a 3100 cm^{-1} ainda se observa a banda de ligação C-H do anel aromático com hibridização sp^s (Andrioli *et al.* 2014; Garrigues; Gallignani; Delaguardia, 1993; Pavia *et al.* 2015).

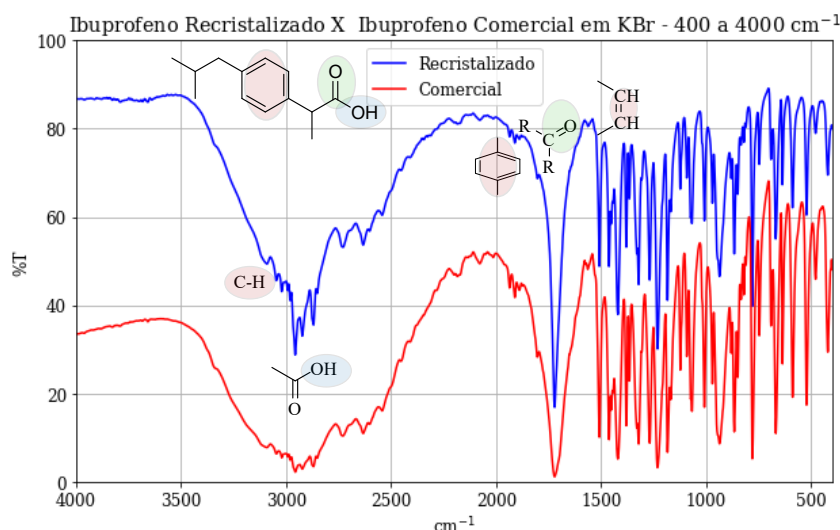


Figura 28 – Comparativo dos espectros de IV para o fármaco ibuprofeno comercial e recristalizado, com destaque dos grupos funcionais identificados.

Fonte: Autora, 2025.

Em ambas as amostras é possível notar em 1700 cm^{-1} a banda forte e fina correspondente à carbonila do ácido carboxílico, e em 2800 cm^{-1} a banda característica da hidroxila do ácido carboxílico. Também nota-se estiramentos de baixa intensidade entre

3000-3200 cm^{-1} característicos do estiramento da ligação C–H no anel aromático. Já em 2000 cm^{-1} observa-se o sinal fraco correspondente ao anel aromático *para* substituído. Em 1500 cm^{-1} tem o sinal correspondente ao estiramento das ligações C=C do anel (Pavia *et al.* 2015). Ademais, os espectros obtidos são condizentes com os encontrados na literatura (Andrioli *et al.* 2014; Garrigues; Galignani; Delaguardia, 1993).

Por fim, foram obtidos espectros de RMN de ^{13}C (Figura 33) e ^1H (Figura 29), a partir dos quais é possível confirmar que o fármaco adquirido possuía a pureza necessária, não sendo observadas diferenças entre os espectros de hidrogênio.

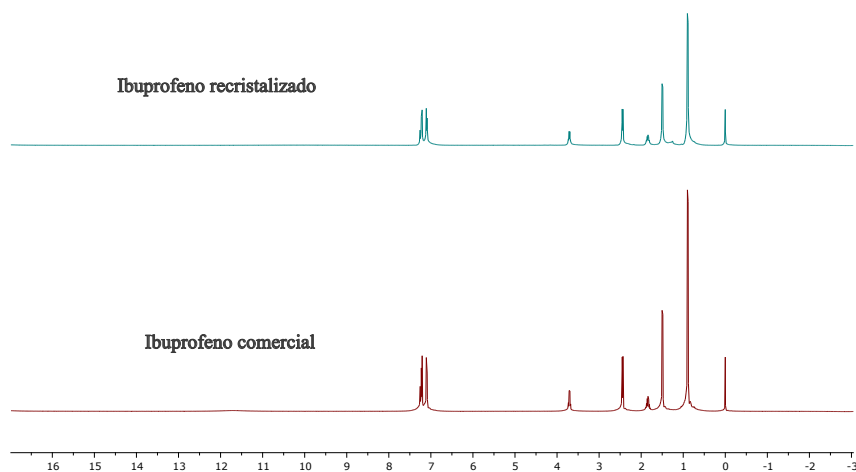


Figura 29 – Espectro de ^1H obtidos em CDCl_3 , com 8 scans, em 400 MHz (Bruker[®] AVANCE I 400).

Fonte: Autora, 2025.

Na Figura 30 é possível observar os deslocamentos químicos ^1H , bem como as multiplicidades e também a integração para os sinais obtidos para a amostra de ibuprofeno recristalizado.

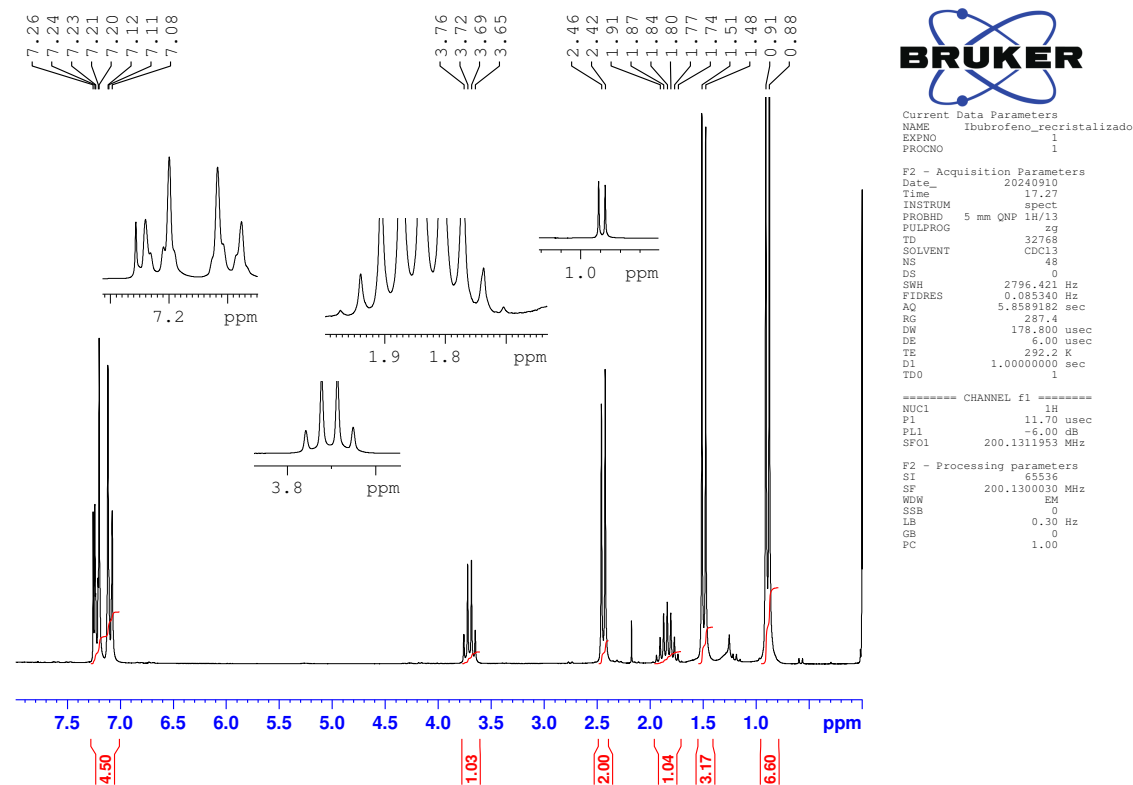


Figura 30 – Espectro de ^1H em CDCl_3 com TMS0 0,1 %, com 48 scans, em 200 MHz para o fármaco ibuprofeno recristalizado

Fonte: Autora, 2025.

Na Figura 31 é possível observar, junto aos deslocamentos químicos do ^1H , as multiplicidades e também a integração para os sinais da amostra de ibuprofeno comercial. O qual é possível observar o singlete largo em 11,7 ppm característico da hidroxila de ácido carboxílico.

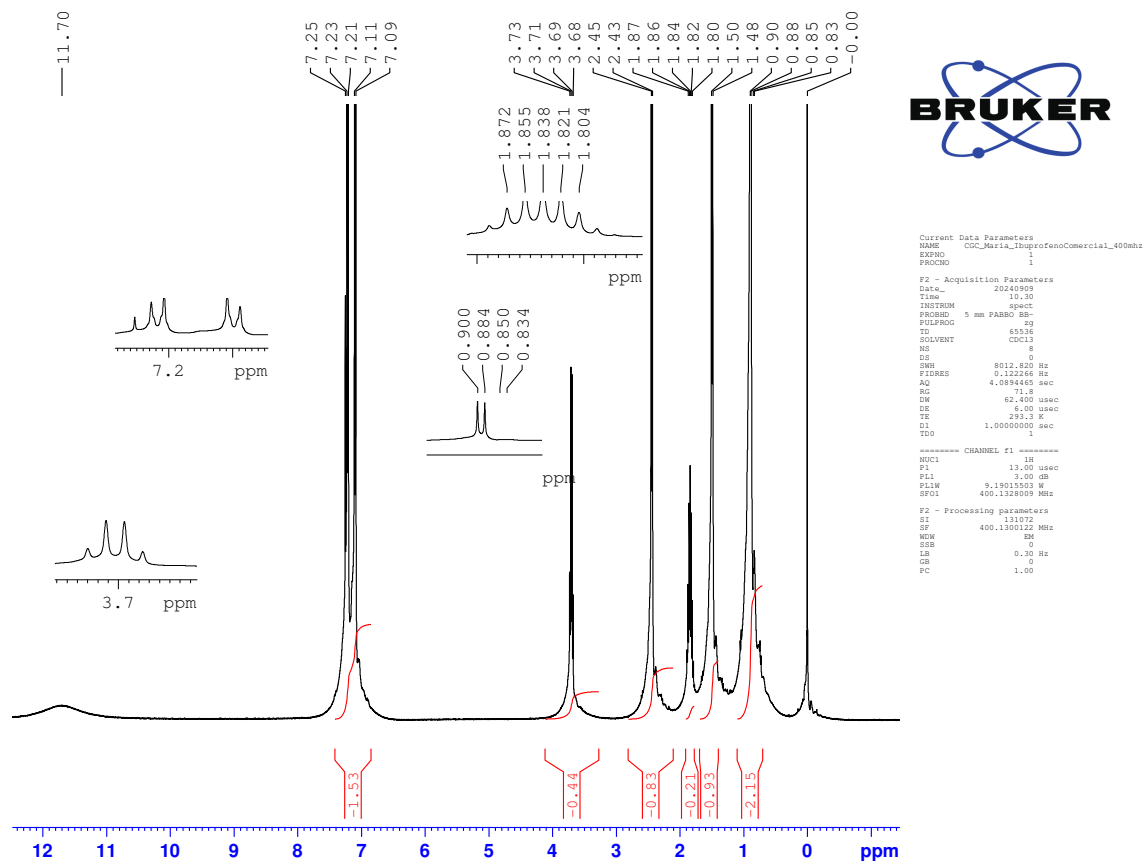


Figura 31 – Espectro de ^1H em CDCl_3 com TMS0 0,1 %, com 8 scans, em 400 MHz para o fármaco ibuprofeno comercial

Fonte: Autora, 2025.

A tabela 9 mostra os dados espectrais de ^1H para a amostra de Ibuprofeno comercial, recristalizado, os quais foram comparados com (Shieh *et al.* 1993). Enquanto na tabela 10 têm-se os dados de ^{13}C que foram comparados com a nota técnica *Application Note 21* (Oxford Instruments, 2022). A Figura 32 traz o ibuprofeno com a numeração de carbonos.

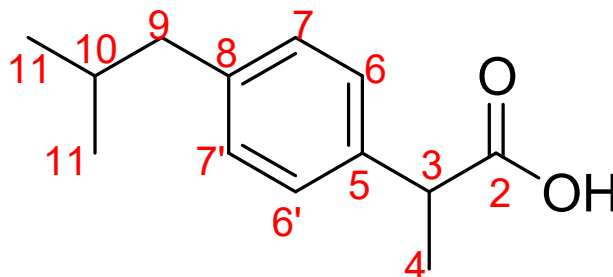


Figura 32 – Estrutura química do Ibuprofeno com numeração de carbonos em vermelho.

Fonte: Autora, 2025.

Tabela 9 – Deslocamentos espectrais de RMN para ^1H em ppm das amostras de ibuprofeno em relação a literatura.

posição C	$\delta^1\text{H}$ ($\int J = \text{Hz}$)		
	Literatura (75 MHz)	Comercial (400 MHz)	Recristalizado (200 MHz)
- (OH)	9 10 <i>sl</i> (1H)	11,70 <i>sl</i> (1H)	-
2	-	-	-
3	3,5 <i>qq</i> (1H $J= 7,18$ Hz)	3,7 <i>q</i> (1H $J= 6,9$ Hz)	3,7 <i>q</i> (1H $J= 7,2$ Hz)
4	1,5 <i>dd</i> (3H) $J= 7,5; 4,5$ Hz)	1,5 <i>d</i> (3H $J= 6,9$ Hz)	1,49 <i>d</i> (3H $J= 7,2$ Hz)
5	-	-	-
6/7	7,2 - 6,9 <i>m</i> (4H)	7,16 <i>dd</i> (4H $J= 7,9; 39,6$ Hz)	7,16 <i>dd</i> (4H $J= 7,2; 16$ Hz)
8	-	-	-
9	2,45 <i>d</i> (2H $J=7,12$ Hz)	2,44 <i>d</i> (2H $J= 7,9$ Hz)	2,44 <i>d</i> (2H $J= 7,2$ Hz)
10	1,85 <i>sept</i> (1H)	1,83 <i>noneto</i> (1H $J= 6,6$ Hz)	1,84 <i>noneto</i> (1H $J= 6,6$ Hz)
11	0,9 <i>d</i> (6H $J= 6,6$ Hz)	0,89 <i>d</i> (6H $J= 6,6$ Hz)	0,89 <i>d</i> (6H $J= 6,6$ Hz)

Fonte: Autora, 2025.

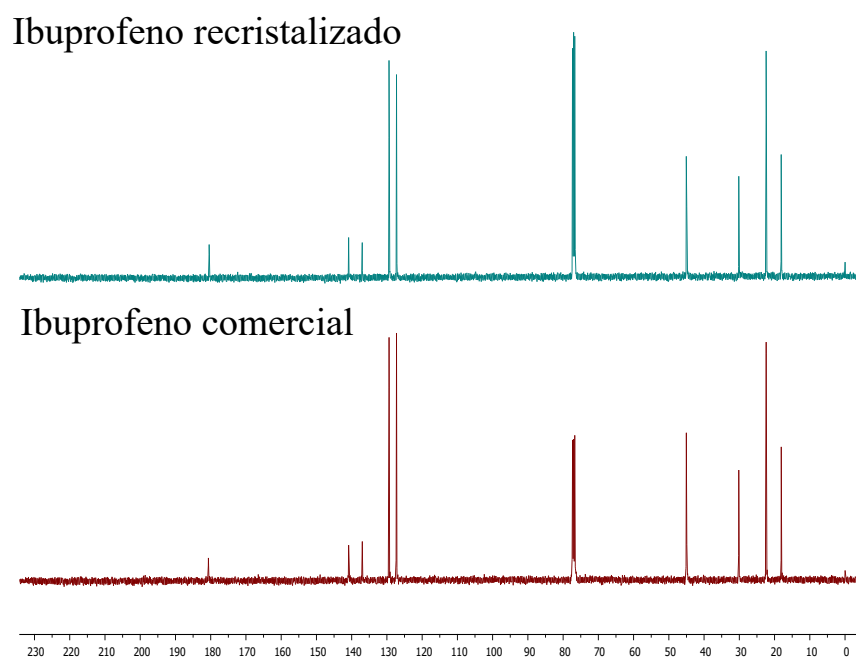


Figura 33 – Espectro de ^{13}C obtidos em CDCl_3 , em 100 MHz (Bruker[®] AVANCE I 400).

Fonte: Autora, 2025.

Na Figura 34 é possível observar os deslocamentos químicos de ^{13}C para a amostra de ibuprofeno recristalizado.

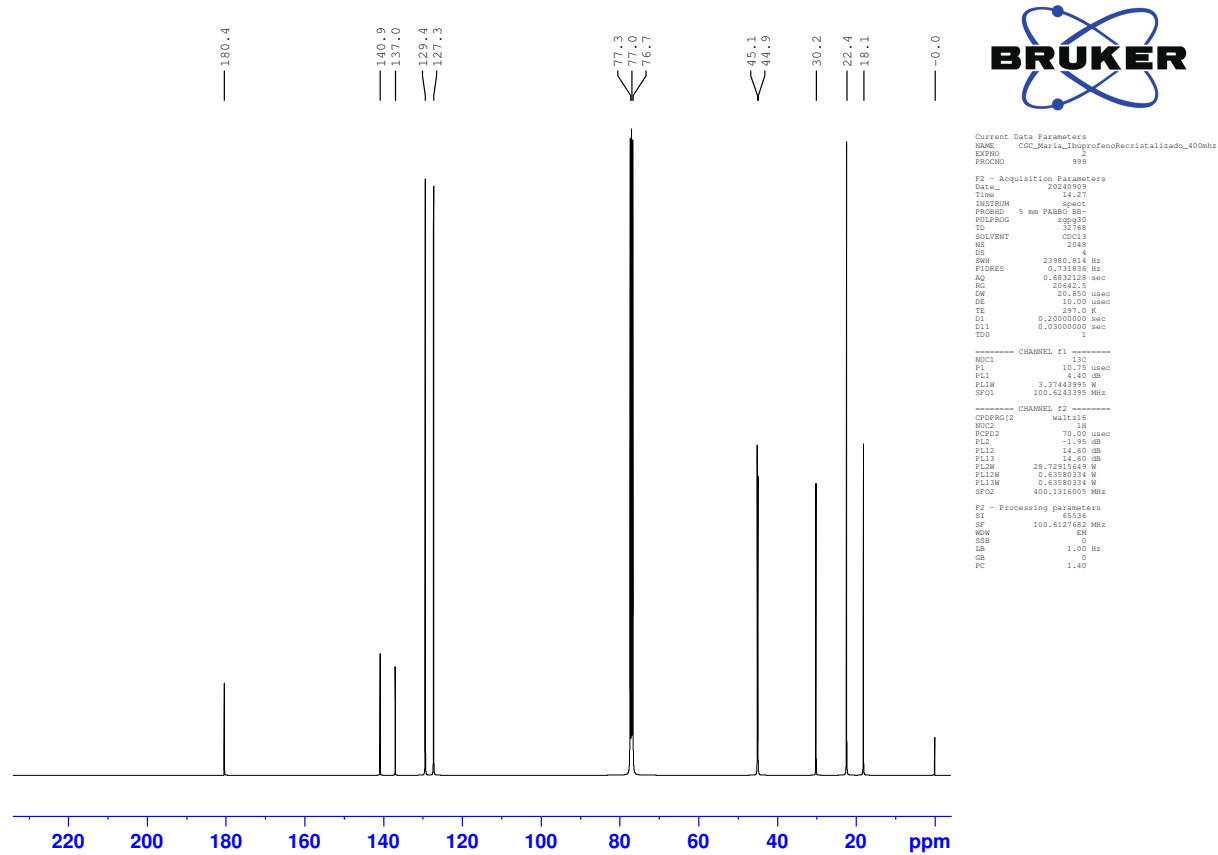


Figura 34 – Espectro de ^{13}C obtidos em CDCl_3 , em 100 MHz para a amostra de ibuprofeno recristalizado

Fonte: Autora, 2025.

Na Figura 35 é possível observar os deslocamentos químicos do ^{13}C para a amostra de ibuprofeno comercial.

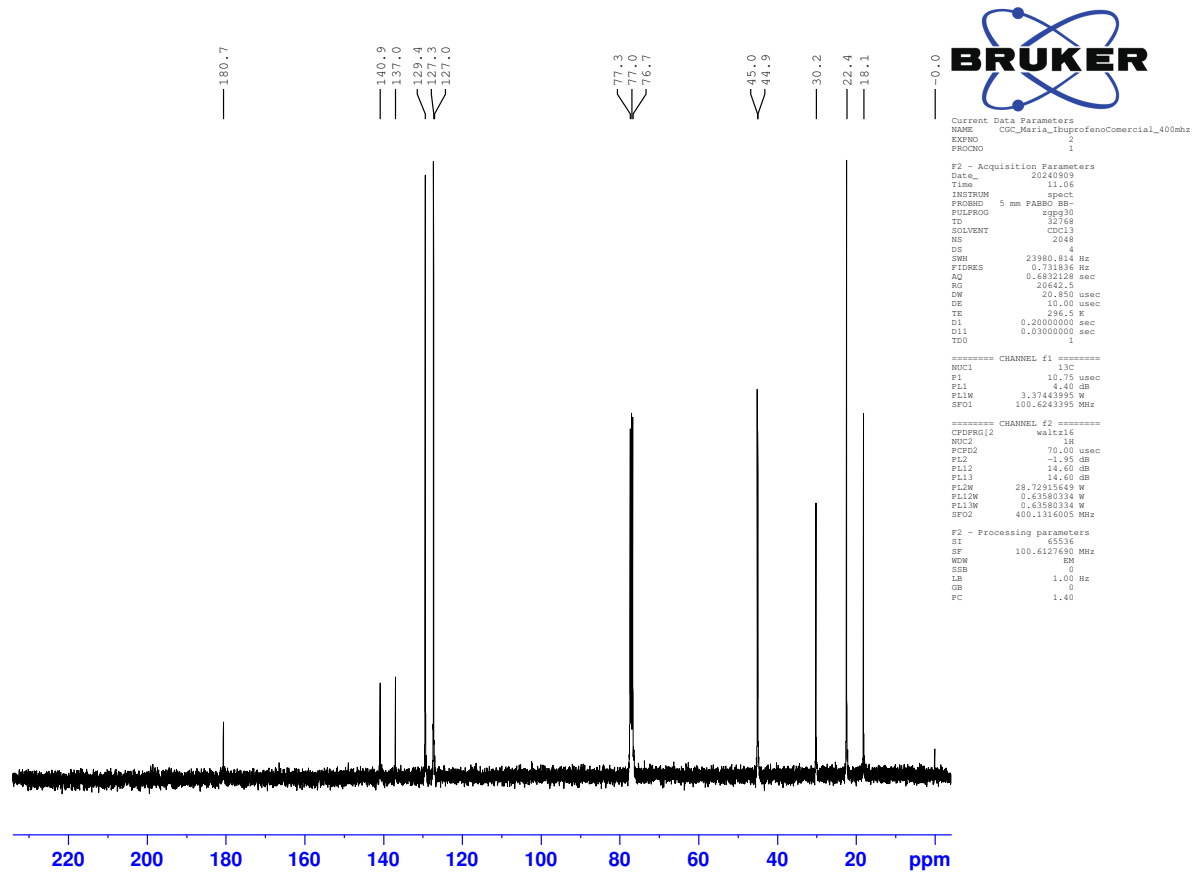


Figura 35 – Espectro de ^{13}C obtidos em CDCl_3 , em 100 MHz para a amostra de ibuprofeno comercial

Fonte: Autora, 2025.

Tabela 10 – Deslocamentos espectrais de RMN para ^{13}C em ppm das amostras de ibuprofeno em relação a literatura, em 100 MHz.

número C	$\delta^{13}\text{C}$		
	Literatura	Comercial	Recristalizado
1	-	-	-
2	181,4	180,8	180,4
3	45,2	45,0	45,0
4	30,25	30,2	30,2
5	137,2	137,0	137,0
6	127,4	127,3	127,3
7	129,5	129,4	129,4
8	140,9	140,8	140,9
9	45,2	44,9	44,9
10	18,2	18,1	18,2
11	22,5	22,4	22,4

Fonte: Autora, 2025.

13.2 Ensaio de citotoxicidade do ibuprofeno

A concentração inibitória é necessária em virtude de no ensaio de tolerância não ter sido analisado o Ibuprofeno em separado. Ademais, era necessário avaliar a toxicidade do DMSO, solvente utilizado na preparação da solução de ibuprofeno a ser usado nos ensaios de biodegradação, uma vez que o fármaco apresenta-se praticamente insolúvel em água.

Para avaliar a dose máxima suportada pelo fungo, foi realizado um teste de citotoxicidade do ibuprofeno. Para um melhor rendimento na obtenção dos produtos, é interessante que não se use concentrações tão baixas do fármaco. Então, a dose ideal pode ser encontrada entre a toxicidade e a mais alta concentração tolerada, como mostra a Tabela 11, foi de $100 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, que inibiu apenas em 6,6 % o fungo *Albonectria rigidiuscula* mgk_A3_15 e em 19,6 % o *Alternaria* sp. mgk_C3_9.

Tabela 11 – Taxa de inibição do ibuprofeno em relação a cepas selecionadas.

Concentração ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	<i>Albonectria rigidiuscula</i> mgk_A3_15	<i>Alternaria</i> sp. mgk_C3_9
10	-6,93	10,46
30	-14,44	13,47
50	2,55	15,23
80	45,03	44,78
100	6,63	19,62
150	96,93	98,32
200	99,25	99,12
DMSO	152,45	131,51

Fonte: Autora, 2025.

13.3 Avaliação da Biotransformação do Ibuprofeno

Ao final da extração, foi obtido óleo amarelo-dourado, tanto para amostra de *Alternaria* sp. mgk_C3_9 como para *Albonectria rigidiuscula* mgk_A3_15. No cromatograma em UV/VIS 220 nm, o sinal correspondente ao Ibuprofeno com o tempo de retenção de 10,5 minutos, enquanto o padrão interno (PI), a benzofenona, teve tempo de retenção igual a 9,6 minutos. Na análise por emissão em 290 nm não foi observado o sinal da benzofenona.

A amostra *Alternaria* sp. mgk_C3_9 mostrou um sinal intenso no cromatograma na região de 3 minutos em apenas 24 h, sendo possível inferir a formação de um produto majoritário. Na Figura 36 é possível observar o surgimento dos sinais da conversão do ibuprofeno no produto em função do tempo de reação para 2 h, 24 h e 96 h. As taxas de conversão foram de 13,5 % em 24 h, para 55,7 % em 96 h.

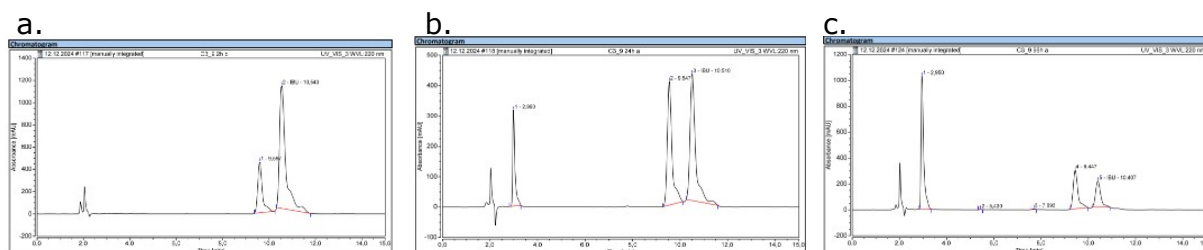


Figura 36 – Cromatograma para o *Alternaria* sp. mgk_C3_9 em diferentes tempos de catálise, a. 2 h; b. 24 h; c. 96 h.

Fonte: Autora, 2025.

Já a amostra *Albonectria rigidiuscula* mgk_A3_15 apresentou uma conversão conforme a Figura 37. Em 72 h surgiu o primeiro sinal de transformação, em 2,7 minutos de corrida, e que se manteve em 96 h.

