



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

JÉSEKA GABRIELA SCHIRMANN

**LACASES DE *BOTRYOSPHAERIA RHODINA* E
PLEUROTUS OSTREATUS NA OXIDAÇÃO DO 2,6-
DIMETOXIFENOL E AVALIAÇÃO DA AÇÃO ANTIOXIDANTE
DO 3,3',5,5'-TETRAMETOXIBIFENIL-4,4'-DIOL EM
BIODIESEL E ATIVIDADE LEISHMANICIDA *IN VITRO***

JÉSEKA GABRIELA SCHIRMANN

**LACASES DE *BOTRYOSPHAERIA RHODINA* E
PLEUROTUS OSTREATUS NA OXIDAÇÃO DO 2,6-
DIMETOXIFENOL E AVALIAÇÃO DA AÇÃO ANTIOXIDANTE
DO 3,3',5,5'-TETRAMETOXIBIFENIL-4,4'-DIOL EM
BIODIESEL E ATIVIDADE LEISHMANICIDA *IN VITRO***

Tese apresentada à Universidade Estadual de Londrina, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Química, curso de Doutorado em Química – Área de concentração Química Orgânica – Associação Ampla UEL/UEPG/UNICENTRO, para a obtenção do título de Doutora.

Orientadora: Profa. Dra. Aneli de Melo
Barbosa- Dekker

Londrina
2019

JÉSEKA GABRIELA SCHIRMANN

**AVALIAÇÃO DE LACASES DE *BOTRYOSPHERA RHODINA* E
PLEUROTUS OSTREATUS NA OXIDAÇÃO DO 2,6-DIMETOXIFENOL
E AVALIAÇÃO DA AÇÃO ANTIOXIDANTE DO 3,3',5,5'-
TETRAMETOXIBIFENIL-4,4'-DIOL EM BIODIESEL E ATIVIDADE
LEISHMANICIDA *IN VITRO***

Tese apresentada à Universidade Estadual de Londrina, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Química, curso de Doutorado em Química – Área de concentração Química Orgânica – Associação Ampla UEL/UEPG/UNICENTRO, para a obtenção do título de Doutora.

BANCA EXAMINADORA

Orientadora: Profa. Dra. Aneli de Melo
Barbosa-Dekker
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Profa. Dra. Ivete Conchon Costa
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Profa. Dra. Marcelle de Lima Ferreira Bispo
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Prof. Dr. Nilton Syogo Arakawa
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Profa. Dra. Rosane Marina Peralta
Universidade Estadual de Maringá – UEM

Londrina, 20 de fevereiro de 2019.

Dedico este trabalho à minha amada mãe Lenir Schirmann, e minha querida avó Juvelina Schirmann, que sempre foram exemplos de perseverança e coragem. Sem vocês nada disso teria sentido.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus, por cuidar de mim, me guiar, me confortar e renovar minhas forças nos momentos difíceis.

À minha orientadora, Profa. Dra. Aneli M. Barbosa Dekker, por aceitar orientar-me nesta importante etapa acadêmica, e sem mesmo me conhecer confiar em mim. Sou grata pela sua orientação, amizade, e principalmente pela contribuição na minha visão interdisciplinar da ciência. Meu crescimento profissional nesses quatro anos também é reflexo dos seus ensinamentos à parte do trabalho acadêmico. Sua paixão pela pesquisa me inspira!

Ao Dr. Robert Dekker, pela colaboração no desenvolvimento deste trabalho. Obrigada pelas sugestões, ensinamentos e principalmente pela paciência. Sua contribuição foi sem dúvida fundamental para o meu crescimento acadêmico. Um pesquisador com 50 anos de experiência com certeza só tem a acrescentar, principalmente para quem está começando. Muito obrigada!

Aos professores Ivete Conchon Costa e Wander Pavanelli por abrirem as portas do Laboratório de Protozoologia Experimental (CCB), para o desenvolvimento da pesquisa de Leishmania. Aos integrantes do laboratório Bruna Bortoletti, Fernanda Tominotto-Pellissier e Manuela Gonçalves, pelo auxílio nos ensaios realizados. Aos demais membros do grupo que sempre ajudaram quando preciso.

Ao professor Dr. Dionísio Borsato por disponibilizar o Laboratório de Pesquisa de Análise de Biocombustíveis para o estudo com biodiesel e pela colaboração no trabalho. A professora Dra. Karina Angilelli, pelo auxílio prestado no desenvolvimento da pesquisa, e aos demais membros do grupo que foram prestativos quando necessário.

À professora Dra. Maria Luiza Zeraik, do LabFitoBio, pela colaboração no desenvolvimento do ensaio ORAC.

À professora Dra. Claudia Bueno dos Reis Martinez, do Laboratório de Ecofisiologia Animal (CCB), pelo empréstimo do equipamento de fluorescência para a realização do ensaio ORAC. Ao Vagner pelo auxílio no uso do equipamento.

À professora Dra. Elen Sartori Braz e ao Gabriel Junquetti, por realizar o estudo do potencial redox de lacase.

Aos membros da banca de qualificação: Profa. Dra. Marcelle Bispo, Prof. Dr. Nilton Arakawa pela avaliação e contribuição no trabalho. Aos membros da banca de defesa: Profa. Dra. Ivete Conchon Costa, Profa. Dra. Marcelle Bispo, Prof. Dr. Nilton Arakawa e Profa. Dra. Rosane Peralta, por prontamente aceitarem participar da avaliação deste trabalho e por toda contribuição.

Aos docentes: Dra. Anna Paola Butera, Dra. Carla Perez, Dr. Cesar Andrei e Prof. Dr. Fernando De Macedo Jr. pela colaboração na minha formação acadêmica.

Aos funcionários dos laboratórios que colaboraram nas análises contidas neste trabalho. Ao Dr. Jurandir Pereira Pinto do LPMBA pelas análises de CG-EM, aos responsáveis pelas análises de RMN do LABSPEC e a Cristina pelas análises de MS/MS e GC-EM do LAMM. Ao Prof. Dr. César Tischer pelo auxílio nas análises de MS/MS.

As alunas de iniciação científica Tatiane e Natalia Rodrigues que contribuíram com esse trabalho.

Ao Departamento de Bioquímica, pelo empréstimo de equipamentos. À Profa. Dra. Maria Inês Rezende e ao Nelson, pela ajuda prestada no decorrer deste trabalho.

Aos queridos amigos que a ciência me proporcionou, e que tornaram a rotina de trabalho mais leve e divertida. Agradeço à: Henrique Esteves, Simone Birkheur, Márcio Oliveira, Paula Rivero, Giovana Ramos e João Zimmerman. Em especial à: Camila Bernardes, minha querida amiga que a pós-graduação me presenteou, que sempre esteve disposta a ajudar de todas as formas possíveis, sua amizade foi essencial; Priscila Carvalho, que este ano em um período difícil, me mostrou que os verdadeiros amigos fazem a diferença em nossas vidas; Tiago Brito, pelas tantas conversas sobre minha pesquisa. Aos demais amigas Cássia Magalhães e Priscila Brugin.

À minha família que eu tanto amo, responsável pela pessoa que me tornei. Minha mãe Lenir Schirmann, que me ensinou a nunca desistir dos sonhos, que mesmo distante durante toda a jornada acadêmica foi minha inspiração em tantos momentos e meu porto seguro. Agradeço minha avó Juvelina Schirmann, mulher corajosa, a quem devo muito o que sou hoje. Aos meus tios Ênio, Loreni e meu amado primo Gabriel, pelo carinho. Às minhas tias Nelci e Ivete que sempre estiveram preocupadas comigo e torcendo para a finalização do doutorado.

À família Galindo, que agora também é minha, agradeço a todos pelo incentivo e pelos momentos divertidos. Ao meu marido Ederson Botelho pelo apoio nesses quatro anos e por compreender minha ausência em função dos compromissos do doutorado.

A todos que me apoiaram sou grata de coração. Muito obrigada!

SCHIRMANN, Jéseka Gabriela. **Lacases de *Botryosphaeria rhodina* e *Pleurotus ostreatus* na oxidação do 2,6-dimetoxifenol e avaliação da ação antioxidante do 3,3',5,5'-tetrametoxibifenil-4,4'-diol em biodiesel e atividade leishmanicida *in vitro*.** 2019. 187 f. Tese (Doutorado em Química) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2019.

RESUMO

A síntese de produtos transformados por enzimas a partir do 2,6-dimetoxifenol (2,6-DMP) pode ser seletivamente obtida através do acoplamento oxidativo controlado em reações catalisadas por lacases, e os produtos formados dependem da fonte da enzima, bem como das condições aplicadas à reação. A lacase de *Botryosphaeria rhodina* MAMB-05 foi investigada quanto à sua capacidade de catalisar a oxidação do 2,6-DMP em meio aquoso em pH 3,0, e 6,5, durante os tempos de reações de 48,96 e 144h. Observou-se que a formação de 3 dímeros através de reações de acoplamento C-C (I e II) e C-O (III), depende do pH e do tempo de reação. Os dímeros I, II e III foram identificados como 3,3',5,5'-tetrametoxibifenil-4,4'-diol (TMBP), 3,3',5,5'-tetrametoxidifenilquinona e 4-(2,6-dimetoxi-fenoxi)-2,6- dimetoxifenol, respectivamente. A síntese do TMBP catalisada pela lacase de *B. rhodina* em pH 6,5, foi otimizada utilizando-se um planejamento fatorial incompleto Box-Behnken, com três variáveis: concentração de 2,6-DMP, atividade de lacase e tempo de reação. O valor ótimo obtido foi $11,93 \pm 0,49\%$, o qual concordou com o valor preditivo (12%) do modelo matemático. A biocatálise do 2,6-DMP com a lacase de *Pleurotus ostreatus* Florida, em meio aquoso nos valores de pH: 3,0, 4,0, 5,0 e 6,5, nos tempos de reação de 48, 96 e 144h, resultou na síntese dos três dímeros de acoplamento, com rendimentos superiores aos obtidos com a lacase de *B. rhodina*. O uso de sistemas lacase-mediador (SLM) na reação de oxidação do 2,6-DMP catalisada pela lacase de *B. rhodina* usando mediadores químicos, ABTS e TEMPO, promoveu o aumento do potencial redox da enzima. Outros fatores como a concentração de oxigênio e a combinação do 2,6-DMP com o SLM e a adição de cobre como cofator, também contribuíram para a síntese e distribuição dos dímeros de acoplamento oxidativo I e II. As lacases de *B. rhodina* e *P. ostreatus*, atuando na presença de diferentes concentrações de solventes orgânicos, apresentaram perfis diferentes de estabilidade nas reações de oxidação dos substratos ABTS e 2,6-DMP. A atividade antioxidante do TMBP foi avaliada pelo método ORAC e apresentou EC50 igual a 6,9 μM . O TMBP foi avaliado como antioxidante para biodiesel, e mostrou-se tão eficaz quanto o butil hidroxitolueno (BHT), padrão comercial, indicando que o TMBP pode servir como um antioxidante alternativo para estabilizar o biodiesel. O potencial leishmanicida do TMBP foi avaliado sobre formas promastigotas de *Leishmania amazonensis* e apresentou um IC50 igual a 0,86 μM após 24h de tratamento. O efeito antipromastigota do TMBP está relacionado com a despolarização mitocondrial e com o aumento da produção de espécies reativas de oxigênio. Nas formas amastigotas, o TMBP agiu intracelularmente nos macrófagos, diminuindo a quantidade de formas viáveis, sem apresentar citotoxicidade em macrófagos murinos e eritrócitos de carneiro. Este é o primeiro trabalho que demonstra o potencial de aplicação do TMBP como antioxidante para biodiesel, bem como leishmanicida para formas promastigotas e amastigotas de *L. amazonensis*.

Palavras-chave: Biocatálise. Lacases. 2,6-dimetoxifenol. Antioxidante de biodiesel. Leishmaniose.

SCHIRMANN, Jéseka Gabriela. **Laccase of *Botryosphaeria rhodina* and *Pleurotus ostreatus* in the oxidation of 2,6-dimethoxyphenol and evaluation of the antioxidant action of 3,3',5,5'-tetramethoxybiphenyl-4,4'-diol in biodiesel and on vitro leishmanicidal activity.** 2019. 187 p. Thesis (Doctorate degree in Chemistry) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2019.

ABSTRACT

The synthesis of enzyme-transformed products from 2,6-dimethoxyphenol (2,6-DMP) can be selectively obtained through controlled oxidative coupling in laccase-catalyzed reactions, and the products formed are dependent upon the enzyme source, as well as, the reaction conditions applied. The laccase from *Botryosphaeria rhodina* MAMB-05 was investigated for its ability to catalyze the oxidation of 2,6-DMP in aqueous medium at pH 3.0 and 6.5, during reaction times of 48, 96 and 144h. The formation of 3 dimers via C-C (I and II) and C-O (III) coupling reactions was observed to depend upon the pH and reaction time. Dimers I, II and III were identified as 3,3',5,5'-tetramethoxybiphenyl-4,4'-diol (TMBP), 3,3',5,5'-tetramethoxydiphenylquinone and (4-(2,6-dimethoxy-phenoxy)-2,6-dimethoxyphenol), respectively. The synthesis of TMBP catalyzed by *B. rhodina* laccase at pH 6.5 was optimized using an incomplete Box-Behnken factorial-design with three variables: 2,6-DMP concentration, laccase activity and reaction time. The optimal value obtained was $11.93 \pm 0.49\%$, which was in agreement with the predictive value (12%) of the mathematical model. The biocatalysis of 2,6-DMP by laccase from *Pleurotus ostreatus* Florida isolate, in aqueous medium at pH values of 3.0, 4.0, 5.0 and 6.5, at reaction times of 48, 96 and 144h, resulted in the synthesis of the three coupling dimers with yields higher than those obtained with the *B. rhodina* laccase. The use of laccase-mediator systems (LMS) in the oxidation reaction of 2,6-DMP catalyzed by *B. rhodina* laccase using chemical mediators, ABTS and TEMPO, provided an increase in the redox potential of the enzyme. Other factors such as oxygen concentration and combination of 2,6-DMP with LMS's and the addition of copper as a cofactor also contributed to the synthesis and distribution of oxidative coupling dimers I, and II. The laccases from *B. rhodina* and *P. ostreatus* acting in the presence of different concentrations of organic solvents, showed different stability profiles in the oxidation reactions of ABTS and 2,6-DMP substrates. The antioxidant activity of TMBP was evaluated by the ORAC method and presented EC₅₀ of 6.9 μM . TMBP was evaluated as an antioxidant to biodiesel, and proved to be as effective as commercial butyl hydroxytoluene (BHT), indicating that TMBP may serve as an alternative antioxidant to stabilize biodiesel. The leishmanicidal potential of TMBP was evaluated on *Leishmania amazonensis* promastigotes and showed an IC₅₀ of 0.86 μM after 24h of treatment. The anti-promastigote effect of TMBP is related to mitochondrial depolarization and increased production of reactive oxygen species. In amastigote forms, TMBP acted intracellularly in the macrophages, decreasing the amount of viable forms, without presenting cytotoxicity in murine macrophages and sheep erythrocytes. This is the first work that demonstrates the potential of TMBP applications as an antioxidant for use in biodiesel, as well as leishmanicide for promastigotes and amastigotes of *L. amazonensis*.

Key words: Biocatalysis. Laccases. 2,6-dimethoxyphenol. Biodiesel antioxidante. Leishmaniasis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	– Ocorrência e o papel de lacases na natureza	27
Figura 2	– Estrutura tridimensional de lacase de <i>Trametes versicolor</i> . A proteína representada pela fita (azul), os íons de cobre como esferas (rosa) e os carboidratos como linhas (verde/azul/vermelho). Imagem criada com <i>PyMol</i> do arquivo	28
Figura 3	– À esquerda: estrutura tridimensional de lacase de <i>Trametes versicolor</i> . Imagem criada com <i>PyMol</i> do arquivo 1GYC de livre acesso no PDB. À direita: representação do sítio ativo da mesma lacase mostrando resíduos de coordenação e distâncias interatômicas (Å).....	29
Figura 4	– Ciclo catalítico de lacases. As setas vermelhas indicam etapas do ciclo catalítico enquanto que as setas pretas indicam a redução da enzima de repouso para entrar no ciclo catalítico	32
Figura 5	– Estrutura química de mediadores de lacases	35
Figura 6	– Distribuição das aplicações biotecnológicas das lacases. Dados obtidos da pesquisa no banco de dados Scopus	37
Figura 7	– Fungos <i>Botryosphaeria rhodina</i> MAMB-05 e <i>Pleurotus ostreatus</i> : fontes de lacase.....	50
Figura 8	– Fluxograma dos dímeros de acoplamento obtidos na reação de oxidação do 2,6-DMP em pH 3,0	57
Figura 9	– Superfície de resposta tridimensional para a síntese do 3,3',5,5'-tetrametoxibifenil-4,4'-diol (TMBP) em função da concentração de 2,6-DMP (X2) e concentração de lacase em Unidade de enzima (X3). O tempo (X1) foi fixado em 120h, e a reação foi realizada a pH 6,5	76
Figura 10	– Reação de oxidação do 2,6-DMP catalisada pela lacase de <i>B. rhodina</i> com o borbulhamento de oxigênio no meio reacional	84
Figura 11	– Estruturas químicas de fármacos de primeira e segunda escolha usados no tratamento de leishmaniose.....	113
Figura 12	– Estrutura química do eugenol, deidrodieugenol e quercetina.....	115
Figura 13	– Avaliação da atividade antioxidante do TMBP e dos padrões ácido gálico (AG) e ácido ascórbico (AA) pelo ensaio ORAC.....	128

- Figura 14** – Atividade leishmanicida do TMBP (0.03- 15.6 μ M) sobre formas promastigotas de *L. amazonensis* em (A) 24h de tratamento (B) 48h de tratamento (C) 72h de tratamento. (AmB 1 μ M) controle positivo e DMSO (0,015%) diluente. Os valores representam a média \pm SEM de três experimentos independentes realizados em duplicata. Diferença significativa em relação ao controle * ($p \leq 0,05$), ** ($p \leq 0.01$), *** ($p \leq 0,001$), **** ($p \leq 0,0001$) 132
- Figura 15** – Volume celular em formas promastigotas de *L. amazonensis* tratadas com TMBP. FSC-H foram considerados uma função do tamanho da célula. A linha preta corresponde ao grupo controle (parasitos não tratados) e a área da linha vermelha corresponde ao grupo tratado 133
- Figura 16** – Análise do mecanismo de morte em formas promastigotas de *L. amazonensis* submetidos a tratamentos com TMBP (0,86 e 1,72 μ M) por 24h e analisadas por ensaio de TMRE para análise fluorométrica do potencial de membrana mitocondrial. (CTRL) Controle (parasitos não tratados) e (CCCP) controle positivo. Diferença significativa em relação ao controle ** ($p \leq 0.01$), **** ($p \leq 0.0001$) 134
- Figura 17** – Análise do mecanismo de morte em formas promastigotas de *L. amazonensis* submetidos a tratamentos com TMBP (0,86 e 1,72 μ M) por 24h usando sonda fluorescente H₂DCFDA para a medição de espécies reativas de oxigênio. (CTRL) Controle (parasitos não tratados) e (H₂O₂) controle positivo. Diferença significativa em relação ao controle **** ($p \leq 0.0001$) 135
- Figura 18** – Viabilidade de macrófagos tratados com TMBP. Macrófagos peritoneais de camundongo BALB/c tratados com TMBP (0,03-125 μ M). Controle negativo (meio RPMI 1640), controle positivo (H₂O₂) e DMSO 0,015% (controle diluente). Os valores representam a média \pm SEM de três experimentos independentes realizados em duplicata. Diferença significativa em relação ao controle *** ($p \leq 0,001$) 136

- Figura 19** – Viabilidade de eritrócitos tratados com TMBP. Eritrócitos ovinos tratados com TMBP (0,03-125 μ M). Hemólise verificada pela leitura da absorbância a 550 nm. Como controle foi utilizado PBS (não-hemólise), e controle positivo indica a exposição à água destilada. Os valores representam a média \pm SEM de três experimentos independentes realizados em duplicata. Diferença significativa em relação ao controle **** ($p \leq 0,0001$)..... 136
- Figura 20** – Macrófagos infectados por *L. amazonensis* tratados com TMBP (IC50 (0,86 μ M) e 2xIC50 (1,72 μ M)). (A) Porcentagem de macrófagos infectados (B) Avaliação da quantidade de amastigotas por macrófago. Controle negativo (meio RPMI 1640), controle positivo (AmB 1 μ M) e DMSO 0,015% (controle diluente). Os valores representam a média \pm SEM de três experimentos independentes realizados em duplicata. Diferença significativa em relação ao controle negativo *** ($p \leq 0,001$), **** ($p \leq 0,0001$). Diferença significativa em relação ao controle diluente ## ($p \leq 0,01$), 137
- Figura 21** – Estrutura química dos principais ésteres alquílicos presentes na composição do biodiesel..... 151
- Figura 22** – Estrutura química dos principais aditivos antioxidante comerciais usado em biodiesel..... 154
- Figura 23** – Dados de CG-EM para o 2,6-dimetoxifenol obtidos no equipamento GCMS-QP5000. (a) Cromatograma gasoso, (b) Espectro de massa..... 168
- Figura 24** – Dados de CG-EM para o 3,3',5,5'-tetrametoxibifenil-4,4'-diol (TMBP) (obtidos no equipamento GCMS-QP5000). (a) Cromatograma gasoso, (b) Espectro de massa 169
- Figura 25** – Dados de CG-EM (obtidos no equipamento GCMS-QP5000) para o sólido de cor amarela escura B (ver Figura 8 do texto) obtido às 96 h (pH 3,0) por lacase de *B. rhodina*. (a) Cromatograma gasoso, (b) Espectro de massa do TMBP, com íon molecular a m/z 306, identificados na região B indicada no cromatograma gasoso 170

Figura 26 – Dados de CG-EM (obtidos no equipamento GCMS-QP2010) para os produtos obtidos a pH 5,0 (96 e 144h) por lacase de <i>P. ostreatus</i> . (a) Cromatograma gasoso, (b) espectro de massa do pico 1 (c) espectro de massa do pico 2 observados no cromatograma	171
Figura 27 – Dados de CG-EM (obtidos no equipamento GCMS-QP5000) para o sólido de cor amarelo escuro obtido pelo sistema lacase/TEMPO em pH 6,5. (a) Cromatograma gasoso, (b) Espectro de massa do pico 1 (c) Espectro de massa do TMBP (I), identificado no pico 2 no cromatograma gasoso.....	172
Figura 28 – Dados de CG-EM (obtidos no equipamento GCMS-QP5000) para o sólido de cor amarelo escuro obtido pelo sistema lacase/TEMPO em pH 6,5. (a) Cromatograma gasoso, (b) Espectros de massas do pico 3 no cromatograma gasoso.....	173
Figura 29 – Dados de CG-EM (obtidos no equipamento GCMS-QP5000) para o sólido de cor amarelo escuro obtido pelo sistema lacase/TEMPO com fluxo de oxigênio em pH 6,5. (a) Cromatograma gasoso, (b) Espectro de massa do pico 1 (c) Espectro de massa do TMBP (I), identificado no pico 2 no cromatograma gasoso	174
Figura 30 – Dados de CG-EM (obtidos no equipamento GCMS-QP5000) para o sólido de cor amarelo escuro obtido pelo sistema lacase/TEMPO com fluxo de oxigênio em pH 6,5. (a) Cromatograma gasoso, (b) Espectros de massas do pico 3 no cromatograma gasoso.....	175
Figura 31 – Dados de CG-EM (obtidos no equipamento GCMS-QP5000) para o sólido de cor amarelo escuro obtido pela lacase combinada com cofator cobre e fluxo de oxigênio em pH 3,0. (a) Cromatograma gasoso, (b) Espectro de massa do 2,6-DMP identificado no pico 1, (c) Espectro de massa do TMBP (I), identificado no pico 2 no cromatograma gasoso	176
Figura 32 – Dados de CG-EM (obtidos no equipamento GCMS-QP5000) para o sólido de cor amarelo escuro obtido pela lacase combinada com cofator cobre e fluxo de oxigênio em pH 6,5. (a) Cromatograma gasoso, (b) Espectros de massas do pico 3 no cromatograma gasoso.....	177

Figura 33 – Espectro de RMN de ^{13}C do dímero 3,3',5,5'-tetrametoxidifenilquinona (II) formado durante a oxidação do 2,6-dimetoxifenol catalisada pela lacase de <i>B. rhodina</i>	178
Figura 34 – Espectro de RMN de ^{13}C do dímero 3,3',5,5'-tetrametoxidifenilquinona (II) formado durante a oxidação do 2,6-dimetoxifenol catalisada pela lacase de <i>P. ostreatus</i>	179
Figura 35 – Espectro de RMN de ^1H do dímero 3,3',5,5'-tetrametoxibifenil-4,4'-diol (I) formado durante a oxidação do 2,6-dimetoxifenol catalisada pela lacase de <i>B. rhodina</i>	180
Figura 36 – Espectro de RMN de ^1H do dímero 3,3',5,5'-tetrametoxibifenil-4,4'-diol (I) formado durante a oxidação do 2,6-dimetoxifenol catalisada pela lacase de <i>P. ostreatus</i>	181
Figura 37 – Espectros de MS/MS dos dímeros de 2,6-dimetoxifenol obtidos durante a reação de oxidação catalisada pela lacase de <i>B. rhodina</i> , (a) dímero III (4-(2,6-dimetoxi-fenoxi) -2,6-dimetoxifenol), e (b) dímero I (3,3',5 5'-tetrametoxi-bifenil-4,4'- diol). Painéis superiores mostram os produtos de síntese. Os painéis inferiores mostram os produtos de fragmentação do principal produto sintetizado	182
Figura 38 – Espectro de MS/MS do dímero 4-(2,6-dimetoxi-fenoxi) de 2,6-dimetoxifenol (III) obtido durante a reação de oxidação do 2,6-dimetoxifenol catalisada pela lacase de <i>P. ostreatus</i> . Painel superior mostra os produtos de síntese. Painel inferior mostra as fragmentações do dímero III	183
Figura 39 – Quadro que define as variáveis de reação para a otimização de condições para a síntese de TMBP pela lacase de <i>Botryosphaeria rhodina</i>	184
Figura 40 – Voltamograma cíclico para solução tampão citrato-fosfato (pH 3,0) (linha vermelha) e Lacase 1,5 mg mL ⁻¹ em solução tampão citrato-fosfato (pH 3,0) (linha azul), empregando um eletrodo de carbono vítreo	185
Figura 41 – Voltamograma cíclico para solução tampão citrato-fosfato (pH 6,5) (linha vermelha) e Lacase 1,5 mg mL ⁻¹ em solução tampão citrato-fosfato (pH 6,5) (linha azul), empregando um eletrodo de carbono vítreo. Parâmetro VC: $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$	186

LISTA DE ESQUEMAS

- Esquema 1** – Mecanismo redox proposto para a catálise por lacase para a oxidação de substratos fenólicos 31
- Esquema 2** – Mecanismo redox catalisado por lacase na presença de mediador químico 34
- Esquema 3** – Oxidação de um composto modelo de lignina não fenólico (álcool veratrílico) pelo sistema Lacase/ABTS. (a) Oxidação do ABTS na presença de lacase. (b) Oxidação do álcool veratrílico pelo mediador 35
- Esquema 4** – Oxidação de compostos não fenólicos pelo sistema lacase-mediador via oxidação por **(a)** transferência de átomos de hidrogênio e **(b)** mecanismo iônico 36
- Esquema 5** – Formação de intermediários quinona mediada por lacase com reação adicional de nucleófilo via adição de Michael 38
- Esquema 6** – Exemplos de aplicações sintéticas de lacases. **(a)** Síntese de o- naftoquinona **(b)** Síntese de aminoquinonas **(c)** Síntese de tio éteres de catecol 39
- Esquema 7** – Síntese de derivados de pirimidobenzotiazol catalisada por lacase de *bisporus* 40
- Esquema 8** – Reação de acoplamento cruzado catalisada por lacase 41
- Esquema 9** – Reação de derivatização do L-triptofano usando lacase de *Pycnoporus cinnabarinus* 41
- Esquema 10** – Síntese de cefalosporinas catalisadas por lacase de *Trametes sp.* e *Myceliophthora thermophila* 42
- Esquema 11** – Dimerização de derivados de penicilina X catalisada por lacase de *Tametes versicolor* 42
- Esquema 12** – Dimerização do 2,6-dimetoxifenol (2,6-DMP) catalisada por lacase 43
- Esquema 13** – Dimerização do álcool vanílico catalisada por lacase 44
- Esquema 14** – Polimerização oxidativa o do ácido siríngico catalisada por lacase 45
- Esquema 15** – Síntese de derivados de acetofenona α,α -di-halogenada catalisada pelo sistema lacase/TEMPO 45

Esquema 16 – Oxidação de monossacarídeos e dissacarídeos catalisada pelo sistema lacase/TEMPO.....	46
Esquema 17 – Reação via radicais livres do 2,6-DMP catalisada por lacase que leva a (a) três possíveis dímeros e (b) produtos poliméricos de acoplamento oxidativo.....	66
Esquema 18 – Principais fragmentações de massa de (a) 4-(2,6-dimetoxifenoxi) - 2,6-dimetoxifenol (dímero III) e (b) TMBP (dímero I).....	69
Esquema 19 – Mecanismo proposto para a síntese de dímeros de 2,6-DMP catalisados por lacase de <i>B. rhodina</i> . (a) acoplamento oxidativo C–C a pH 3,0, (b) acoplamento oxidativo C–O a pH 3,0 e (c) acoplamento oxidativo C–C a pH 6,5	71
Esquema 20 – Reação de síntese do TMBP a partir do 2,6-DMP catalisada por lacases de <i>B. rhodina</i> e <i>P. ostreatus</i>	115
Esquema 21 – Reação do radical peroxil com a fluoresceína durante o ensaio ORAC.	119
Esquema 22 – Reação de síntese do TMBP a partir do 2,6-DMP catalisada por lacases de <i>B. rhodina</i> e <i>P. ostreatus</i>	127
Esquema 23 – Reação de transesterificação para a obtenção do biodiesel (mistura de ésteres graxos de alquila)	150
Esquema 24 – Mecanismo de oxidação do éster metílico do ácido linoleico presente no biodiesel	152
Esquema 25 – Mecanismo proposto para a ação de antioxidantes fenólicos	154
Esquema 26 – Reação de síntese do TMBP a partir do 2,6-DMP catalisada por lacases de <i>B. rhodina</i> e <i>P. ostreatus</i>	155

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Sistema de incubação utilizado para determinar a atividade de lacase	54
Tabela 2 – Sistema de incubação utilizado para avaliar a influência dos respectivos solventes na atividade de lacase utilizando-se como substratos ABTS e 2,6-DMP	64
Tabela 3 – Produtos da oxidação do 2,6-DMP catalisada por lacase de <i>B. rhodina</i> em diferentes valores de pH e tempos reacionais.....	67
Tabela 4 – Planejamento fatorial Box-Behnken com as três variáveis estudadas para otimizar as condições de síntese do TMBP (dímero I) com a lacase de <i>Botryosphaeria rhodina</i> MAMB-05 sobre o 2,6-DMP em pH 6,5.....	74
Tabela 5 – Produtos da oxidação do 2,6-DMP catalisada pela lacase de <i>P. ostreatus</i> em diferentes valores de pH e tempos reacionais	77
Tabela 6 – Comparação dos rendimentos dos produtos de oxidação do 2,6-DMP obtidos pela ação catalítica das lacases de <i>B. rhodina</i> e <i>P. ostreatus</i> em diferentes tempos de reação e valores de pH.....	79
Tabela 7 – Produtos da oxidação do 2,6-DMP catalisada pelo SLM usando a lacase do <i>B. rhodina</i>	82
Tabela 8 – Produtos da oxidação do 2,6-DMP obtidos pela catálise da lacase de <i>B. rhodina</i> com borbulhamento de oxigênio no meio reacional.....	84
Tabela 9 – Produtos da oxidação do 2,6-DMP catalisada pelo SLM com borbulhamento de oxigênio no meio reacional	86
Tabela 10 – Produtos da oxidação do 2,6-DMP catalisada por lacase de <i>B. rhodina</i> na presença de cobre e fluxo de oxigênio	88
Tabela 11 – Atividades residuais (%) da lacase de <i>B. rhodina</i> na presença de concentrações crescentes de solventes orgânicos sobre os substratos ABTS e 2,6- DMP	91
Tabela 12 – Atividades residuais (%) da lacase de <i>P. ostreatus</i> na presença de concentrações crescentes de solventes orgânicos sobre os substratos ABTS e 2,6- DMP	92

Tabela 13 – Atividade antioxidante do TMBP descrita na literatura científica.....	127
Tabela 14 – Regras de Lipinski e área de superfície polar do TMBP e dos fármacos anfotericina B e antimoniato de meglumina.....	130
Tabela 15 – Períodos de indução de amostras de biodiesel com e sem adição de antioxidantes.....	159
Tabela 16 – Comparação das constantes de velocidade do TMBP, BHT e amostra controle das reações de oxidação nas temperaturas de 110, 115, 120 e 125 °C	160
Tabela 17 – Parâmetros cinéticos e termodinâmicos das reações de oxidação utilizando TMBP, BHT e amostra controle de biodiesel.....	161

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

%	Porcentagem
°C	Graus Celsius
µg	Micrograma
µM	Micromolar
¹³ C	Carbono 13
¹ H	Hidrogênio
2,6-DMP	2,6-dimetoxifenol
AAPH	2,2'-azobis (2-amidinopropano) dihidroclorato
Abs	absorbância
ABTS	Ácido 2,2'-azino-bis[3-etil-benzothiazolino-6-sulfônico]
Amb	Anfotericina B
ANOVA	Análise de variância
<i>B. rhodina</i>	<i>Botryosphaeria rhodina</i> MAMB-05
B.O.D	do inglês <i>Biochemical Oxygen Demand</i>
BDA	Batata-dextrose-agar
BHT	Butil hidroxitolueno
CCCP	Carbonilcianeto <i>m</i> -clorofenil-hidrazona
CDCl ₃	Clorofórmio Deuterado
CG-EM	Cromatógrafo a Gás acoplado ao Espectrômetro de Massas
DMF	Dimetilformamida
DMSO	Dimetilsulfóxido
DPPH	2,2-difenil-1-picril-hidrazila
EC ₅₀	Metade da concentração máxima eficiente
EROs	Espécies Reativas de Oxigênio
FL	Fluoresceína
FRAP	do inglês Ferric Reducing Antioxidant Power
g	Gramas
h	Horas
H ₂ DCFDA	2'7' diclorofluoresceína
H ₂ O ₂	Peróxido de Hidrogênio
HTA	Transferência de átomos de hidrogênio
Hz	Hertz

IC ₅₀	do inglês <i>inhibitory concentration 50%</i>
LTA	Leishmaniose Tegumentar Americana
M	Molar
m/v	Massa/volume
MHz	Mega-hertz
miLogP	Lipofelicidade
mL	Mililitro
MM	Massa molecular
mM	Milimol
mM	milimolar
mmol	Milimol
nm	Nanômetro
nOHNH	Número de doadores de ligação de hidrogênio
nON	Número de aceptores de ligação de hidrogênio
ORAC	do inglês <i>Oxygen radical absorbance capacity</i>
<i>P. ostreatus</i>	<i>Pleurotus ostreatus</i>
PBS	do inglês <i>phosphate buffered saline</i>
PEs	b-phycoerythrins
pf	Ponto de Fusão
pH	Potencial Hidrogeniônico
PI	Período de indução
ppm	Partes por milhão
PSA	do inglês <i>Polar surface area</i>
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
rpm	Rotação por Minuto
RPMI 1640	Meio de cultura (<i>Roswell Park Memorial Institute</i>)
SET	Transferência de elétrons
THF	Tetraidrofurano
TMRE	do inglês <i>Tetramethylrhodamine, ethyl ester</i>
TMS	Tetrametilsilano
U	Unidade de enzima

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.....	23
CAPÍTULO I: Avaliação de lacases de <i>Botryosphaeria rhodina</i> e <i>Pleurotus ostreatus</i> na oxidação do 2,6-dimetoxifenol.....	
25	
1 REVISÃO DE LITERATURA	26
1.1 OCORRÊNCIA DE LACASES	26
1.2 ESTRUTURA E CICLO CATALÍTICO DE LACASES.....	27
1.3 MEDIADORES DE LACASE	33
1.4 APLICAÇÕES DE LACASES	37
1.5 BIOCATALISE EM SOLVENTES ORGÂNICOS	46
1.6 LACASES DE <i>B. RHODINA</i> E <i>P. OSTREATUS</i>	49
2 OBJETIVOS	52
2.1 Objetivo Geral.....	52
2.2 Objetivos Específicos.....	52
3 METODOLOGIA.....	53
3.1 MANUTENÇÃO DE MICRORGANISMOS	53
3.2 PRODUÇÃO DE LACASE PELO <i>Botryosphaeria Rhodina</i> Mamb-05.....	53
3.3 PRODUÇÃO DE LACASE PELO <i>Pleurotus Ostreatus</i> VARIEDADE FLORIDA	53
3.4 ENSAIO ENZIMÁTICO.....	54
3.5 MÉTODOS DE CARACTERIZAÇÃO.....	55
3.6 PRODUÇÃO E AVALIAÇÃO DOS PRODUTOS DE ACOPLAMENTO OXIDATIVO OBTIDOS A PARTIR DE 2,6-DIMETOXIFENOL POR LACASE DE <i>B. RHODINA</i>	56
3.6.1 Isolamento e Caracterização dos Compostos Diméricos Formados a pH 3,0 por Catálise com Lacase de <i>B. rhodina</i>	56
3.6.2 Isolamento e Caracterização dos Composto Dimérico TMBP Sintetizado a pH 6,5 por Catálise com Lacase de <i>B. rhodina</i>	58
3.7 OTIMIZAÇÃO DA SÍNTESE DE 3,3',5,5'-TETRAMETOXIBIFENIL-4,4'-DIOL (TMBP) CATALISADA POR LACASE DE <i>B. RHODINA</i> ATRAVÉS DE PLANEJAMENTO FATORIAL	58
3.7.1 Análise Estatística.....	59