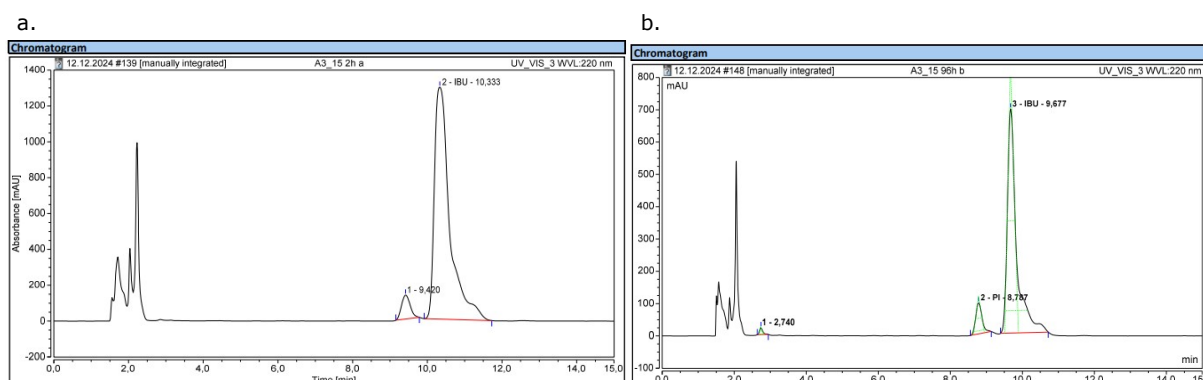


Figura 37 – Cromatograma para *Albonectria rigidiuscula* mgk_A3_15 no tempo inicial e final da reação, a. 72 h e b. 96 h;.

Fonte: Autora, 2025.

A diferença entre os tempos de retenção do composto majoritário formado entre *Alternaria* sp. mgk_C3_9 e *Albonectria rigidiuscula* mgk_A3_15 sugere a formação de

compostos diferentes, resultantes de vias metabólicas próprias. Para elucidar essas diferenças, as amostras *Albonectria rigidiuscula* mgk_A3_15 96 h e *Alternaria* sp. mgk_C3_9 48 h e 96 h foram enviadas para realização de espectrometria de massas. E todos os tempos de *Alternaria* sp. mgk_C3_9 foram encaminhados para RMN, uma vez que a quantidade obtida do produto era maior.

13.3.1 RMN e LC/MS do *Alternaria* sp. mgk_C3_9

Pelo espectro de ^{13}C observou-se que em 48 h já ocorreu uma alteração no grupo funcional do ácido carboxílico, o deslocamento do sinal da carboxila de 180 ppm para 175 ppm. Observa-se que o anel aromático e parte da cadeia lateral não sofreram alterações, pois os sinais se mantêm, conforme observado na Figura 38.

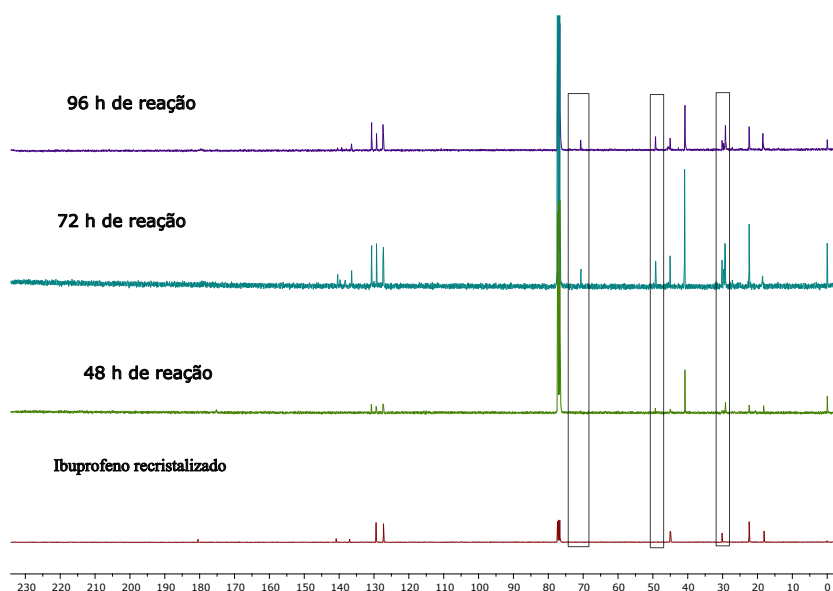


Figura 38 – Espectros de ^{13}C para os diferentes tempos de reação do fungo *Alternaria* sp. mgk_C3_9 em relação ao ibuprofeno. Em 100 MHz.

Fonte: Autora, 2025.

Com o avanço após 72 h, as modificações ficam mais claras, no espectro de ^{13}C observou-se o surgimento de sinais na região de 40 ppm, para os espectros da biotransformação; ademais, os carbonos quaternários, ligados ao anel em 140 ppm e 136 ppm, apresentam-se deslocados em relação ao fármaco. E na região de 65 ppm, observa-se um intenso sinal para as amostras de 72 h e 96 h, característico de ligação OH.

Nos espectros de hidrogênios (Figura 39), é possível observar as diferenças entre o ibuprofeno (controle do fármaco), o controle do fungo e os resultados da reação. O sinal do solvente CDCl_3 aparece em 7,25 ppm, junto do sinal referente ao anel aromático nas amostras da biotransformação e do ibuprofeno.

Com o avanço da biotransformação, assim como no carbono, os espectros de

hidrogênio ficam mais complexos. Destaca-se o singlete largo em 4,44 ppm na amostra de 48 h, em 3,85 ppm em 72 h e em 4,13 ppm observado após 96 h, o que é indicativo da presença de prótons trocáveis, sugerindo a presença de grupo hidroxila, como em álcoois. O surgimento do singlete em 1,24, referente a metilas e em 2,64 indicativo de CH₂ também se destacam.

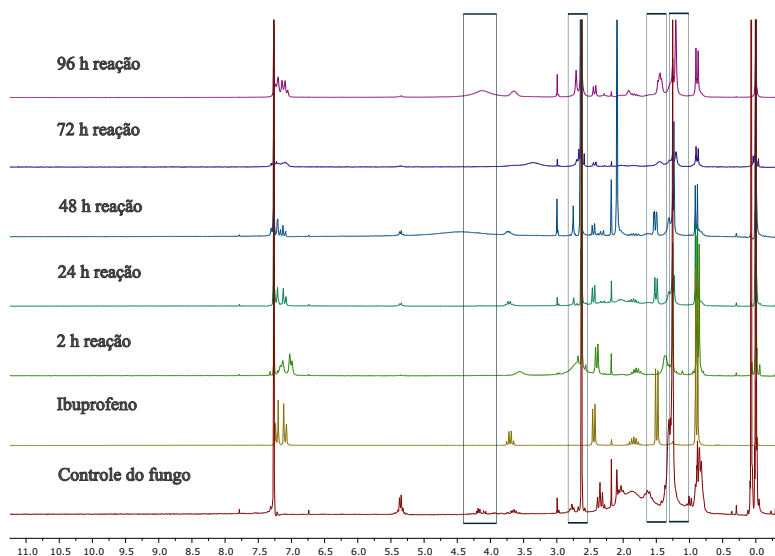


Figura 39 – Comparativo entre os espectros de hidrogênio da reação com o ibuprofeno e o controle do fungo *Alternaria* sp. mgk_C3_9. Em 200 MHz.
fonteAutora, 2025.

Na análise de UPLC/MS em polo negativo da amostra *Alternaria* sp. mgk_C3_9, o sinal de maior intensidade no tempo de retenção de 1,45 minutos (Figura 40), que corresponde ao fragmento de m/z igual 221 ($[M-H]^-$) (Figura 41).

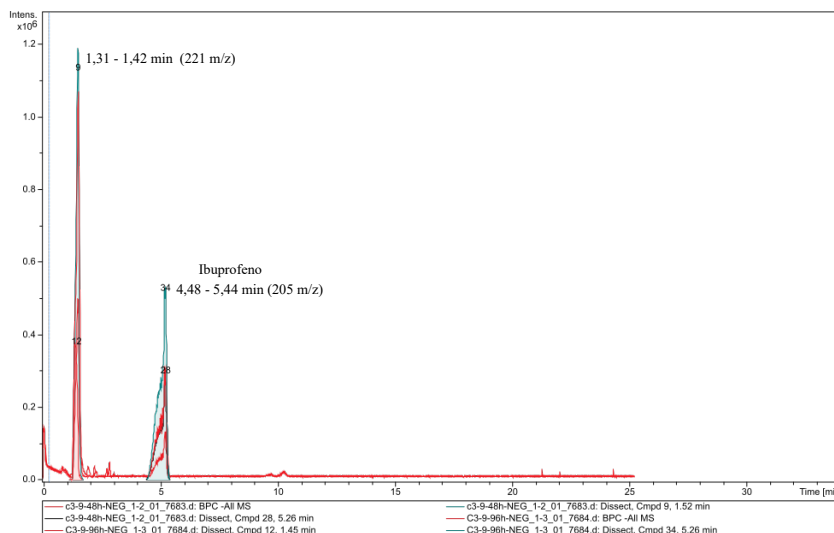


Figura 40 – Principais picos no cromatograma de UPLC/MS para o fungo *Alternaria* sp. mgk_C3_9

Fonte: Autora, 2025.

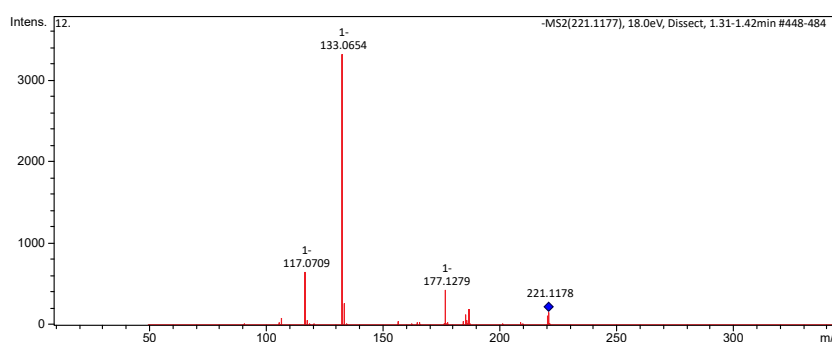
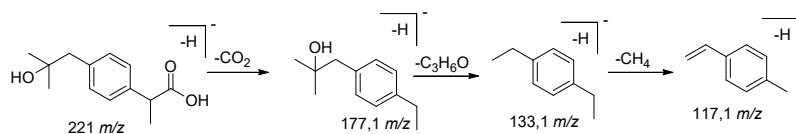


Figura 41 – Espectro de fragmentação de massas do composto majoritário produzido pelo fungo *Alternaria* sp. mgk_C3_9, em modo negativo de ionização

Fonte: Autora, 2025.

Na Figura 42 é possível observar os deslocamentos químicos do ^{13}C para a amostra oriunda da biotransformação do ibuprofeno recristalizado pelo fungo *Alternaria* sp. mgk_C3_9.

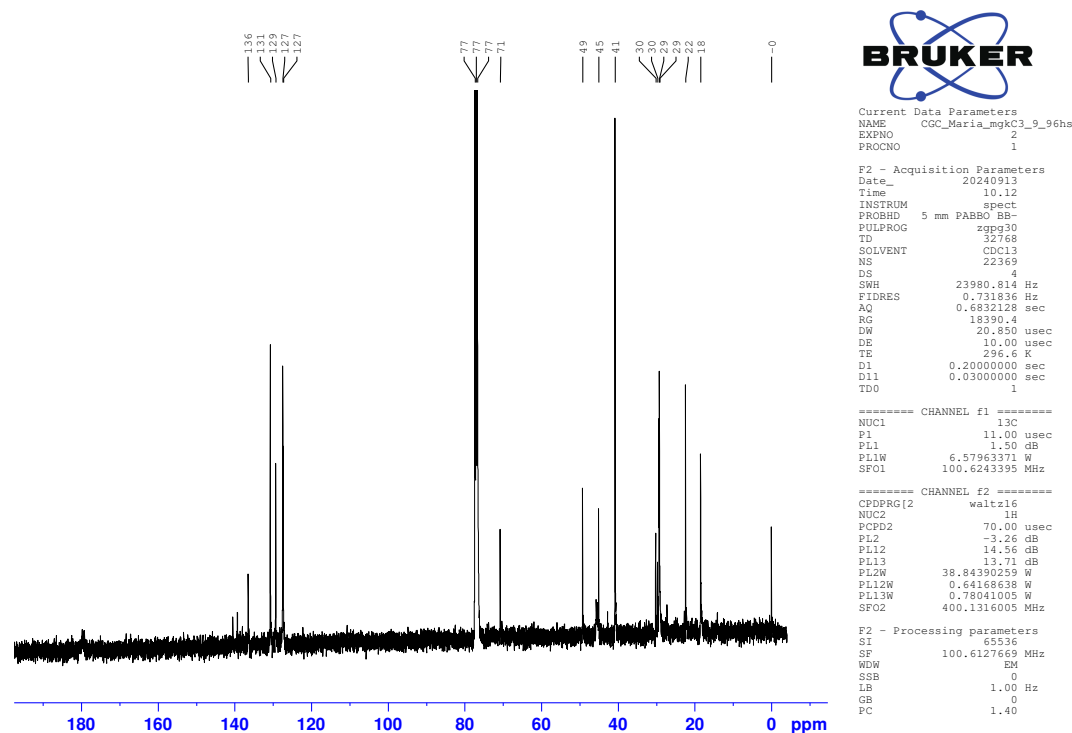


Figura 42 – Espectro de ^{13}C obtidos em CDCl_3 , em 100 MHz para a amostra resultante de 96 h de biotransformação do ibuprofeno pelo fungo *Alternaria* sp. mgk_C3_9.

Fonte: Autora, 2025.

A partir da análise em conjunto dos dados de massas e dos espectros de RMN foi possível propor que o composto majoritário formado é o 2-hidroxi-ibuprofeno (2-OH-ibu) (Figura 43). Destaca-se para esta conclusão os sinais em 29,5 ppm e em 70,7 ppm que não estavam presentes no espectro do controle do ibuprofeno. A Tabela 12 apresenta um resumo das diferenças encontradas entre os espectros.

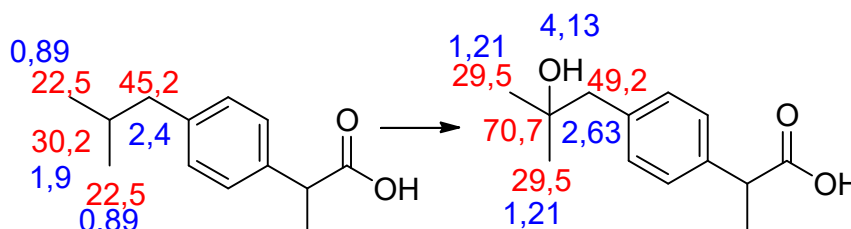


Figura 43 – Hidroxilação da cadeia lateral do Ibuprofeno resultante da reação de biotransformação pelo fungo *Alternaria* sp. mgk_C3_9.

Fonte: Autora, 2025..

Tabela 12 – Deslocamentos espectrais de RMN para ^1H (200 MHz) e ^{13}C (100 MHz) em ppm das amostras de ibuprofeno em relação ao 2-hidroxi-ibuprofeno

Composto	posição	$\delta^1\text{H}$ ($\int J = \text{Hz}$)	$\delta^{13}\text{C}$
Ibuprofeno	9	2,44 <i>d</i> (2H $J= 7,2$ Hz)	45,2
	10	1,84 <i>noneto</i> (1H $J= 6,6$ Hz)	30,2
	11	0,89 <i>d</i> (6H $J= 6,6$ Hz)	22,5
2-OH-Ibuprofeno	9	2,63 <i>s</i> (2H)	49,2
	10	-	70,7
	11	1,21 <i>s</i> (6H)	29,5

Fonte: Autora, 2025.

Na literatura foram encontrados os deslocamentos do 2-OH-ibu, porém metanol deuterado, os valores encontrados são ^1H (ppm) (500.13 MHz) 9. 2,73 (*s*, 2H); 10. -; 11 e 11' 1,16 (*s*, 3H). Os respectivos ^{13}C (ppm) (125.76 MHz) 9. 50,0; 10. 71,3 11 e 11' 28,9 (Marco-Urrea *et al.* 2009). Contudo, pela diferença de solvente, não é possível fazer uma comparação entre os sinais.

Este composto já foi relatado na literatura como metabólito, o estudo de urina (Djukovic *et al.* 2008). Em estudo com bactérias foi relatado como produto da mono-oxigenação alifática de *Bacillus thuringiensis* (Marchlewicz *et al.* 2017). A produção do 2-hidroxi-ibuprofeno também foi relatada em estudo com o fungo *Trametes versicolor*, embora sejam importantes para a metabolização do ibuprofeno, as enzimas MnP, Lac e do citocromo P450 podem não ser as únicas envolvidas no processo (Marco-Urrea *et al.* 2009).

13.3.2 LC/MS para *Albonectria rigidiuscula* mgk_A3_15

O espectro de massas para o fungo *Albonectria rigidiuscula* mgk_A3_15 indica que o composto majoritário é um hidroxi-ibuprofeno, já que foi observado um íon $[M-H]^-$ de massa/carga de 221 m/z , com o tempo de retenção de 1,7 minutos. Ressalta-se a diferença no padrão de fragmentação observado entre o metabólito formado pelo fungo *Alternaria* sp. mgk_C3_9, e após a conclusão da análise dos fragmentos formados, sugere-se que foi formado o 1-hidroxi-ibuprofeno, conforme descrito anteriormente por Peng e colaboradores (2024). Na Figura 44 é possível observar o padrão de fragmentação.

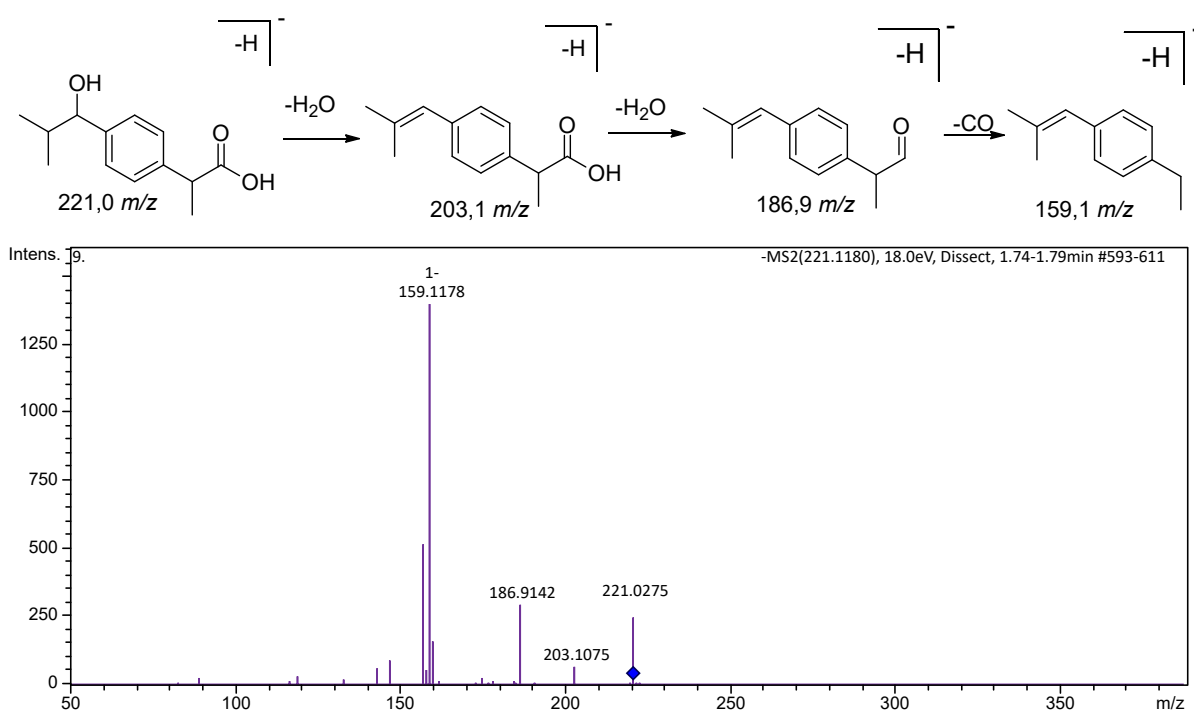


Figura 44 – Fragmentação em modo negativo de ionização para o composto majoritário formado na reação de biotransformação do Ibuprofeno pelo fungo *Albonectria rigidiuscula* mgk_A3_15.

Fonte: Autora, 2025..

14 CONCLUSÃO

O fungo *Alternaria* sp. mgk_C3_9 confirmou seu potencial biocatalítico na transformação do ibuprofeno em apenas 48 h, formando o 2-hidroxi-ibuprofeno como majoritário, com 55,7 % de conversão em 96 h.

Já o fungo *Albonectria rigidiuscula* mgk_A3_15, mostrou um potencial de conversão de 0,7 % , sendo o composto majoritário formado o 1-hidroxi-ibuprofeno.

Os resultados mostram que ambos foram capazes de hidroxilar o ibuprofeno, porém por vias metabólicas distintas, o que é sugerido pela diferença na posição da hidroxila entre os compostos.

Diante dos produtos majoritários formados, se confirma a presença de enzimas do tipo oxidases para o *Alternaria* sp. mgk_C3_9 e *Albonectria rigidiuscula* mgk_A3_15.

Considerações finais

Como resultados deste trabalho destaca-se o maior conhecimento sobre a microbiota de espécies botânicas da região, onde 169 fungos foram isolados. Das 10 cepas, 9 foram identificadas por biologia molecular.

A triagem enzimática mostrou um alto potencial dos microrganismos isolados, tanto para enzimas intracelulares como extracelulares, e que muitas aplicações biotecnológicas podem ser avaliadas, além da biotransformação de fármacos, como na produção de combustíveis renováveis, como etanol de segunda geração, devido à presença de enzimas lignolíticas (Lac, MnP e LiP).

Como agente de biotransformação, os fungos triados mostram-se capazes de biotransformar o Ibuprofeno. Os produtos obtidos confirmam a presença de enzimas monooxigenases, como previsto pela triagem enzimática.

Por fim, os resultados obtidos neste estudo reforçam o potencial biotecnológico de fungos endofíticos como fontes promissoras de enzimas com aplicações na biotransformação de fármacos.

A diversidade enzimática observada entre os isolados, especialmente em relação às oxigenases e lipases, destaca a relevância desses microrganismos para processos sustentáveis dentro dos princípios da química verde. Em particular, o desempenho do isolado *Colletotrichum* sp. mgk_C3_9 na conversão do ibuprofeno em 2-hidroxi-ibuprofeno evidencia sua aplicabilidade como biocatalisador.

Assim, este trabalho contribui para a prospecção de novos biocatalisadores e reforça a importância da biodiversidade microbiana regional na busca por soluções inovadoras e ambientalmente responsáveis para a indústria no âmbito ODS da agenda 2030.

Referências

- ABDELRAHEEM, Eman M. M. *et al.* Biocatalysis explained: from pharmaceutical to bulk chemical production. *Reaction Chemistry & Engineering*, Royal Society of Chemistry (RSC), v. 4, n. 11, p. 1878–1894, 2019. DOI: [10.1039/c9re00301k](https://doi.org/10.1039/c9re00301k).
- AGRAWAL, Komal; VERMA, Pradeep. Laccase: addressing the ambivalence associated with the calculation of enzyme activity. *3 Biotech*, Springer Science e Business Media LLC, v. 9, n. 10, set. 2019. DOI: [10.1007/s13205-019-1895-1](https://doi.org/10.1007/s13205-019-1895-1).
- AGRAWAL, Komal; VERMA, Pradeep. Multicopper oxidase laccases with distinguished spectral properties: A new outlook. *Heliyon*, Elsevier BV, v. 6, n. 5, e03972, mai. 2020. DOI: [10.1016/j.heliyon.2020.e03972](https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e03972).
- AHMED, Arwa Mortada *et al.* The endophytic *Fusarium* strains: a treasure trove of natural products. *RSC Advances*, Royal Society of Chemistry (RSC), v. 13, n. 2, p. 1339–1369, 2023. ISSN 2046-2069. DOI: [10.1039/d2ra04126j](https://doi.org/10.1039/d2ra04126j).
- ALBUQUERQUE, Nayara Cristina Perez de; GAITANI, Cristiane Masetto de; OLIVEIRA, Anderson Rodrigo Moraes de. A new and fast DLLME-CE method for the enantioselective analysis of zopiclone and its active metabolite after fungal biotransformation. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, Elsevier BV, v. 109, p. 192–201, mai. 2015. DOI: [10.1016/j.jpba.2015.02.039](https://doi.org/10.1016/j.jpba.2015.02.039).
- ANBU, Periasamy *et al.* Microbial Enzymes and Their Applications in Industries and Medicine 2016. *BioMed Research International*, Hindawi Limited, v. 2017, p. 1–3, 2017. DOI: [10.1155/2017/2195808](https://doi.org/10.1155/2017/2195808).
- ANDRIOLI, Andrea *et al.* Caracterização do insumo ibuprofeno e a correlação com propriedades de dissolução e de fluxo. *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada*, v. 35, n. 3, p. 401–411, 2014. ISSN 1808-4532.
- ANVISA. Farmacopeia Brasileira, Monografia: Insumos Farmacêuticos e Especialidade. In: 6. ed. Brasília, Brasil: Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), 2019. v. 2 IF225-00. Monografia: Insumos Farmacêuticos e Especialidade.
- ANVISA. *Microbiologia clínica para o controle de infecção relacionada à assistência à saúde: Módulo 8 - Detecção e Identificação de Fungos de Importância Médica*. <https://gqr.sh/6MQD>, out. 2022.
- BABU, Pallam Revanth; SARMA, Vemuri Venkateswara. Fungi as Promising Biofuel Resource. In: *NEW and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering*. Elsevier, 2019. P. 149–164. DOI: [10.1016/b978-0-444-64191-5.00011-0](https://doi.org/10.1016/b978-0-444-64191-5.00011-0).