3.8	PRODUÇÃO E AVALIAÇÃO DOS PRODUTOS OBTIDOS PELA CATÁLISE DA LACASE DE <i>P. OSTREATUS</i> USANDO COMO SUBSTRATO O 2,6-DIMETOXIFENOL.....	59
3.8.1	Isolamento e Caracterização dos Compostos Sintetizados pela ação catalítica da Lacase de <i>P. ostreatus</i> sobre o 2,6-DMP	59
3.9	AVALIAÇÃO DA AÇÃO CATALÍTICA DA LACASE DE <i>B. RHODINA</i> SOBRE O 2,6-DMP COM FLUXO DE OXIGÊNIO	60
3.10	AVALIAÇÃO DA AÇÃO CATALÍTICA DA LACASE DE <i>B. RHODINA</i> SOBRE O 2,6-DMP USANDO OS MEDIADORES ABTS E TEMPO	61
3.11	AVALIAÇÃO DA AÇÃO CATALÍTICA DA LACASE DE <i>B. RHODINA</i> SOBRE O 2,6-DMP USANDO OS MEDIADORES ABTS E TEMPO E FLUXO DE OXIGÊNIO	61
3.12	Avaliação dos Produtos da Catálise da Lacase de <i>B. Rhodina</i> Sobre o 2,6-dimetoxifenol Com Adição de Cobre.....	61
3.13	AVALIAÇÃO DOS PRODUTOS DA CATÁLISE DA LACASE DE <i>B. RHODINA</i> SOBRE O 2,6-DIMETOXIFENOL COM ADIÇÃO DE COBRE E FLUXO DE OXIGÊNIO	62
3.14	DETERMINAÇÃO DO POTENCIAL DE OXIDAÇÃO DA LACASE DE <i>B. RHODINA</i> POR VOLTAMETRIA CÍCLICA.....	63
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	66
4.1	AVALIAÇÃO DOS PRODUTOS DE DIMERIZAÇÃO DE 2,6-DIMETOXIFENOL POR LACASE DE <i>BOTRYOSPHAERIA RHODINA</i>	66
4.2	OTIMIZAÇÃO DA SÍNTESE DE 3,3',5,5'-TETRAMETOXIBIFENIL-4,4'-DIOL (TMBP) CATALISADA POR LACASE DE <i>BOTRYOSPHAERIA RHODINA</i>	73
4.3	OTIMIZAÇÃO DA SÍNTESE DE 3,3',5,5'-TETRAMETOXIBIFENIL-4,4'-DIOL (TMBP) CATALISADA POR LACASE DE <i>BOTRYOSPHAERIA RHODINA</i>	76
4.4	COMPARAÇÃO DOS PRODUTOS DE OXIDAÇÃO DO 2,6-DIMETOXIFENOL CATALISADO PELA LACASE DE <i>B. RHODINA</i> USANDO SISTEMA LACASE-MEDIADOR, FLUXO DE OXIGÊNIO E COBRE	80
5	CONCLUSÃO	96
6	REFERÊNCIAS	99

	CAPÍTULO II: Investigação da atividade anti-Leishmania amazonensis do 3,3',5,5'-tetrametoxibifenil-4,4'-diol (TMBP)	109
1	REVISÃO DE LITERATURA	110
1.1	LEISHMANIOSE	110
1.2	ANTIOXIDANTES	116
2	OBJETIVOS	120
2.1	Objetivo Geral.....	120
2.2	Objetivos Específicos.....	120
3	METODOLOGIA	121
3.1	ENSAIO DA CAPACIDADE DE ABSORÇÃO DO RADICAL OXIGÊNIO (ORAC).....	121
3.2	ESTUDO IN SILICO POR ANÁLISE MOLINSPIRATION	121
3.3	MANUTENÇÃO DAS FORMAS PROMASTIGOTAS DE <i>L. AMAZONENSIS</i>	122
3.4	ENSAIO ANTIPROMASTIGOTA	122
3.5	DETERMINAÇÃO DO VOLUME DE CÉLULAS PARASITAS	123
3.6	DETERMINAÇÃO DO POTENCIAL DA MEMBRANA MITOCONDRIAL	123
3.7	DETERMINAÇÃO DA GERAÇÃO DE EROS EM PROMASTIGOTAS	123
3.8	VIABILIDADE DE MACRÓFAGOS PERITONEAIS	124
3.9	ÍNDICE DE SELETIVIDADE (SI)	124
3.10	ATIVIDADE HEMOLÍTICA	125
3.11	ENSAIO ANTIAMASTIGOTA	125
3.12	TRATAMENTO ESTATÍSTICO	126
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	127
4.1	ENSAIO DA CAPACIDADE DE ABSORÇÃO DO RADICAL OXIGÊNIO (ORAC).....	127
4.2	ATIVIDADE LEISHMANICIDA DO TMBP	129
5	CONCLUSÃO	139
6	REFERÊNCIAS	140
	CAPÍTULO III: Aplicação do 3,3',5,5'-tetrametoxibifenil-4,4'-diol (TMBP) como aditivo antioxidante para biodiesel de soja	149
1	REVISÃO DE LITERATURA	150

2	OBJETIVOS	156
2.1	Objetivo Geral.....	156
2.2	Objetivos Específicos.....	156
3	METODOLOGIA	157
3.1	AÇÃO ANTIOXIDANTE DO 3,3',5,5'-TETRAMETOXIBIFENIL-4,4'-DIOL (TMBP) EM BIODIESEL	157
3.2	ANÁLISE TERMOGRAVIMÉTRICA (TGA).....	157
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	158
5	CONCLUSÃO	163
6	REFERÊNCIAS	164
	APÊNDICES	167
	ANEXO	187

INTRODUÇÃO

As reações de oxidação são de importância crucial no desenvolvimento de processos para a síntese de substâncias químicas. Essas reações podem ser catalisadas quimicamente, porém esses processos são na maioria das vezes, considerados perigosos e principalmente poluentes, produzindo resíduos tóxicos que requerem tratamento específico para seu descarte. Alternativamente, os processos verdes que catalisam as reações oxidativas por agentes redox biológicos seletivos, tais como existentes nas células microbianas e catalisadas por certas enzimas (por exemplo, lacases), têm o benefício adicional de serem altamente específicas, sendo regio, quimio e estereo seletivas.

Desde o início do século XXI, as aplicações de lacases como biocatalisadores ganharam ampla atenção na síntese orgânica devido à sua capacidade de catalisar uma multiplicidade de reações que podem incluir a biossíntese e a biodegradação (CANNATELLI & RAGAUSKAS, 2017; WITAYAKRAN & RAGAUSKAS, 2009). Além disso, lacases, estão distribuídas na natureza em bactérias, fungos, plantas e também em alguns insetos (OTTO; SCHLOSSER & REISSER, 2010).

Lacases (EC 1.10.3.2, *p*-difenol: oxigênio oxidoreductase) são enzimas multicúpricas, que catalisam a redução do oxigênio molecular à água com a abstração simultânea de um elétron de um substrato doador na forma reduzida, que por sua vez é oxidado (BALDRIAN, 2006; CANNATELLI & RAGAUSKAS, 2017). Essas enzimas catalisam a síntese de diferentes compostos fenólicos, como *orto* e *para*-difenois, aminofenois, polifenois, poliaminas, bem como de alguns não fenólicos quando na presença de mediadores químicos (CANNATELLI & RAGAUSKAS, 2017; MOGHARABI & FARAMARZI, 2014; NAVARRA et al., 2010). As lacases são, portanto, um dos biocatalisadores ideais para processos tecnológicos verdes, considerando que a água é o único subproduto formado.

Os produtos de acoplamento oxidativo de substratos fenólicos apresentam estruturas químicas interessantes, que podem ser encontradas em moléculas naturais bioativas e sintéticas. Muitos destes compostos possuem diferentes propriedades biológicas, desde atividade antioxidante, até mesmo atividade antitumoral (QUIDEAU & FELDMAN, 1996a; VON NUSSBAUM et al.,

2006).

Neste trabalho o 2,6-dimetoxifenol, um composto fenólico derivado da lignina e comumente usado como substrato de lacases (GIARDINA et al., 2010a; KANG; IRMAK & WILKINS, 2019), foi adotado como substrato modelo para avaliar a ação da lacase produzida pelo ascomiceto *Botryosphaeria rhodina* MAMB-05, bem como comparar com os produtos de acoplamento oxidativo obtidos por ação da lacase do basidiomiceto *Pleurotus ostreatus* variedade Florida. As lacases tiveram suas atividades enzimática avaliadas na presença de diferentes concentrações de solventes orgânicos, a fim de determinar a estabilidade de cada uma, bem como a concentração máxima de solvente a ser usado em uma reação de biocatálise sem comprometer a atividade catalítica. A aplicação do dímero de acoplamento oxidativo 3,3',5,5'-tetrametoxibifenil-4,4'- diol (TMBP) foi pela primeira vez avaliado como antioxidante para biodiesel e também como potencial leishmanicida.

Este trabalho encontra-se dividido em três capítulos. O capítulo 1 é designado a avaliação e comparação de lacases de *B. rhodina* e *P. ostreatus* na oxidação do 2,6-dimetoxifenol em diferentes valores de pH e tempos reacionais. Uma otimização da síntese do TMBP catalisada pela lacase de *B. rhodina* em pH 6,5 foi proposta usando um planejamento fatorial incompleto Box-Behnken. Ainda usando a lacase de *B. rhodina*, foram avaliados sistemas lacase-mediador (SLM) na reação de oxidação do 2,6-DMP, bem como a influência de outros fatores como a concentração de oxigênio e a adição de cobre. E por último, as atividades enzimáticas de ambas as lacases foram avaliadas na presença de diferentes concentrações de solventes orgânicos. O capítulo 2 traz a investigação da atividade leishmanicida do TMBP, sobre formas promastigota e amastigota de *Leishmania amazonensis*, e a determinação da sua atividade antioxidante pelo método ORAC. O capítulo 3 descreve a aplicação do TMBP como aditivo antioxidante para biodiesel de soja.

CAPÍTULO I

Avaliação de lacases de *Botryosphaeria rhodina* e *Pleurotus ostreatus*
na oxidação do 2,6-dimetoxifenol

1 REVISÃO DE LITERATURA

1.1 OCORRÊNCIA DE LACASES

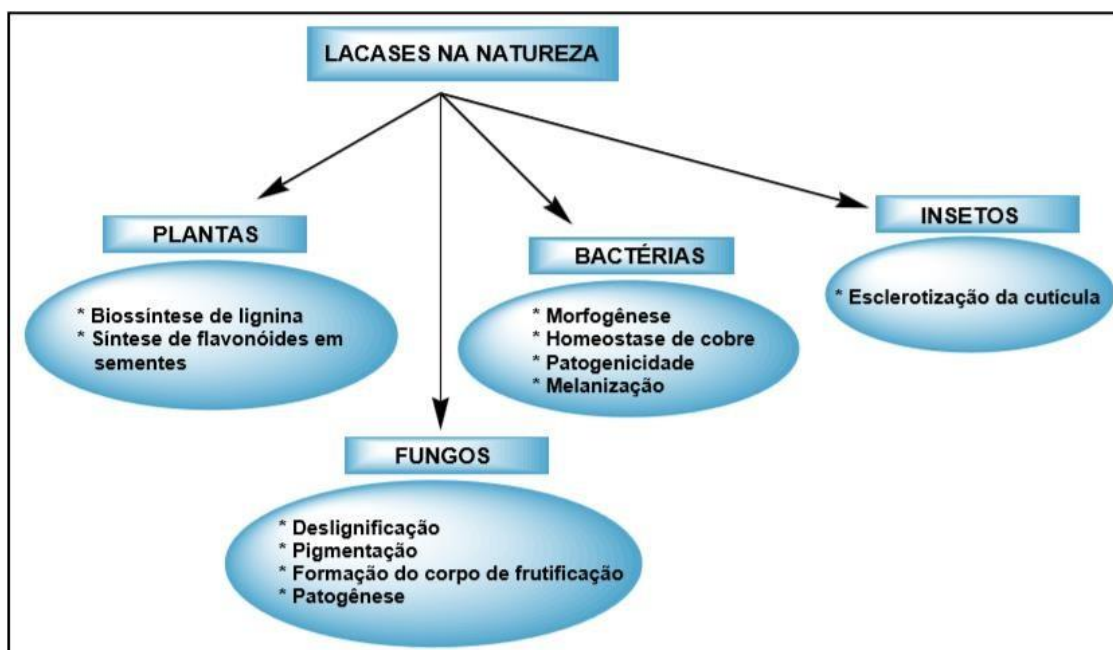
Lacases (EC 1.10.3.2, *p*-difenoil: oxigênio oxidoreductase) são enzimas multicúpricas, que catalisam a redução do oxigênio molecular à água com a abstração simultânea de um elétron de um substrato doador na forma reduzida, que por sua vez é oxidado (BALDRIAN, 2006; CANNATELLI & RAGAUSKAS, 2017). Essas enzimas catalisam a síntese de diferentes compostos fenólicos, como *orto* e *para*-difenois, aminofenois, polifenois, poliaminas, bem como de alguns não fenólicos quando na presença de mediadores químicos (CANNATELLI & RAGAUSKAS, 2017; MOGHARABI & FARAMARZI, 2014; NAVARRA et al., 2010). As lacases são, portanto, biocatalisadores ideais para processos tecnológicos verdes, considerando que a água é o único subproduto formado.

A primeira descrição de uma lacase foi feita em 1883 por Yoshida, a qual foi isolada no Japão a partir da seiva da laca de *Rhus vernicifera* (YOSHIDA, 1883). Em 1896, as primeiras lacases fúngicas foram descobertas, sendo estas as que prevalecem entre as lacases caracterizadas na última década (BERTRAND, 1896). A literatura científica descreve mais de 100 lacases fúngicas, derivadas de espécies de fungos ascomicetos e basidiomicetos como enzimas intracelulares e extracelulares (BALDRIAN, 2006). A maioria das lacases investigadas são derivadas de basidiomicetos, são extracelulares, monoméricas e proteínas glicosiladas (RIVA, 2006). Além de serem amplamente distribuídas em fungos e plantas superiores, nos últimos anos as lacases também foram detectadas em bactérias, esponjas, algas e insetos (MATE & ALCALDE, 2017; OTTO; SCHLOSSER & REISSER, 2010).

A função biológica exercida pelas lacases é definida pela sua origem, bem como pelo estágio de vida dos organismos que as produzem (Mate & Alcalde, 2017). As lacases fúngicas são responsáveis pela deslignificação, formação de corpo de frutífero, pigmentação, morfogênese e síntese de substâncias húmicas no solo (DWIVEDI et al., 2011; GIANFREDA; XU & BOLLAG, 1999; THURSTON, 1994). Nas plantas, essas enzimas contribuem na biossíntese de lignina (MAYER & STAPLES, 2002). As lacases bacterianas participam da morfogênese, oxidação de toxinas, pigmentação e proteção contra a radiação UV e agentes oxidantes (SHARMA; GOEL & CAPALASH, 2007; SINGH et al., 2011). Com exceção das

lacases fúngicas, as demais isoformas de lacases atuam em reações de polimerização na natureza (Figura 1) (SHARMA et al., 2018).

Figura 1 – Ocorrência e o papel de lacases na natureza



Fonte: Sharma et al. 2018

1.2 ESTRUTURA E CICLO CATALÍTICO DE LACASES

As lacases fúngicas são normalmente proteínas monoméricas com peso molecular de 60-70 KDa, com uma extensão glicosilada entre 10 a 25% de carboidratos (BALDRIAN, 2006). Os carboidratos estão ligados à cadeia polipeptídica através de ligações covalentes com o nitrogênio, tendo como finalidade o aumento da termoestabilidade da enzima e a proteção contra a proteólise (SLOMCZYNSKI; NAKAS & TANENBAUM, 1995; YOSHITAKE et al., 1993). As estruturas tridimensionais das lacases tem sido obtidas a partir dos cristais das respectivas enzimas purificadas. A Figura 2 apresenta a estrutura tridimensional da lacase do fungo *Trametes versicolor* (PIONTEK; ANTORINI & CHOINOWSKI, 2002).

O sítio ativo de lacases é formado, geralmente, por quatro íons de cobre, denominados cobre tipo 1 (T1), cobre tipo 2 (T2) e dois íons de cobre tipo 3 (T3), onde T2 e T3 formam um “cluster” trinuclear (CTN), Figura 3 (REINHAMMAR B., 1981). Nas lacases fúngicas, o cobre T1 apresenta geometria trigonal planar, coordenado com um átomo de enxofre de um resíduo de cisteína (Cys) e a átomos

de nitrogênio de dois resíduos de histidina (His) (GIARDINA et al., 2010b). No caso de lacases não fúngicas, um quarto ligante, normalmente uma metionina (Met) axial, pode estar presente. Na maioria das lacases fúngicas não há um ligante axial no cobre T1, e esta ausência é compensada por uma ligação mais forte entre cobre e Cys (PALMER et al., 1999). Este átomo de cobre é responsável por atribuir a típica coloração azul das proteínas multicúpricas, em função da sua forte absorção em torno de 600 nm proporcionada pela transferência de carga do enxofre presente no resíduo de Cys para o íon de cobre (LEE et al., 2002). Os íons de cobre T2 e T3 possuem uma geometria triangular, onde cada íon T3 está coordenado a três resíduos de His, os quais são ligados através de um hidróxido e absorvem em aproximadamente 330 nm. O cobre T2, é coordenado a dois resíduos de His, à uma molécula de água e apresenta fraca absorção na região do visível (PIONTEK; ANTORINI & CHOINOWSKI, 2002).

Figura 2 – Estrutura tridimensional de lacase de *Trametes versicolor*. A proteína representada pela fita (azul), os íons de cobre como esferas (rosa) e os carboidratos como linhas (verde/azul/vermelho). Imagem criada com *PyMol* do arquivo 1GYC de livre acesso no PDB



Fonte: Cannatelli & Ragauskas 2017

taxa de transferência de elétrons, sendo este o passo limitante do ciclo catalítico (XU, 1996). As lacases podem ser delimitadas de acordo com o E° que apresentam, podendo ser de baixo potencial redox (0,4 a 0,6 V) como por exemplo lacases de *Thermphila myceliophthora* e *Coprinus cinereus* (0,45 V) ou de alto potencial redox (0,6 a 0,8 V) como é o caso de *Trametes villosa*, *Trametes versicolor* (0,79 V) e *Pycnoporus cinnabarinus* (0,75 V) (GIANFREDA; XU & BOLLAG, 1999; MOROZOVA et al., 2007). Os potenciais redox de lacases fúngicas variam entre 0,44 e 0,79 V versus um eletrodo normal de hidrogênio (NHE) e geralmente são maiores do que as lacases de origem bacteriana e vegetal (XU et al., 1996).

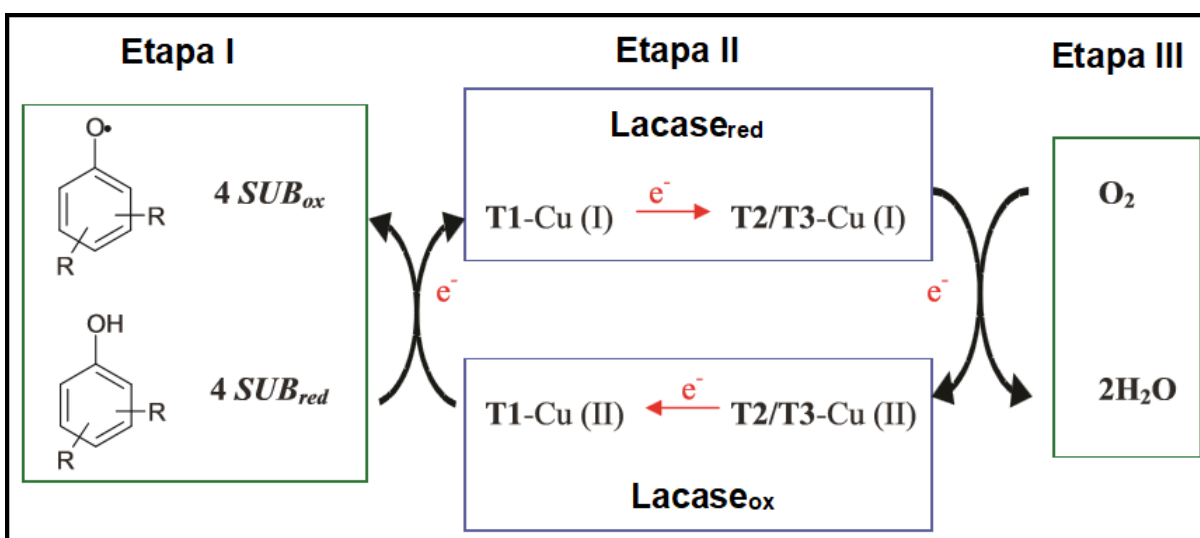
Estudos mostram que o potencial redox de uma lacase pode ter relação com a distância interatômica do cobre T1 e seus ligantes coordenados. Para lacases fúngicas, quanto maior a distância entre os ligantes de coordenação e o cobre T1, maior o valor do E° (GARAVAGLIA et al., 2004; PIONTEK; ANTORINI & CHOINOWSKI, 2002). Assim, lacases com alto E° possuem uma distância alongada entre o cobre T1 e o átomo de nitrogênio de um resíduo de His. A razão para esta distância alongada, seria uma ligação de hidrogênio entre o resíduo de His e resíduos de Glu ou serina (Ser) altamente conservados, localizados na mesma hélice que o resíduo de His, deixando este último mais afastado do cobre T1 (CANNATELLI & RAGAUSKAS, 2017). Tem sido postulado que a distância alongada entre o íon cobre e o átomo de nitrogênio da His faz com que o íon de cobre fique deficiente em elétrons, uma vez que, a contribuição do par de elétrons isolados do nitrogênio é menor, causando a desestabilização do estado de oxidação maior, aumentando então o E° (PIONTEK; ANTORINI & CHOINOWSKI, 2002).

O mecanismo redox da catálise por lacase para substratos fenólicos está apresentado na Esquema 1 (POLAK & JAROSZ-WILKOLAZKA, 2012). A primeira etapa descreve a oxidação de quatro moléculas do substrato pelo cobre T1, sendo este reduzido de Cu (II) para Cu (I). Na segunda etapa ocorre a transferência de elétrons do cobre T1 para o “cluster” trinuclear T2/T3, que tem seus íons cobre reduzidos. Na última etapa o CTN T2/T3 na sua forma reduzida é responsável pela redução do oxigênio molecular e a liberação de água.

Através de técnicas espectroscópicas foram elucidados o ciclo catalítico, as estruturas geométricas e eletrônicas de intermediários envolvidos na oxidação por lacase (Figura 4) (CANNATELLI & RAGAUSKAS, 2017; SOLOMON; AUGUSTINE & YOON, 2008). A oxidação dos substratos ocorre a partir de um

mecanismo concertado de transferência de elétrons e prótons (GALLI et al., 2013). Visto que o cobre T1 é um aceptor de elétrons do substrato, estes elétrons podem ser transferidos para o CTN T2/T3 de duas formas diferentes: através de um tripeptídeo His-Cys-His altamente conservado ou através do espaço (BERTRAND et al., 2002).

Esquema 1 – Mecanismo redox proposto para a catálise por lacase para a oxidação de substratos fenólicos



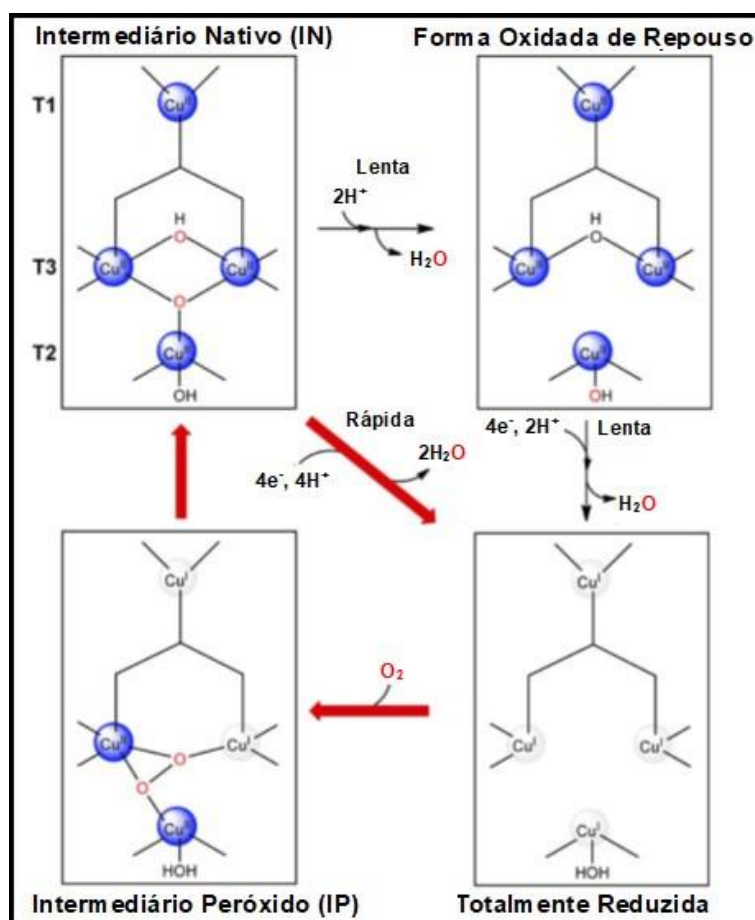
Fonte: Polak & Jarosz-Wilkolazka 2012

O intermediário nativo (IN) mostrado na Figura 4 é a forma totalmente oxidada da enzima, com todos os íons de cobre do “cluster” trinuclear T2/T3 conectados, o que permite a transferência de elétrons para todos estes íons (LEE et al., 2002). Na presença de um substrato fenólico, este intermediário nativo atua como um aceptor de elétrons, recebendo quatro elétrons, reduzindo desta forma todos os íons Cu (II) para íons Cu (I), liberando simultaneamente duas moléculas de água com a ajuda de quatro prótons. Dados espectroscópicos indicam que o primeiro íon de cobre a ser reduzido no CTN é um dos íons T3, seguido pelo íon T2 e por último o outro íon T3. Não havendo nenhum outro íon de cobre para transferir o quarto elétron adquirido o íon T1 permanece na forma reduzida (YOON et al., 2007).

A etapa seguinte do ciclo catalítico envolve a reação entre a enzima totalmente reduzida com a molécula de oxigênio. O “cluster” trinuclear totalmente

reduzido reage com o oxigênio molecular em duas etapas sequenciais envolvendo dois elétrons cada. Primeiramente a molécula de oxigênio é ligada ao CTN, seguido da transferência imediata de dois elétrons, sendo um elétron para o íon cobre T2 e o segundo para um íon T3, levando a um intermediário peróxido (IP). Neste intermediário formado, um átomo de oxigênio está ligado a um íon de cobre T3 e T2, o outro átomo de oxigênio se encontra coordenado com o outro íon T3. O intermediário peróxido sofre um segundo processo de transferência de dois elétrons, um elétron para o íon cobre T3 e outro para o íon T1, e a ligação oxigênio-oxigênio é clivada produzindo a forma totalmente oxidada, intermediário nativo, completando desta forma o ciclo catalítico (CANNATELLI & RAGAUSKAS, 2017). Quando não há substrato redutor presente, o intermediário nativo passa para uma forma oxidada de repouso, que não faz parte do ciclo catalítico (YOON et al., 2007).

Figura 4 – Ciclo catalítico de lacases. As setas vermelhas indicam etapas do ciclo catalítico enquanto que as setas pretas indicam a redução da enzima de repouso para entrar no ciclo catalítico



Fonte: Cannatelli & Ragauskas 2017

O intermediário nativo (NI) pode ser convertido lentamente a uma forma oxidada de “repouso” quando não está na presença do substrato redutor. Nesta forma, os íons de cobre T2 estão isolados dos íons binucleares T3. O cobre T1 da forma oxidada de repouso pode ser reduzido por um substrato. No entanto, a taxa de transferência de elétrons para o CTN T2/T3 é muito baixa para ser significativa para a catálise enzimática, assim esta forma de repouso da enzima não faz parte do ciclo catalítico (YOON et al., 2007).

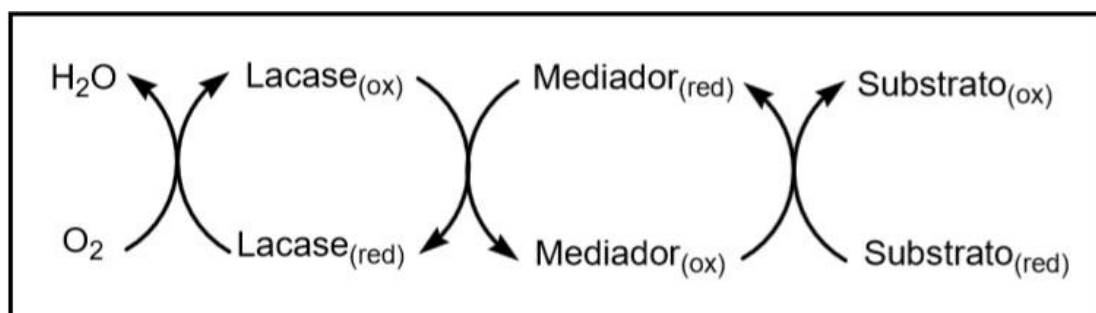
1.3 MEDIADORES DE LACASE

As lacases podem catalisar a oxidação de uma variedade de compostos, incluindo *orto* e *para*-benzenodióis, polifenóis, aminofenóis, lignina e arildiaminas (MAYER & STAPLES, 2002; RIVA, 2006). O alcance das oxidações catalisadas por estas enzimas pode ser aumentado visto que elas poderão atuar em substratos não convencionais. Dentre estes substratos estão compostos não fenólicos, aqueles com elevado potencial redox ou muito volumosos para penetrar no sítio ativo da enzima. Nos casos em que o efeito catalítico da lacase se mostra insuficiente, a oxidação dos substratos pode ocorrer com o auxílio de um mediador químico, através de um sistema lacase-mediador (SLM) (GIARDINA et al., 2010b; RIVA, 2006). Este sistema utiliza moléculas orgânicas de baixo peso molecular que aumentam a especificidade da enzima pelo substrato e o potencial de alcance da lacase. Os mediadores atuam como intermediários entre o substrato e a enzima possibilitando que esta oxide indiretamente o substrato. O mediador é rapidamente oxidado pela lacase, formando um cátion radical altamente reativo, de alto potencial redox, que atua na transferência de elétrons entre a enzima e o substrato alvo (Esquema 2) (MOROZOVA et al., 2007). Uma vez oxidado pela lacase, o mediador deve ser estável o suficiente para se difundir no meio reacional e reagir com o substrato alvo (GIARDINA et al., 2010b; RIVA, 2006).

A degradação de lignina promovida por lacases só é possível por via do sistema lacase-mediador. Em decorrência do impedimento estérico da molécula de lignina, esta é impedida de acessar o sítio ativo da enzima, não sendo viável a oxidação pela lacase de forma convencional (STRONG & CLAUS, 2011). Lacases não conseguem oxidar diretamente substratos com elevado potencial redox, como é o caso de compostos não fenólicos. O cobre T1 no sítio ativo da lacase tem

potencial redox de aproximadamente 470-790 mV, mas o uso de um mediador eleva a capacidade de oxidação da enzima, permitindo a oxidação de compostos com potencial redox superiores a 1100 mV (KUNAMNENI et al., 2008).

Esquema 2 – Mecanismo redox catalisado por lacase na presença de mediador químico



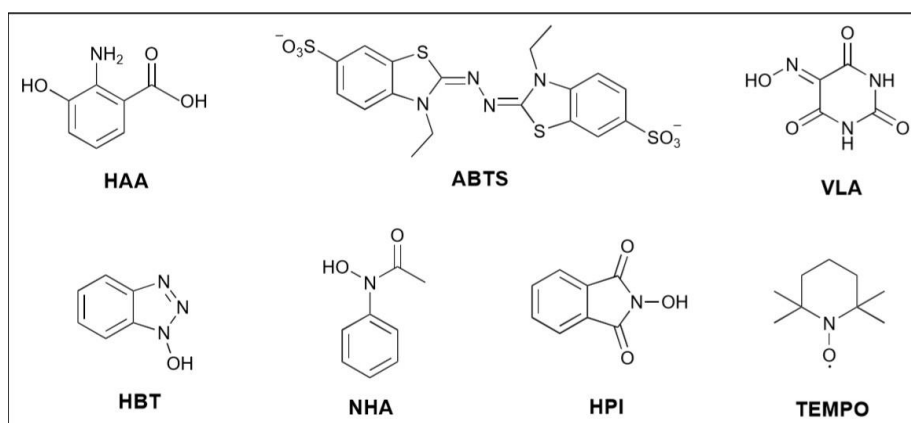
Fonte: Riva 2006

Um mediador perfeito para a lacase pode ser descrito como uma molécula pequena, que seja um bom substrato para a lacase, que apresente estabilidade, não provoque inibição da ação enzimática e que possa realizar vários ciclos de oxidação sem ser degradado ou sem reações colaterais (GIARDINA et al., 2010b). Os mediadores podem ser naturais ou derivados sintéticos. Os mediadores naturais se assemelham estruturalmente aos produtos de degradação da lignina. O primeiro mediador natural relatado para lacases foi o ácido 3-hidroxiantranílico (HAA) (Figura 5). Alguns mediadores sintéticos comuns que tem sido descritos incluem: o ácido 2,2'-azino-bis[3-etil-benzotiazolino-6-sulfônico] (ABTS), os mediadores do tipo *N*-hidroxi (N-OH), tais como ácido violúrico (VLA), *N*-hidroxibenzotriazol (HBT) *N*-acetil-*N*-fenil-hidroxilamina (NHA), e *N*-hidroxiftalimida (HPI) e o radical 2,2,6,6-tetrametil-1-piperidinoxil (TEMPO) (Figura 5) (ASTOLFI et al., 2005).

Os mecanismos de oxidação pelos quais os sistemas lacase-mediador atuam são diferentes, dependendo da estrutura do mediador. Para o sistema Lacase/ABTS, a oxidação do substrato-mediador ocorre por transferência de elétrons, e a oxidação do ABTS acontece em duas etapas (Esquema 3). A primeira etapa é rápida, e leva ao cátion radical ($\text{ABTS}^{\cdot+}$), seguida de uma etapa lenta de oxidação do cátion radical ao dicátion ABTS^{2+} (BOURBONNAIS; LEECH & PAICE, 1998). Em seu trabalho de análise eletroquímica das interações de mediadores de lacases com compostos modelo de lignina, Bourbonnais e colaboradores (1998)

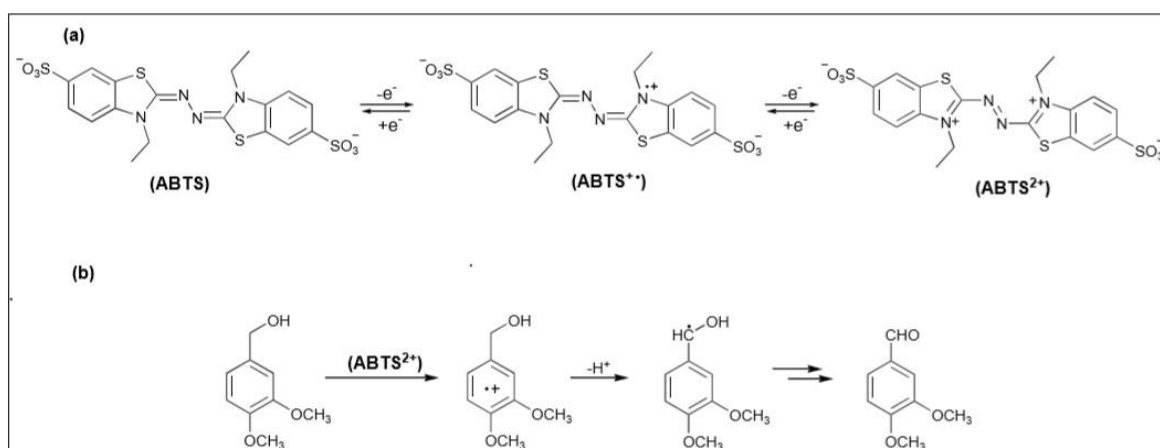
relataram que a oxidação pelo cátion radical ($\text{ABTS}^{\bullet+}$) é limitada a grupos fenólicos, enquanto que o dicátion ABTS^{2+} é indispensável para a oxidação de compostos aromáticos não fenólicos. Estudos de voltametria cíclica usando álcool veratrílico (Esquema 3b), como modelo de lignina aromático não fenólico, mostraram que o ABTS precisa ser oxidado ao dicátion ABTS^{2+} para promover a oxidação deste composto. Para o álcool vanílico, um modelo fenólico de lignina, os dados indicam que durante a catálise não houve completa regeneração do ABTS no eletrodo, e uma certa proporção dos cátions radicais ($\text{ABTS}^{\bullet+}$) possivelmente se acoplaram aos radicais vanílico também formados, como sugerido pela ausência do pico de oxidação do dicátion ABTS^{2+} .