- BAIK, Jina *et al.* Functional Characterization of Melanin Decolorizing Extracellular Peroxidase of *Bjerkandera adusta*. *Journal of Fungi*, MDPI AG, v. 7, n. 9, p. 762, set. 2021. ISSN 2309-608X. DOI: [10.3390/jof7090762](https://doi.org/10.3390/jof7090762).
- BANKOLE, Paul Olusegun *et al.* Novel cobiomass degradation of NSAIDs by two wood rot fungi, *Ganoderma applanatum* and *Laetiporus sulphureus*: Ligninolytic enzymes induction, isotherm and kinetic studies. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, Elsevier BV, v. 203, p. 110997, out. 2020. ISSN 0147-6513. DOI: [10.1016/j.ecoenv.2020.110997](https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.110997).
- BARZKAR, Noora *et al.* Marine Bacterial Esterases: Emerging Biocatalysts for Industrial Applications. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, Springer Science e Business Media LLC, v. 193, n. 4, p. 1187–1214, jan. 2021. DOI: [10.1007/s12010-020-03483-8](https://doi.org/10.1007/s12010-020-03483-8).
- BATISTA, Bárbara Nunes *et al.* Hydrolytic enzyme production from açai palm (*Euterpe precatoria*) endophytic fungi and characterization of the amylolytic and cellulolytic extracts. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, Springer Science e Business Media LLC, v. 38, n. 2, jan. 2022. ISSN 1573-0972. DOI: [10.1007/s11274-021-03217-w](https://doi.org/10.1007/s11274-021-03217-w).
- BELAIR, Marie *et al.* Pathogenicity Factors of Botryosphaeriaceae Associated with Grapevine Trunk Diseases: New Developments on Their Action on Grapevine Defense Responses. *Pathogens*, MDPI AG, v. 11, n. 8, p. 951, ago. 2022. ISSN 2076-0817. DOI: [10.3390/pathogens11080951](https://doi.org/10.3390/pathogens11080951).
- BERNINI, Caterina *et al.* The nature of tryptophan radicals involved in the long-range electron transfer of lignin peroxidase and lignin peroxidase-like systems: Insights from quantum mechanical/molecular mechanics simulations. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, Wiley, v. 80, n. 5, p. 1476–1483, mar. 2012. DOI: [10.1002/prot.24046](https://doi.org/10.1002/prot.24046).
- BHAMBRI, Anne *et al.* Mushrooms as Potential Sources of Active Metabolites and Medicines. *Frontiers in Microbiology*, Frontiers Media SA, v. 13, abr. 2022. ISSN 1664-302X. DOI: [10.3389/fmicb.2022.837266](https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.837266).
- BHATTACHARYYA, P. N.; GOSWAMI, M. P.; BHATTACHARYYA, L. H. Perspective of beneficial microbes in agriculture under changing climatic scenario: a review. *Journal of Phytology*, TathQeef Scientific Publishing, v. 8, p. 26, mai. 2016. DOI: [10.19071/jp.2016.v8.3022](https://doi.org/10.19071/jp.2016.v8.3022).
- BIKO, Odwa D.V.; VILJOEN-BLOOM, Marinda; ZYL, Willem H. van. Microbial lignin peroxidases: Applications, production challenges and future perspectives. *Enzyme and Microbial Technology*, Elsevier BV, v. 141, p. 109669, nov. 2020. DOI: [10.1016/j.enzmictec.2020.109669](https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2020.109669).
- BOCATO, Mariana Zuccherato *et al.* Solid phase microextraction and LC–MS/MS for the determination of paliperidone after stereoselective fungal biotransformation of risperidone. *Analytica Chimica Acta*, Elsevier BV, v. 742, p. 80–89, set. 2012. DOI: [10.1016/j.aca.2012.05.056](https://doi.org/10.1016/j.aca.2012.05.056).

- BOHLIN, Lars *et al.* Natural products in modern life science. *Phytochemistry Reviews*, Springer Science e Business Media LLC, v. 9, n. 2, p. 279–301, jan. 2010. DOI: [10.1007/s11101-009-9160-6](https://doi.org/10.1007/s11101-009-9160-6).
- BORGES, Warley de *et al.* Endophytic Fungi: Natural Products, Enzymes and Biotransformation Reactions. *Current Organic Chemistry*, Bentham Science Publishers Ltd., v. 13, n. 12, p. 1137–1163, ago. 2009. DOI: [10.2174/138527209788921783](https://doi.org/10.2174/138527209788921783).
- BRAGANÇA, Idalina *et al.* QuEChERS: A new sample preparation approach for the determination of ibuprofen and its metabolites in soils. *Science of The Total Environment*, Elsevier BV, v. 433, p. 281–289, set. 2012. ISSN 0048-9697. DOI: [10.1016/j.scitotenv.2012.06.035](https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2012.06.035).
- BRATKOVSKAJA, I.; VIDZIUNAITE, R.; KULYS, J. Oxidation of Phenolic Compounds by Peroxidase in the Presence of Soluble Polymers. *Biochemistry (Moscow)*, Springer Science e Business Media LLC, v. 69, n. 9, p. 985–992, set. 2004. DOI: [10.1023/b:biry.0000043540.87287.80](https://doi.org/10.1023/b:biry.0000043540.87287.80).
- BUENO, Norlene Regina *et al.* Medicinal plants used by the Kaiowá and Guarani indigenous populations in the Caarapó Reserve, Mato Grosso do Sul, Brazil. *Acta Botanica Brasílica*, FapUNIFESP (SciELO), v. 19, n. 1, p. 39–44, mar. 2005. DOI: [10.1590/s0102-33062005000100005](https://doi.org/10.1590/s0102-33062005000100005).
- BUSS, O. *et al.* Statistical Evaluation of HTS Assays for Enzymatic Hydrolysis of -Keto Esters. Edição: Monika Oberer. *PLOS ONE*, Public Library of Science (PLoS), v. 11, n. 1, e0146104, jan. 2016. ISSN 1932-6203. DOI: [10.1371/journal.pone.0146104](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0146104).
- CAMBRIA, Maria Teresa *et al.* Enhanced Laccase Production in White-Rot Fungus *Rigidoporus lignosus* by the Addition of Selected Phenolic and Aromatic Compounds. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, Springer Science e Business Media LLC, v. 163, n. 3, p. 415–422, ago. 2010. ISSN 1559-0291. DOI: [10.1007/s12010-010-9049-2](https://doi.org/10.1007/s12010-010-9049-2).
- CAMPOS BRAGA, Patrícia A. de *et al.* Dammarane triterpenes from *Cabralea canjerana* (Vell.) Mart. (Meliaceae): Their chemosystematic significance. *Biochemical Systematics and Ecology*, Elsevier BV, v. 34, n. 4, p. 282–290, abr. 2006. DOI: [10.1016/j.bse.2005.10.012](https://doi.org/10.1016/j.bse.2005.10.012).
- CARACCIOLLO, Anna Barra; TOPP, Edward; GRENNI, Paola. Pharmaceuticals in the environment: Biodegradation and effects on natural microbial communities. A review. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, Elsevier BV, v. 106, p. 25–36, mar. 2015. DOI: [10.1016/j.jpba.2014.11.040](https://doi.org/10.1016/j.jpba.2014.11.040).
- CARDULLO, Nunzio; MUCCILLI, Vera; TRINGALI, Corrado. Laccase-mediated synthesis of bioactive natural products and their analogues. *RSC Chemical Biology*, Royal Society of Chemistry (RSC), v. 3, n. 6, p. 614–647, 2022. DOI: [10.1039/d1cb00259g](https://doi.org/10.1039/d1cb00259g).

- CHAMBERGO, Felipe S.; VALENCIA, Estela Y. Fungal biodiversity to biotechnology. *Applied Microbiology and Biotechnology*, Springer Science e Business Media LLC, v. 100, n. 6, p. 2567–2577, jan. 2016. DOI: [10.1007/s00253-016-7305-2](https://doi.org/10.1007/s00253-016-7305-2).
- CHAVEZ-FLORES, David; SALVADOR, James M. Facile conversion of racemic ibuprofen to (S)-ibuprofen. *Tetrahedron: Asymmetry*, Elsevier BV, v. 23, n. 3–4, p. 237–239, fev. 2012. ISSN 0957-4166. DOI: [10.1016/j.tetasy.2012.02.014](https://doi.org/10.1016/j.tetasy.2012.02.014).
- CHEN, Lu Shi. Triagem de alto desempenho na detecção de atividade de epóxido-hidrolases e monooxigenases utilizando células íntegras / Lu Shi Chen. *Biodiversidade. I. Marsaioli*, Campinas, SP, 2006.
- CHEN, Tse-Lun *et al.* Implementation of green chemistry principles in circular economy system towards sustainable development goals: Challenges and perspectives. *Science of The Total Environment*, Elsevier BV, v. 716, p. 136998, mai. 2020. DOI: [10.1016/j.scitotenv.2020.136998](https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.136998).
- CHEN, Yuhong *et al.* A novel fungal strain, *Bjerkandera adusta* BK-1, as a promising broad-spectrum biological control agent against plant fungal diseases. *Biocontrol Science and Technology*, Informa UK Limited, v. 32, n. 4, p. 515–519, dez. 2021. ISSN 1360-0478. DOI: [10.1080/09583157.2021.1992347](https://doi.org/10.1080/09583157.2021.1992347).
- CRAGG, Gordon M.; NEWMAN, David J. Natural Product Drug Discovery in the Next Millennium. *Pharmaceutical Biology*, Swets & Zeitlinger Publishers, v. 39, sup1, p. 8–17, jan. 2001. DOI: [10.1076/phbi.39.s1.8.0009](https://doi.org/10.1076/phbi.39.s1.8.0009).
- DANKYIRA, Daniel Osei *et al.* Antifungal Cytosporone Derivatives from the Mangrove-Derived Fungus *Dothiorella* sp. ML002. *Chemistry of Natural Compounds*, Springer Science e Business Media LLC, v. 58, n. 5, p. 842–844, set. 2022. ISSN 1573-8388. DOI: [10.1007/s10600-022-03812-9](https://doi.org/10.1007/s10600-022-03812-9).
- DAO, Anh T.N. *et al.* Elucidating fungal *Rigidoporus* species FMD21 lignin-modifying enzyme genes and 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin degradation by laccase isozymes. *Enzyme and Microbial Technology*, Elsevier BV, v. 147, p. 109800, jun. 2021. ISSN 0141-0229. DOI: [10.1016/j.enzmictec.2021.109800](https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2021.109800).
- DEVINE, Paul N. *et al.* Extending the application of biocatalysis to meet the challenges of drug development. *Nature Reviews Chemistry*, Springer Science e Business Media LLC, v. 2, n. 12, p. 409–421, nov. 2018. DOI: [10.1038/s41570-018-0055-1](https://doi.org/10.1038/s41570-018-0055-1).
- DIOUM, Mbaye *et al.* A Ring-D-Seco-Tetranortriterpenoid from Seeds of *Carapa procera* Active against Breast Cancer Cell Lines. *Planta Medica*, Georg Thieme Verlag KG, v. 82, n. 11/12, p. 967–972, mai. 2016. DOI: [10.1055/s-0042-107797](https://doi.org/10.1055/s-0042-107797).

- DJUKOVIC, Danijel *et al.* Ibuprofen metabolite profiling using a combination of SPE/column-trapping and HPLC–micro-coil NMR. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, Elsevier BV, v. 47, n. 2, p. 328–334, jun. 2008. ISSN 0731-7085. DOI: [10.1016/j.jpba.2007.12.035](https://doi.org/10.1016/j.jpba.2007.12.035).
- DOSHI, Pratik; ŠERÁ, Božena. Role of Non-Thermal Plasma in Fusarium Inactivation and Mycotoxin Decontamination. *Plants*, MDPI AG, v. 12, n. 3, p. 627, jan. 2023. ISSN 2223-7747. DOI: [10.3390/plants12030627](https://doi.org/10.3390/plants12030627).
- DUBE, Aman K.; KUMAR, Maushmi S. Biotransformation of bromhexine by *Cunninghamella elegans*, *C. echinulata* and *C. blakesleeana*. *Brazilian Journal of Microbiology*, Springer Science e Business Media LLC, v. 48, n. 2, p. 259–267, abr. 2017. DOI: [10.1016/j.bjm.2016.11.003](https://doi.org/10.1016/j.bjm.2016.11.003).
- ELGHAFFAR, Rasha Y. Abd *et al.* Promising Endophytic *Alternaria alternata* from Leaves of *Ziziphus spina-christi*: Phytochemical Analyses, Antimicrobial and Antioxidant Activities. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, Springer Science e Business Media LLC, v. 194, n. 9, p. 3984–4001, mai. 2022. ISSN 1559-0291. DOI: [10.1007/s12010-022-03959-9](https://doi.org/10.1007/s12010-022-03959-9).
- ESCRIBANO, Pilar; GUINEA, Jesús. Fluconazole-resistant *Candida parapsilosis*: A new emerging threat in the fungi arena. *Frontiers in Fungal Biology*, Frontiers Media SA, v. 3, out. 2022. ISSN 2673-6128. DOI: [10.3389/ffunb.2022.1010782](https://doi.org/10.3389/ffunb.2022.1010782).
- ESTEVEZ, Ana Cristina *et al.* Botryosphaerales fungi produce extracellular enzymes with biotechnological potential. *Canadian Journal of Microbiology*, Canadian Science Publishing, v. 60, n. 5, p. 332–342, mai. 2014. ISSN 1480-3275. DOI: [10.1139/cjm-2014-0134](https://doi.org/10.1139/cjm-2014-0134).
- EVANS, S.; BAGNALL, J.; KASPRZYK-HORDERN, B. Enantiomeric profiling of a chemically diverse mixture of chiral pharmaceuticals in urban water. *Environmental Pollution*, Elsevier BV, v. 230, p. 368–377, nov. 2017. DOI: [10.1016/j.envpol.2017.06.070](https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.06.070).
- FABER, Kurt. *Biotransformations in Organic Chemistry: A text book*. 4. ed.: Springer, 2000. ISBN 3-540-66334-7.
- FAGUNDES, Nathalle Cristine Alencar; OLIVEIRA, Gisele Lopes; SOUZA, Betânia Guedes De. Etnobotânica de plantas medicinais utilizadas no distrito de Vista Alegre, Claro dos Poçoões – Minas Gerais. *Revista Fitos*, Fiocruz - Instituto de Tecnologia em Farmacos, v. 11, n. 1, p. 62–80, set. 2017. DOI: [10.5935/2446-4775.20170007](https://doi.org/10.5935/2446-4775.20170007).
- FAN, Wenxiang *et al.* Limonoids From the Genus *Melia* (Meliaceae): Phytochemistry, Synthesis, Bioactivities, Pharmacokinetics, and Toxicology. *Frontiers in Pharmacology*, Frontiers Media SA, v. 12, jan. 2022. DOI: [10.3389/fphar.2021.795565](https://doi.org/10.3389/fphar.2021.795565).

- FANELE, Asiphe; NDLOVU, Sizwe I. Endophytic fungal species *Nigrospora oryzae* and *Alternaria alternata* exhibit antimicrobial activity against gram-positive and gram-negative multi-drug resistant clinical bacterial isolates. *BMC Complementary Medicine and Therapies*, Springer Science e Business Media LLC, v. 23, n. 1, set. 2023. ISSN 2662-7671. DOI: [10.1186/s12906-023-04157-8](https://doi.org/10.1186/s12906-023-04157-8).
- FELIPPI, Marciele; ARAÚJO, Maristela Machado; LONGHI, Solon Jonas. Morfologia da flor, fruto, semente plântula e muda de *Cabralea canjerana* (Vell.) Mart. *CERNE*, FapUNI-FESP (SciELO), v. 21, n. 3, p. 387–394, set. 2015. DOI: [10.1590/01047760201521031466](https://doi.org/10.1590/01047760201521031466).
- FERREIRA, Mariana Costa *et al.* Molecular phylogeny, diversity, symbiosis and discover of bioactive compounds of endophytic fungi associated with the medicinal Amazonian plant *Carapa guianensis* Aublet (Meliaceae). *Biochemical Systematics and Ecology*, Elsevier BV, v. 59, p. 36–44, abr. 2015. DOI: [10.1016/j.bse.2014.12.017](https://doi.org/10.1016/j.bse.2014.12.017).
- FIEL, Luana Almeida *et al.* Labeling the oily core of nanocapsules and lipid-core nanocapsules with a triglyceride conjugated to a fluorescent dye as a strategy to particle tracking in biological studies. *Nanoscale Research Letters*, Springer Science e Business Media LLC, v. 9, n. 1, mai. 2014. ISSN 1556-276X. DOI: [10.1186/1556-276x-9-233](https://doi.org/10.1186/1556-276x-9-233).
- FLORES, T.B. *Meliaceae in Flora do Brasil*. Acesso em: 30 set. 2024. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. 2020. Disponível em: <http://floradobrasil2020.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB9996>.
- FUKUYAMA, Hirofumi; MATOUSEK, Roman; TZEREMES, Nickolaos G. Estimating the degree of firms' input market power via data envelopment analysis: Evidence from the global biotechnology and pharmaceutical industry. *European Journal of Operational Research*, Elsevier BV, v. 305, n. 2, p. 946–960, mar. 2023. DOI: [10.1016/j.ejor.2022.06.023](https://doi.org/10.1016/j.ejor.2022.06.023).
- GABARDO, Renata P. *et al.* Determination of atrazine and main metabolites in natural waters based on a simple method of QuEChERS and liquid chromatography coupled to a diode-array detector. *Microchemical Journal*, Elsevier BV, v. 168, p. 106392, set. 2021. ISSN 0026-265X. DOI: [10.1016/j.microc.2021.106392](https://doi.org/10.1016/j.microc.2021.106392).
- GALLIANO, H. *et al.* Lignin degradation by *Rigidoporus lignosus* involves synergistic action of two oxidizing enzymes: Mn peroxidase and laccase. *Enzyme and Microbial Technology*, Elsevier BV, v. 13, n. 6, p. 478–482, jun. 1991. ISSN 0141-0229. DOI: [10.1016/0141-0229\(91\)90005-u](https://doi.org/10.1016/0141-0229(91)90005-u).
- GAMBOA, Miguel A.; BAYMAN, Paul. Communities of Endophytic Fungi in Leaves of a Tropical Timber Tree (*Guarea guidonia*: Meliaceae)1. *Biotropica*, Wiley, v. 33, n. 2, p. 352–360, jun. 2001. DOI: [10.1111/j.1744-7429.2001.tb00187.x](https://doi.org/10.1111/j.1744-7429.2001.tb00187.x).
- GAMBOA GAITAN, Miguel A *et al.* Effects of fungicides on endophytic fungi and photosynthesis in seedlings of a tropical tree, *Guarea guidonia* (Meliaceae). *Acta biológica colombiana*, Universidad Nacional de Colombia, v. 10, n. 2, p. 41–48, 2005.

GARDENS, ROYAL BOTANIC. *Cabrlea canjerana*. acesso 30 setembro 2024. ROYAL BOTANIC GARDENS. 2024. Disponível em: <https://powo.science.kew.org/taxon/urn:lsid:ipni.org:names:1021145-2/general-information#uses>.

GARRIGUES, S; GALLIGNANI, M; DELAGUARDIA, M. FIA—FT—IR determination of ibuprofen in pharmaceuticals. *Talanta*, Elsevier BV, v. 40, n. 1, p. 89–93, jan. 1993. ISSN 0039-9140. DOI: [10.1016/0039-9140\(93\)80145-h](https://doi.org/10.1016/0039-9140(93)80145-h).

GOMORI, G. Handbook of Biochemistry and Molecular Biology - Physical and Chemical data. In: edição: G.D Fasman. 3. ed. Boca Raton, Florida: CRC-Press Inc., 1976. v. 1 Preparations of buffers for use in enzyme studies, p. 370–377. ISBN 9780878195091.

GONÇALVES, Caroline C. S.; FONSECA, Francine S. A. da. Enzyme-Catalyzed Redox Reactions. *Revista Virtual de Química*, Sociedade Brasileira de Química (SBQ), v. 10, n. 4, p. 778–797, 2018. DOI: [10.21577/1984-6835.20180057](https://doi.org/10.21577/1984-6835.20180057).

GONÇALVES, Caroline da C. S.; LIMA, Maria Lair Sabóia de Oliveira *et al.* Bioprospecção de enzimas produzidas por fungos decompositores isolados de detritos vegetais de riachos da região de Foz do Iguaçu-PR. In: ESTUDOS Interdisciplinares nas Ciências Exatas e da Terra e Engenharias 2. Atena Editora, set. 2019. P. 128–137. DOI: [10.22533/at.ed.648191030913](https://doi.org/10.22533/at.ed.648191030913).

GONÇALVES, Caroline da Costa Silva; MARSAIOLI, Anita Jocelyne. Monitoring Enzymatic activities with fluorogenic probes. *Química Nova*, GN1 Sistemas e Publicacoes Ltd., 2014. ISSN 0100-4042. DOI: [10.5935/0100-4042.20140142](https://doi.org/10.5935/0100-4042.20140142).

GONDA, Sándor *et al.* Efficient biotransformation of non-steroid anti-inflammatory drugs by endophytic and epiphytic fungi from dried leaves of a medicinal plant, *Plantago lanceolata* L. *International Biodeterioration & Biodegradation*, Elsevier BV, v. 108, p. 115–121, mar. 2016. ISSN 0964-8305. DOI: [10.1016/j.ibiod.2015.12.018](https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2015.12.018).

GORVETT, Zaria. *Terra chega a 8 bilhões de habitantes: quantas pessoas o planeta aguenta?* PT. Atualizado em nov. 2022. BBC News Brasil. Set. 2022. Disponível em: <https://www.bbc.com/portuguese/vert-fut-62807711>.

GOSCH, M; RIGLER, R. Fluorescence correlation spectroscopy of molecular motions and kinetics. *Advanced Drug Delivery Reviews*, Elsevier BV, v. 57, n. 1, p. 169–190, jan. 2005. ISSN 0169-409X. DOI: [10.1016/j.addr.2004.07.016](https://doi.org/10.1016/j.addr.2004.07.016).

GRIGNET, Rosane dos Santos *et al.* Medicines as an emergent contaminant: the review of microbial biodegradation potential. *Folia Microbiologica*, Springer Science e Business Media LLC, v. 67, n. 2, p. 157–174, jan. 2022. DOI: [10.1007/s12223-021-00941-6](https://doi.org/10.1007/s12223-021-00941-6).

GUDIÑA, E.J. *et al.* Antimicrobial and antiadhesive properties of a biosurfactant isolated from *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei* A20. *Letters in Applied Microbiology*, Oxford University Press (OUP), v. 50, n. 4, p. 419–424, abr. 2010. ISSN 1472-765X. DOI: [10.1111/j.1472-765x.2010.02818.x](https://doi.org/10.1111/j.1472-765x.2010.02818.x).

- GUMBLETON, M. Coming out of the dark: the evolving role of fluorescence imaging in drug delivery research. *Advanced Drug Delivery Reviews*, Elsevier BV, v. 57, n. 1, p. 5–15, jan. 2005. ISSN 0169-409X. DOI: [10.1016/j.addr.2004.08.002](https://doi.org/10.1016/j.addr.2004.08.002).
- HAWKSWORTH, D. L. Global species numbers of fungi: are tropical studies and molecular approaches contributing to a more robust estimate? *Biodiversity and Conservation*, Springer Science e Business Media LLC, v. 21, n. 9, p. 2425–2433, jul. 2012. DOI: [10.1007/s10531-012-0335-x](https://doi.org/10.1007/s10531-012-0335-x).
- HE, Peng *et al.* Identification of a fungal cytochrome P450 with steroid two-step ordered selective hydroxylation characteristics in *Colletotrichum lini*. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, Elsevier BV, v. 220, p. 106096, jun. 2022. ISSN 0960-0760. DOI: [10.1016/j.jsbmb.2022.106096](https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2022.106096).
- HERNÁNDEZ-BUENO, Nancy Sofia *et al.* A Versatile Peroxidase from the Fungus *Bjerkandera adusta* Confers Abiotic Stress Tolerance in Transgenic Tobacco Plants. *Plants*, MDPI AG, v. 10, n. 5, p. 859, abr. 2021. ISSN 2223-7747. DOI: [10.3390/plants10050859](https://doi.org/10.3390/plants10050859).
- HOPKINS, M.M. *et al.* Is the Biotechnology Revolution a Myth? In: COMPREHENSIVE Medicinal Chemistry II. Elsevier, 2007. P. 591–613. DOI: [10.1016/b0-08-045044-x/00004-3](https://doi.org/10.1016/b0-08-045044-x/00004-3).
- HUMPHREYS, Nicholas J Turner; Luke. Biocatalysis in Organic Synthesis: The Retrosynthesis Approach. In: Royal Society of Chemistry, fev. 2018. 3- Hydrolysis. ISBN 978-1782625308.
- IBRAHIM, Sabrin R. M. *et al.* Bright Side of *Fusarium oxysporum*: Secondary Metabolites Bioactivities and Industrial Relevance in Biotechnology and Nanotechnology. *Journal of Fungi*, MDPI AG, v. 7, n. 11, p. 943, nov. 2021. ISSN 2309-608X. DOI: [10.3390/jof7110943](https://doi.org/10.3390/jof7110943).
- IQBAL, Javed; NELSON, Jim A.; MCCULLEY, Rebecca L. Fungal endophyte presence and genotype affect plant diversity and soil-to-atmosphere trace gas fluxes. *Plant and Soil*, Springer Science e Business Media LLC, v. 364, n. 1-2, p. 15–27, jun. 2012. DOI: [10.1007/s11104-012-1326-0](https://doi.org/10.1007/s11104-012-1326-0).
- IVSHINA, Irina B. *et al.* Features of diclofenac biodegradation by *Rhodococcus ruber* IEGM 346. *Scientific Reports*, Springer Science e Business Media LLC, v. 9, n. 1, jun. 2019. DOI: [10.1038/s41598-019-45732-9](https://doi.org/10.1038/s41598-019-45732-9).
- JARAMILLO, David A. *et al.* Biocatalytic Potential of Native Basidiomycetes from Colombia for Flavour/Aroma Production. *Molecules*, MDPI AG, v. 25, n. 18, p. 4344, set. 2020. ISSN 1420-3049. DOI: [10.3390/molecules25184344](https://doi.org/10.3390/molecules25184344).
- JÄRVINEN, Juho *et al.* Screening of white-rot fungi manganese peroxidases: a comparison between the specific activities of the enzyme from different native producers. *AMB Express*, Springer Science e Business Media LLC, v. 2, n. 1, p. 62, 2012. DOI: [10.1186/2191-0855-2-62](https://doi.org/10.1186/2191-0855-2-62).

- JIA, Xuewei *et al.* Characterization and Antioxidant Activity of an Exopolysaccharide Produced by *Rigidoporus microporus* (Agaricomycetes). *International Journal of Medicinal Mushrooms*, Begell House, v. 20, n. 4, p. 311–320, 2018. ISSN 1521-9437. DOI: [10.1615/intjmedmushrooms.2018025808](https://doi.org/10.1615/intjmedmushrooms.2018025808).
- JOHANNES, Tyler W.; WOODYER, Ryan D.; ZHAO, Huimin. *High-throughput Screening Methods Developed for Oxidoreductases*. Wiley, nov. 2005. P. 77–93. DOI: [10.1002/3527607846.ch3](https://doi.org/10.1002/3527607846.ch3).
- JÚNIOR, Cláudio Viegas. Terpenos com atividade inseticida: uma alternativa para o controle químico de insetos. *Química Nova*, FapUNIFESP (SciELO), v. 26, n. 3, p. 390–400, mai. 2003. DOI: [10.1590/s0100-40422003000300017](https://doi.org/10.1590/s0100-40422003000300017).
- KAMBLE, Manoj P.; YADAV, Ganapati D. Biocatalytic resolution of (R,S)-styrene oxide using a novel epoxide hydrolase from red mung beans. *Catalysis Today*, Elsevier BV, v. 309, p. 236–241, jul. 2018. DOI: [10.1016/j.cattod.2017.06.013](https://doi.org/10.1016/j.cattod.2017.06.013).
- KASONGA, Teddy Kabeya; KAMIKA, Ilunga; NGOLE-JEME, Veronica M. Ligninolytic enzyme activity and removal efficiency of pharmaceuticals in a water matrix by fungus *Rhizopus* sp. Isolated from cassava. *Environmental Technology*, Informa UK Limited, v. 44, n. 14, p. 2157–2170, jan. 2022. ISSN 1479-487X. DOI: [10.1080/09593330.2021.2024885](https://doi.org/10.1080/09593330.2021.2024885).
- KEN, Chuian-Fu *et al.* A *Rigidoporus vinctus* Alcohol Dehydrogenase and Its Characterization. *Journal of the Chinese Chemical Society*, Wiley, v. 63, n. 3, p. 308–312, jan. 2016. ISSN 2192-6549. DOI: [10.1002/jccs.201500283](https://doi.org/10.1002/jccs.201500283).
- KHAN, Mohd Faheem; MURPHY, Cormac D. Cytochrome P450 5208A3 is a promiscuous xenobiotic biotransforming enzyme in *Cunninghamella elegans*. *Enzyme and Microbial Technology*, Elsevier BV, v. 161, p. 110102, nov. 2022. ISSN 0141-0229. DOI: [10.1016/j.enzmictec.2022.110102](https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2022.110102).
- KHINDARIA, Aditya; YAMAZAKI, Isao; AUST, Steven D. Veratryl alcohol oxidation by lignin peroxidase. *Biochemistry*, American Chemical Society (ACS), v. 34, n. 51, p. 16860–16869, dez. 1995. DOI: [10.1021/bi00051a037](https://doi.org/10.1021/bi00051a037).
- KHIRALLA, A. *et al.* *Endophytic fungi : diversity, characterization and biocontrol*. Edição: Evelyn Hughes. Hauppauge, New York: Nova Science Publisher's, Inc, 2016. ISBN 9781536103588.
- KOTIK, Michael; ARCHELAS, Alain; WOHLGEMUTH, Roland. Epoxide Hydrolases and their Application in Organic Synthesis. *Current Organic Chemistry*, Bentham Science Publishers Ltd., v. 16, n. 4, p. 451–482, fev. 2012. DOI: [10.2174/138527212799499840](https://doi.org/10.2174/138527212799499840).
- KOWALSKA-KROCHMAL, Beata; DUDEK-WICHER, Ruth. The Minimum Inhibitory Concentration of Antibiotics: Methods, Interpretation, Clinical Relevance. *Pathogens*, MDPI AG, v. 10, n. 2, p. 165, fev. 2021. ISSN 2076-0817. DOI: [10.3390/pathogens10020165](https://doi.org/10.3390/pathogens10020165).