Figura 5 – Estrutura química de mediadores de lacases



Fonte: o próprio autor

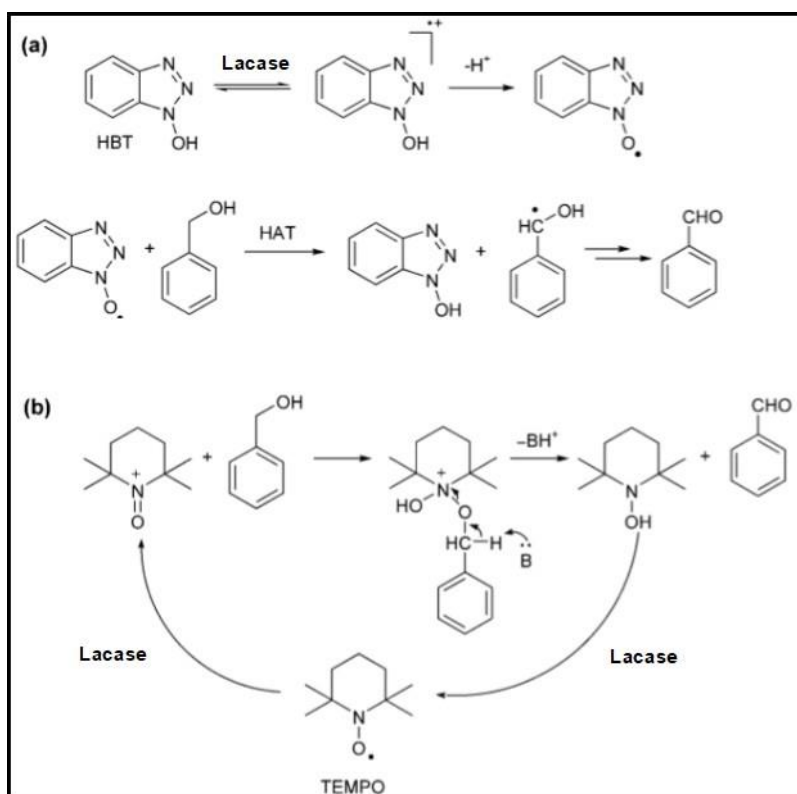
Esquema 3 – Oxidação de um composto modelo de lignina não fenólico (álcool veratrílico) pelo sistema Lacase/ABTS. **(a)** Oxidação do ABTS na presença de lacase. **(b)** Oxidação do álcool veratrílico pelo mediador



Fonte: o próprio autor

Os mediadores do tipo *N*-hidroxi (N-OH), tal como o HBT, promovem a oxidação de substratos não fenólicos por um mecanismo de transferência de átomos de hidrogênio (HAT) (Esquema 4a) (BOURBONNAIS; LEECH & PAICE, 1998). A oxidação deste tipo de mediadores por lacase forma um radical nitroxil altamente reativo ($>N-O^{\bullet}$), como resultado da remoção de um elétron seguido de liberação de um próton. A oxidação de substratos não fenólicos pelo mediador TEMPO é resultado de um mecanismo iônico (Esquema 4b) (FABBRINI; GALLI & GENTILI, 2002). Neste caso, o íon oxoamônio gerado pela oxidação do TEMPO pela lacase, é responsável pela oxidação do substrato. Após esta oxidação inicial, o íon oxoamônio sofre um ataque nucleofílico do par de elétrons não compartilhado do átomo de oxigênio da molécula do álcool, formando um aduto. Na sequência, a desprotonação do aduto a partir da forma básica do tampão, dá origem ao TEMPO na sua forma reduzida e ao produto carbonílico. Na última etapa a forma oxidada de TEMPO é regeneranda. Assim, a lacase atua como um oxidante catalítico do TEMPO (D'ACUNZO et al., 2002; FABBRINI; GALLI & GENTILI, 2002).

Esquema 4 – Oxidação de compostos não fenólicos pelo sistema lacase-mediador via oxidação por **(a)** transferência de átomos de hidrogênio e **(b)** mecanismo iônico



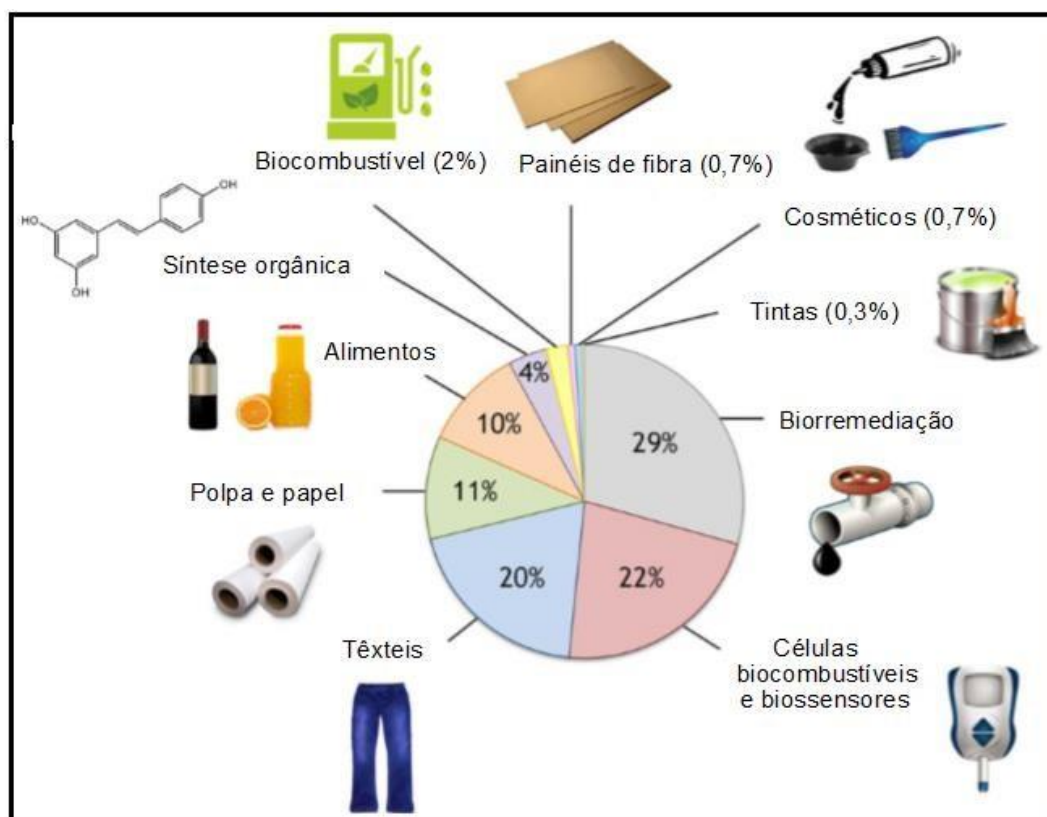
Fonte: Witayakrana & Ragauskas 2009

De acordo com estudos de Fabbrini e colaboradores (2002), no qual foi investigada a habilidade relativa de diferentes sistemas lacase-mediadores, usando o álcool 4-metoxibenzílico como substrato de referência para a oxidação, o mediador TEMPO foi o mais eficiente. Os mediadores ABTS e TEMPO apresentam potenciais redox suficientemente elevados, podendo realizar múltiplos eventos catalíticos sem degradação química (MOROZOVA et al., 2007).

1.4 APLICAÇÕES DE LACASES

As lacases são mencionadas comumente no plural, em virtude das várias isoformas isoladas das mais diferentes fontes; e também por apresentarem diferentes potenciais de usos. Várias aplicações biotecnológicas tem sido descritas para lacases, como por exemplo, em indústrias de alimentos, têxteis, de celulose e papel, de biocombustíveis, de cosméticos, em processos de biorremediação e em síntese orgânica (Figura 6) (MATE & ALCALDE, 2017).

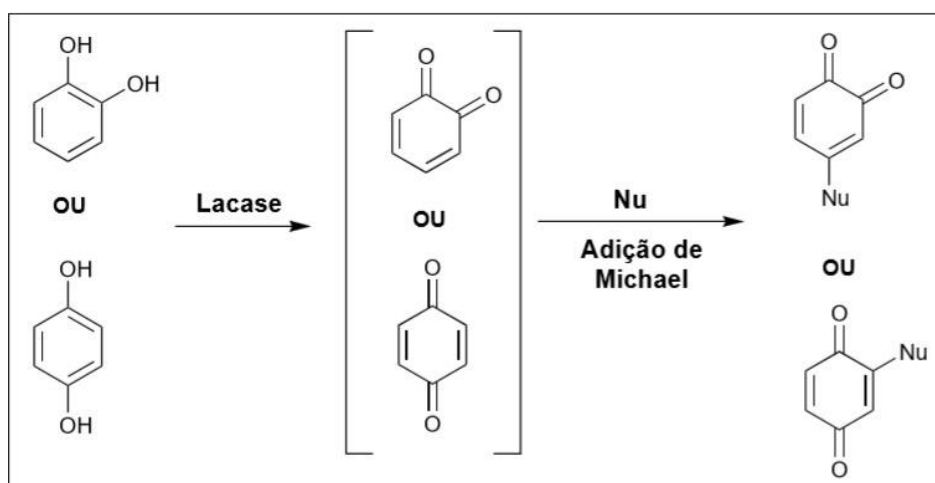
Figura 6 – Distribuição das aplicações biotecnológicas das lacases. Dados obtidos da pesquisa no banco de dados Scopus



Fonte: Mate & Alcalde 2017

A aplicação de lacases em síntese orgânica ainda é muito pouco explorada, cerca de 4%, de acordo com uma pesquisa no banco de dados Scopus, na qual a maior parte é direcionada para biorremediação, células biocombustível, biossensores e indústria têxtil (MATE & ALCALDE, 2017). Entretanto, uma ampla variedade de produtos de oxidação podem ser obtidos usando estas enzimas de diferentes fontes, uma vez que podem oxidar diferentes grupos funcionais e promover acoplamentos oxidativos de substratos ricos em elétrons. Uma das abordagens reacionais explora a formação de moléculas altamente reativas pela oxidação enzimática, seguida de reações não enzimáticas num processo em cascata. Assim, núcleos quinóides derivados de compostos *orto* ou *para*-diidroxilados, formados pela oxidação por lacase, reagem com nucleófilos via adição de Michael para formar o produto desejado (Esquema 5). Neste caso, o intermediário quinona atua como um aceptor de Michael, enquanto o nucleófilo age como um doador de Michael. Esta estratégia sintética permite a obtenção do produto final por uma metodologia *one pot*, permitindo melhor eficiência da reação, eliminando processos de purificação e aumentando o rendimento reacional.

Esquema 5 – Formação de intermediários quinona mediada por lacase com reação adicional de nucleófilo via adição de Michael

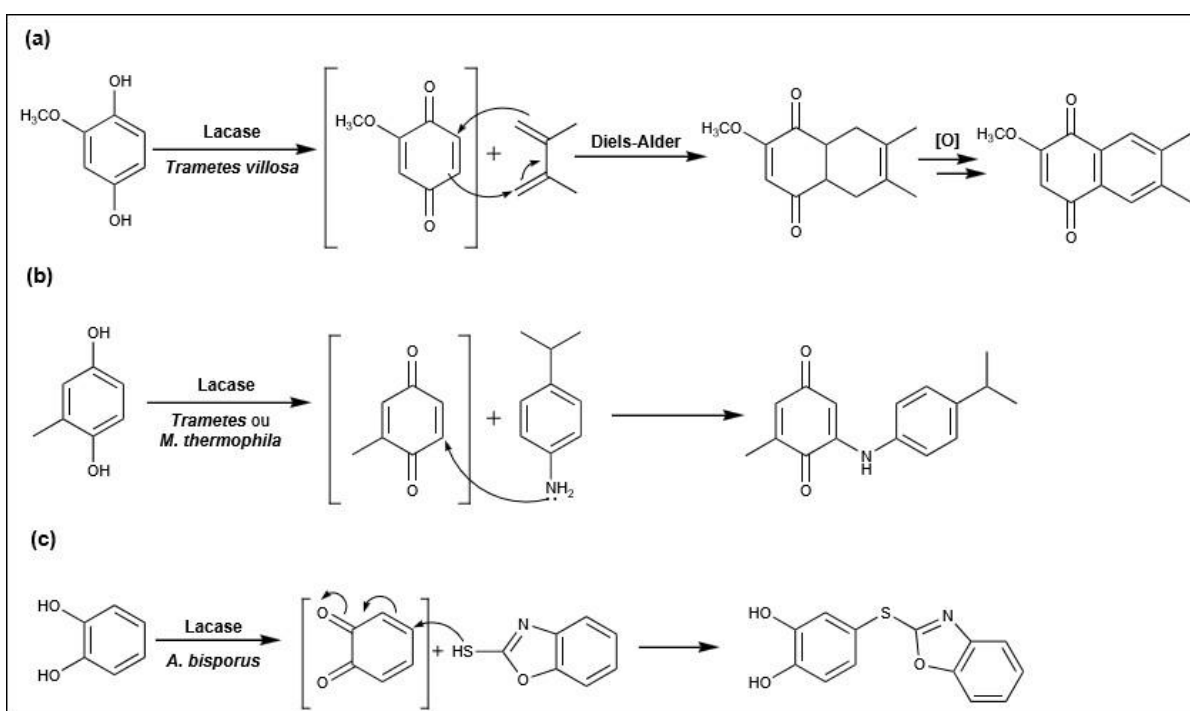


Fonte: o próprio autor

O método de obtenção de quinonas a partir de lacases, seguido de uma adição de Michael, permite a obtenção de uma variedade de compostos através da formação de ligações C–C, C–N, C–O e C–S. A síntese de uma *o*-naftoquinona foi realizada pela oxidação de uma hidroquinona, catalisada por lacase de *Trametes*

villosa, produzindo um intermediário quinona, seguido de uma reação de Diels-Alder com um dieno, resultando na formação da ligação C–C (Esquema 6a) (WITAYAKRAN & RAGAUSKAS, 2007; WITAYAKRAN; ZETILI & RAGAUSKAS, 2007). A obtenção de aminoquinonas catalisada por lacases de *Myceliophthora thermophila* e *Trametes sp.*, foi possível pelo acoplamento C–N do intermediário quinona e de uma amina (Esquema 6b) (NIEDERMEYER; MIKOLASCH & LALK, 2005). A reação catalisada por lacase de *A. bisporus* entre o catecol e o tiol 2-mercaptobenzoxazol, promoveu a formação de tioéteres de catecol sob condições reacionais suaves (Esquema 6c) (ABDEL-MOHSEN; CONRAD & BEIFUSS, 2014). Tioéteres derivados do catecol apresentam várias atividades biológicas, como antioxidante e antibacteriana, atraindo interesse para a sua síntese.

Esquema 6– Exemplos de aplicações sintéticas de lacases. **(a)** Síntese de o-naftoquinona **(b)** Síntese de aminoquinonas **(c)** Síntese de tio éteres de catecol

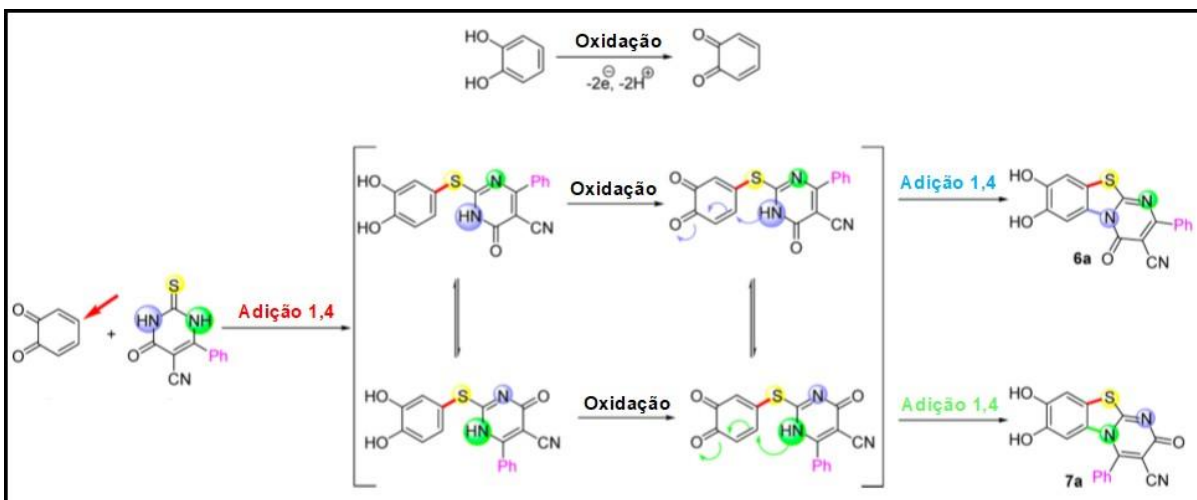


Fonte: o próprio autor

A síntese de compostos heterocíclicos também é possível pela catálise da lacase. Estes compostos são na sua maioria biologicamente ativos, e a obtenção seletiva e eficiente dos mesmos é um desafio na síntese orgânica. A reação em cascata baseada na combinação da oxidação de catecóis catalisada por lacase para a obtenção da correspondente o-benzoquinona, e sua reação com o

tioxo-5-pirimidinocarbonitrilos proporciona a síntese de derivados de pirimidobenzotiazol (Esquema 7) (ABDEL-MOHSEN; CONRAD & BEIFUSS, 2014).

Esquema 7 – Síntese de derivados de pirimidobenzotiazol catalisada por lacase de *A. bisporus*

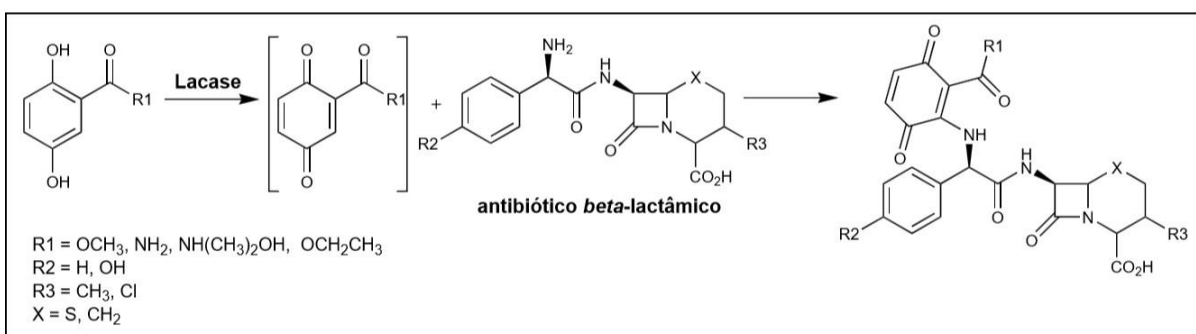


Fonte: Abdel-Mohsen, Conrad & Beifuss 2014

Reações de acoplamento cruzado entre compostos fenólicos e diferentes moléculas também podem ser catalisadas por lacases. A oxidação do substrato fenólico é catalisado por lacase, levando à formação de um cátion radical (THURSTON, 1994), que pode sofrer reações não enzimáticas proporcionando a formação de diferentes compostos. Na derivatização do ácido diidrocafeico com aminas na presença de lacase de *Pycnoporus cinnabarinus* (Esquema 8), a formação do produto ocorreu pelo acoplamento da amina com o cátion radical (MIKOLASCH et al., 2002; PILZ et al., 2003).

A derivatização de aminoácidos também pode ser catalisada por lacases. Derivados de aminoácidos podem ser usados como componentes ativos para produtos farmacêuticos. A derivatização do aminoácido L-triptofano com o 2,5-diidroxil-N-(2-hidroxi-etil)-benzamida, catalisada por lacase de *Pycnoporus cinnabarinus*, resultou em um produto de monoaminação (Esquema 9) (MANDA et al., 2006). Este derivado é formado a partir da oxidação por lacase do substrato fenólico dihidroxilado, que é convertido em uma quinona, que sofre um ataque nucleofílico do grupo amino do L-triptofano.