- KRISHNAMURTHY, Yelugere L.; NAIK, B. Shankar. Endophytic Fungi Bioremediation. In: ENDOPHYTES: Crop Productivity and Protection. Springer International Publishing, 2017. P. 47–60. DOI: [10.1007/978-3-319-66544-3_3](https://doi.org/10.1007/978-3-319-66544-3_3).
- KUMAR, Adarsh; CHANDRA, Ram. Ligninolytic enzymes and its mechanisms for degradation of lignocellulosic waste in environment. *Heliyon*, Elsevier BV, v. 6, n. 2, e03170, fev. 2020. DOI: [10.1016/j.heliyon.2020.e03170](https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e03170).
- KUMAR, Ashish; ARORA, Pankaj Kumar. Biotechnological Applications of Manganese Peroxidases for Sustainable Management. *Frontiers in Environmental Science*, Frontiers Media SA, v. 10, abr. 2022. DOI: [10.3389/fenvs.2022.875157](https://doi.org/10.3389/fenvs.2022.875157).
- KUMAR, Sudhir; STECHER, Glen *et al.* MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. Edição: Fabia Ursula Battistuzzi. *Molecular Biology and Evolution*, Oxford University Press (OUP), v. 35, n. 6, p. 1547–1549, mai. 2018. ISSN 1537-1719. DOI: [10.1093/molbev/msy096](https://doi.org/10.1093/molbev/msy096).
- LAGO, João Henrique G.; ROQUE, Nídia F. Estudo fitoquímico da madeira de *Guarea macrophylla* (Meliaceae). *Química Nova*, FapUNIFESP (SciELO), v. 32, n. 9, 2009. DOI: [10.1590/s0100-40422009000900022](https://doi.org/10.1590/s0100-40422009000900022).
- LAWRENCE, Daniel P.; ROTONDO, Francesca; GANNIBAL, Philipp B. Biodiversity and taxonomy of the pleomorphic genus *Alternaria*. *Mycological Progress*, Springer Science e Business Media LLC, v. 15, n. 1, dez. 2015. ISSN 1861-8952. DOI: [10.1007/s11557-015-1144-x](https://doi.org/10.1007/s11557-015-1144-x).
- LEE, Yunjin; ROBBINS, Nicole; COWEN, Leah E. Molecular mechanisms governing antifungal drug resistance. *npj Antimicrobials and Resistance*, Springer Science e Business Media LLC, v. 1, n. 1, jul. 2023. ISSN 2731-8745. DOI: [10.1038/s44259-023-00007-2](https://doi.org/10.1038/s44259-023-00007-2).
- LEVASSEUR, Anthony *et al.* Expansion of the enzymatic repertoire of the CAZy database to integrate auxiliary redox enzymes. *Biotechnology for Biofuels*, Springer Science e Business Media LLC, v. 6, n. 1, p. 41, 2013. DOI: [10.1186/1754-6834-6-41](https://doi.org/10.1186/1754-6834-6-41).
- LI, Jian *et al.* Pyrrolidinones from the Ascomycete Fungus *Albonectria rigidiuscula*. *Journal of Natural Products*, American Chemical Society (ACS), v. 72, n. 12, p. 2184–2187, nov. 2009. ISSN 1520-6025. DOI: [10.1021/np900619z](https://doi.org/10.1021/np900619z).
- LIM, Seon-Hwa; LEE, Yun-Hae; KANG, Hee-Wan. Efficient Recovery of Lignocellulolytic Enzymes of Spent Mushroom Compost from Oyster Mushrooms, *Pleurotus* spp., and Potential Use in Dye Decolorization. *Mycobiology*, Informa UK Limited, v. 41, n. 4, p. 214–220, dez. 2013. DOI: [10.5941/myco.2013.41.4.214](https://doi.org/10.5941/myco.2013.41.4.214).
- LIMA, Maria *et al.* Simultaneous Multienzymatic Screening with Fluorogenic Probes. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, Sociedade Brasileira de Química (SBQ), 2017. DOI: [10.21577/0103-5053.20170188](https://doi.org/10.21577/0103-5053.20170188).

- LIMA, Raquel Cosmo de. *Limonóide de Guarea kunthiana com potencial leishmanicida*. 2006. Diss. (Mestrado) – Universidade de Brasília.
- MAGRINI, Flaviane E. *et al.* Antifeedant activity and effects of fruits and seeds extracts of *Cabralea canjerana canjerana* (Vell.) Mart. (Meliaceae) on the immature stages of the fall armyworm *Spodoptera frugiperda* (JE Smith) (Lepidoptera: Noctuidae). *Industrial Crops and Products*, Elsevier BV, v. 65, p. 150–158, mar. 2015. DOI: [10.1016/j.indcrop.2014.11.032](https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2014.11.032).
- MAGRINI, Flaviane Eva *et al.* Viability of *Cabralea canjerana* extracts to control the South American fruit fly, *Anastrepha fraterculus*. *Journal of Insect Science*, Oxford University Press, v. 14, n. 1, p. 47, 2014.
- MAIDEN, N. A. *et al.* Growth and physiological responses of *Hevea brasiliensis* to *Rigidoporus microporus* infection. *Journal of Rubber Research*, Springer Science e Business Media LLC, v. 25, n. 3, p. 213–221, jun. 2022. ISSN 2524-3993. DOI: [10.1007/s42464-022-00156-5](https://doi.org/10.1007/s42464-022-00156-5).
- MARCHLEWICZ, Ariel *et al.* Exploring the Degradation of Ibuprofen by *Bacillus thuringiensis* B1(2015b): The New Pathway and Factors Affecting Degradation. *Molecules*, MDPI AG, v. 22, n. 10, p. 1676, out. 2017. ISSN 1420-3049. DOI: [10.3390/molecules22101676](https://doi.org/10.3390/molecules22101676).
- MARCO-URREA, Ernest *et al.* Ability of white-rot fungi to remove selected pharmaceuticals and identification of degradation products of ibuprofen by *Trametes versicolor*. *Chemosphere*, Elsevier BV, v. 74, n. 6, p. 765–772, fev. 2009. ISSN 0045-6535. DOI: [10.1016/j.chemosphere.2008.10.040](https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2008.10.040).
- MARPANI, Fauziah; PINELO, Manuel; MEYER, Anne S. Enzymatic conversion of CO₂ to CH₃OH via reverse dehydrogenase cascade biocatalysis: Quantitative comparison of efficiencies of immobilized enzyme systems. *Biochemical Engineering Journal*, Elsevier BV, v. 127, p. 217–228, nov. 2017. DOI: [10.1016/j.bej.2017.08.011](https://doi.org/10.1016/j.bej.2017.08.011).
- MARQUES, Catarina M. *et al.* Decision-support challenges in the chemical-pharmaceutical industry: Findings and future research directions. *Computers & Chemical Engineering*, Elsevier BV, v. 134, p. 106672, mar. 2020. DOI: [10.1016/j.compchemeng.2019.106672](https://doi.org/10.1016/j.compchemeng.2019.106672).
- MARQUES NETTO, Caterina G.C.; ANDRADE, Leandro H.; TOMA, Henrique E. Carbon dioxide/methanol conversion cycle based on cascade enzymatic reactions supported on superparamagnetic nanoparticles. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, FapUNIFESP (SciELO), v. 90, 1 suppl 1, p. 593–606, out. 2017. ISSN 0001-3765. DOI: [10.1590/0001-3765201720170330](https://doi.org/10.1590/0001-3765201720170330).
- MEHTA, Tushar; MEENA, Mukesh; NAGDA, Adhishree. Bioactive compounds of *Curvularia* species as a source of various biological activities and biotechnological applications. *Frontiers in Microbiology*, Frontiers Media SA, v. 13, dez. 2022. ISSN 1664-302X. DOI: [10.3389/fmicb.2022.1069095](https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.1069095).

- MELAIS, N.; ARIBI-ZOUIOUECHE, L.; Riant, O. The effect of the migrating group structure on enantioselectivity in lipase-catalyzed kinetic resolution of 1-phenylethanol. *Comptes Rendus Chimie*, Elsevier BV, v. 19, n. 8, p. 971–977, ago. 2016. DOI: [10.1016/j.crci.2016.05.002](https://doi.org/10.1016/j.crci.2016.05.002).
- MERÉNYI, Zsolt *et al.* Genomes of fungi and relatives reveal delayed loss of ancestral gene families and evolution of key fungal traits. *Nature Ecology & Evolution*, Springer Science e Business Media LLC, v. 7, n. 8, p. 1221–1231, jun. 2023. ISSN 2397-334X. DOI: [10.1038/s41559-023-02095-9](https://doi.org/10.1038/s41559-023-02095-9).
- MESQUITA, S.S. *et al.* Etnobotânica das plantas medicinais utilizadas nos cuidados com a saúde na comunidade Nossa Senhora do Livramento, Acará, Pará. *Gaia Scientia*, v. 14, n. 2, p. 142–159, 2020. ISSN 1981-1268.
- MOHAN, S.Venkata; KATAKOJWALA, Ranaprathap. The circular chemistry conceptual framework: A way forward to sustainability in industry 4.0. *Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry*, Elsevier BV, v. 28, p. 100434, abr. 2021. DOI: [10.1016/j.cogsc.2020.100434](https://doi.org/10.1016/j.cogsc.2020.100434).
- MORSCHHÄUSER, Joachim. The development of fluconazole resistance in *Candida albicans* – an example of microevolution of a fungal pathogen. *Journal of Microbiology*, Springer Science e Business Media LLC, v. 54, n. 3, p. 192–201, fev. 2016. ISSN 1976-3794. DOI: [10.1007/s12275-016-5628-4](https://doi.org/10.1007/s12275-016-5628-4).
- MOURELLE-INSUA, Ángela *et al.* What to sacrifice? Fusions of cofactor regenerating enzymes with Baeyer-Villiger monooxygenases and alcohol dehydrogenases for self-sufficient redox biocatalysis. *Tetrahedron*, Elsevier BV, v. 75, n. 13, p. 1832–1839, mar. 2019. DOI: [10.1016/j.tet.2019.02.015](https://doi.org/10.1016/j.tet.2019.02.015).
- MOUSSA, Shaaban H. *et al.* Tetrazolium/Formazan Test as an Efficient Method to Determine Fungal Chitosan Antimicrobial Activity. *Journal of Mycology*, Hindawi Limited, v. 2013, p. 1–7, jun. 2013. DOI: [10.1155/2013/753692](https://doi.org/10.1155/2013/753692).
- MUELLER, Gregory M.; SCHMIT, John Paul. Fungal biodiversity: what do we know? What can we predict? *Biodiversity and Conservation*, Springer Science e Business Media LLC, v. 16, n. 1, p. 1–5, jan. 2007. DOI: [10.1007/s10531-006-9117-7](https://doi.org/10.1007/s10531-006-9117-7).
- NARASIMHA, G; KUMAR, A Praveen; SUBRAMANYAM, D. Production and optimization of lipase enzyme by *Pseudomonas* sps. *Biotechnology-An Indian Journal*, v. 5, n. 1, p. 36–42, 2011.
- NAVEEN, Jayapala *et al.* Pathological, biochemical and molecular variability of *Colletotrichum truncatum* incitant of anthracnose disease in chilli (*Capsicum annuum* L.) *Microbial Pathogenesis*, Elsevier BV, v. 152, p. 104611, mar. 2021. ISSN 0882-4010. DOI: [10.1016/j.micpath.2020.104611](https://doi.org/10.1016/j.micpath.2020.104611).

- NDANA, Salisu Abubakar; Rebeccah Wusa. Preliminary study of Endomycodiversity among three ethnomedicinal plants family Meliaceae in Nigeria. *J. BioSci. Biotechnol.*, v. 5, n. 2, p. 195–201, set. 2016. ISSN 1314-6246.
- NELSON DAVID L., Michael Cox. Princípios de Bioquímica de Lehninger. In: 7. ed.: ArtMed, 2019. Capítulo 6 - Enzimas, p. 187–240.
- NEVES JUNIOR, Athayde *et al.* A microplate assay for extracellular hydrolase detection. *Journal of Microbiological Methods*, Elsevier BV, v. 175, p. 105948, ago. 2020. ISSN 0167-7012. DOI: [10.1016/j.mimet.2020.105948](https://doi.org/10.1016/j.mimet.2020.105948).
- NEWMAN, David J.; CRAGG, Gordon M. Natural Products as Sources of New Drugs over the Nearly Four Decades from 01/1981 to 09/2019. *Journal of Natural Products*, American Chemical Society (ACS), v. 83, n. 3, p. 770–803, mar. 2020. ISSN 1520-6025. DOI: [10.1021/acs.jnatprod.9b01285](https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.9b01285).
- OLIVEIRA, A *et al.* Lipase production by endophytic yeast through factorial design. *Academia Journal of Microbiology Research*, n. 1, p. 16–21, 2013. DOI: [10.15413/ajmr.2013.0005](https://doi.org/10.15413/ajmr.2013.0005).
- OLIVEIRA, Camila Freitas de *et al.* Evaluation of the nutritional composition and antioxidant activity of *Bjerkandera adusta*. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, FapUNIFESP (SciELO), v. 58, 2022. ISSN 2175-9790. DOI: [10.1590/s2175-97902022e20312](https://doi.org/10.1590/s2175-97902022e20312).
- OLIVEIRA, Francisco C. *et al.* Perfil dos componentes voláteis produzidos pelo fungo fitopatogênico *Albonectria rigidiuscula* em diferentes condições de cultivo. *Química Nova*, Sociedade Brasileira de Química (SBQ), jun. 2017. ISSN 1678-7064. DOI: [10.21577/0100-4042.20170064](https://doi.org/10.21577/0100-4042.20170064).
- OLIVEIRA MELO, Arthur Tavares de; FRANCESCHINELLI, Edivani Villaron. Gene flow and fine-scale spatial genetic structure in *Cabralea canjerana* (Meliaceae), a common tree species from the Brazilian Atlantic forest. *Journal of Tropical Ecology*, Cambridge University Press (CUP), v. 32, n. 2, p. 135–145, mar. 2016. DOI: [10.1017/s0266467416000067](https://doi.org/10.1017/s0266467416000067).
- ONU. *Agenda 2030 para o Desenvolvimento Sustentável*. pt. Traduzido pelo Centro de Informação das Nações Unidas para o Brasil (UNIC Rio), última edição em 13 de outubro de 2015. ONU. Set. 2015. Disponível em: <https://brasil.un.org/pt-br/91863-agenda-2030-para-o-desenvolvimento-sustent%C3%A1vel>.
- ONU. *Sobre o nosso trabalho para alcançar os Objetivos de Desenvolvimento Sustentável no Brasil*. 2023. Disponível em: <https://brasil.un.org/pt-br/sdgs>.
- OXFORD INSTRUMENTS. *Application Note 21: Structural Elucidation by Benchtop NMR Spectroscopy: Ibuprofen*. 2022.
- OYEDEJI-AMUSA, Mariam Oyefunke; SADGROVE, Nicholas J.; WYK, Ben-Erik Van. The Ethnobotany and Chemistry of South African Meliaceae: A Review. *Plants*, MDPI AG, v. 10, n. 9, p. 1796, ago. 2021. DOI: [10.3390/plants10091796](https://doi.org/10.3390/plants10091796).

- ÖZÇINAR, Özge *et al.* Biotransformation of Neoruscogenin by the Endophytic Fungus *Alternaria eureka*. *Journal of Natural Products*, American Chemical Society (ACS), v. 81, n. 6, p. 1357–1367, jun. 2018. DOI: [10.1021/acs.jnatprod.7b00898](https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.7b00898).
- PALARIC, Cécile *et al.* Processing of NMR and MS metabolomics data using chemometrics methods: a global tool for fungi biotransformation reactions monitoring. *Metabolomics*, Springer Science e Business Media LLC, v. 15, n. 8, jul. 2019. DOI: [10.1007/s11306-019-1567-5](https://doi.org/10.1007/s11306-019-1567-5).
- PALMIERI, Gianna *et al.* A Novel White Laccase from *Pleurotus ostreatus*. *Journal of Biological Chemistry*, Elsevier BV, v. 272, n. 50, p. 31301–31307, dez. 1997. DOI: [10.1074/jbc.272.50.31301](https://doi.org/10.1074/jbc.272.50.31301).
- PANDINI, J. A. *et al.* Chemical composition, antimicrobial and antioxidant potential of the essential oil of *Guarea kunthiana* A. Juss. *Brazilian Journal of Biology*, FapUNIFESP (SciELO), v. 78, n. 1, p. 53–60, jul. 2017. DOI: [10.1590/1519-6984.04116](https://doi.org/10.1590/1519-6984.04116).
- PAVIA, Donald L. *et al.* *Introdução à Espectroscopia*. Tradução: Pedro Barros. 4. ed. São Paulo: Cengage learning, 2015. Tradução da 4^a edição norte-americana.
- PENG, Liang *et al.* Biotransformation activities of fungal strain *apiotrichum* sp. IB-1 to ibuprofen and naproxen. *Archives of Microbiology*, Springer Science e Business Media LLC, v. 206, n. 5, abr. 2024. ISSN 1432-072X. DOI: [10.1007/s00203-024-03963-z](https://doi.org/10.1007/s00203-024-03963-z).
- PENNINGTON, T. D.; CLARKSON, J. J. A REVISION OF GUAREA (MELIACEAE). *Edinburgh Journal of Botany*, Cambridge University Press (CUP), v. 70, n. 2, p. 179–362, jun. 2013. DOI: [10.1017/s0960428613000036](https://doi.org/10.1017/s0960428613000036).
- PEREIRA, Tiago de Andrade. *Efeitos dos extratos de Aiouea trinervis e Guarea kunthiana sobre as formas epimastigotas de Trypanosoma cruzi*. 2016. Diss. (Mestrado) – Universidade Federal de Mato Grosso do Sul.
- PEREIRA DOS SANTOS, Valmore Henrique *et al.* Oxidative potential of two Brazilian endophytic fungi from *Handroanthus impetiginosus* towards progesterone. *Steroids*, Elsevier BV, v. 187, p. 109101, nov. 2022. ISSN 0039-128X. DOI: [10.1016/j.steroids.2022.109101](https://doi.org/10.1016/j.steroids.2022.109101).
- PESSÔA, Marina Gabriel *et al.* Fusarium species—a promising tool box for industrial biotechnology. *Applied Microbiology and Biotechnology*, Springer Science e Business Media LLC, v. 101, n. 9, p. 3493–3511, mar. 2017. ISSN 1432-0614. DOI: [10.1007/s00253-017-8255-z](https://doi.org/10.1007/s00253-017-8255-z).
- PHUONG TRUONG. *Productivity Enhancement of USP Assay for Ibuprofen Oral Suspension with the Varian 920-LC and Pursuit™ XRs C8 Column*. 2007. Application Note SI-01023.
- PIETRO-SOUZA, William *et al.* Mercury resistance and bioremediation mediated by endophytic fungi. *Chemosphere*, Elsevier BV, v. 240, p. 124874, fev. 2020. DOI: [10.1016/j.chemosphere.2019.124874](https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.124874).

- PINHEIRO, Larissa Zambe *et al.* Activity of endophytic fungi in enantioselective biotransformation of chiral amines: New approach for solid-state fermentation. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, Elsevier BV, v. 48, p. 102631, mar. 2023. ISSN 1878-8181. DOI: [10.1016/j.bcab.2023.102631](https://doi.org/10.1016/j.bcab.2023.102631).
- PLÁCIDO, Jerisson; CAPAREDA, Sergio. Ligninolytic enzymes: a biotechnological alternative for bioethanol production. *Bioresources and Bioprocessing*, Springer Science e Business Media LLC, v. 2, n. 1, mai. 2015. DOI: [10.1186/s40643-015-0049-5](https://doi.org/10.1186/s40643-015-0049-5).
- PMFI. *Relação dos Medicamentos Essenciais do Município de Foz do Iguaçu (2017)*. Edição: Prefeitura Municipal de Foz do Iguaçu- Secretária Municipal de Saúde. Mai. 2017. Disponível em: <http://www.pmfi.pr.gov.br/conteudo/203Bjse%20ssion%20id%3D0a2c7e477f85613aed262a8db2ba?idMenu=2178>.
- PRENAFETA-BOLDÚ, Francesc X.; SUMMERBELL, Richard; HOOG, G. Sybren de. Fungi growing on aromatic hydrocarbons: biotechnology's unexpected encounter with biohazard? *FEMS Microbiology Reviews*, Oxford University Press (OUP), v. 30, n. 1, p. 109–130, jan. 2006. DOI: [10.1111/j.1574-6976.2005.00007.x](https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2005.00007.x).
- QUEIROZ, Casley Borges de *et al.* The repertoire of effector candidates in *Colletotrichum lindemuthianum* reveals important information about *Colletotrichum* genus lifestyle. *Applied Microbiology and Biotechnology*, Springer Science e Business Media LLC, v. 103, n. 5, p. 2295–2309, jan. 2019. ISSN 1432-0614. DOI: [10.1007/s00253-019-09639-9](https://doi.org/10.1007/s00253-019-09639-9).
- RANA, Kusam Lata *et al.* Endophytic Fungi: Biodiversity, Ecological Significance, and Potential Industrial Applications. In: *RECENT Advancement in White Biotechnology Through Fungi*. Springer International Publishing, 2019. P. 1–62. DOI: [10.1007/978-3-030-10480-1_1](https://doi.org/10.1007/978-3-030-10480-1_1).
- RATNASARI, Anisa *et al.* Bio-prospective of Acidophile Microorganisms in Biodegradation of NSAIDs. *Current Pollution Reports*, Springer Science e Business Media LLC, v. 10, n. 2, p. 189–206, mar. 2024. ISSN 2198-6592. DOI: [10.1007/s40726-024-00301-1](https://doi.org/10.1007/s40726-024-00301-1).
- REYMOND, Jean-Louis; FLUXÀ, Viviana S.; MAILLARD, Noélie. Enzyme assays. *Chem. Commun.*, Royal Society of Chemistry (RSC), n. 1, p. 34–46, 2008. ISSN 1364-548X. DOI: [10.1039/b813732c](https://doi.org/10.1039/b813732c).
- RHODEN. Antimicrobial Activity of Crude Extracts of Endophytic Fungi Isolated from Medicinal Plant *Trichilia elegans* A. Juss. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, Journal of Applied Pharmaceutical Science, ago. 2012. DOI: [10.7324/japs.2012.2807](https://doi.org/10.7324/japs.2012.2807).
- RHODEN, S.A. *et al.* Phylogenetic diversity of endophytic leaf fungus isolates from the medicinal tree *Trichilia elegans* (Meliaceae). *Genetics and Molecular Research*, Genetics e Molecular Research, v. 11, n. 3, p. 2513–2522, 2012. DOI: [10.4238/2012.june.15.8](https://doi.org/10.4238/2012.june.15.8).

- RICHARD, T; GUILLOT, J; BOLTON, Barry. Immunological properties of the lectin isolated from the phytopathogenic basidiomycete *Rigidoporus lignosus*. *Cryptogamie. Mycologie*, Biodiversity Heritage Library, v. 18, n. 2, p. 115–123, 1997. ISSN 0181-1584. DOI: [10.5962/p.354638](https://doi.org/10.5962/p.354638).
- RODRÍGUEZ-COUTO, Susana. Fungal Laccase: A Versatile Enzyme for Biotechnological Applications. In: RECENT Advancement in White Biotechnology Through Fungi. Springer International Publishing, 2019. P. 429–457. DOI: [10.1007/978-3-030-10480-1_13](https://doi.org/10.1007/978-3-030-10480-1_13).
- RUDIYANSYAH *et al.* Arugosins O-Q, New Fungal Metabolites from the Fungus *Xylariaceae* sp. Isolated from Leaves of *Lansium domesticum* (Meliaceae). *Natural Product Communications*, SAGE Publications, v. 14, n. 1, p. 1934578x1901400, jan. 2019. DOI: [10.1177/1934578x1901400133](https://doi.org/10.1177/1934578x1901400133).
- RUEDA, Andrés M. *et al.* Genome sequencing and functional characterization of a *Dictyopanus pusillus* fungal enzymatic extract offers a promising alternative for lignocellulose pretreatment of oil palm residues. Edição: Katherine A. Borkovich. *PLOS ONE*, Public Library of Science (PLoS), v. 15, n. 7, e0227529, jul. 2020. ISSN 1932-6203. DOI: [10.1371/journal.pone.0227529](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0227529).
- SAFRIANSYAH, Wahyu *et al.* Phytochemistry and Biological Activities of Guarea Genus (Meliaceae). *Molecules*, MDPI AG, v. 27, n. 24, p. 8758, dez. 2022. DOI: [10.3390/molecules27248758](https://doi.org/10.3390/molecules27248758).
- SALVATORE, Maria Michela *et al.* First report of 6-methylpyridione analogues from *Dothiorella sarmentorum*, a botryosphaeriaceous fungus associated with grapevine trunk diseases. *Natural Product Research*, Informa UK Limited, v. 38, n. 16, p. 2748–2755, jul. 2023. ISSN 1478-6427. DOI: [10.1080/14786419.2023.2232083](https://doi.org/10.1080/14786419.2023.2232083).
- SALVIA, Marie-Virginie *et al.* Development of a multi-residue method using acetonitrile-based extraction followed by liquid chromatography–tandem mass spectrometry for the analysis of steroids and veterinary and human drugs at trace levels in soil. *Journal of Chromatography A*, Elsevier BV, v. 1245, p. 122–133, jul. 2012. ISSN 0021-9673. DOI: [10.1016/j.chroma.2012.05.034](https://doi.org/10.1016/j.chroma.2012.05.034).
- SANDE, Denise *et al.* Production of omega 3, 6, and 9 fatty acids from hydrolysis of vegetable oils and animal fat with *Colletotrichum gloeosporioides* lipase. *Food Science and Biotechnology*, Springer Science e Business Media LLC, nov. 2017. ISSN 2092-6456. DOI: [10.1007/s10068-017-0249-1](https://doi.org/10.1007/s10068-017-0249-1).
- SANTOS, Regina M. Geris dos; RODRIGUES-FO, Edson. Meroterpenes from *Penicillium* sp found in association with *Melia azedarach*. *Phytochemistry*, Elsevier BV, v. 61, n. 8, p. 907–912, dez. 2002. ISSN 0031-9422. DOI: [10.1016/s0031-9422\(02\)00379-5](https://doi.org/10.1016/s0031-9422(02)00379-5).