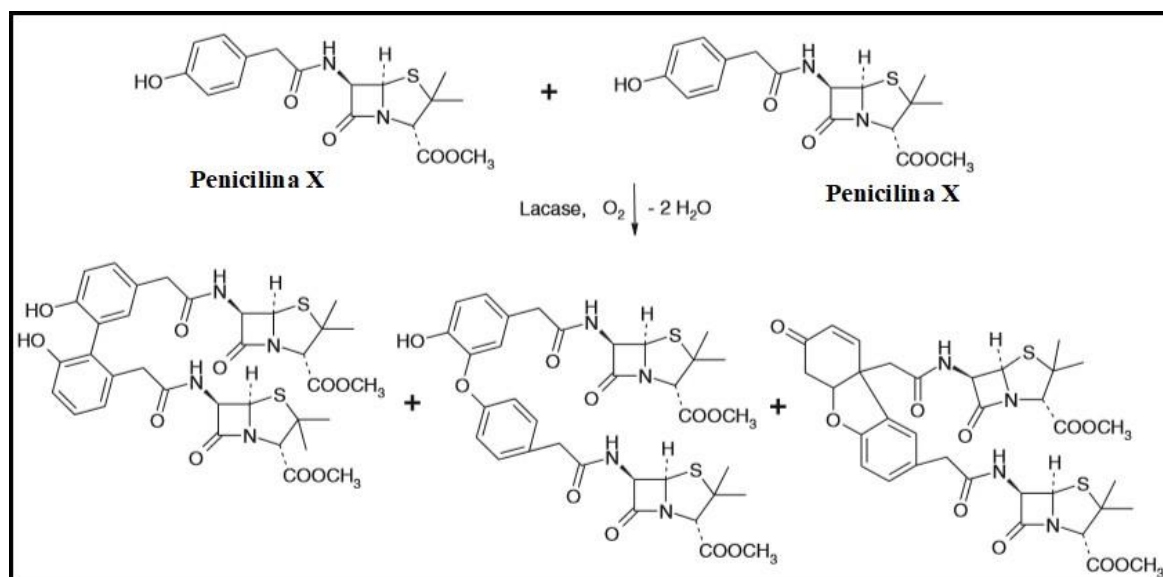
Esquema 10– Síntese de cefalosporinas catalisadas por lacase de *Trametes* sp. e *Myceliophthora thermophila*



Fonte: Mikolasch et al. 2007

Os acoplamentos oxidativos C–C e C–O entre compostos fenólicos podem levar a formação de dímeros de homoacoplamento. Na dimerização de derivados de penicilina X catalisados por lacase de *Tametes versicolor*, o acoplamento de duas moléculas de um antibiótico contendo uma porção fenólica deu origem aos produtos de acoplamento C–C e C–O (Esquema 11) (Agematu et al, 1993).

Esquema 11 – Dimerização de derivados de penicilina X catalisada por lacase de *Tametes versicolor*

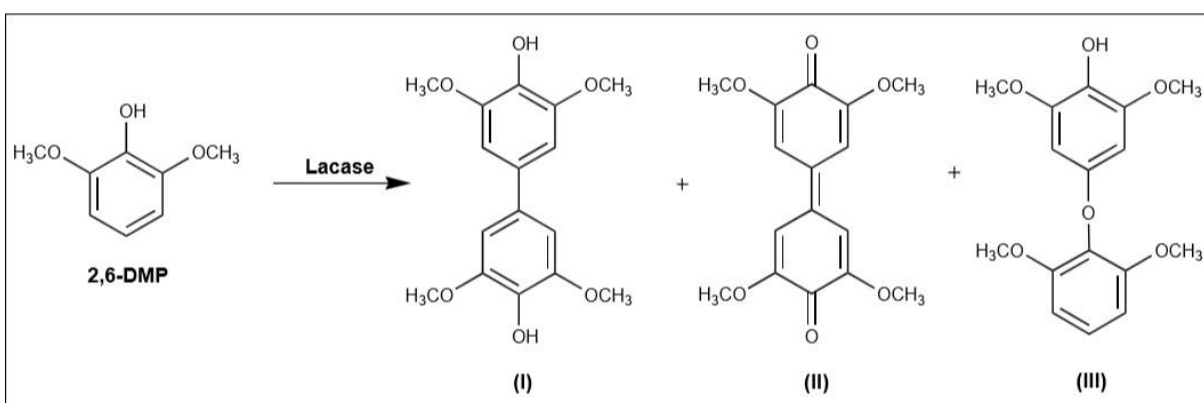


Fonte: Mikolasch & Schauer 2009

O acoplamento oxidativo de derivados fenólicos é uma etapa fundamental na biossíntese de compostos naturais como lignina, lignanas,

flavonolignanas e alcalóides (GAVEZZOTTI et al., 2011). A síntese de bifenois e seus derivados tem recebido atenção, uma vez que são encontrados nas estruturas químicas de moléculas naturais bioativas e sintéticas (QUIDEAU & FELDMAN, 1996b; VON NUSSBAUM et al., 2006). Compostos diméricos tais como o bifenol, 3,3',5,5'-tetrametoxibifenil-4,4'-diol (TMBP) (I), a difenilquinona, 3,3',5,5'-tetrametoxidifenilquinona (II) e o 4-(2,6-dimetoxi-fenoxi)-2,6-dimetoxifenol (III) tem sido relatados como produtos obtidos pela oxidação do 2,6-DMP catalisada por lacases (Esquema 12) (ADELAKUN et al., 2012a; KALLIO et al., 2009; WAN; DU & MIYAKOSHI, 2008).

Esquema 12 – Dimerização do 2,6-dimetoxifenol (2,6-DMP) catalisada por lacase



Fonte: o próprio autor

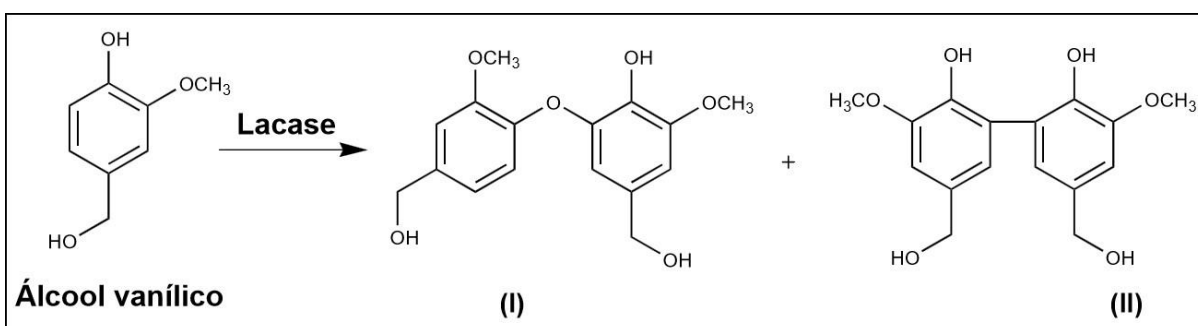
A literatura científica relata que os diferentes produtos diméricos de acoplamento oxidativo carbono-carbono (C–C) do 2,6-DMP podem ser obtidos de acordo com a fonte de lacase usada, bem como com os parâmetros das condições de reação (LLEVOT et al., 2016). Por exemplo, o pH e o solvente podem influenciar na síntese de 3,3', 5,5'-tetrametoxidifenoquinona a partir de lacases de várias fontes: *Melanocarpus albomyces* (pH 4,2) (KALLIO et al., 2009); *Pyricularia oryzae* (pH 5,0) (SOLANO et al., 2001); *Trametes versicolor* (acetona/tampão acetato pH 5,0) (LLEVOT et al., 2016); *T. versicolor* e *Pseudomonas lemonnierii* (pH 5,2) (BETTS & KING, 1991); e *Myceliophthora thermophila* (N51003) produzida por *Aspergillus oryzae* geneticamente modificado (pH 7,0) (ENGELMANN; ILLNER & KRAGL, 2015). Uma preparação com lacase de *Rhus vernicifera* e *Pycnoporus coccineus* em solventes orgânicos (WAN; DU & MIYAKOSHI, 2008), e *T. pubescens* em tampão

acetato pH 5,0 (ADELAKUN et al., 2012a), promoveu a síntese do 3,3',5,5'-tetrametoxibifenil-4,4'-diol a partir do 2,6-DMP.

Existe apenas um único relato na literatura sobre a síntese catalisada por lacase do dímero de acoplamento carbono-oxigênio (C–O), o 4-(2,6-dimetoxi-fenoxi)-2,6-dimetoxifenol, a partir de 2,6-DMP (KALLIO et al., 2009). Neste caso, os cristais de lacase de *M. albomyces* foram embebidos em solução de 2,6-DMP a pH 4,2 e o produto formado foi encontrado na interface do cristal.

Estudos com compostos fenólicos diferentes do 2,6-DMP catalisados por lacases demonstraram de forma similar que o pH do meio reacional, bem como o tempo, fonte de enzimas e solventes influenciaram os produtos de acoplamento oxidativo formados (LLEVOT et al., 2016). A oxidação do álcool vanílico catalisado por lacases de *T. villosa* e *M. thermophile* nos valores de pH 5,0 e 7,5, levou à síntese de dois dímeros através de acoplamento C–O (I) e C–C (II) (Esquema 13) (ARESKOGH et al., 2010). Houve, no entanto, uma variação na distribuição dos produtos de oxidação de acordo com o pH do meio de reação. O produto de acoplamento C–C foi preferencialmente formado no pH mais baixo (5,0). Quando se utilizou a lacase de *M. albomyces* a pH 4,5 a 7,5, o principal produto de oxidação observado do álcool vanílico foi o dímero de acoplamento C–C (LAHTINEN et al., 2013). Uma diminuição na quantidade deste dímero, bem como nos outros produtos de oxidação formados, foi observada com o aumento do pH. As lacases de *Rhizoctonia praticola* e *T. versicolor*, a pH 3,5 e 6,9, promoveram a síntese de diferentes dímeros de oxidação a partir de ácido sirínico e ácido vanílico, em valores de pH ácido e neutro, porém produziram os mesmos produtos em um valor de pH ajustado (LEONOWICZ & EDGEHILI, 1984).

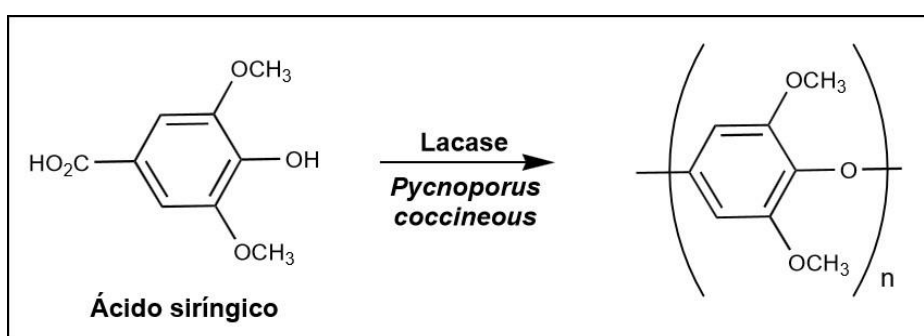
Esquema 13 – Dimerização do álcool vanílico catalisada por lacase



Fonte: o próprio autor

Os compostos poliméricos também podem ser obtidos por meio de reações de acoplamento catalisadas por enzimas, dependendo da natureza das polifenóis oxidases e das condições de reação (SU et al., 2017). Por exemplo, foi descrito que uma preparação de lacase bruta de *Pycnoporus coccineus* polymerizou o ácido siríngico (um fenol estruturalmente semelhante ao 2,6-DMP) à poli (óxido de fenileno) substituído com grupos 2,6-dimetoxi (Esquema 14) (IKEDA; UYAMA & KOBAYASHI, 1996).

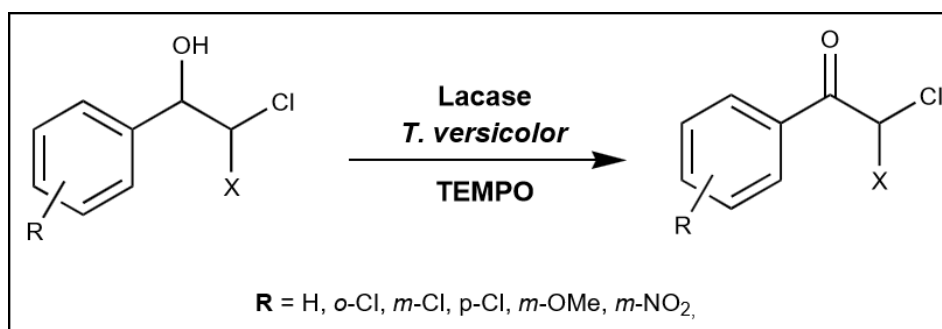
Esquema 14 – Polimerização oxidativa do ácido siríngico catalisada por lacase



Fonte: o próprio autor

A oxidação de compostos que não são considerados substratos de lacases, pode ser alcançada usando o sistema lacase-mediador. Álcoois secundário α,α -di-halogenados puderam ser oxidados para suas cetonas correspondentes, usando condições suaves e limpas, quando empregado o sistema Lacase/Tempo (Esquema 15) (KEDZIORA et al., 2014).

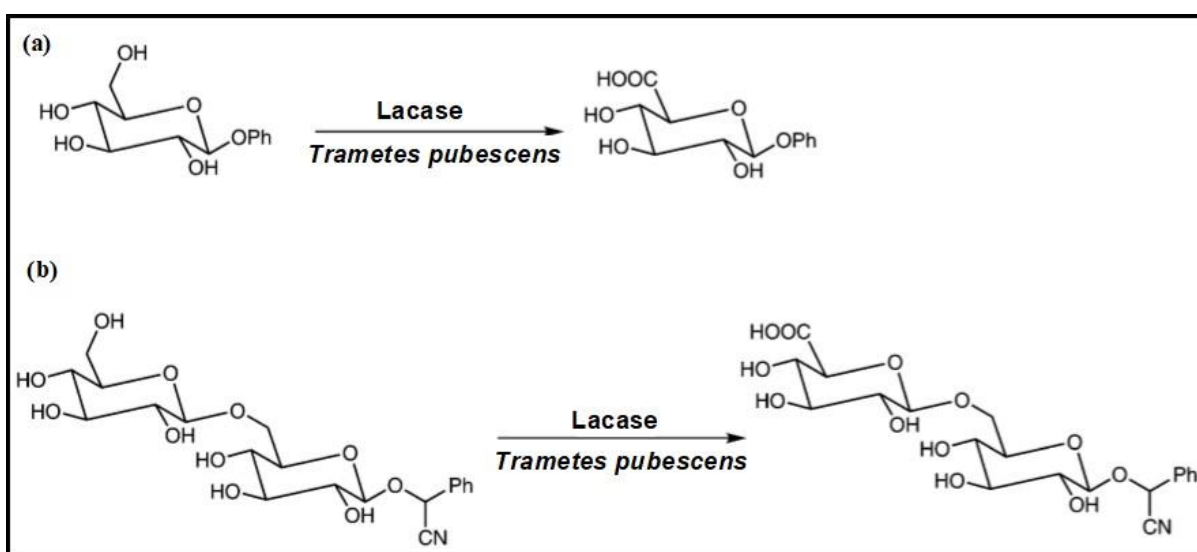
Esquema 15 – Síntese de derivados de acetofenona α,α -di-halogenada catalisada pelo sistema lacase/TEMPO



Fonte: o próprio autor

A seletividade na oxidação de álcoois primários e secundários é uma questão importante na síntese orgânica. A oxidação regioselectiva dos grupos hidroxil primários de monossacarídeos e dissacarídeos foi alcançada quando empregado o sistema lacase/TEMPO, usando lacase de *Trametes pubescens* (Esquema 16). Este sistema lacase-mediador promoveu uma oxidação seletiva sob condições brandas (MARZORATI et al., 2005).

Esquema 16 – Oxidação de monossacarídeos e dissacarídeos catalisada pelo sistema lacase/TEMPO



Fonte: Mogharabia & Faramarzia 2014

As lacases promovem a síntese de uma ampla variedade de produtos de oxidação, que podem ser obtidos a partir de lacases de diferentes fontes. Isto torna estas enzimas ferramentas interessantes para a aplicação em síntese orgânica, além da seletividade conseguida em muitas reações, bem como pelas condições reacionais brandas. As lacases são, portanto, biocatalisadores ideais para processos tecnológicos verdes, considerando que a água é o único subproduto formado.

1.5 BIOCATALISE EM SOLVENTES ORGÂNICOS

O uso de biocatalisadores em síntese orgânica está em amplo desenvolvimento em virtude da sua grande versatilidade, alta especificidade, bem como pela promoção de metodologias limpas. Nas reações de bioconversão, para

um processo eficaz, é necessário o estudo dos fatores que afetam a atividade enzimática favorecendo a sua ação catalítica. Primeiramente se faz necessário selecionar o biocatalisador que tenha atividade catalítica sobre o substrato desejado, boa seletividade e estabilidade adequada para atuar nas condições empregadas no meio reacional de pH, tipo de tampão, temperatura e tempo. Muitas reações podem incluir meio reacional aquoso (convencional) ou então um meio não convencional, na presença de solventes orgânicos.

O uso exclusivo de meio aquoso nas reações de biocatálise limita reações que envolvem substratos hidrofóbicos. Assim, a principal razão do uso de solventes orgânicos nessas reações, é o fato de favorecer a solubilização de substratos insolúveis em meio completamente aquoso. Os solventes utilizados podem ser miscíveis em água, favorecendo com que a biocatálise ocorra em um sistema homogêneo, ou então, se os solventes forem imiscíveis a reação pode acontecer em um sistema bifásico, porém se faz necessário solubilizar o substrato sem inativar a enzima.

A água tem função fundamental na catálise enzimática na presença de solventes não aquosos, em decorrência do efeito que desempenha na estabilidade, seletividade, particularmente na atividade da enzima (BELL et al., 1995). As enzimas são biomoléculas anfipáticas e em meio aquoso a região hidrofóbica não mantém contato com a água, enquanto as regiões hidrofílicas interagem com as moléculas de água, maximizando suas interações. A hidratação da enzima viabiliza sua conformação, responsável pela catálise enzimática, a partir das múltiplas ligações de hidrogênio com o sítio ativo (RUPLEY; GRATTON & CARERI, 1983). Quando a água é substituída por solventes orgânicos, que em geral não são capazes de promover ligações de hidrogênio, a enzima pode sofrer alterações na sua conformação nativa, causando a sua desestabilização. Assim, as enzimas devem ser menos ativas em solventes anidros do que em água. Em um sistema que contém solvente orgânico e água, esta última é distribuída entre a fase do solvente e a enzima, garantindo uma camada de hidratação, que proporciona e aumenta a mobilidade do sítio ativo por formar ligações de hidrogênio, e a enzima pode exercer a sua atividade catalítica (KLIBANOV, 1997).

A atividade enzimática está associada à quantidade de água ligada à proteína e não à concentração de água no meio (ZAKS & KLIBANOV, 1988). A quantidade de água necessária para garantir a atividade enzimática, e

consequentemente a catálise, depende do tipo de enzima usada (MA; PERSSON & ADLERCREUTZ, 2002; VALIVETY; HAILING & MACRAE, 1992; WEHTJE et al., 1997). Na etapa inicial de hidratação, o acréscimo de água ligado à enzima tem um efeito positivo, com particular flexibilização da enzima e do sítio ativo (PARTRIDGE et al., 1998). Entretanto, elevada quantidade de água pode favorecer a agregação da enzima, ou ainda dificultar o acesso do substrato ao sítio ativo da mesma, promovendo a redução da atividade catalítica (VALIVETY; HAILING & MACRAE, 1992).