- SANTOS, Regina M. Geris dos; RODRIGUES-FO., Edson. Further Meroterpenes Produced by *Penicillium* sp., an Endophyte Obtained from *Melia azedarach*. *Zeitschrift für Naturforschung C*, Walter de Gruyter GmbH, v. 58, n. 9–10, p. 663–669, out. 2003. ISSN 0939-5075. DOI: [10.1515/znc-2003-9-1012](https://doi.org/10.1515/znc-2003-9-1012).
- SAPARRAT, Mario Carlos Nazareno *et al.* Production of ligninolytic enzymes by *Fusarium solani* strains isolated from different substrata. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, Springer Science e Business Media LLC, v. 16, n. 8/9, p. 799–803, 2000. ISSN 0959-3993. DOI: [10.1023/a:1008923804859](https://doi.org/10.1023/a:1008923804859).
- SARMENTO, Ulana Chaves *et al.* Larvicidal efficacies of plants from Midwestern Brazil: melianodiol from *Guarea kunthiana* as a potential biopesticide against *Aedes aegypti*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, FapUNIFESP (SciELO), v. 111, n. 7, p. 469–474, jun. 2016. DOI: [10.1590/0074-02760160134](https://doi.org/10.1590/0074-02760160134).
- SARNAIK, Aditya *et al.* High-throughput screening for efficient microbial biotechnology. *Current Opinion in Biotechnology*, Elsevier BV, v. 64, p. 141–150, ago. 2020. ISSN 0958-1669. DOI: [10.1016/j.copbio.2020.02.019](https://doi.org/10.1016/j.copbio.2020.02.019).
- SATO, Daisuke *et al.* In situ detection of enzymatic activities by the bioorthogonal reaction-coupled assay using a dialkoxysilylated fluorogenic probe. *Chemistry Letters*, Oxford University Press (OUP), v. 53, n. 3, mar. 2024. ISSN 1348-0715. DOI: [10.1093/chemle/upae031](https://doi.org/10.1093/chemle/upae031).
- SAZCI, A.; ERENLER, K.; RADFORD, A. Detection of cellulolytic fungi by using Congo red as an indicator: a comparative study with the dinitrosalicylic acid reagent method. *Journal of Applied Bacteriology*, Wiley, v. 61, n. 6, p. 559–562, dez. 1986. DOI: [10.1111/j.1365-2672.1986.tb01729.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1986.tb01729.x).
- SHIEH, W.R. *et al.* A ¹³C NMR Study on Ibuprofen Metabolism in Isolated Rat Liver Mitochondria. *Analytical Biochemistry*, Elsevier BV, v. 212, n. 1, p. 143–149, jul. 1993. ISSN 0003-2697. DOI: [10.1006/abio.1993.1304](https://doi.org/10.1006/abio.1993.1304).
- SIBBR. *Relatório Consulta de Testemunha*. <https://gqr.sh/LSmt>, set. 2020.
- SILVA, Carla Porto da. *Potencial enzimático da microbiota da pele humana e sua ação sobre insumos de fragrâncias*. 2012. Tese (Doutorado) – Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP.
- SILVA, J D A *et al.* Ethnobotanical survey of medicinal plants used by the community of Sobradinho, Lus Correia, Piau, Brazil. *Journal of Medicinal Plants Research*, Academic Journals, v. 9, n. 32, p. 872–883, ago. 2015. DOI: [10.5897/jmpr2015.5881](https://doi.org/10.5897/jmpr2015.5881).
- SILVA, Kethlen Rose Inácio da. *Biodegradação de polietileno tereftalato (PET) por fungos ligninolíticos*. 2009. Diss. (Mestrado) – Universidade Estadual de Campinas.

- SILVA BARBOSA, Carolina da. *Triagem de plantas do cerrado e Pantanal sul-Matogrossense e ação do 3-o-tigloilmelianolisolado de Guarea kunthiana (Meliaceae) sobre Hipicephalus (boophilus) microplus (canestrini, 1887)(acari: ixodidae)*. 2012. Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Goiás.
- SINGH, Pooja *et al.* Evaluating biopulping as an alternative application on oil palm trunk using the white-rot fungus *Trametes versicolor*. *International Biodeterioration & Biodegradation*, Elsevier BV, v. 82, p. 96–103, ago. 2013. DOI: [10.1016/j.ibiod.2012.12.016](https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2012.12.016).
- SINGH, R. Microbial Biotransformation: A Process for Chemical Alterations. *Journal of Bacteriology & Mycology: Open Access*, MedCrave Group, LLC, v. 4, n. 2, fev. 2017. DOI: [10.15406/jbmoa.2017.04.00085](https://doi.org/10.15406/jbmoa.2017.04.00085).
- SINGH, Rajendra *et al.* Microbial enzymes: industrial progress in 21st century. *3 Biotech*, Springer Science e Business Media LLC, v. 6, n. 2, ago. 2016. DOI: [10.1007/s13205-016-0485-8](https://doi.org/10.1007/s13205-016-0485-8).
- SIÓDMIĄK, Tomasz *et al.* High Enantioselective Novozym 435-Catalyzed Esterification of (R,S)-Flurbiprofen Monitored with a Chiral Stationary Phase. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, Springer Science e Business Media LLC, v. 175, n. 5, p. 2769–2785, jan. 2015. DOI: [10.1007/s12010-014-1455-4](https://doi.org/10.1007/s12010-014-1455-4).
- SONG, Lisha *et al.* Effects of endophytic fungi on parasitic process of *Taxillus chinensis*. *Scientific Reports*, Springer Science e Business Media LLC, v. 12, n. 1, mai. 2022. DOI: [10.1038/s41598-022-11940-z](https://doi.org/10.1038/s41598-022-11940-z).
- SOTA, Teiji *et al.* Metagenomic Approach Yields Insights into Fungal Diversity and Functioning. In: SPRINGERBRIEFS in Biology. Springer Japan, ago. 2013. P. 1–23. DOI: [10.1007/978-4-431-54261-2_1](https://doi.org/10.1007/978-4-431-54261-2_1).
- SUDHA, Venkatesan *et al.* Biological properties of Endophytic Fungi. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, FapUNIFESP (SciELO), v. 59, n. 0, 2016. ISSN 1516-8913. DOI: [10.1590/1678-4324-2016150436](https://doi.org/10.1590/1678-4324-2016150436).
- SUJARWO, Wawan *et al.* Ethnobotanical uses of neem (*Azadirachta indica* A.Juss. Meliaceae) leaves in Bali (Indonesia) and the Indian subcontinent in relation with historical background and phytochemical properties. *Journal of Ethnopharmacology*, Elsevier BV, v. 189, p. 186–193, ago. 2016. DOI: [10.1016/j.jep.2016.05.014](https://doi.org/10.1016/j.jep.2016.05.014).
- SUNDARAMOORTHY, M *et al.* The crystal structure of manganese peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium* at 2.06-Å resolution. *J Biol Chem*, v. 269, n. 52, p. 32759–32767, 30 dez. 1994.
- SURESH, Anushree; ABRAHAM, Jayanthi. Degradation of Emerging Pharmaceutical Pollutants from Wastewater Using *Penicillium aurantiogriseum* 2AJS. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, Springer Science e Business Media LLC, v. 196, n. 6, p. 3488–3510, set. 2023. ISSN 1559-0291. DOI: [10.1007/s12010-023-04653-0](https://doi.org/10.1007/s12010-023-04653-0).

- TADYCH, Mariusz; WHITE, James F. Endophytic Microbes. In: REFERENCE Module in Life Sciences. Elsevier, 2019. DOI: [10.1016/b978-0-12-809633-8.13036-5](https://doi.org/10.1016/b978-0-12-809633-8.13036-5).
- TEIXEIRA, S; MELO, J; DE. Plantas medicinais utilizadas no município de Jupi. *Brasil. Iheringia, Série Botânica*, Pernambuco, v. 61, n. 1/2, p. 5–11, 2006.
- TEOH, Eng Soon. Secondary Metabolites of Plants. In: MEDICINAL Orchids of Asia. Springer International Publishing, 2016. P. 59–73. DOI: [10.1007/978-3-319-24274-3_5](https://doi.org/10.1007/978-3-319-24274-3_5).
- TIWARI, Pragya; BAE, Hanhong. Endophytic Fungi: Key Insights, Emerging Prospects, and Challenges in Natural Product Drug Discovery. *Microorganisms*, MDPI AG, v. 10, n. 2, p. 360, fev. 2022. ISSN 2076-2607. DOI: [10.3390/microorganisms10020360](https://doi.org/10.3390/microorganisms10020360).
- TOGHUEO, R.M.K.; ZABALGOGEAZCOA, I. *et al.* Enzymatic activity of endophytic fungi from the medicinal plants *Terminalia catappa*, *Terminalia mantaly* and *Cananga odorata*. *South African Journal of Botany*, Elsevier BV, v. 109, p. 146–153, mar. 2017. DOI: [10.1016/j.sajb.2016.12.021](https://doi.org/10.1016/j.sajb.2016.12.021).
- TOGHUEO, Rufin Marie Kouipou; BOYOM, Fabrice Fekam. Endophytic Fungi from Terminalia Species: A Comprehensive Review. *Journal of Fungi*, MDPI AG, v. 5, n. 2, p. 43, mai. 2019. DOI: [10.3390/jof5020043](https://doi.org/10.3390/jof5020043).
- TRUPPO, Matthew D. Biocatalysis in the Pharmaceutical Industry: The Need for Speed. *ACS Medicinal Chemistry Letters*, American Chemical Society (ACS), v. 8, n. 5, p. 476–480, abr. 2017. DOI: [10.1021/acsmchemlett.7b00114](https://doi.org/10.1021/acsmchemlett.7b00114).
- UPADHYAY, Pooja; SHRIVASTAVA, Rahul; AGRAWAL, Pavan Kumar. Bioprospecting and biotechnological applications of fungal laccase. *3 Biotech*, Springer Science e Business Media LLC, v. 6, n. 1, jan. 2016. DOI: [10.1007/s13205-015-0316-3](https://doi.org/10.1007/s13205-015-0316-3).
- VÁSQUEZ, Silvia Patricia Flores; MENDONÇA, Maria Silvia de; NODA, Sandra do Nascimento. Etnobotânica de plantas medicinais em comunidades ribeirinhas do Município de Manacapuru, Amazonas, Brasil. *Acta Amazonica*, FapUNIFESP (SciELO), v. 44, n. 4, p. 457–472, dez. 2014. ISSN 0044-5967. DOI: [10.1590/1809-4392201400423](https://doi.org/10.1590/1809-4392201400423).
- VASUNDHARA, M.; REDDY, M. Sudhakara; KUMAR, Anil. Secondary Metabolites From Endophytic Fungi and Their Biological Activities. In: NEW and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering. Elsevier, 2019. P. 237–258. DOI: [10.1016/b978-0-444-63504-4.00018-9](https://doi.org/10.1016/b978-0-444-63504-4.00018-9).
- VÁZQUEZ, Maryen Alberto *et al.* Cellulolytic and ligninolytic potential of new strains of fungi for the conversion of fibrous substrates. *Biotechnology Research and Innovation*, Editora Cubo, v. 3, n. 1, p. 177–186, jan. 2019. ISSN 2452-0721. DOI: [10.1016/j.biori.2018.11.001](https://doi.org/10.1016/j.biori.2018.11.001).

- VELEVA, Vesela R.; CUE, Berkeley W.; TODOROVA, Svetlana. Benchmarking Green Chemistry Adoption by the Global Pharmaceutical Supply Chain. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, American Chemical Society (ACS), v. 6, n. 1, p. 2–14, nov. 2017. DOI: [10.1021/acssuschemeng.7b02277](https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.7b02277).
- VĚTROVSKÝ, Tomáš *et al.* A meta-analysis of global fungal distribution reveals climate-driven patterns. *Nature Communications*, Springer Science e Business Media LLC, v. 10, n. 1, nov. 2019. DOI: [10.1038/s41467-019-13164-8](https://doi.org/10.1038/s41467-019-13164-8).
- WANG, Xiaolu; YAO, Bin; SU, Xiaoyun. Linking Enzymatic Oxidative Degradation of Lignin to Organics Detoxification. *International Journal of Molecular Sciences*, MDPI AG, v. 19, n. 11, p. 3373, out. 2018. DOI: [10.3390/ijms19113373](https://doi.org/10.3390/ijms19113373).
- WANG, Zhenfei; LIANG, Bin *et al.* Weak electrostimulation enhanced the microbial transformation of ibuprofen and naproxen. *Science of The Total Environment*, Elsevier BV, v. 835, p. 155522, ago. 2022. ISSN 0048-9697. DOI: [10.1016/j.scitotenv.2022.155522](https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.155522).
- WARIISHI, H; VALLI, K; GOLD, M.H. Manganese(II) oxidation by manganese peroxidase from the basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. Kinetic mechanism and role of chelators. *Journal of Biological Chemistry*, Elsevier BV, v. 267, n. 33, p. 23688–23695, nov. 1992. ISSN 0021-9258. DOI: [10.1016/s0021-9258\(18\)35893-9](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(18)35893-9).
- WHITE, T.J. *et al.* Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: PCR Protocols. Elsevier, 1990. P. 315–322. ISBN 9780123721808. DOI: [10.1016/b978-0-12-372180-8.50042-1](https://doi.org/10.1016/b978-0-12-372180-8.50042-1).
- WILLRODT, Christian *et al.* Highly Efficient Access to (*S*)-Sulfoxides Utilizing a Promiscuous Flavoprotein Monooxygenase in a Whole-Cell Biocatalyst Format. *ChemCatChem*, Wiley, v. 12, n. 18, p. 4664–4671, jan. 2020. DOI: [10.1002/cctc.201901894](https://doi.org/10.1002/cctc.201901894).
- WINKLER, Christoph K.; SCHRITTWIESER, Joerg H.; KROUTIL, Wolfgang. Power of Biocatalysis for Organic Synthesis. *ACS Central Science*, American Chemical Society (ACS), v. 7, n. 1, p. 55–71, jan. 2021. DOI: [10.1021/acscentsci.0c01496](https://doi.org/10.1021/acscentsci.0c01496).
- WONG, Dominic W. S. Structure and Action Mechanism of Lignolytic Enzymes. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, Springer Science e Business Media LLC, v. 157, n. 2, p. 174–209, jun. 2008. DOI: [10.1007/s12010-008-8279-z](https://doi.org/10.1007/s12010-008-8279-z).
- WU, Xudong; RAPOPORT, Tom A. Translocation of Proteins through a Distorted Lipid Bilayer. *Trends in Cell Biology*, Elsevier BV, v. 31, n. 6, p. 473–484, jun. 2021. ISSN 0962-8924. DOI: [10.1016/j.tcb.2021.01.002](https://doi.org/10.1016/j.tcb.2021.01.002).
- XU, Z. *et al.* Discovery of the Endophytic Fungi from *Polygonum cuspidatum* and Biotransformation of Resveratrol to Pterostillbene by the Endophyte *Penicillium* sp. F5. *Applied Biochemistry and Microbiology*, Pleiades Publishing Ltd, v. 56, n. 3, p. 313–320, mai. 2020. ISSN 1608-3024. DOI: [10.1134/s0003683820030163](https://doi.org/10.1134/s0003683820030163).

- YADAV, Monika; VIVEKANAND, Vivekanand. Biological treatment of lignocellulosic biomass by *Curvularia lunata* for biogas production. *Bioresource Technology*, Elsevier BV, v. 306, p. 123151, jun. 2020. ISSN 0960-8524. DOI: [10.1016/j.biortech.2020.123151](https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.123151).
- YAP, Ling Sze; LEE, Wai Leng; TING, Adeline Su Yien. Bioprocessing and purification of extracellular L-asparaginase produced by endophytic *Colletotrichum gloeosporioides* and its anticancer activity. *Preparative Biochemistry & Biotechnology*, Informa UK Limited, v. 53, n. 6, p. 653–671, set. 2022. ISSN 1532-2297. DOI: [10.1080/10826068.2022.2122064](https://doi.org/10.1080/10826068.2022.2122064).
- ZHANG, Zhihao *et al.* Development and Comparison of Substrate-Supplied and Product-Convergent Redox-Neutral Cascade Reactions for the Sustainable Synthesis of Lactones. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, American Chemical Society (ACS), v. 11, n. 28, p. 10380–10390, jul. 2023. DOI: [10.1021/acssuschemeng.3c01495](https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.3c01495).
- ZHAO, Dan *et al.* Characterisation of a Novel White Laccase from the Deuteromycete Fungus *Myrothecium verrucaria* NF-05 and Its Decolourisation of Dyes. Edição: Eric Cascales. *PLoS ONE*, Public Library of Science (PLoS), v. 7, n. 6, e38817, jun. 2012. DOI: [10.1371/journal.pone.0038817](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0038817).

Apêndices

APÊNDICE A – Reagentes e Soluções

A.1 Tampão Fosfato

A solução estoque a $0,2 \text{ mol.L}^{-1}$ de fosfato monobásico de sódio (NaHPO_4) (ACS científica[®]) foi preparada pesando 27,8 g e em balão volumétrico foi ajustado o volume em 1,0 L com água deionizada. Também foi preparada uma solução a $0,2 \text{ mol.L}^{-1}$ de fosfato bibásico de sódio anidro (Na_2HPO_4) (Chemicals[®]), neste caso foram pesados 28,39 g de Na_2HPO_4 e completada para 1,0 L com água deionizada. Para o preparo de 1,0 litro do tampão a pH 7,4, foram adicionados 95 mL da solução de NaHPO_4 $0,2 \text{ mol.L}^{-1}$ e 405 mL da solução de Na_2HPO_4 a $0,2 \text{ mol.L}^{-1}$ (Gomori, 1976).

A.2 Tampão Borato

Inicialmente foram preparadas as soluções estoque de $0,2 \text{ mol.L}^{-1}$ de ácido bórico (H_3BO_3) e de boráx ($0,05 \text{ mol.L}^{-1}$). Para a solução de H_3BO_3 foram pesados 6,2 g em 500 mL e para a de boráx 9,75 g em 500 mL de água destilada.

O tampão borato pH 8,8 foi preparado a partir de 50 mL de uma solução estoque a $0,2 \text{ mol.L}^{-1}$ H_3BO_3 - e de 30 mL da solução de bórax $0,05 \text{ mol.L}^{-1}$, completada com água deionizada para 200 mL (Gomori, 1976).

A.3 Tampão Citrato

Para obter a solução estoque de ácido cítrico a $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ foram pesados 21,01 g em 1,0 L de água deionizada. Para preparar a solução de citrato de sódio a $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ foram pesados 29,41 g para 1 L de água deionizada.

Os tampões citrato, pH 3,0 e pH 4,5, foram preparados a partir das soluções estoque de ácido cítrico ($0,1 \text{ mol.L}^{-1}$) e citrato de sódio ($0,1 \text{ mol.L}^{-1}$). Para o pH 3,0 foram 46,5 mL da solução de ácido e 3,5 mL da solução de citrato completados para 100 mL com água deionizada. Já para o pH 4,5 foram adicionados 56 mL de ácido cítrico e 44 mL de citrato de sódio completados para 500 mL de água deionizada (Gomori, 1976).

A.4 Tampão Malonato

O tampão malonato ($3,5 \text{ mol.L}^{-1}$) com pH 4,5, foi preparado a partir da diluição de 100,64 g de malonato de sódio (SigmaAldrich[®]) em 200 mL de água deionizada (Gomori,

1976).

A.5 Tampão Acetato

Foram preparadas as soluções estoque. Para obter a solução ácido acético ($0,2 \text{ mol.L}^{-1}$) foram transferidos 11,5 mL de ácido acético glacial em 1 L de água deionizada. Para preparar a solução de acetato de sódio ($0,2 \text{ mol.L}^{-1}$) 16,4 g foram diluídos em 1,0 L de água deionizada.

Para o tampão acetato pH 4,5 foi preparada uma solução estoque de $0,2 \text{ mol.L}^{-1}$ de ácido acético e uma de $0,2 \text{ mol.L}^{-1}$ de acetato de sódio. Sendo que para 100 mL foram acrescentados 30,5 mL da solução de ácido e 19,5 mL da solução básica (Gomori, 1976).

A.6 Solução de Fármacos

Foram preparadas soluções estoque dos fármacos comerciais, em uma concentração final de 50 mg.L^{-1} em água destilada. Para obter estas soluções mais homogêneas, os fármacos ibuprofeno, fluconazol, dipirona sódica, fluoxetina, e o estradiol foram inicialmente diluídos em 1 mL de dimetilsulfóxido (DMSO) e posteriormente diluídos em água. O ácido acetilsalicílico (AAS) foi diluído diretamente em água. Já a amoxicilina, foi diluída em 1 mL de hidróxido de amônia (NH_4OH) a 1 mol.L^{-1} e o diclofenaco de potássio foi previamente diluído em 1 mL de metanol (MeOH) PA. Para obter a concentração desejada, o volume foi completado com água destilada, utilizou-se balão volumétrico de 50 mL.

A.7 Meio de cultura – mínimo com glicose

O meio mínimo foi preparado com $0,20 \text{ g.L}^{-1}$ de cloreto de cálcio (CaCl_2), $0,7 \text{ g.L}^{-1}$ fosfato de potássio bi-básico (K_2HPO_4), $0,7 \text{ g.L}^{-1}$ de fosfato de potássio monobásico (KH_2PO_4), $0,9 \text{ g.L}^{-1}$ de glicose, $0,5 \text{ g.L}^{-1}$ de nitrato de sódio (NaNO_3), $0,5 \text{ g.L}^{-1}$ de sulfato de amônio ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$), e $0,2 \text{ g.L}^{-1}$ de sulfato de magnésio (MgSO_4) em água destilada (Ivshina *et al.* 2019).

A.8 Meio de cultura basal com ureia

Para 1,0 L de meio foram utilizados: extrato de levedura 0,2 g; peptona 0,76 g; ureia ($\text{CO}(\text{NH}_2)_2$) 0,3 g; sulfato de cobre penta-hidratado ($\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{ H}_2\text{O}$) 0,25 g; sulfato de amônio ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) 1,4 g; fosfato de potássio monobásico (KH_2PO_4) 2 g; sulfato de magnésio hepta-hidratado ($\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{ H}_2\text{O}$) 0,3 g; cloreto de cálcio di-hidratado

($\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$) 0,4 g; sulfato de ferro hepta-hidratado ($\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$) 0,005 g; sulfato de manganês anidro (MnSO_4) 0,016 g; sulfato de zinco hepta-hidratado ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$) 0,037 g; cloreto de cobalto hexa-hidratado ($\text{CoCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$) 0,037 g e completado o volume com água destilada (Rueda *et al.* 2020).

A.9 Meio Czpack

Para a preparação de 1,0 litro do meio Czpack utilizou-se 1 g KHPO_4 , 1 g Na_2HPO_4 , 0,5 MgSO_4 , 5 g de extrato de levedura, 30 g de glicose, 2 g NaNO_3 , 0,02 g FeSO_4 e 0,5 g de KCl , completou-se o volume com água destilada (Palaric *et al.* 2019).

A.10 Meio Muller-Hilton

Para a preparação de 1,0 litro do Muller-hilton (Kasvi[®]) suspender 36 g de pó em 1 litro de água destilada.

A.11 Solução Salina 0,85 %

A solução foi preparada com NaCl grau PA. Onde para 1 L foi solubilizado 8,5 g em 1 litro de água destilada.

A.12 Tampão de extração do DNA

Para a preparação do tampão, pesou-se 1 g de dodecil sulfato de sódio (SDS) e diluiu-se em 80 mL de água destilada. Na sequência, adicionou-se 0,9305 g de EDTA, 1,461 g de NaCl , 3,152 g Tris, completou-se o volume para 100 mL de água destilada, e ajustou o pH em 8,0 com auxílio de solução de HCl 0,1 mol. L^{-1} .

APÊNDICE B – Códigos dos Isolados

Quadros com os códigos dos fungos isolados da *G. kunthiana* e da *C. canjerana*, onde as iniciais 'm' nos códigos indicam a família Meliaceae, 'cc' refere-se a espécie *C. canjerana*, enquanto o 'gk' faz referência a *G. kunthiana*. No caso desta as letras 'A' a 'D', indicam que foram isoladas de exemplares diferentes.

Quadro B.1 – Código dos isolados para árvore *C. canjerana*

Códigos *C. canjerana*

mcc_A5_2	mcc_A2_4	mcc_A4_5
mcc_A1_3	mcc_A3_1	mcc_A4_6
mcc_A1_2	mcc_A2_7	mcc_A2_5
mcc_A1_4	mcc_A2_3	mcc_A4_7
mcc_A1_9	mcc_A3_3	mcc_A4_8
mcc_A1_8	mcc_A3_5	mcc_A4_2
mcc_A1_7	mcc_A3_6	mcc_A4_3
mcc_A1_5	mcc_A3_4	mcc_A4_9
mcc_A5_6	mcc_A4_4	mcc_A2_2
mcc_A5_4	mcc_A5_1	mcc_A4_1
mcc_A2_8	mcc_A2_6	mcc_A1_1
mcc_A5_3	mcc_A2_1	mcc_A3_2
mcc_A1_6	mcc_A5_2	

Fonte: Autora, 2025.

Quadro B.2 – Código dos isolados para árvore *G. kunthiana*Códigos *G. kunthiana*

mgk_A3_14	mgk_C1_4	mgk_B1_12
mgk_C4_1	mgk_C5_3	mgk_B1_14
mgk_B1_8	mgk_B3_5	mgk_D1_20
mgk_D1_9	mgk_C3_10	mgk_A5_9
mgk_C5_2	mgk_C4_3	mgk_A3_14
mgk_A3_13	mgk_A3_15	mgk_C1_7
mgk_A3_11	mgk_D2_9	mgk_D2_8
mgk_B1_5	mgk_C5_5	mgk_C1_5
mgk_D2_4	mgk_D1_10	mgk_A2_2
mgk_B3_4	mgk_D2_7	mgk_B3_6
mgk_A4_2	mgk_A3_12	mgk_B1_6
mgk_A3_2	mgk_B1_7	mgk_A3_10
mgk_A2_1	mgk_B4_11	mgk_B2_5
mgk_B1_9	mgk_B1_2	mgk_A3_3
mgk_C2_2	mgk_B2_3	mgk_C5_4
mgk_A5_4	mgk_D1_7	mgk_B3_1
mgk_A3_7	mgk_B4_8	mgk_D1_13
mgk_A3_4	mgk_B4_9	mgk_A2_3
mgk_D2_5	mgk_D2_10	mgk_B4_7
mgk_B4_6	mgk_C1_3	mgk_B4_3
mgk_B4_2	mgk_B4_4	mgk_C2_5
mgk_C6_1	mgk_C2_4	mgk_C3_5
mgk_D2_4	mgk_D1_12	mgk_D1_2
mgk_C2_6	mgk_A3_9	mgk_A3_6
mgk_C2_3	mgk_C3_6	mgk_C2_7
mgk_A5_7	mgk_A5_8	mgk_B3_3
mgk_B1_11	mgk_D2_6	mgk_B4_1
mgk_C3_9	mgk_A2_5	mgk_D1_6
mgk_C3_7	mgk_B1_13	mgk_B4_10
mgk_C3_8	mgk_C4_2	mgk_D2_2
mgk_C2_7	mgk_A5_6	mgk_A4_3
mgk_A5_5	mgk_B1_9	mgk_A4_4
mgk_A3_8	mgk_D2_3	mgk_B4_5
mgk_B1_4	mgk_C1_6	mgk_A5_3
mgk_A3_5	mgk_D1_8	mgk_A5_1
mgk_C1_2	mgk_D1_3	mgk_B2_1
mgk_D2_1	mgk_C3_2	mgk_A5_2
mgk_C3_4	mgk_C3_3	mgk_A4_1
mgk_B2_2	mgk_C3_1	mgk_A4_5
mgk_A3_1	mgk_B1_1	mgk_D1_13A
mgk_D1_1	mgk_A6_1	mgk_D1_13b
mgk_A1_2	mgk_A4_6	mgk_B1_3
mgk_A1_1	mgk_C1_1	mgk_A3_5
mgk_D1_4	mgk_C5_1	
mgk_D1_5	mgk_C2_1	

Fonte: Autora, 2025.

APÊNDICE C – Identificação e caracterização das cepas promissoras

Tabela 13 – Tabela de identificação para os isolados de interesse *C. canjerana*

Isolado	% similiaridade	Espécies <i>BLAST</i>	Identificação final
mcc_A3_5	99,79	KP131872.1 - <i>Curvularia geniculata</i>	<i>Curvularia</i> sp.
	99,79	KM386433.1 - <i>Curvularia affinis</i>	
	99,79	DQ993652.1 - <i>Curvularia</i> sp.	
mcc_A5_3	98,67	EU520055.1 - <i>Dothiorella gregaria</i>	<i>Dothiorella</i> sp.
	98,67	PQ117743.1 - <i>Didymella</i> sp.	
	98,67	KT264588.1 - <i>Phoma</i> sp.	
	98,67	KF293970.1 - <i>Leptosphaerulina australis</i>	
	98,67	AB470868.1 - <i>Coniothyrium aleuritidis</i>	
	98,67	LT592943.1 - <i>Nothophoma gossypiicola</i>	
mcc_A4_9	79,66%	KX197964.1 - <i>Diaporthe</i> sp.	Não identificado
	79,71	KC343218.1 - <i>Diaporthe terebinthifolii</i>	

Fonte: Autora, 2025.

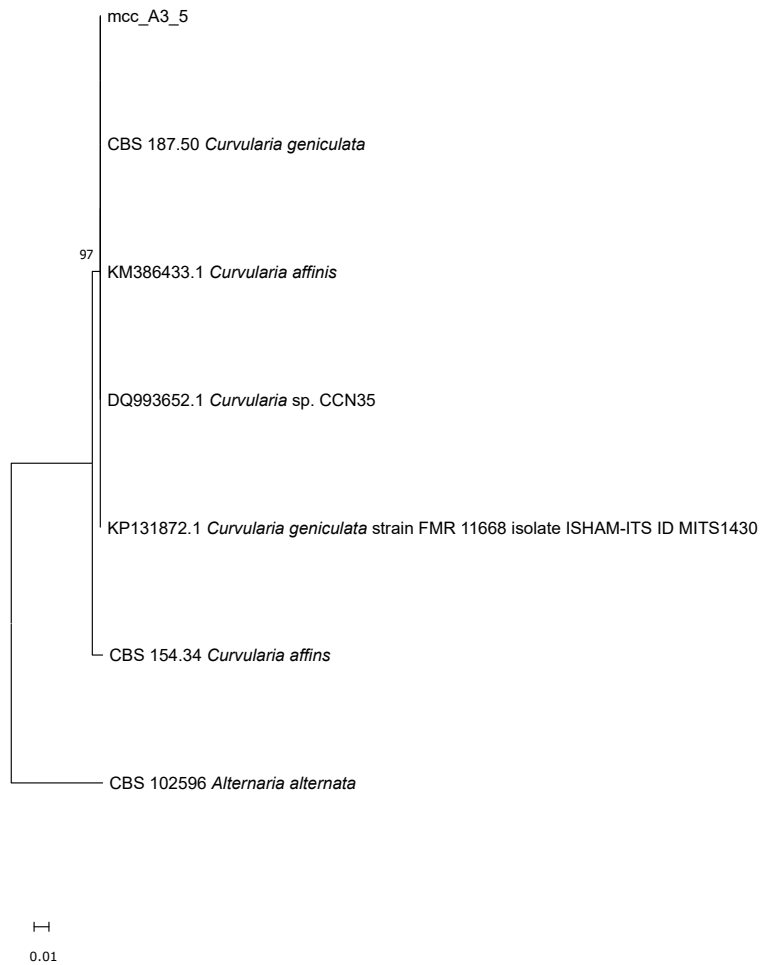


Figura 45 – Árvore filogenética para o *mcc_A3_5* gerada no MEGA11 com 1000 *boots-*
tresps usando o método K2 de probabilidade, e Cluster W para o alinhamento

Fonte: Autora, 2025.

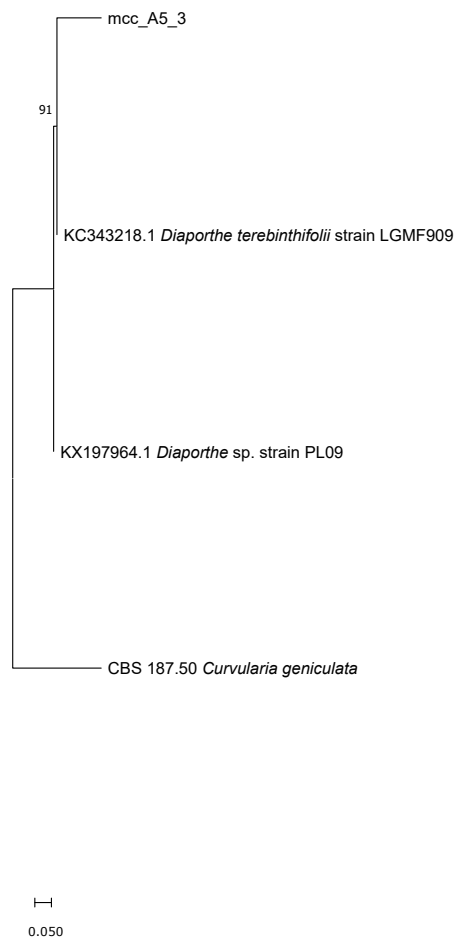


Figura 46 – Árvore filogenética para o fungo *mcc_A5_3*, gerada no MEGA11 com 1000 *bootstresps* usando o método K2 de probabilidade, e MUSCLE para o alinhamento

Fonte: Autora, 2025.

Tabela 14 – Tabela de identificação para os isolados de interesse *G. kunthiana*

Isolado	% similiaridade	Espécies <i>BLAST</i>	Identificação final
mgk_C3_9	100	MK798182.1 - <i>Alternaria tenuissima</i>	<i>Alternaria</i> sp.
	100	OQ001024.1 - <i>Alternaria alternata</i>	
	100	KM979854.1 - <i>Alternaria arborescens</i>	
	100	OR660557.1 - <i>Alternaria</i> sp.	
mgk_A3_15	100	KU377440.1 - <i>Fusarium decemcellulare</i>	<i>Albonectria</i> sp.
	99,8	ON931758.1 - <i>Fusarium decemcellulare</i>	
	99,8	ON931735.1 - <i>Fusarium</i> sp.	
mgk_A3_8	100	KY523049.1 - <i>Fusarium decemcellulare</i>	<i>Fusarium</i> sp.
	99,7	OQ756175.1 - <i>Fusarium</i> sp.	
	99,7	MK482228.1 - <i>Fusarium decemcellulare</i>	
mgk_A3_3	100	KU377440.1 - <i>Fusarium decemcellulare</i>	<i>Albonectria</i> sp.
	99,8	KR534720.1- <i>Fusarium decemcellulare</i>	
	99,8	ON931735.1 - <i>Fusarium</i> sp.	
	99,8	ON931749.1 - <i>Fusarium</i> sp.	
mgk_A3_5	99,8	KU377440.1 - <i>Fusarium decemcellulare</i>	<i>Albonectria</i> sp.
	99,61	KR534720.1 - <i>Fusarium decemcellulare</i>	
	99,41	MK482228.1 - <i>Fusarium</i> sp.	
mgk_A5_5	98,4	KM979975.1- <i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	<i>Colletotrichum</i> sp.
	98,4	OQ596459.1 - <i>Colletotrichum cliviicola</i>	
	98,4	MH031687.1 - <i>Colletotrichum magnum</i>	
	98,4	JX258711.1 - <i>Colletotrichum boninense</i>	
	98,4	KC702974.1 - <i>Colletotrichum cliviae</i>	
	98,4	MT318552.1 - <i>Colletotrichum plurivorum</i>	
	98,4	MT139630.1 - <i>Colletotrichum</i> sp.	
	98,4	OP922133.1 - <i>Colletotrichum salicis</i>	
mgk_D2_4	98,8	ON931771.1 - <i>Fusarium decemcellulare</i>	<i>Albonectria</i> sp.
	99,6	ON931739.1 - <i>Fusarium</i> sp.	
	99,8	MK482226.1 - <i>Fusarium decemcellulare</i>	
	99,4	KU377443.1 - <i>Fusarium decemcellulare</i>	
mgk_C5_2	99,8	KU377440.1- <i>Fusarium decemcellulare</i>	<i>Albonectria</i> sp.
	99,82	ON931737.1 - <i>Fusarium</i> sp.	
	98,82	MH854804.1 - <i>Fusarium decemcellulare</i>	
	99,61	KR534720.1 - <i>Fusarium decemcellulare</i>	
mgk_C4_2	99,52	MH486977.1- <i>Bjerkandera adusta</i>	<i>Bjerkandera</i> sp.
	98,83	MW507113.1 - <i>Bjerkandera mikrofumosa</i>	
	99,15	KU509527.1 - <i>Bjerkandera adusta</i>	
	99,14	MH025418.1 - <i>Bjerkandera</i> sp.	
mgk_B1_1	100	MW016555.1- <i>Fusarium stilboides</i>	<i>Fusarium</i> sp.
	98,8	OK482905.1 - <i>Fusarium lateritium</i>	
	99,8	PQ363039.1 - <i>Fusarium citri</i>	
	99,59	LC342979.1 - <i>Fusarium</i> sp.	
mgk_B1_3	98,61	OQ878414.1- <i>Rigidoporus cf. microporus</i>	<i>Rigidoporus</i> sp.
	99,48	KJ559480.1 - <i>Rigidoporus microporus</i>	
	98,61	OQ930265.1 - <i>Rigidoporus</i> sp.	

Fonte: Autora, 2025.

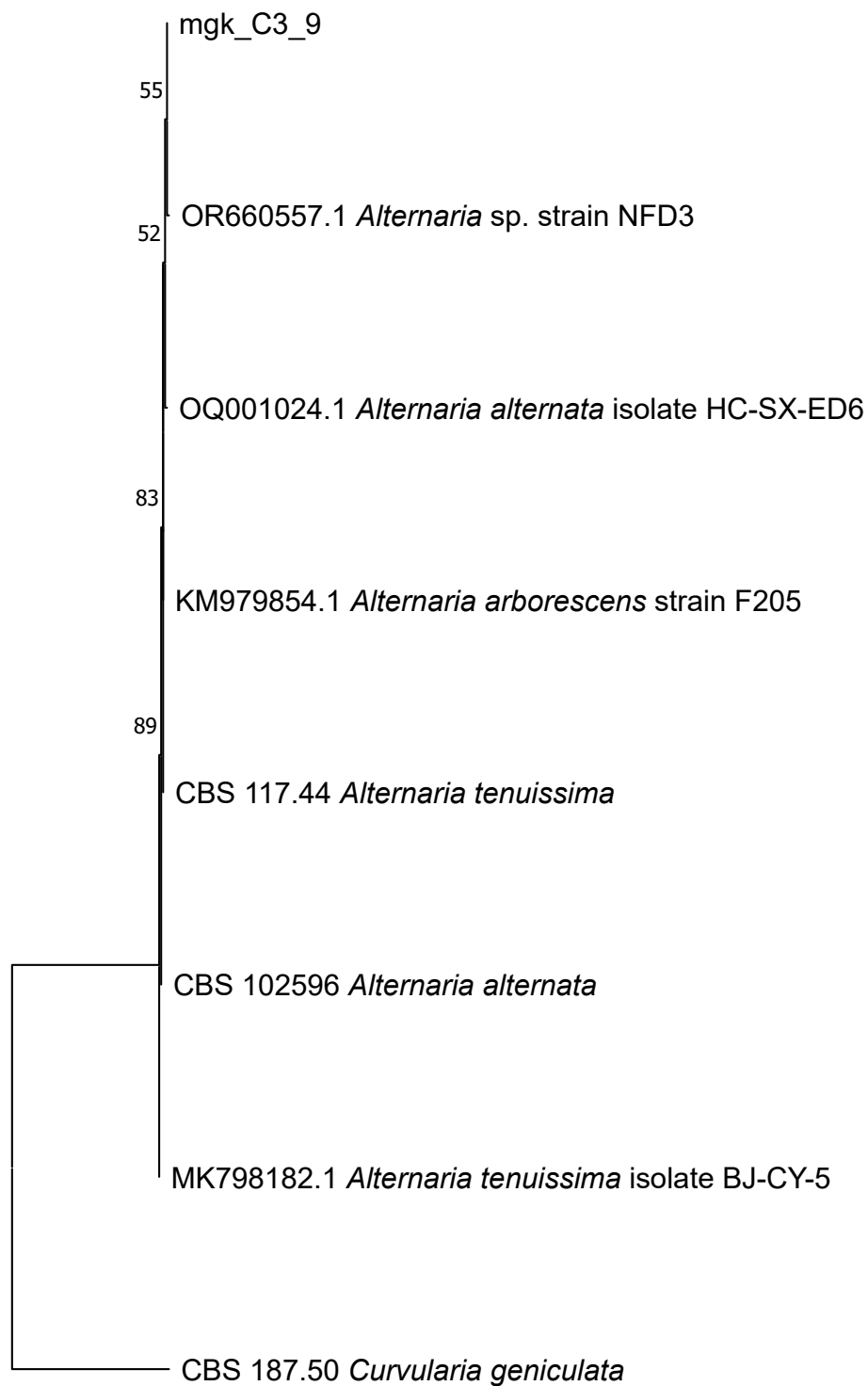


Figura 47 – Árvore filogenética para o fungo mgk_C3_9, gerada no MEGA11 com 1000 *bootstresps* usando o método K2 de probabilidade, e *MUSCLE* para o alinhamento

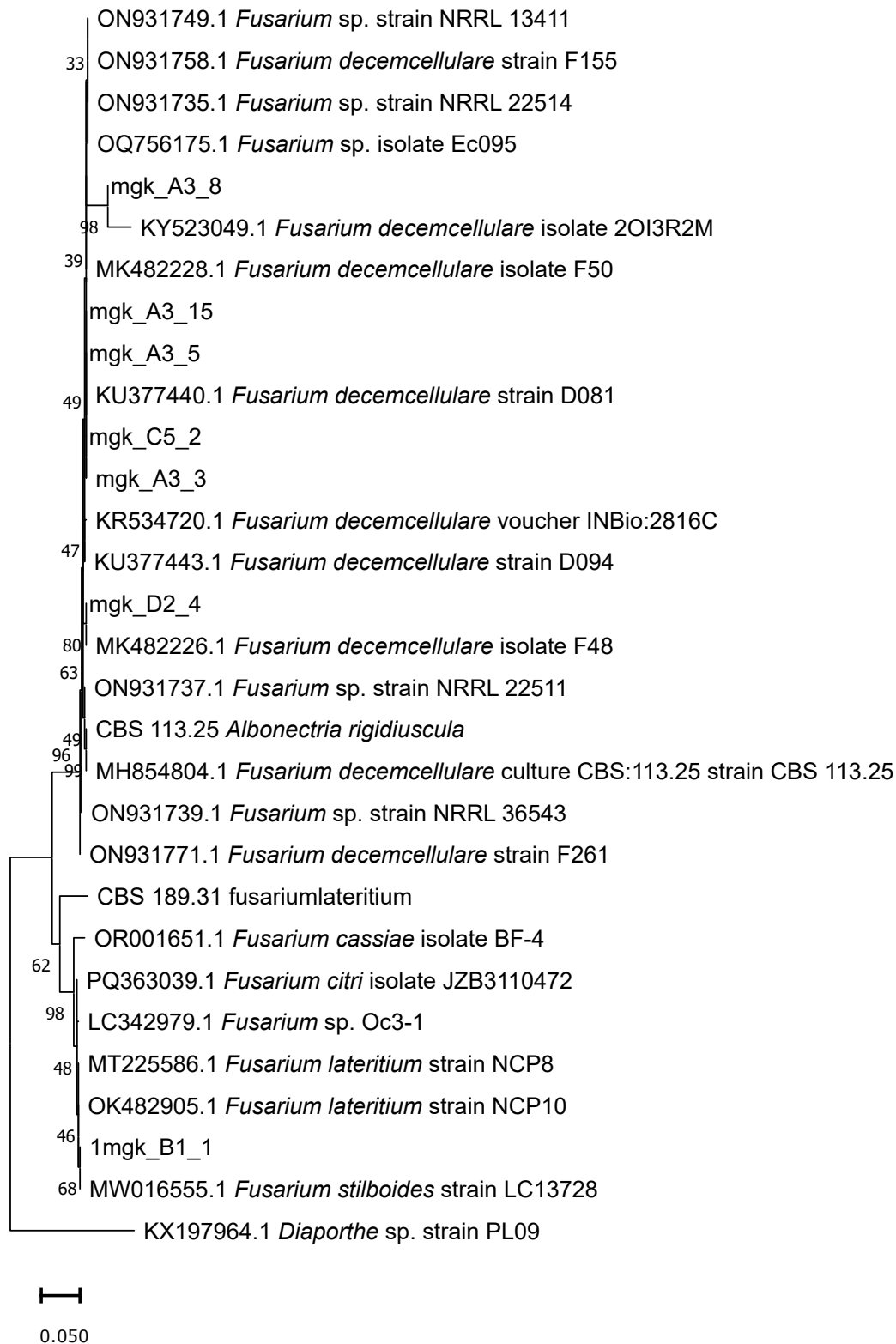


Figura 48 – Árvore filogenética para os fungos do gênero *Fusarium* e *Albonectria*, gerada no MEGA11 com 1000 *bootstraps* usando o método K2+G de probabilidade, e *Cluster W* para o alinhamento

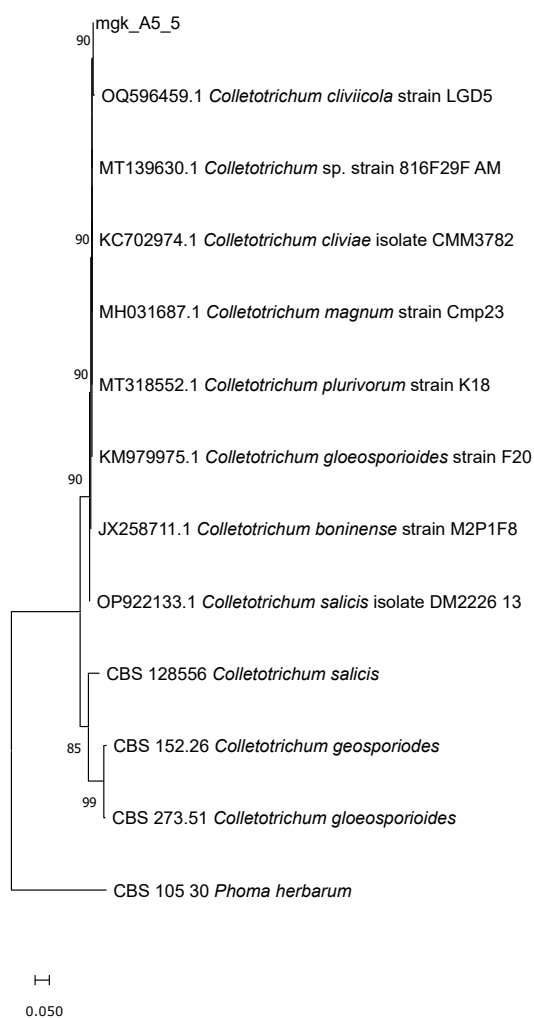


Figura 49 – Árvore filogenética para o fungo mgk_A5_5, gerada no MEGA11 com 1000 *bootstresps* usando o método K2 de probabilidade, e *Cluster W* para o alinhamento

Fonte: Autora, 2025.

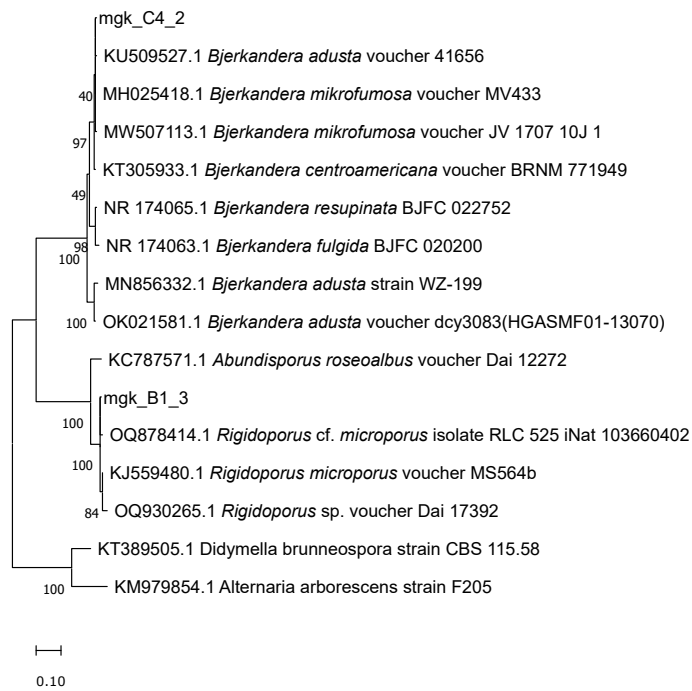


Figura 50 – Árvore filogenética para os fungo mgk_C4_2 e mgk_B1_3, gerada no MEGA11 com 1000 *bootstresps* usando o método K2+I de probabilidade e *Cluster W* para o alinhamento

Fonte: Autora, 2025.

APÊNDICE D – Dados estatísticos do teste de susceptibilidade celular

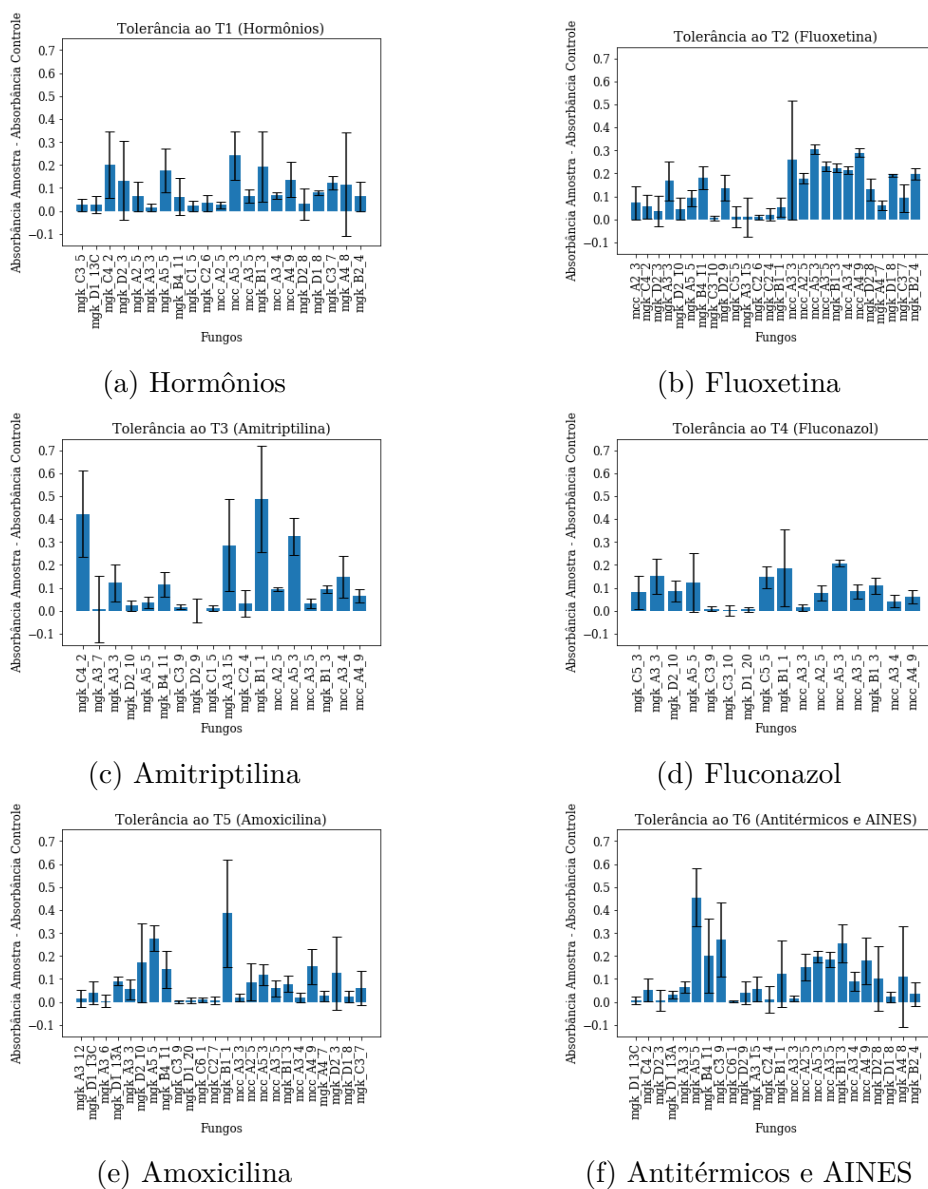


Figura 51 – Gráficos das médias com desvio padrão para o Ensaio de TTC resultados absorbância da amostra - absorbância do controle, observados em 450 nm.

Fonte: Autora, 2025.