A escolha do solvente a ser usado na reação de biocatálise é um passo importante, uma vez que este pode afetar direta e indiretamente a atividade enzimática. O solvente pode interferir de forma indireta ao interagir com a água, removendo a camada de hidratação da enzima (ZAKS & KLIBANOV, 1988), resultando na diminuição da atividade catalítica (HAILING, 1994). A capacidade de solventes hidrofílicos alterarem a camada de hidratação da enzima é maior, logo, solventes hidrofóbicos são normalmente os preferidos (BELL et al., 1995). A interação do solvente com os substratos influencia a disponibilidade deste no meio reacional, em decorrência da solvatação, afetando sua estabilização, através de uma interferência indireta. A interferência ocorre na partição dos substratos para o sítio ativo. Na biocatálise, a primeira etapa é a formação da ligação entre o substrato e o sítio ativo, assim quanto mais fortemente associadas estiverem as moléculas de solvente e substrato, menos favorável será a formação da ligação (BELL et al., 1995). A constante de Michaelis-Menten (K_m), pode ser usada como uma medida da afinidade relativa do substrato pelo sítio ativo da enzima em comparação com as moléculas do solvente. Quanto mais elevado for o K_m , maior a afinidade dos substratos pelo solvente, e consequentemente menor disponibilidade apresentam para o sítio ativo (BELL et al., 1995).

A ação direta do solvente sobre a atividade catalítica pode resultar da interação das moléculas do solvente com o sítio ativo da enzima, promovendo alterações conformacionais e comprometendo a ligação da enzima com o substrato (KIM & DORDICK, 1993; RYU & DORDICK, 1992). Além disso, pode haver uma competição direta entre as moléculas do substrato e as do solvente para se ligarem ao sítio ativo da enzima, causando a diminuição da atividade enzimática (SAMPAIO et al., 1996).

No caso das lacases, grande parte dessas enzimas dificilmente mantêm sua atividade enzimática quando é utilizado um sistema com solvente orgânico, limitando seu uso (CRESTINI & ARGYROPOULOS, 1998; RODAKIEWICZ-NOWAK et al., 2000). Assim, a concentração ideal de solvente é necessária para solubilizar o substrato e não comprometer a atividade catalítica. Neste trabalho, a estabilidade enzimática das lacases de *B. rhodina* e *P. ostreatus* foram avaliadas em diferentes concentrações de solventes orgânicos.

1.6 LACASES DE *B. RHODINA* E *P. OSTREATUS*

A aplicação de lacases em síntese orgânica merece considerável atenção devido a sua utilidade na oxidação de compostos fenólicos e não fenólicos. Assim, a avaliação e emprego de lacases de diferentes fontes é interessante e necessária para atuarem como biocatalisadores. As lacases fúngicas são as mais estudadas em decorrência do maior potencial redox que apresentam (0,6-0,8V), sendo descritas na literatura científica mais de 100 lacases fúngicas, derivadas de espécies de fungos ascomicetos e basidiomicetos como enzimas intracelulares e extracelulares (BALDRIAN, 2006).

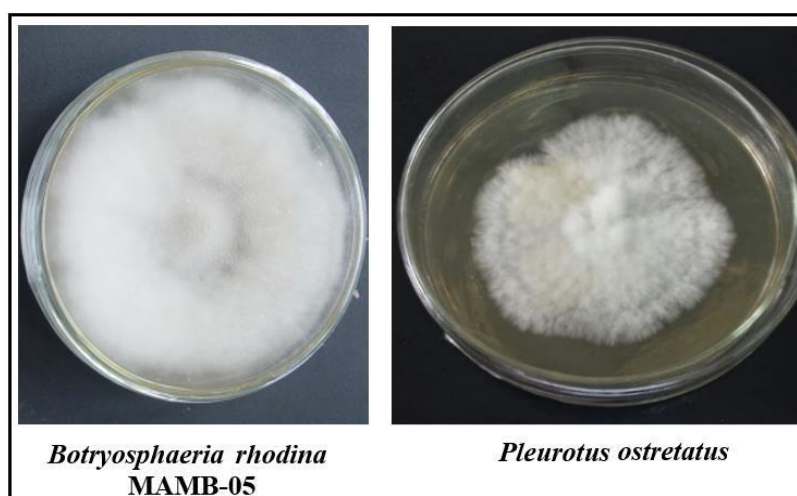
A classificação dos fungos é dada de acordo com as estruturas de reprodução (ALEXOPOULOS; MIMS & BLACKWELL, 1996; KENDRICK, 2000). Os ascomicetos apresentam estruturas em forma de sacos responsáveis pela reprodução sexuada, denominada asco, onde após a meiose são formados os ascósporos. Os ascos normalmente são formados em ascocarpos, estrutura multicelulares formada por hifas entrelaçadas e compactadas com pequeno poro através do qual saem os ascoporos, que são o corpo de frutificação de ascomicetos (KIRK et al., 2008).

Os basidiomicetos são conhecidos popularmente como cogumelos e orelhas de pau, os quais são produzidos para a reprodução sexuada desses fungos. A reprodução acontece na estrutura denominada basídio onde após a meiose são formados os basidiosporos. Os basídios são abrigados nos basidiocarpos, que são o corpo de frutificação. Muitas espécies desta classe de fungos são capazes de degradar a madeira, sendo conhecidos como fungos causadores de podridão branca. Estes microrganismos secretam enzimas que promovem a degradação de

moléculas como a celulose, hemicelulose e lignina em água e gás carbônico. Por essa razão, são aplicados na degradação de resíduos lignocelulósicos.

O fungo ascomiceto, *Botryosphaeria rhodina* MAMB-05 (Figura 7), é ligninolítico e um bom produtor de lacase (BARBOSA; DEKKER & HARDY, 1996; DEKKER & BARBOSA, 2001; DEKKER; BARBOSA & SARGENT, 2002). A lacase deste fungo demonstrou detoxificar enzimaticamente os pré-hidrolisados de hemicelulose resultantes do tratamento hidrotérmico de lascas de madeira (VITHANAGE et al., 2015). Produtos furânicos e fenólicos gerados a partir da degradação da hemicelulose e da lignina, respectivamente, foram reduzidos e removidos, e a destoxicação aumentou na presença de um sistema com mediador químico (VITHANAGE et al., 2015). No entanto, esta lacase ainda não tinha sido avaliada em reações de oxidação visando aplicação em síntese orgânica. O *Pleurotus ostreatus* (Figura 7) é um fungo que causa a podridão branca em madeira, é ligninolítico, pertencente à classe dos basidiomicetos e tem sido descrito como um produtor natural de lacase (PALMIERI et al., 2003). Este fungo produz diferentes isoenzimas de lacases, as quais estão relacionadas com as suas funções, como por exemplo, a síntese e degradação de lignina, desenvolvimento do corpo de frutificação, produção de pigmentos, entre outras (LETTERA et al., 2011; PEZZELLA et al., 2009).

Figura 7 – Fungos *Botryosphaeria rhodina* MAMB-05 e *Pleurotus ostreatus*: fontes de lacase



Fonte: o próprio autor

As lacase de ambos os fungos acima citados foram utilizadas no presente trabalho, conforme os objetivos geral e específicos descritos a seguir.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Produzir as lacases de *Botryosphaeria rhodina* MAMB-05 e *Pleurotus ostreatus* var Florida, e avaliar os produtos de acoplamento oxidativo da reação do 2,6-dimetoxifenol com as respectivas lacases, na presença e na ausência de mediadores químicos, bem como investigar a influência do oxigênio e do cofator cobre sobre a reação de oxidação com estas lacases.

2.2 Objetivos Específicos

Produzir e obter as lacases de *Botryosphaeria rhodina* MAMB-05 e *Pleurotus ostreatus* var Florida.

Comparar a reação de acoplamento oxidativo do 2,6-dimetoxifenol com as lacases do *B. rhodina* e *P. ostreatus* em diferentes valores de pH e tempos de reação.

Otimizar a síntese do 3,3',5,5'-tetrametoxibifenil-4,4'-diol (TMBP) a partir do 2,6-dimetoxifenol usando lacase a do *B. rhodina*.

Avaliar os sistemas lacase-mediador (Lacase/ABTS e Lacase/TEMPO) na reação de acoplamento oxidativo do 2,6-DMP com lacase do *B. rhodina* MAMB-05 em valores de pH 3,0 e 6,5.

Verificar a influência do aumento do fluxo de oxigênio na oxidação do 2,6-DMP pela lacase de *B. rhodina* de forma convencional e com o sistema lacase-mediador.

Determinar e comparar o potencial redox da lacase de *B. rhodina*.

Investigar a importância do cofator cobre na oxidação do 2,6-DMP catalisada pela lacase de *B. rhodina*.

Avaliar a estabilidade catalítica das lacases de *B. rhodina* e *P. ostreatus* em diferentes concentrações de solventes orgânicos.

3 METODOLOGIA

3.1 MANUTENÇÃO DE MICRORGANISMOS

Os microrganismos *B. rhodina* MAMB-05 e *P. ostreatus* têm sido mantidos em meio sólido de batata-dextrose-agar (BDA) a 4 °C, com repiques trimestrais para a manutenção das respectivas cepas fúngicas.

3.2 PRODUÇÃO DE LACASE PELO *Botryosphaeria rhodina* MAMB-05

Para a produção de lacase, o fungo foi transferido do meio de manutenção (BDA) para placas de Petri contendo meio sólido de Vogel (VOGEL, 1956), tendo sido cultivado por 96 h a 28 °C. Frascos Erlenmeyer (2 L) contendo meio líquido de Vogel, álcool veratílico (30,4 mM, Sigma-Aldrich) como indutor de lacase (VASCONCELOS et al., 2000) e glicose (10 g/L), foram inoculados com 64 discos (1,0 cm de diâmetro) retirados de uma placa de Vogel colonizada com hifas de *B. rhodina* cultivado durante 96 h. Os cultivos submersos foram mantidos a 28 °C, sob agitação a 180 rpm durante 4,5 dias. Em seguida, os cultivos foram centrifugados (1250 xg/30 min) para separar a biomassa fúngica e os sobrenadantes foram coletados, dialisados exaustivamente durante 48 h, com várias trocas de água destilada, e por último, foram congelados, liofilizados e armazenado a -20 °C. Este extrato liofilizado foi utilizado como fonte de lacase. Uma solução a 1% (m/v) deste extrato bruto de lacase foi solubilizado em água destilada para o desenvolvimento dos ensaios enzimáticos e reações de biocatálise.

3.3 PRODUÇÃO DE LACASE PELO *Pleurotus ostreatus* VARIEDADE FLORIDA

Para a produção de lacase, o fungo foi transferido do meio de manutenção (BDA) para placa de Petri contendo o meio sólido de Vogel, sendo cultivado por 168 h a 28 °C. Frascos Erlenmeyer (2 L) contendo meio líquido de Vogel e 4% (m/v) de extrato de levedura, foram inoculados com 64 discos (1,0 cm de diâmetro) retirados de uma placa de Vogel colonizada com hifas de *P. ostreatus* cultivados durante 168 h. Os cultivos líquidos foram mantidos sob agitação a 180 rpm a 28 °C, durante 5 dias. Os meios de cultivo foram centrifugados (1250 xg/30

min) para separar a biomassa fúngica e os sobrenadantes foram coletados, dialisados em água destilada, durante 48 horas, com várias trocas de água, em seguida foram congelados, liofilizados e armazenado a -20 °C. Uma solução a 1% (m/v) deste extrato liofilizado foi solubilizada em água destilada para o desenvolvimento dos ensaios enzimáticos e reações de biocatálise.

3.4 ENSAIO ENZIMÁTICO

As atividades enzimáticas das lacases de *B. rhodina* e *P. ostreatus* foram determinadas pela oxidação dos substratos convencionais desta enzima, ABTS (50 mM) e 2,6-DMP (10 mM), durante 5 minutos presentes em uma mistura de tampão citrato fosfato, solução 1% (m/v) do extrato bruto das respectivas e água destilada, em um volume final do ensaio enzimático de 1000 µL. A Tabela 1 mostra o sistema de incubação utilizado para a determinação das atividades de lacase. Os ensaios foram monitorados pelo produto oxidado formado medido espectrofotometricamente a 468 nm ($\epsilon = 10000.M^{-1}.cm^{-1}$) para o 2,6-DMP e 420 nm ($\epsilon = 36,000.M^{-1}.cm^{-1}$) para o ABTS.

Tabela 1 – Sistema de incubação utilizado para determinar a atividade de lacase

	Reação	C1	C2
Solução do substrato	50 µL	0 µL	50 µL
Solução tampão	150 µL	150 µL	150 µL
H₂O(q.s.p)	775 µL	825 µL	800 µL
Solução de lacase	25 µL	25 µL	0 µL

Fonte: o próprio autor

Os ensaios enzimáticos foram desenvolvidos em duplicata e os resultados apresentados representam a média das mesmas, tendo sido descontados as absorbâncias dos respectivos controles. Onde **Reação** é referente a reação completa na presença do substrato e da enzima; **C₁** representa o controle da absorbância da solução da enzima na ausência de substrato; **C₂** representa a absorbância do substrato na ausência de solução da enzima.

As atividades de lacase de *B. rhodina* e *P. ostreatus* foram determinadas utilizando-se como substrato o 2,6-DMP em pH 6,5 e 5,0,

respectivamente, a 45 °C e o ABTS em pH 3,0 e 4,0 a 50 °C, respectivamente.

A unidade de enzima (U) foi definida como o número de μmol de substrato oxidado por minuto, por mL de solução enzimática, nas condições padrão do ensaio. A atividade de lacase foi calculada de acordo com a seguinte fórmula:

$$\frac{U}{\text{mL}} = \frac{\text{Abs}}{\epsilon} \times \frac{1}{t} \times \frac{1}{\text{VE}} \times \text{FD} \times 1000$$

onde: ϵ é o coeficiente de extinção molar de cada substrato; t o tempo de incubação da enzima em minutos; VE é o volume de enzima usado no sistema de incubação (em mL); FD o fator de diluição da enzima; e 1000 é usado para a conversão em μmol da unidade de atividade enzimática.

3.5 MÉTODOS DE CARACTERIZAÇÃO

Os espectros de massas foram obtidos em cromatógrafo de gás acoplado ao espectrômetro de massas (CG-EM), sendo usados dois equipamentos diferentes para as análises. O primeiro equipamento foi um modelo GCMS-QP5000 (Shimadzu, Japão), do Laboratório de Pesquisas de Moléculas Bioativas (LP MBA) da UEL, tendo sido utilizada uma coluna capilar RTX-1 (30 m x 0,25 mm). A temperatura do injetor foi 300 °C e a temperatura da interface foi 250 °C. O gás hélio (99,999%) foi o gás transportador a uma taxa de fluxo de 1,2 mL/min. O programa de temperatura para o aquecimento do forno foi inicialmente 60 °C durante 4 minutos, depois foi programado a 15 °C/min até 320 °C e então foi mantido a 320 °C durante 5 min. O detector de ionização por impacto de elétrons foi operado no modo de varredura de m/z 45 a 550 com um ganho de detector igual a 2,5 Kv com um intervalo de varredura de 0,5 s. O tempo total para o programa de análise foi estabelecido em 26 min. O segundo equipamento utilizado, foi um modelo GCMS-QP2010 (Shimadzu, Japão), do Laboratório Multiusuário de Análise de Materiais e Moléculas (LAMM) da UEL. Os parâmetros cromatográficos usados foram os mesmos descritos para o equipamento modelo GCMS-QP5000, assim como a coluna capilar usada. A única diferença no método, foi o tempo total de análise, que foi de 31,67 min.

Os espectros de massa de alta resolução foram adquiridos no

(LAMM) da Universidade Estadual de Londrina por injeção direta em um espectrômetro HRMS ESI-Q-TOF (Bruker, Alemanha) operado no modo negativo, [M-H]⁻. As espécies aniônicas foram submetidas à dissociação induzida por colisão com nitrogênio gasoso a uma taxa de fluxo de 4,0 L/min. A pressão do gás nebulizador foi de 0,4 bar, com pulverização iônica de 3500 eV e uma temperatura de 200 °C. Os espectros MS/MS foram adquiridos utilizando energias de colisão otimizadas a 25 eV.

Os espectros de ressonância magnética nuclear (RMN de ¹H e ¹³C) foram obtidos no Laboratório Multiusuário de Espectroscopia (LABSPEC) da Universidade Estadual de Londrina, em um instrumento modelo AVANCE III RMN (BRUKER, Alemanha), o qual foi operando a 400 MHz para ¹H e 100 MHz para ¹³C, equipado com sondas multinucleares de 5 mm para líquidos e CP/MAS de 4 mm para sólidos. As análises foram registradas usando CDCl₃ como solventes e TMS como padrão interno.

Os pontos de fusão (P.f.) dos compostos foram determinados utilizando-se um aparelho digital MQAPF-302 da Microquímica Ltda (Palhoça, Santa Catarina-Brasil).

3.6 PRODUÇÃO E AVALIAÇÃO DOS PRODUTOS DE ACOPLAMENTO OXIDATIVO OBTIDOS A PARTIR DE 2,6-DIMETOXIFENOL POR LACASE DE *B. RHODINA*

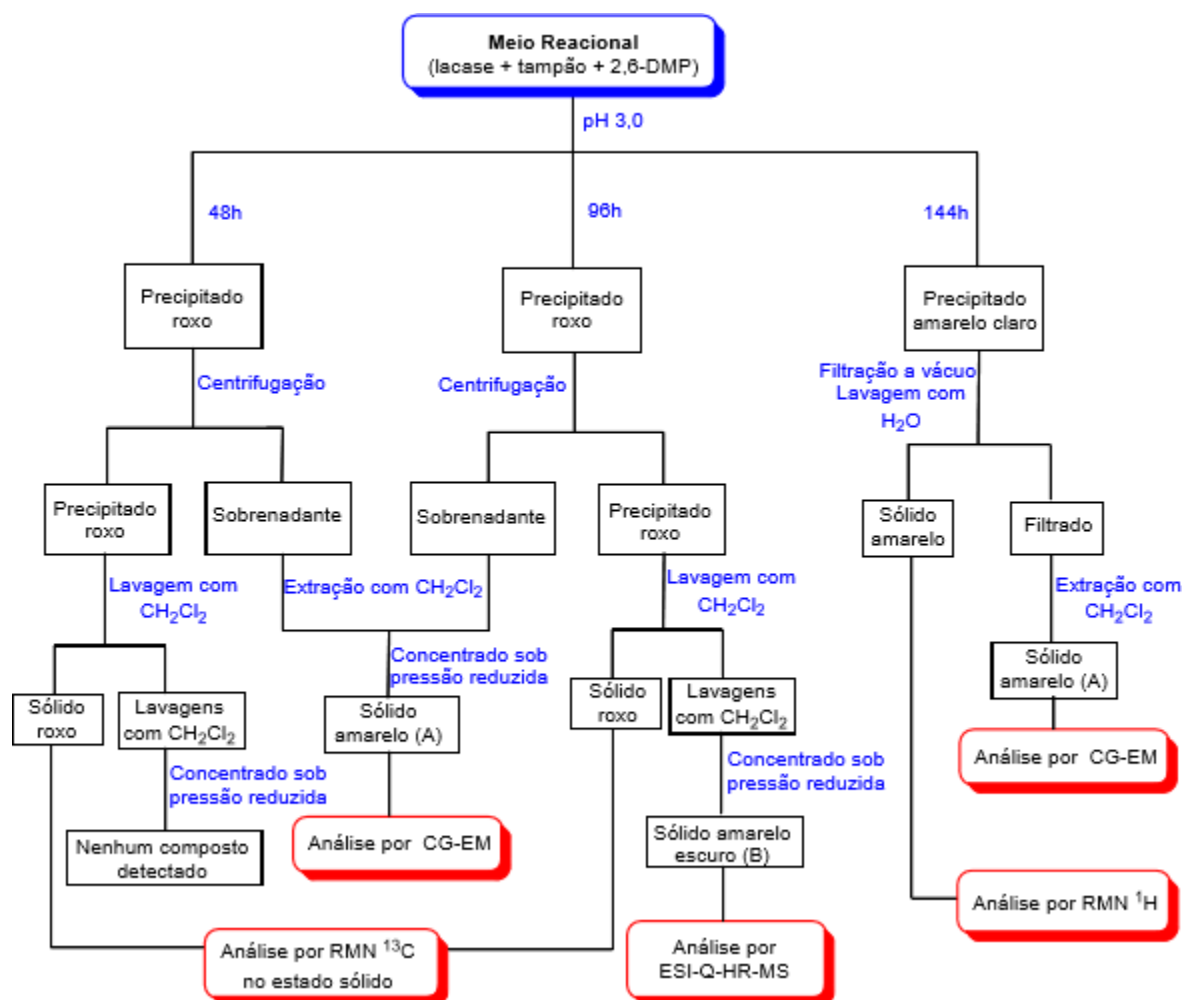
Em um balão de 50 mL, o 2,6-DMP (3,5 mmol) foi solubilizado em água destilada (12 mL) a 37 °C. Em seguida, adicionou-se 1,6 mL de tampão citrato-fosfato (pH 3,0 e 6,5). Esta mistura foi mantida sob agitação durante 10 min, seguido da adição de lacase (3 U → atividade determinada com o substrato 2,6-DMP; 44 U → atividade determinada com o substrato ABTS). A mistura reacional foi deixada sob agitação moderada a 37 °C na presença de ar, como fonte de oxigênio, durante os tempos de reação de 48, 96 e 144h.