Tabela 15 – Tratamentos do ensaio TTC (Absorbância amostra - Absorbância do controle), valores média e desvio padrão

Fungos	Tratamentos do ensaio TTC					
	Hormônio	Fluoxetina	Amitriptilina	Fluconazol	Amoxicilina	AINES e Analgésicos
mgk_B1_8	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
mgk_D1_9	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
mgk_A3_12	-0,02 ± 0,12	-0,06 ± 0,05	-0,09 ± 0,08	-0,1 ± 0,02	0,02 ± 0,06	-0,12 ± 0,06
mgk_A3_9	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
mgk_A5_6	-0,08 ± 0,04	-0,16 ± 0,0	-0,13 ± 0,05	-0,16 ± 0,0	-0,16 ± 0,0	-0,16 ± 0,0
mcc_A2_3	0,0 ± 0,0	0,07 ± 0,13	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
mgk_C3_5	0,03 ± 0,05	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
mgk_A5_3	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
mgk_D1_13C	0,03 ± 0,06	-0,01 ± 0,0	-0,01 ± 0,0	-0,01 ± 0,0	0,04 ± 0,09	0,01 ± 0,03
mgk_C4_2	0,2 ± 0,25	0,06 ± 0,09	0,42 ± 0,33	-0,01 ± 0,04	-0,04 ± 0,0	0,05 ± 0,09
mgk_D2_3	0,13 ± 0,3	0,04 ± 0,11	0,04 ± 0,0	-0,04 ± 0,0	-0,04 ± 0,0	0,01 ± 0,08
mgk_A2_5	0,06 ± 0,11	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
mgk_A3_6	-0,03 ± 0,0	-0,0 ± 0,04	-0,01 ± 0,02	-0,0 ± 0,05	0,0 ± 0,05	-0,03 ± 0,0
mgk_D1_13A	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,09 ± 0,03	0,03 ± 0,03
mgk_D1_13B	-0,03 ± 0,1	-0,08 ± 0,02	-0,15 ± 0,0	-0,14 ± 0,01	-0,15 ± 0,0	-0,15 ± 0,0
mgk_A3_7	-0,1 ± 0,06	-0,13 ± 0,01	0,01 ± 0,25	-0,13 ± 0,01	-0,12 ± 0,04	-0,13 ± 0,01
mgk_C5_3	-0,0 ± 0,0	-0,0 ± 0,0	-0,0 ± 0,0	0,08 ± 0,13	-0,0 ± 0,0	-0,0 ± 0,0

mgk_A3_3	0,02 ± 0,03	0,17 ± 0,15	0,12 ± 0,14	0,15 ± 0,13	0,05 ± 0,08	0,06 ± 0,04
mgk_D2_10	0,0 ± 0,0	0,05 ± 0,08	0,02 ± 0,04	0,09 ± 0,08	0,17 ± 0,3	0,0 ± 0,0
mgk_B2_5	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
mgk_D1_12	-0,21 ± 0,0	-0,21 ± 0,0	-0,21 ± 0,0	-0,2 ± 0,01	-0,21 ± 0,0	-0,21 ± 0,0
mgk_A5_5	0,18 ± 0,17	0,09 ± 0,06	0,04 ± 0,04	0,12 ± 0,22	0,28 ± 0,09	0,45 ± 0,22
mcc_A1_7	-0,02 ± 0,01	-0,02 ± 0,0	0,02 ± 0,02	-0,03 ± 0,02	-0,02 ± 0,02	-0,03 ± 0,02
mgk_B4_11	0,06 ± 0,14	0,18 ± 0,09	0,12 ± 0,1	-0,02 ± 0,02	0,14 ± 0,14	0,2 ± 0,28
mgk_C3_9	-0,0 ± 0,01	-0,0 ± 0,01	,02 ± 0,01	0,01 ± 0,02	0,0 ± 0,01	0,27 ± 0,28
mgk_C3_10	-0,02 ± 0,0	0,01 ± 0,02	0,02 ± 0,0	0,0 ± 0,04	-0,01 ± 0,01	-0,02 ± 0,01
mgk_D1_20	-0,01 ± 0,01	-0,0 ± 0,01	- ,01 ± 0,01	0,01 ± 0,02	0,0 ± 0,02	-0,0 ± 0,02
mgk_C6_1	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,01 ± 0,02	0,0 ± 0,01
mgk_D2_9	-0,05 ± 0,03	0,14 ± 0,1	0,0 ± 0,09	-0,04 ± 0,06	-0,01 ± 0,09	0,04 ± 0,09
mgk_C5_5	-0,03 ± 0,06	0,01 ± 0,08	- ,07 ± 0,05	0,15 ± 0,08	-0,01 ± 0,07	-0,06 ± 0,01
mgk_C1_5	0,02 ± 0,04	-0,0 ± 0,0	0,01 ± 0,02	-0,0 ± 0,0	-0,0 ± 0,0	-0,0 ± 0,0
mgk_C1_7	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
mgk_A3_15	-0,03 ± 0,07	0,01 ± 0,15	0,29 ± 0,35	-0,0 ± 0,17	-0,0 ± 0,05	0,06 ± 0,1
mgk_A3_5	-0,01 ± 0,0	-0,01 ± 0,0	-0,01 ± 0,0	-0,01 ± 0,0	-0,01 ± 0,0	-0,01 ± 0,0
mgk_B3_5	-0,04 ± 0,0	-0,03 ± 0,01	-0,03 ± 0,01	-0,02 ± 0,02	-0,02 ± 0,01	-0,02 ± 0,01
mgk_C2_7	-0,01 ± 0,0	-0,01 ± 0,02	-0,0 ± 0,02	-0,01 ± 0,01	0,01 ± 0,03	-0,0 ± 0,01
mgk_C2_6	0,03 ± 0,06	0,01 ± 0,02	-0,0 ± 0,0	-0,0 ± 0,0	-0,0 ± 0,0	-0,0 ± 0,0
mgk_C2_4	-0,01 ± 0,06	0,02 ± 0,05	0,03 ± 0,1	-0,0 ± 0,09	-0,04 ± 0,03	0,01 ± 0,1
mgk_B1_1	-0,02 ± 0,04	0,05 ± 0,07	0,49 ± 0,4	0,19 ± 0,29	0,39 ± 0,4	0,12 ± 0,25
mcc_A3_3	0,0 ± 0,0	0,26 ± 0,45	0,0 ± 0,0	0,01 ± 0,02	0,02 ± 0,03	0,02 ± 0,02
mcc_A2_5	0,03 ± 0,03	0,18 ± 0,04	0,09 ± 0,01	0,08 ± 0,06	0,09 ± 0,14	0,15 ± 0,1
mcc_A5_3	0,24 ± 0,18	0,31 ± 0,04	0,32 ± 0,14	0,21 ± 0,03	0,12 ± 0,08	0,2 ± 0,04

mcc_A2_4	$-0,18 \pm 0,02$	$-0,02 \pm 0,02$	$-0,21 \pm 0,05$	$-0,21 \pm 0,06$	$-0,25 \pm 0,02$	$-0,09 \pm 0,04$
mcc_A3_5	$0,07 \pm 0,05$	$0,23 \pm 0,03$	$0,03 \pm 0,04$	$0,08 \pm 0,05$	$0,06 \pm 0,06$	$0,19 \pm 0,06$
mgk_B1_3	$0,19 \pm 0,27$	$0,22 \pm 0,03$	$0,09 \pm 0,03$	$0,11 \pm 0,06$	$0,08 \pm 0,06$	$0,25 \pm 0,15$
mcc_A3_4	$0,07 \pm 0,03$	$0,21 \pm 0,03$	$0,15 \pm 0,16$	$0,04 \pm 0,05$	$0,02 \pm 0,04$	$0,09 \pm 0,07$
mcc_A4_9	$0,13 \pm 0,13$	$0,29 \pm 0,03$	$0,06 \pm 0,05$	$0,06 \pm 0,05$	$0,15 \pm 0,13$	$0,18 \pm 0,17$
mgk_D2_8	$0,03 \pm 0,12$	$0,13 \pm 0,08$	$-0,04 \pm 0,0$	$-0,04 \pm 0,0$	$-0,04 \pm 0,0$	$0,1 \pm 0,25$
mgk_A4_7	$-0,01 \pm 0,0$	$0,06 \pm 0,04$	$-0,01 \pm 0,0$	$-0,01 \pm 0,0$	$0,03 \pm 0,04$	$-0,01 \pm 0,0$
mgk_D1_8	$0,08 \pm 0,02$	$0,19 \pm 0,01$	$0,0 \pm 0,0$	$0,0 \pm 0,0$	$0,02 \pm 0,04$	$0,02 \pm 0,04$
mgk_C3_7	$0,12 \pm 0,05$	$0,09 \pm 0,1$	$-0,01 \pm 0,0$	$-0,01 \pm 0,0$	$0,06 \pm 0,13$	$-0,01 \pm 0,01$
mgk_A4_8	$0,12 \pm 0,39$	$-0,06 \pm 0,07$	$-0,11 \pm 0,0$	$-0,11 \pm 0,0$	$-0,11 \pm 0,01$	$0,11 \pm 0,38$
mgk_B2_4	$0,06 \pm 0,11$	$0,2 \pm 0,04$	$-0,0 \pm 0,01$	$-0,02 \pm 0,0$	$-0,02 \pm 0,0$	$0,03 \pm 0,09$

APÊNDICE E – Tabelas com os dados estatísticos dos ensaios enzimáticos realizados

Tabelas com os valores médios, desvio padrão e indicação da variação estatística, para ps testes quantitativos enzimáticos.

Tabela 16 – Perfil enzimático por sondas para o mcc_A3_5

Tempo em H	Enzimas em % RFU					
	BVMO2	BVMO1	EPH2	EPH1	Est1	Lip1
1	100,00 ± 11,53	0	0	0	0,17 ± 0,06	0,24 ± 0,07
2	80,81 ± 8,17	0	0	0	0,30 ± 0,09	0,09 ± 0,09
3	62,49 ± 7,10	0	0	0	0	0
4	51,86 ± 6,45	0	0	0	0	0
5	42,49 ± 4,76	0	0	0	0	0
6	35,35 ± 5,37	0	0	0	0	0
7	31,03 ± 4,41	0	0	0	0,23 ± 0,06	0
8	27,32 ± 3,96	0	0	0	0,18 ± 0,09	0
9	24,30 ± 3,67	0	0	0	0,21 ± 0,10	0
10	21,61 ± 3,42	0	0	0	0,01 ± 0,09	0
11	19,43 ± 3,33	0	0	0	0,37 ± 0,12	0
12	17,48 ± 3,16	0	0	0	0,76 ± 0,11	0
13	16,29 ± 2,86	0	0	0	1,10 ± 0,09	0,09 ± 0,03
14	14,24 ± 2,86	0	0	0	0,96 ± 0,13	0
15	13,54 ± 3,04	0	0	0	0,77 ± 0,09	0
16	11,83 ± 2,98	0	0	0	0,87 ± 0,10	0
17	10,65 ± 3,05	0	0	0	1,45 ± 0,14	0
18	8,93 ± 4,41	0	0	0	1,27 ± 0,15	0
19	8,22 ± 3,87	0	0	0	1,09 ± 0,18	0
20	8,25 ± 3,22	0	0	0	1,76 ± 0,16	0
21	7,45 ± 2,98	0	0	0	1,79 ± 0,21	0
22	5,81 ± 5,09	0	0	0	2,08 ± 0,19	0
23	5,31 ± 4,02	0	0	0	2,19 ± 0,18	0
24	3,21 ± 6,57	0	0	0	1,88 ± 0,24	0

Tabela 17 – Perfil enzimático avaliado por sondas para o mgk_C3_9

Tempo em H	Enzimas em % RFU					
	Lip	Est1	EPH1	BVMO2	BVMO1	EPH2
1	0	0	0	66,63 ± 5,35	0,71 ± 2,58	1,57 ± 0,68
2	5,42 ± 2,14	0,51 ± 2,89	3,16 ± 0,65	66,66 ± 4,51	1,37 ± 3,55	2,61 ± 0,73
3	14,75 ± 4,32	6,37 ± 6,59	5,93 ± 0,91	65,96 ± 3,66	1,56 ± 4,39	3,65 ± 0,86
4	23,50 ± 6,44	13,18 ± 9,46	8,67 ± 1,02	66,97 ± 4,98	2,24 ± 5,25	5,27 ± 1,04
5	30,61 ± 7,16	19,80 ± 11,85	11,55 ± 1,21	67,41 ± 4,90	3,00 ± 5,80	7,46 ± 1,39
6	35,29 ± 8,31	25,04 ± 13,09	13,47 ± 1,82	66,93 ± 4,94	3,48 ± 6,52	9,66 ± 2,13
7	40,35 ± 8,34	29,86 ± 14,37	14,99 ± 1,86	66,48 ± 4,99	3,40 ± 7,16	11,70 ± 3,21
8	45,80 ± 9,18	35,83 ± 15,64	17,93 ± 1,64	66,88 ± 5,28	3,74 ± 7,69	14,53 ± 4,28
9	49,07 ± 10,31	39,50 ± 16,03	18,90 ± 1,65	66,87 ± 5,75	4,18 ± 8,30	17,56 ± 6,47
10	54,25 ± 10,54	45,25 ± 15,79	22,79 ± 2,19	66,66 ± 5,24	4,66 ± 8,52	20,42 ± 8,78
11	56,40 ± 11,65	47,96 ± 15,54	25,00 ± 2,70	66,18 ± 5,04	4,98 ± 8,94	22,90 ± 10,61
12	58,02 ± 11,78	49,56 ± 14,36	26,29 ± 3,22	65,18 ± 5,13	5,35 ± 9,29	24,97 ± 12,84
13	60,01 ± 12,03	51,08 ± 13,93	27,59 ± 4,40	64,83 ± 5,11	5,35 ± 9,73	27,59 ± 15,71
14	62,53 ± 12,64	52,68 ± 12,38	29,86 ± 5,87	64,52 ± 4,99	5,89 ± 9,74	30,03 ± 17,38
15	64,23 ± 13,29	53,25 ± 11,26	31,41 ± 7,09	63,59 ± 4,69	5,72 ± 8,70	31,50 ± 18,42
16	61,75 ± 13,35	51,75 ± 9,93	31,59 ± 7,81	62,62 ± 4,18	6,01 ± 9,64	33,54 ± 20,69
17	64,74 ± 14,15	52,84 ± 9,73	32,95 ± 9,77	61,82 ± 5,20	6,85 ± 9,86	35,93 ± 22,54
18	64,29 ± 13,52	51,39 ± 8,07	33,20 ± 9,82	61,48 ± 4,93	7,25 ± 9,57	37,57 ± 23,57
19	65,60 ± 14,44	52,12 ± 8,42	34,09 ± 11,57	60,55 ± 4,93	7,39 ± 9,99	39,10 ± 25,43
20	67,01 ± 14,47	51,58 ± 7,43	34,65 ± 11,61	58,97 ± 4,59	7,50 ± 9,88	39,59 ± 25,90
21	67,21 ± 14,93	50,50 ± 7,43	34,24 ± 11,87	58,27 ± 4,50	8,11 ± 9,84	41,84 ± 27,66
22	68,34 ± 15,51	50,63 ± 7,64	34,88 ± 13,72	57,18 ± 4,64	8,18 ± 9,76	41,66 ± 27,90
23	70,22 ± 16,41	51,30 ± 8,22	35,05 ± 13,51	56,59 ± 4,58	8,54 ± 9,95	43,03 ± 29,18
24	70,98 ± 16,47	52,30 ± 8,75	35,59 ± 13,96	56,64 ± 4,65	8,85 ± 9,91	43,71 ± 29,87

Tabela 18 – Perfil enzimático por sondas para o mgk_C4_2

Tempo em H	Enzimas em % RFU					
	Lip	Est1	EPH1	BVMO2	BVMO1	EPH2
1	0,19 ± 0,02	2,41 ± 3,53	0	100,00 ± 27,54	0	0
2	0,14 ± 0,04	2,08 ± 3,44	0	91,32 ± 22,12	0	0
3	0	1,52 ± 3,35	0	88,23 ± 18,53	0	0
4	0	1,76 ± 3,42	0	73,72 ± 16,41	0	0
5	0	1,37 ± 3,35	0	63,71 ± 14,89	0	0
6	0	1,60 ± 3,36	0	55,57 ± 13,66	0	0
7	0	1,80 ± 3,30	0	49,65 ± 12,67	0	0
8	0	1,76 ± 3,38	0	45,17 ± 12,41	0	0
9	0	1,73 ± 3,38	0	41,64 ± 11,79	0	0
10	0	1,58 ± 3,38	0	38,76 ± 11,43	0	0
11	0	1,80 ± 3,34	0	36,18 ± 11,14	0	0
12	0,02 ± 0,06	2,11 ± 3,46	0	34,17 ± 10,92	0	0
13	0,23 ± 0,09	2,30 ± 3,40	0	32,75 ± 10,71	0	0
14	0	2,14 ± 3,37	0	30,45 ± 10,51	0	0
15	0	1,95 ± 3,33	0	29,93 ± 10,53	0	0
16	0	2,13 ± 3,37	0	28,04 ± 10,30	0	0
17	0,14 ± 0,12	2,48 ± 3,38	0	26,92 ± 10,19	0	0
18	0	2,09 ± 3,39	0	26,14 ± 10,36	0	0
19	0	1,94 ± 3,47	0	24,38 ± 9,83	0	0
20	0,09 ± 0,17	2,55 ± 3,43	0	23,38 ± 9,93	0	0
21	0,06 ± 0,15	2,56 ± 3,34	0	22,75 ± 9,83	0	0
22	0,28 ± 0,17	2,74 ± 3,37	0	21,81 ± 9,72	0	0
23	0,24 ± 0,19	2,71 ± 3,38	0	20,47 ± 9,41	0	0
24	0	2,40 ± 3,35	0	19,69 ± 9,22	0	0

Tabela 19 – Perfil enzimático avaliado por sondas para o mgk_B1_3

Tempo em H	Enzimas em % RFU					
	Lip	Est1	EPH1	BVMO2	BVMO1	EPH2
1	0,24 ± 0,04	0,33 ± 0,10	0	100,00 ± 5,87	0	0
2	0,09 ± 0,04	0,40 ± 0,10	0	72,12 ± 5,27	0	0
3	0	0,04 ± 0,20	0	54,38 ± 4,96	0	0
4	0	0,31 ± 0,23	0	45,34 ± 3,71	0	0
5	0	0,05 ± 0,43	0	38,15 ± 3,08	0	0
6	0	0,48 ± 0,69	0	31,74 ± 2,66	0	0
7	0	1,00 ± 0,85	0	27,14 ± 3,17	0	0
8	0	1,12 ± 1,02	0	23,24 ± 3,22	0	0
9	0	1,35 ± 1,17	0	20,97 ± 2,39	0	0
10	0	1,28 ± 1,42	0	18,51 ± 2,25	0	0
11	0	1,97 ± 1,69	0	16,38 ± 2,25	0	0
12	0,08 ± 0,18	2,56 ± 1,94	0	14,87 ± 1,85	0	0
13	0,31 ± 0,15	3,10 ± 2,10	0	13,81 ± 1,72	0	0
14	0,01 ± 0,21	3,24 ± 2,32	0	11,44 ± 1,93	0	0
15	0	3,24 ± 2,57	0	10,92 ± 1,70	0	0
16	0	3,61 ± 2,76	0	9,52 ± 1,65	0	0
17	0,38 ± 0,29	4,52 ± 3,24	0	7,97 ± 1,46	0	0
18	0,02 ± 0,36	4,70 ± 3,47	0	7,68 ± 1,56	0	0
19	0	4,72 ± 3,67	0	5,80 ± 2,24	0	0
20	0,39 ± 0,42	5,77 ± 4,01	0	4,63 ± 2,94	0	0
21	0,37 ± 0,42	6,06 ± 4,19	0	4,54 ± 1,99	0	0
22	0,45 ± 0,42	6,62 ± 4,43	0	3,84 ± 1,77	0	0
23	0,44 ± 0,43	6,98 ± 4,68	0	2,99 ± 1,78	0	0
24	0,23 ± 0,48	6,91 ± 4,82	0	1,30 ± 3,35	0	0

Tabela 20 – Perfil enzimático por sondas para o mgk_B1_1

Tempo em H	Enzimas em % RFU					
	Lip	Est1	EPH1	BVMO2	BVMO1	EPH2
1	0	0	0	77,70 ± 10,23	0,29 ± 1,81	0
2	0	0	0	79,20 ± 9,94	0,77 ± 2,64	0
3	0	0	0	80,27 ± 9,99	0,88 ± 3,43	0
4	3,02 ± 1,85	0	0	80,98 ± 10,16	1,49 ± 4,05	0
5	6,30 ± 2,48	0	0,20 ± 1,12	82,10 ± 10,48	2,20 ± 4,81	0,16 ± 0,41
6	9,11 ± 3,16	0	0	82,03 ± 10,27	2,58 ± 5,41	0,15 ± 0,42
7	11,79 ± 3,87	0	0	81,75 ± 10,74	2,19 ± 6,00	0
8	16,01 ± 4,68	0	0,52 ± 1,02	81,95 ± 10,30	2,69 ± 6,65	0
9	18,57 ± 5,56	0	0	81,84 ± 10,44	2,81 ± 7,03	0
10	23,45 ± 6,50	0	0,30 ± 1,41	81,84 ± 10,10	3,18 ± 7,59	0,09 ± 0,55
11	26,43 ± 6,97	0	0,54 ± 1,52	82,17 ± 10,41	3,43 ± 7,96	0,22 ± 0,68
12	28,26 ± 7,41	0	0	80,74 ± 10,26	3,45 ± 8,24	0,23 ± 0,62
13	30,54 ± 8,03	0	0,15 ± 1,60	80,54 ± 10,35	3,20 ± 8,53	0
14	32,93 ± 8,32	0	0,73 ± 1,65	80,03 ± 10,09	3,44 ± 8,86	0,12 ± 0,79
15	34,36 ± 8,56	0	0,63 ± 1,77	79,27 ± 10,16	3,67 ± 9,09	0,17 ± 0,77
16	34,41 ± 8,73	0	0,39 ± 1,71	78,47 ± 10,02	3,28 ± 9,34	0
17	35,93 ± 8,91	0	0,34 ± 1,69	78,09 ± 10,04	3,60 ± 9,41	0,10 ± 0,93
18	36,23 ± 9,10	0	0,39 ± 1,79	77,77 ± 10,09	3,95 ± 9,63	0,28 ± 0,95
19	37,23 ± 9,04	0	0,19 ± 2,01	76,92 ± 9,99	3,48 ± 9,69	0
20	38,55 ± 9,47	0	0,75 ± 1,95	75,71 ± 9,97	3,34 ± 9,79	0
21	38,28 ± 9,14	0	0,65 ± 1,98	74,54 ± 9,80	3,54 ± 9,67	0,17 ± 1,03
22	39,85 ± 9,84	0	0,74 ± 2,06	73,71 ± 9,62	3,26 ± 9,63	0,01 ± 1,10
23	41,70 ± 9,98	0	0,91 ± 2,17	73,15 ± 9,35	3,15 ± 9,64	0,00 ± 1,04
24	43,59 ± 10,38	0	0,99 ± 2,21	73,19 ± 9,30	3,30 ± 10,13	0

Tabela 21 – Perfil enzimático por sondas para o mgk_A5_5

Tempo em H	Enzimas em % RFU					
	Lip	Est1	EPH1	BVMO2	BVMO1	EPH2
1	0,18 ± 0,06	0,85 ± 0,42	0	100,00 ± 13,77	0	0
2	0,14 ± 0,05	0,58 ± 0,44	0	90,94 ± 10,65	0	0
3	0	0,18 ± 0,55	0	80,35 ± 8,62	0	0
4	0	0,41 ± 0,40	0	66,88 ± 7,59	0	0
5	0	0	0	56,99 ± 6,80	0	0
6	0	0,42 ± 0,32	0	49,20 ± 6,13	0	0
7	0,27 ± 0,06	0,69 ± 0,35	0	44,20 ± 5,88	0	0
8	0,20 ± 0,05	0,70 ± 0,41	0	39,57 ± 5,12	0	0
9	0,39 ± 0,03	0,82 ± 0,44	0	36,28 ± 5,28	0	0
10	0,15 ± 0,07	0,76 ± 0,43	0	33,58 ± 5,09	0	0
11	0,47 ± 0,06	1,15 ± 0,42	0	30,90 ± 5,02	0	0
12	1,00 ± 0,07	1,58 ± 0,42	0	28,99 ± 4,97	0	0
13	1,35 ± 0,09	1,88 ± 0,50	0	27,68 ± 4,82	0	0
14	1,16 ± 0,09	1,85 ± 0,52	0	25,32 ± 4,66	0	0
15	1,19 ± 0,09	1,81 ± 0,49	0	24,74 ± 4,67	0	0
16	1,35 ± 0,10	2,08 ± 0,52	0	23,11 ± 4,54	0	0
17	1,93 ± 0,12	2,65 ± 0,54	0	21,99 ± 4,59	0	0
18	1,69 ± 0,15	2,34 ± 0,56	0	21,16 ± 4,69	0	0
19	1,67 ± 0,12	2,38 ± 0,59	0	19,55 ± 4,56	0	0
20	2,32 ± 0,13	3,09 ± 0,61	0	18,50 ± 4,63	0	0
21	2,43 ± 0,18	3,21 ± 0,68	0	17,91 ± 4,56	0	0
22	2,79 ± 0,14	3,66 ± 0,64	0	17,02 ± 4,42	0	0
23	2,97 ± 0,13	3,78 ± 0,71	0	15,73 ± 4,89	0	0
24	2,72 ± 0,21	3,63 ± 0,75	0	15,00 ± 4,62	0	0

Tabela 22 – Perfil enzimático por sondas para o *Albonectria rigidiuscula* mgk_A3_15

Tempo em H	Enzimas em % RFU					
	Lip	Est1	EPH1	BVMO2	BVMO1	EPH2
1	0	0	0,24 ± 0,22	78,43 ± 7,87	2,05 ± 3,45	0
2	0	0	0,95 ± 0,44	77,88 ± 7,60	4,30 ± 4,40	0
3	0,17 ± 0,70	0	1,04 ± 0,82	78,76 ± 7,63	5,92 ± 5,54	0
4	3,61 ± 1,48	0	1,65 ± 1,11	79,30 ± 7,99	7,90 ± 6,77	0
5	7,17 ± 2,18	0	2,58 ± 1,39	80,46 ± 8,07	9,95 ± 8,01	0,28 ± 0,28
6	10,03 ± 2,91	0	2,88 ± 1,69	80,19 ± 8,40	11,46 ± 8,98	0,32 ± 0,37
7	12,51 ± 3,62	0	2,90 ± 1,70	79,66 ± 8,46	12,23 ± 10,11	0
8	16,76 ± 4,56	0	3,92 ± 1,85	80,19 ± 8,64	13,78 ± 11,16	0,12 ± 0,45
9	19,15 ± 5,36	0	3,76 ± 2,31	79,74 ± 8,81	14,78 ± 11,82	0,27 ± 0,58
10	23,93 ± 6,42	0	4,65 ± 2,32	80,05 ± 8,84	15,87 ± 12,49	0,44 ± 0,45
11	26,97 ± 6,99	0	5,21 ± 2,51	80,11 ± 8,90	16,89 ± 13,28	0,53 ± 0,55
12	28,69 ± 7,58	0	5,02 ± 2,80	79,00 ± 8,77	17,27 ± 13,64	0,60 ± 0,60
13	30,50 ± 8,19	0	5,41 ± 2,90	78,52 ± 9,02	17,70 ± 14,19	0,48 ± 0,50
14	33,01 ± 8,58	0	6,27 ± 3,15	78,57 ± 8,82	18,39 ± 14,62	0,59 ± 0,51
15	34,38 ± 9,08	0	6,29 ± 3,28	77,70 ± 8,67	18,94 ± 14,96	0,78 ± 0,61
16	34,25 ± 9,20	0	6,21 ± 3,18	76,91 ± 8,64	18,88 ± 15,19	0,57 ± 0,63
17	35,55 ± 9,66	0	6,63 ± 3,30	76,89 ± 8,59	19,65 ± 15,55	0,73 ± 0,58
18	35,81 ± 9,60	0	6,96 ± 3,73	76,12 ± 8,34	19,89 ± 15,47	0,93 ± 0,67
19	36,71 ± 10,01	0	7,27 ± 4,07	75,03 ± 8,15	19,43 ± 15,34	0,81 ± 0,71
20	37,64 ± 10,14	0	7,87 ± 4,12	73,47 ± 7,81	19,26 ± 15,46	0,83 ± 0,80
21	37,65 ± 10,30	0	8,09 ± 4,41	72,29 ± 7,59	19,58 ± 15,60	1,14 ± 0,81
22	38,43 ± 10,61	0	8,22 ± 4,40	71,26 ± 7,11	19,27 ± 15,50	0,88 ± 0,79
23	39,69 ± 11,49	0	8,93 ± 4,83	70,84 ± 6,97	18,14 ± 14,02	1,00 ± 0,79
24	41,66 ± 11,54	0	8,98 ± 4,72	70,59 ± 6,68	17,98 ± 13,79	0,93 ± 0,79

Tabela 23 – Perfil enzimático por sondas para o mgk_A3_3

Tempo em H	Enzimas em % RFU					
	Lip	Est1	EPH1	BVOM2	BVMO1	EPH2
1	0	0	0	76,87 ± 4,58	2,90 ± 3,75	0
2	0	0	0	78,51 ± 5,25	5,19 ± 5,17	0,04 ± 0,14
3	1,09 ± 0,47	0	0	79,20 ± 5,45	6,89 ± 6,70	0
4	4,97 ± 0,86	0	0	79,69 ± 6,20	9,03 ± 8,14	0,02 ± 0,23
5	9,03 ± 1,15	0	0	80,84 ± 5,89	11,22 ± 9,47	0,43 ± 0,21
6	12,73 ± 1,68	0	0	80,56 ± 5,91	12,95 ± 10,77	0,57 ± 0,27
7	15,75 ± 2,04	0	0	80,51 ± 6,35	13,83 ± 11,70	0
8	20,21 ± 2,55	0	0,21 ± 0,96	80,91 ± 6,48	15,38 ± 13,03	0,14 ± 0,26
9	22,97 ± 3,05	0	0	80,17 ± 6,18	16,69 ± 13,97	0,38 ± 0,28
10	27,86 ± 3,70	0	0,33 ± 1,20	80,14 ± 6,87	18,13 ± 14,87	0,59 ± 0,29
11	31,05 ± 3,93	0	0,59 ± 1,23	79,80 ± 6,92	19,34 ± 15,72	0,68 ± 0,31
12	33,52 ± 4,45	0	0,24 ± 1,31	78,19 ± 6,56	19,96 ± 16,31	0,58 ± 0,34
13	36,47 ± 4,50	0	0,26 ± 1,34	77,53 ± 6,64	20,62 ± 17,11	0,27 ± 0,34
14	39,95 ± 4,73	0	1,32 ± 1,43	77,39 ± 6,79	21,59 ± 17,58	0,53 ± 0,35
15	42,22 ± 5,27	0	1,14 ± 1,47	76,43 ± 7,06	22,17 ± 17,88	0,68 ± 0,36
16	42,56 ± 5,13	0	0,56 ± 1,59	75,43 ± 6,93	22,68 ± 18,75	0,26 ± 0,36
17	45,43 ± 5,83	0	0,93 ± 1,62	74,77 ± 6,66	23,65 ± 19,20	0,55 ± 0,37
18	46,39 ± 5,79	0	0,93 ± 1,64	74,05 ± 6,68	24,17 ± 19,36	0,95 ± 0,43
19	48,31 ± 6,25	0	0,89 ± 1,73	72,86 ± 6,54	24,37 ± 19,89	0,39 ± 0,50
20	50,03 ± 6,34	0	1,21 ± 1,69	71,28 ± 6,60	24,51 ± 20,15	0,39 ± 0,44
21	51,00 ± 6,36	0	1,02 ± 1,71	70,12 ± 6,48	24,99 ± 20,16	0,73 ± 0,49
22	52,92 ± 6,68	0	1,08 ± 1,79	68,86 ± 6,34	24,80 ± 20,03	0,52 ± 0,47
23	54,51 ± 6,33	0	1,45 ± 1,97	68,55 ± 6,44	25,34 ± 20,62	0,44 ± 0,48
24	56,40 ± 7,24	0	1,68 ± 1,96	68,49 ± 6,28	25,69 ± 20,94	0,41 ± 0,48

Tabela 24 – Perfil enzimático por sondas para o mcc_A4_9

Tempo em H	Enzimas em % RFU					
	Lip	Est1	EPH1	BVMO2	BVMO1	EPH2
1	0,12 ± 0,15	0,69 ± 0,23	0	100,00 ± 16,98	0	0
2	0,17 ± 0,05	1,01 ± 0,27	0	79,08 ± 12,86	0	0
3	0	1,37 ± 0,45	0	61,25 ± 10,99	0	0
4	0	2,57 ± 0,60	0	50,84 ± 9,06	0	0
5	0	3,27 ± 0,90	0	42,57 ± 8,21	0	0
6	0	4,64 ± 1,09	0	35,82 ± 7,41	0	0
7	0	6,39 ± 1,28	0	31,18 ± 6,76	0	0
8	0	7,71 ± 1,52	0	27,31 ± 6,46	0	0
9	0	9,18 ± 1,74	0	24,58 ± 6,41	0	0
10	0	10,49 ± 1,89	0	21,88 ± 5,79	0	0
11	0	12,66 ± 2,27	0	19,55 ± 5,64	0	0
12	0	14,78 ± 2,51	0	17,61 ± 5,90	0	0
13	0,27 ± 0,21	16,58 ± 2,46	0	16,67 ± 5,62	0	0
14	0,19 ± 0,25	18,53 ± 2,86	0	14,11 ± 5,24	0	0
15	0,15 ± 0,23	19,72 ± 3,11	0	13,37 ± 5,27	0	0
16	0,03 ± 0,38	21,80 ± 3,22	0	12,10 ± 5,36	0	0
17	0,28 ± 0,43	24,18 ± 3,57	0	11,19 ± 5,39	0	0
18	0,13 ± 0,34	25,45 ± 3,52	0	9,76 ± 5,63	0	0
19	0,12 ± 0,38	26,99 ± 3,66	0	8,74 ± 5,56	0	0
20	0,54 ± 0,45	29,33 ± 3,87	0	7,78 ± 5,34	0	0
21	0,59 ± 0,47	30,85 ± 3,94	0	7,19 ± 5,43	0	0
22	0,60 ± 0,53	32,65 ± 4,00	0	6,44 ± 5,62	0	0
23	0,61 ± 0,57	33,91 ± 4,02	0	5,11 ± 5,66	0	0
24	0,42 ± 0,49	34,68 ± 4,09	0	4,33 ± 6,11	0	0

Tabela 25 – Perfil enzimático por sondas para o mcc_A5_3

Tempo em H	Enzimas em % RFU					
	Lip	Est1	EPH1	BVMO2	BVMO1	EPH2
1	0,18 ± 0,08	0,34 ± 0,04	0	100,00 ± 14,50	0	0
2	0,26 ± 0,10	0,39 ± 0,03	0	86,81 ± 10,72	0	0
3	0	0	0	66,68 ± 9,88	0	0
4	0	0,14 ± 0,11	0	56,37 ± 7,42	0	0
5	0	0	0	47,18 ± 6,53	0	0
6	0	0,02 ± 0,11	0	40,17 ± 5,49	0	0
7	0,17 ± 0,07	0,49 ± 0,06	0	35,10 ± 5,17	0	0
8	0,32 ± 0,27	0,59 ± 0,06	0	30,96 ± 5,03	0	0
9	0,47 ± 0,27	0,64 ± 0,16	0	28,01 ± 4,70	0	0
10	0,57 ± 0,19	0,49 ± 0,18	0	25,18 ± 4,46	0	0
11	0,76 ± 0,16	0,79 ± 0,20	0	22,84 ± 4,37	0	0
12	1,06 ± 0,26	1,32 ± 0,17	0	21,03 ± 4,19	0	0
13	1,67 ± 0,28	1,77 ± 0,20	0	19,74 ± 4,08	0	0
14	1,74 ± 0,18	1,67 ± 0,26	0	17,51 ± 4,10	0	0
15	1,97 ± 0,32	1,68 ± 0,26	0	16,81 ± 3,93	0	0
16	2,03 ± 0,40	1,89 ± 0,31	0	15,07 ± 3,96	0	0
17	2,43 ± 0,36	2,43 ± 0,35	0	14,06 ± 3,86	0	0
18	2,52 ± 0,42	2,28 ± 0,36	0	13,23 ± 3,85	0	0
19	2,64 ± 0,51	2,38 ± 0,36	0	11,82 ± 3,72	0	0
20	3,22 ± 0,57	3,26 ± 0,37	0	11,26 ± 3,88	0	0
21	3,55 ± 0,58	3,34 ± 0,38	0	10,48 ± 3,80	0	0
22	3,76 ± 0,68	3,83 ± 0,43	0	9,69 ± 3,81	0	0
23	3,80 ± 0,59	4,09 ± 0,53	0	8,37 ± 3,73	0	0
24	3,89 ± 0,71	4,01 ± 0,52	0	7,77 ± 3,74	0	0

APÊNDICE F – Espectros de RMN

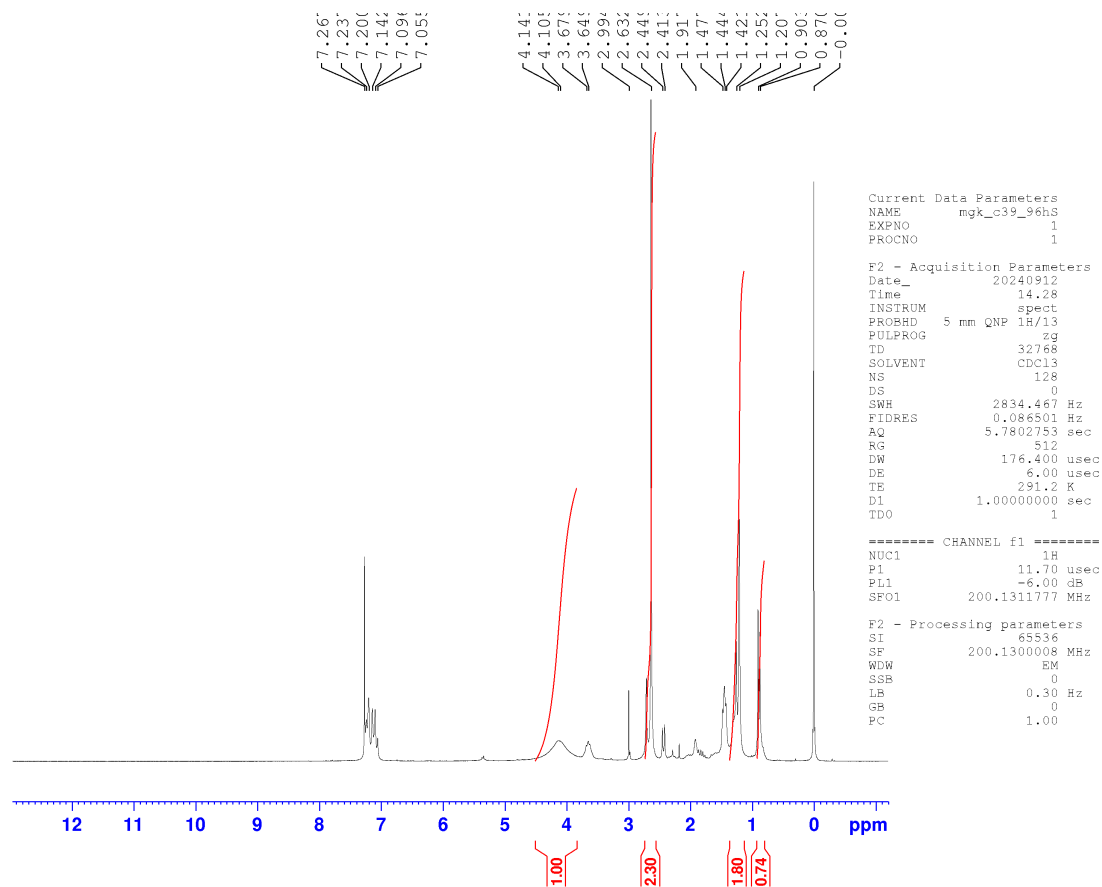


Figura 52 – Espectro de ^1H obtidos em CDCl_3 , 128 scans, em 200 MHz (Bruker[®] DPX 200) para a reação do mgk_C3_9 em 96 h janela spectral de 0 a 12 ppm.

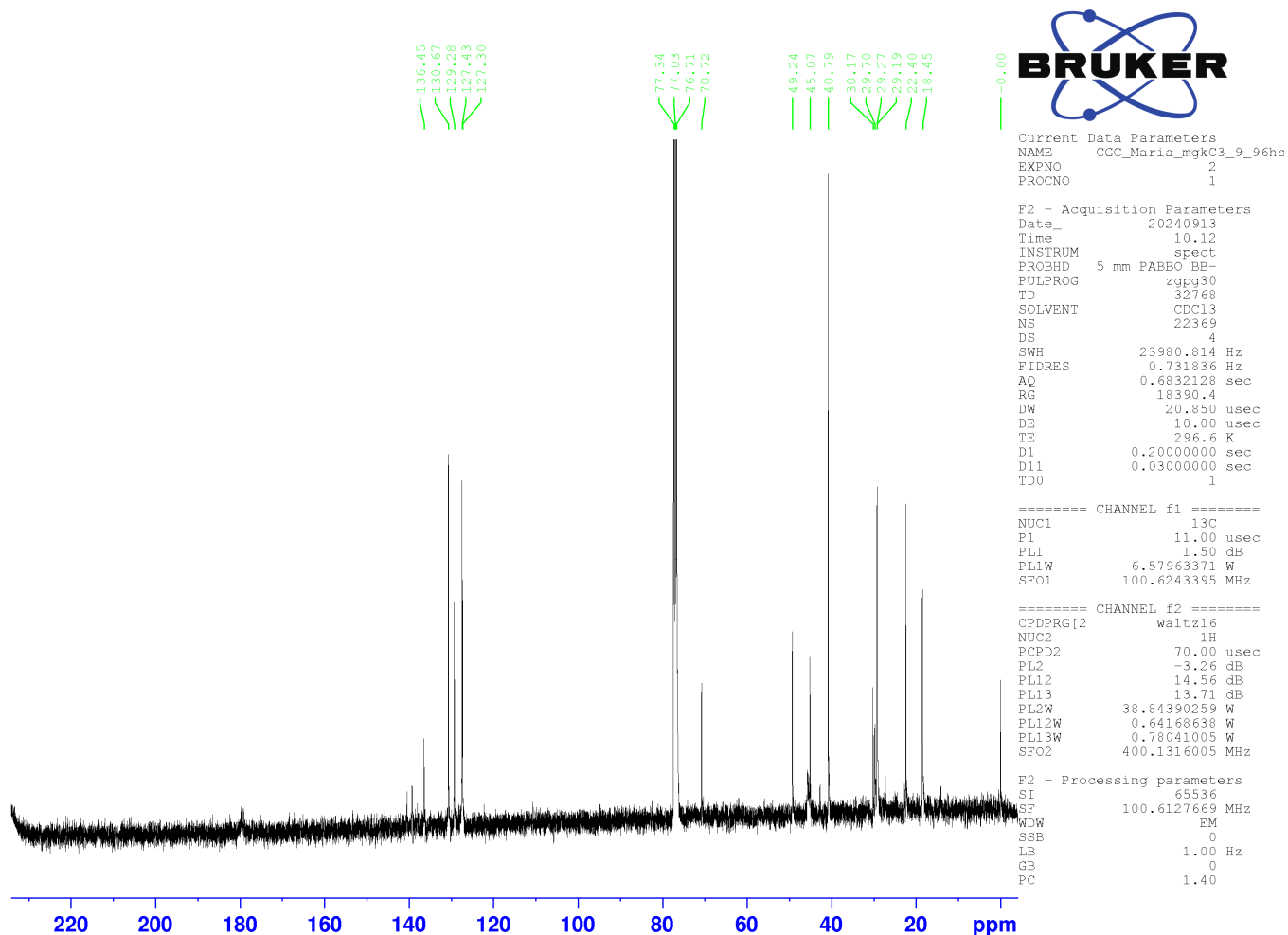


Figura 53 – Espectro de ^{13}C obtidos em CDCl_3 , em 100 MHz (Bruker[®] AVANCE I 400) para a reação do mgk_C3_9 em 96 h.

Fonte: Autora, 2025.

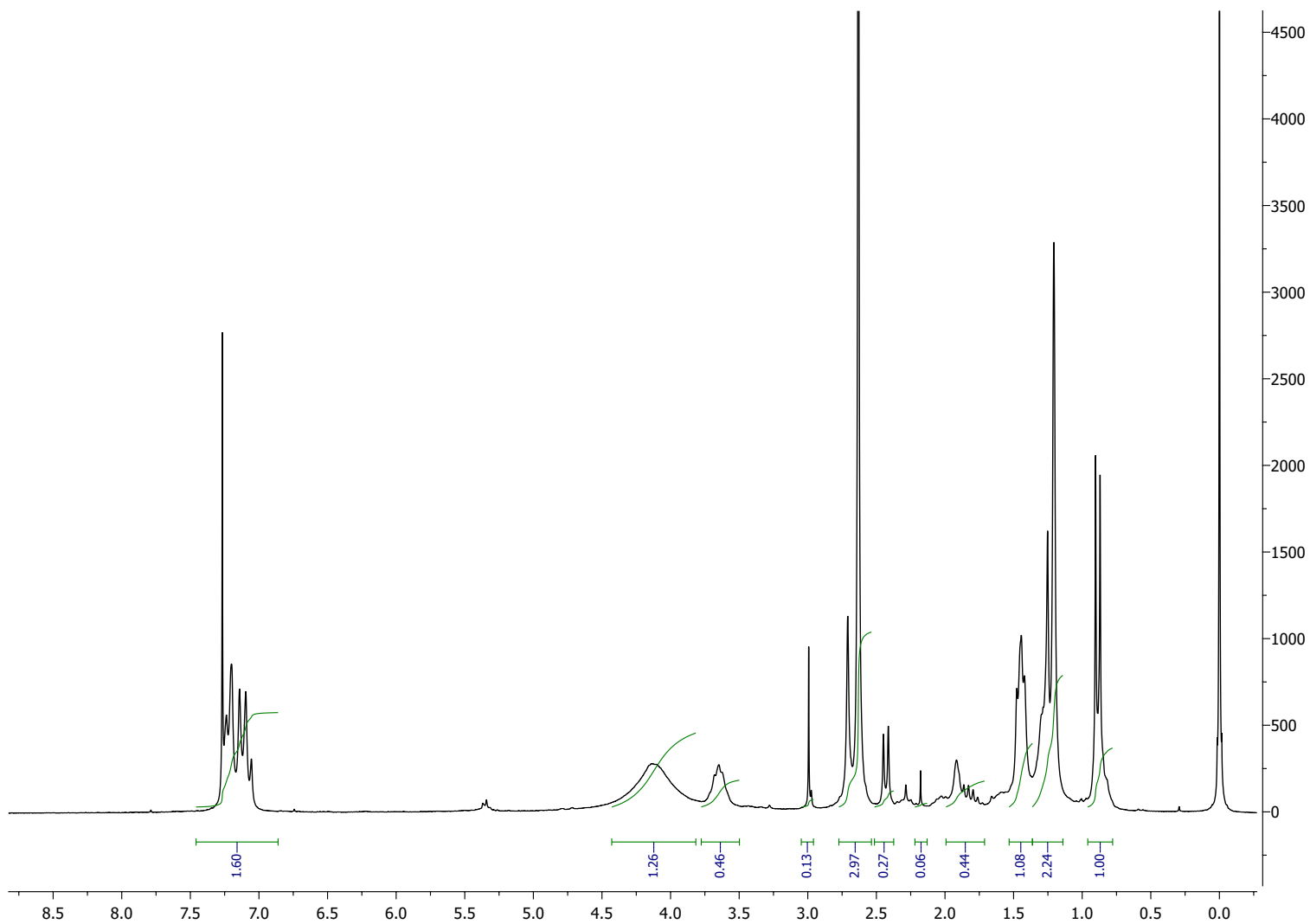


Figura 54 – Espectro de ^1H obtidos em CDCl_3 , 128 scans, em 200 MHz (Bruker[®] DPX 200) para a reação do mgk_C3_9 em 96 h, com integração completa, ampliado, janela espectral de 0 a 8 ppm.

Fonte: Autora, 2025.

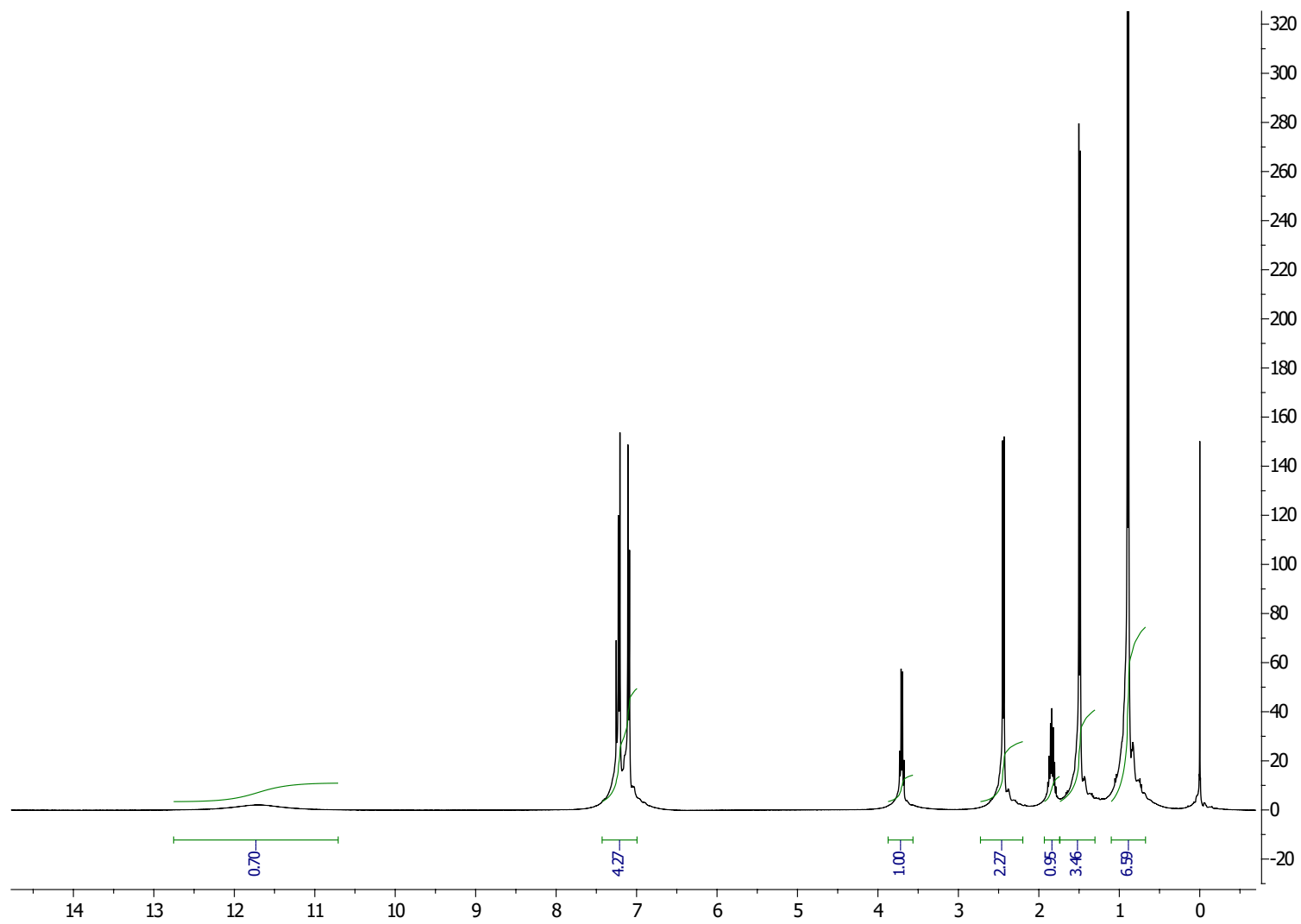


Figura 55 – Espectro de de ^1H obtidos em CDCl_3 , em 400 MHz, com integração, Bruker[®] AVANCE I 400, 48 scans

Fonte: Autora, 2025.

APÊNDICE G – Espectros de massas

Ibuprofeno

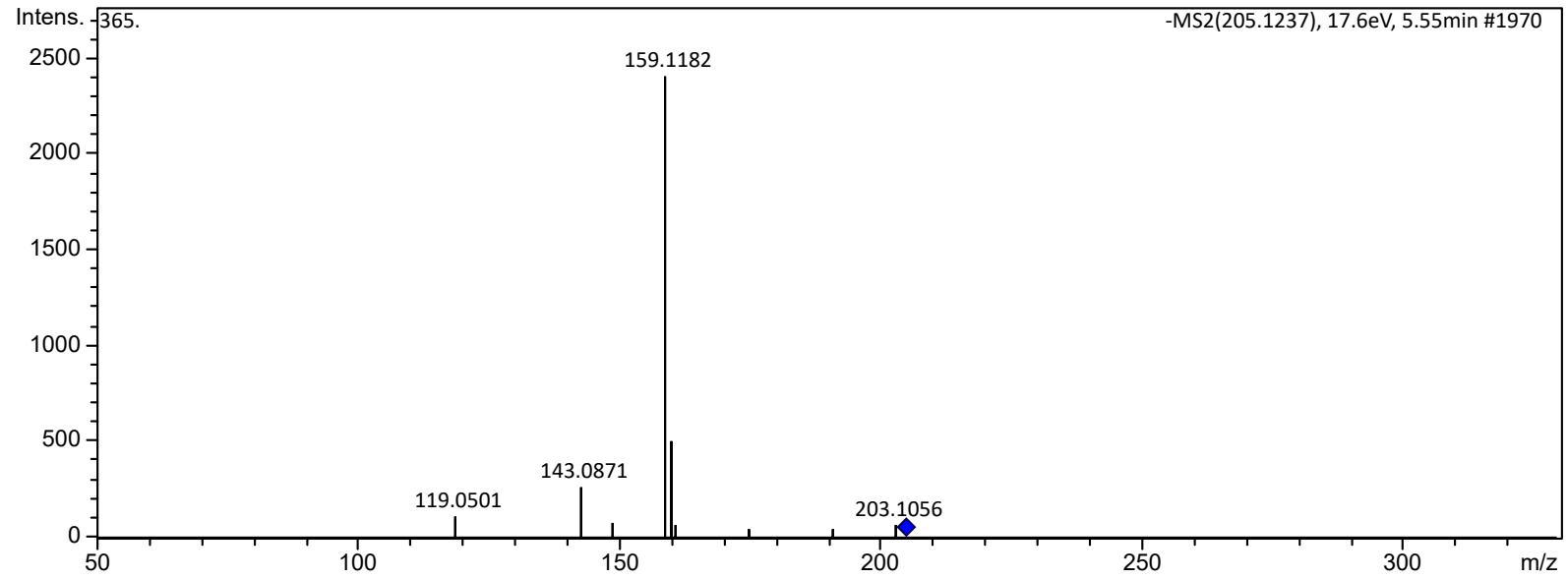


Figura 56 – Espectro da fragmentação de massas para o ibuprofeno, controle para reação de biotransformação

Fonte: Autora, 2025.