3.6.1 Isolamento e Caracterização dos Compostos Diméricos Formados a pH 3,0 por Catálise com Lacase de *B. rhodina*

O protocolo geral para os produtos de acoplamento dimérico formados a pH 3,0 e seu isolamento para identificação estrutural está apresentado

no fluxograma da Figura 8.

Figura 8 – Fluxograma dos dímeros de acoplamento obtidos na reação de oxidação do 2,6-DMP em pH 3,0



Fonte: o próprio autor

Dentro de 48h, a mistura reacional produziu um precipitado de cor roxa e um sobrenadante de cor amarela. O precipitado foi lavado com CH_2Cl_2 (3X), seco sob vácuo e analisado por RMN de ^{13}C . As frações resultantes das lavagens com CH_2Cl_2 foram reunidas e concentradas sob pressão reduzida, mas nenhum composto foi detectado. O sobrenadante foi extraído com CH_2Cl_2 (3X) e as frações combinadas, concentradas sob pressão reduzida tendo sido obtido um sólido de cor amarela (A) que foi analisado por CG-EM. Ao final de 96h, a mistura reacional produziu um precipitado roxo e um sobrenadante amarelo. O precipitado foi cuidadosamente lavado com CH_2Cl_2 (exaustivamente), seco sob vácuo e analisado

por RMN de ^{13}C . A fração resultante das lavagens do precipitado com CH_2Cl_2 foi concentrada sob pressão reduzida tendo sido obtido um sólido de cor amarelo escuro (**B**) que foi analisado por CG-EM e por espectrometria de massa de alta resolução por Ionização Electrospray/tempo de vôo (ESI-Q-HRMS). O sobrenadante foi extraído com CH_2Cl_2 (3X), as frações concentradas sob pressão reduzida, tendo sido obtido um sólido amarelo (**A**) que foi analisado por CG-EM.

Ao completar 144h, a mistura reacional continha um precipitado de cor amarelo claro e um sobrenadante ligeiramente amarelo. A mistura foi filtrada e o precipitado foi cuidadosamente recuperado, lavado com água destilada resultando em um sólido amarelo, o qual foi seco sob vácuo, analisado por RMN de ^1H . A fase aquosa foi extraída com CH_2Cl_2 (3X), as frações foram concentradas sob pressão reduzida, dando origem a um sólido amarelo (**A**) que foi analisado por CG-EM.

3.6.2 Isolamento e Caracterização dos Composto Dimérico TMBP Sintetizado a pH 6,5 por Catálise com Lacase de *B. rhodina*.

Ao final de 48, 96 e 144h, a mistura reacional produziu um precipitado de cor amarelo claro e um sobrenadante ligeiramente amarelo. A mistura de reação foi filtrada a vácuo e o precipitado foi cuidadosamente recuperado, lavado com água destilada, originando um sólido amarelo. O sólido foi seco à vácuo e analisado por RMN de ^1H . A fase aquosa foi extraída com CH_2Cl_2 (3X) e as frações concentradas sob pressão reduzida, resultando em um sólido amarelo (**A**) analisado por CG-EM.

3.7 OTIMIZAÇÃO DA SÍNTESE DE 3,3',5,5'-TETRAMETOXIBIFENIL-4,4'-DIOL (TMBP) CATALISADA POR LACASE DE *B. RHODINA* ATRAVÉS DE PLANEJAMENTO FATORIAL

A metodologia estatística “design” incompleto Box-Behnken, de três variáveis (ver Tabela 4, pg 74) foi utilizada para otimizar a síntese de TMBP a partir da oxidação do 2,6-DMP. Foram selecionadas como variáveis a concentração de 2,6-DMP (2,2, 3,5, 4,8 mmol), concentração de lacase (1,5, 3,0, 4,5 U) e o tempo de reação (72, 96, 120 h). O pH foi fixado em 6,5, e os experimentos foram conduzidos a 37 °C como descrito na seção 3.5. O TMBP produzido foi filtrado, lavado com água

destilada, seco sob vácuo e pesado.

As respostas foram ajustadas à equação polinomial (Equação 1) que correlacionou a relação entre as variáveis e as respostas:

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i x_i + \sum_{i=1}^k \beta_{ii} x_i^2 + \sum_{i < j} \beta_{ij} x_i x_j + \varepsilon \quad (1)$$

onde Y representa a função de resposta (rendimento de TMBP em %) dos dados experimentais, x_1 , x_2 e x_3 são as variáveis independentes codificadas correspondentes ao tempo de reação (h), concentração de 2,6-DMP (mmol) e concentração de lacase em (unidade de enzima (U), respectivamente.

3.7.1 Análise Estatística

A análise de variância (ANOVA), análise de regressão múltipla e otimização pelo método de superfície de resposta foram desenvolvidas usando o “software Statistica” (Statistica, Graphics software, Tusla, v.9, 2009).

3.8 PRODUÇÃO E AVALIAÇÃO DOS PRODUTOS OBTIDOS PELA CATÁLISE DA LACASE DE *P. OSTREATUS* USANDO COMO SUBSTRATO O 2,6-DIMETOXIFENOL

Em um balão de 50 mL o 2,6-DMP (1,4 mmol) foi solubilizado em água destilada (12 mL) a 37 °C e depois adicionaram-se 1,6 mL de tampão citrato-fosfato (pH 3,0; 4,0; 5,0; 6,5). Esta mistura foi mantida sob agitação durante 10 min, seguido da adição de 1,13 U de lacase. A mistura reacional foi deixada sob agitação moderada a 37 °C na presença de ar, como fonte de oxigênio, durante 48, 96 e 144h.

3.8.1 Isolamento e Caracterização dos Compostos Sintetizados pela ação catalítica da Lacase de *P. ostreatus* sobre o 2,6-DMP

Ao final de 48, 96 e 144h a pH 4,0 e 5,0 as misturas reacionais continham um precipitado de cor roxa e os respectivos sobrenadantes estavam

amarelo. O mesmo foi observado para a mistura a pH 3,0 após 48h. Cada uma destas misturas foi filtrada à vácuo e os respectivos precipitados roxo recuperados, lavados exaustivamente com CH_2Cl_2 , secos sob vácuo, analisados por RMN de ^{13}C . As fases orgânicas obtidas das lavagens foram concentradas sob pressão reduzida, secas sob vácuo, resultando em um sólido amarelo que foi analisado por CG-EM e RMN de ^1H . Os sólidos amarelos obtidos nas reações de 96 e 144h a pH 5,0 foram analisados por espectrometria de massa de alta resolução por Ionização Electrospray/tempo de voo (ESI-Q-HRMS) em modo negativo. As fases aquosas foram extraídas com CH_2Cl_2 (3X), as frações combinadas, concentradas sob pressão reduzida, originando um sólido amarelo analisado por CG-EM.

Ao completar 48, 96 e 144h as misturas reacionais realizadas a pH 6,5 continham um precipitado de cor roxa e também um precipitado de cor bege. O mesmo foi observado após 96 e 144h a pH 3,0. Cada uma das misturas foi filtrada à vácuo, obtendo uma mistura de precipitados roxo e bege. Esta mistura foi lavada com CH_2Cl_2 , o precipitado roxo remanescente no papel de filtro foi seco sob vácuo e analisado por RMN de ^{13}C . A fase orgânica resultante das lavagens foi concentrada à vácuo, e o sólido amarelo obtido foi analisado por CG-EM. A fase aquosa foi extraída com CH_2Cl_2 (3X), as frações foram combinadas, concentradas sob pressão reduzida e foi obtido um sólido amarelo, analisado por CG-EM.

3.9 AVALIAÇÃO DA AÇÃO CATALÍTICA DA LACASE DE *B. RHODINA* SOBRE O 2,6-DMP COM FLUXO DE OXIGÊNIO

Em um balão de 50 mL, o 2,6-DMP (0,65 mmol) foi solubilizado em água destilada (12 mL) a 37 °C, seguida da adição 2,5 mL de tampão citrato-fosfato (pH 3,0 e 6,5) e lacase (0,51 U). Um fluxo de oxigênio por períodos de 5 e 27h, com o auxílio de uma bomba de aquário, foi usado na reação de oxidação.

Ao final de 120h cada mistura reacional foi filtrada à vácuo. Quando obtido um precipitado de cor amarela, este foi lavado com água, seco sob vácuo e a fase aquosa extraída com CH_2Cl_2 . Quando obtido um precipitado de cor roxa, este foi lavado com CH_2Cl_2 , e seco sob vácuo, a fase orgânica resultante das lavagens foi concentrada à pressão reduzida. A fase aquosa foi extraída com CH_2Cl_2 (3X), as frações foram combinadas, concentradas sob pressão reduzida.

3.10 AVALIAÇÃO DA AÇÃO CATALÍTICA DA LACASE DE *B. RHODINA* SOBRE O 2,6-DMP USANDO OS MEDIADORES ABTS E TEMPO

Em um balão de 50 mL, o 2,6-DMP (0,65 mmol) foi solubilizado em água destilada (11 mL) a 32 °C. A esta mistura, foi adicionada uma solução de lacase de *B. rhodina* (0,51 U), mediador (0,19 mmol de ABTS ou TEMPO) em 1 mL de água destilada e 2,5 ml de tampão citrato-fosfato (pH 3,0 e 6,5). A mistura final foi agitada por 120h a 35 °C, na presença de ar, como fonte de oxigênio.

Ao final de 120h cada mistura reacional foi filtrada à vacuo. Quando obtido um precipitado de cor amarela, este foi lavado com água, seco sob vácuo e a fase aquosa extraída com CH₂Cl₂. Quando obtido um precipitado de cor roxa, este foi lavado com CH₂Cl₂, e seco sob vácuo, a fase orgânica resultante das lavagens foi concentrada à pressão reduzida. A fase aquosa foi extraída com CH₂Cl₂ (3X), as frações foram combinadas, concentradas sob pressão reduzida.

3.11 AVALIAÇÃO DA AÇÃO CATALÍTICA DA LACASE DE *B. RHODINA* SOBRE O 2,6-DMP USANDO OS MEDIADORES ABTS E TEMPO E FLUXO DE OXIGÊNIO

Em um balão de 50 mL, o 2,6-DMP (0,65 mmol) foi solubilizado em água destilada (11 mL) a 32 °C. A esta mistura, foi adicionada uma solução de lacase de *B. rhodina* (0,51 U), mediador (0,19 mmol de ABTS ou TEMPO) em 1 mL de água destilada e 2,5 ml de tampão citrato-fosfato (pH 3,0 e 6,5). Um fluxo de oxigênio, com o auxílio de uma bomba de aquário, foi usado durante 5h na reação de oxidação.

Ao final de 120h cada mistura reacional foi filtrada à vacuo. Quando obtido um precipitado de cor amarela, este foi lavado com água, seco sob vácuo e a fase aquosa extraída com CH₂Cl₂. Quando obtido um precipitado de cor roxa, este foi lavado com CH₂Cl₂, e seco sob vácuo, a fase orgânica resultante das lavagens foi concentrada à pressão reduzida. A fase aquosa foi extraída com CH₂Cl₂ (3X), as frações foram combinadas, concentradas sob pressão reduzida.

3.12 AVALIAÇÃO DOS PRODUTOS DA CATÁLISE DA LACASE DE *B. RHODINA* SOBRE O 2,6-DIMETOXIFENOL COM ADIÇÃO DE COBRE

Em um balão de 50 mL, o 2,6-DMP (0,65 mmol) foi solubilizado em água destilada (11 mL) a 37 °C. A esta mistura, foi adicionada uma solução de lacase de *B. rhodina* (0,51 U), cobre (0,19 mmol) em 1 ml de água destilada e 2,5 ml de tampão citrato-fosfato (pH 3,0 e 6,5). A mistura final foi agitada por 120h a 37 °C, na presença de ar, como fonte de oxigênio.

Ao final de 120h cada mistura reacional foi filtrada à vacuo. Quando obtido um precipitado de cor amarela, este foi lavado com água, seco sob vácuo e a fase aquosa extraída com CH₂Cl₂. Quando obtido um precipitado de cor roxa, este foi lavado com CH₂Cl₂, e seco sob vácuo, a fase orgânica resultante das lavagens foi concentrada à pressão reduzida. A fase aquosa foi extraída com CH₂Cl₂ (3X), as frações foram combinadas, concentradas sob pressão reduzida.

3.13 AVALIAÇÃO DOS PRODUTOS DA CATÁLISE DA LACASE DE *B. RHODINA* SOBRE O 2,6-DIMETOXIFENOL COM ADIÇÃO DE COBRE E FLUXO DE OXIGÊNIO

Em um balão de 50 mL, o 2,6-DMP (0,65 mmol) foi solubilizado em água destilada (11 mL) a 37 °C. A esta mistura, foi adicionada uma solução de lacase de *B. rhodina* (0,51 U), cobre (0,19 mmol) em 1 ml de água destilada e 2,5 ml de tampão citrato-fosfato (pH 3,0 e 6,5). Um fluxo de oxigênio, com o auxílio de uma bomba de aquário, foi usado durante 5h na reação de oxidação.

Ao final de 120h cada mistura reacional foi filtrada à vacuo. Quando obtido um precipitado de cor amarela, este foi lavado com água, seco sob vácuo e a fase aquosa extraída com CH₂Cl₂. Quando obtido um precipitado de cor roxa, este foi lavado com CH₂Cl₂, e seco sob vácuo, a fase orgânica resultante das lavagens foi concentrada à pressão reduzida. A fase aquosa foi extraída com CH₂Cl₂ (3X), as frações foram combinadas e concentradas sob pressão reduzida,

3.14 DETERMINAÇÃO DO POTENCIAL DE OXIDAÇÃO DA LACASE DE *B. rhodina* POR VOLTAMETRIA CÍCLICA

Os estudos eletroquímicos para determinação do potencial de oxidação da lacase de *B. de rhodina* por voltametria cíclica (VC), foram realizados em um potenciostato/galvanostato FRA2 µAutoLab Tipo III (Metrohm Autolab BV,

Holanda) controlado pelo software NOVA 2.1 (www.metrohm-autolab.com/Produtos/Echem/Software). Os voltamogramas cíclicos foram obtidos no intervalo de potenciais de 0,0 a 0,8 V vs. Ag/AgCl, com uma velocidade de varredura de 50 mV s⁻¹. Uma célula de vidro convencional de três eletrodos de compartimento único foi usada em temperatura ambiente (25,0 ± 0,5 °C) para todos os experimentos, compreendendo um eletrodo de carbono vítreo (ECV), previamente polido com pasta de alumina e lavado com água ultrapura, como eletrodo de trabalho, um eletrodo de referência Ag/AgCl (3,0 molL⁻¹ KCl) e uma placa de platina como eletrodo auxiliar. Como eletrólito suporte, foram utilizadas soluções tampão citrato-fosfato com potenciais hidrogeniônicos iguais a 3,0, 4,0, 5,0 e 6,5. Todos os potenciais apresentados nos voltamogramas cíclicos são em relação ao Eletrodo Padrão de Hidrogênio (EPH). Um tempo de agitação de 30 segundos foi utilizado para homogeneizar a solução da enzima na célula eletroquímica.

3.15 AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE CATALÍTICA DAS LACASES DE *B. RHODINA* E *P. OSTREATUS* EM SOLVENTES ORGÂNICOS

As atividades enzimáticas das lacases de *B. rhodina* e *P. ostreatus* foram avaliadas em diferentes concentrações de solventes orgânicos pela oxidação dos substratos ABTS (50 mM) e 2,6-DMP (10 mM), durante 5 minutos presentes em uma mistura de tampão citrato fosfato, solução 1% (m/v) do extrato bruto das respectivas e água destilada, em um volume final do ensaio enzimático de 1000 µL. Os solventes avaliados foram: metanol, etanol, dimetilsulfóxido (DMSO), acetato de etila, hexano, cicloexano, clorofórmio, acetonitrila, tetraidrofurano (THF), dimetilformamida (DMF) e 1,4-dioxano. A Tabela 2 mostra o sistema de incubação utilizado para a determinação das atividades de lacase.

Tabela 2 – Sistema de incubação utilizado para avaliar a influência dos respectivos solventes na atividade de lacase utilizando-se como substratos ABTS e 2,6-DMP

	Reação	Reação1	C ₁	C ₂	C ₃	C ₄
Substrato	50 µL	50 µL	0 µL	0 µL	50 µL	50 µL
Tampão	150 µL	150 µL	150 µL	150 µL	150 µL	150 µL
H₂O(q.s.p)	X* µL	X* µL	X* µL	X* µL	X* µL	X* µL
Solvente	0 µL	Y* µL	0 µL	Y* µL	0 µL	Y* µL
Solução de Lacase	25 µL	25 µL	25 µL	25 µL	0 µL	0 µL

X* quantidade de H₂O destilada suficiente para completar 1000 µL

Y* quantidade de solvente

Fonte: o próprio autor

Reação: reação completa, ou seja, o valor da atividade de lacase (volume total 1 mL), sem a presença de solvente (considerada 100%);

Reação 1: corresponde a reação completa na presença dos respectivos solventes, utilizados em diferentes concentrações (25, 50, ou 100 µL). Os volumes de cada substrato foram fixos, assim como dos respectivos tampões;

C₁ = controle da absorbância da solução de enzima, na ausência do solvente estudado;

C₂= controle da variação de absorbância entre o solvente e a lacase;

C₃ = controle da absorbância do substrato na ausência do solvente;

C₄ = controle da absorbância do substrato na presença do solvente;

As atividades de lacase de *B. rhodina* e *P. ostreatus* foram determinadas utilizando-se como substrato o 2,6-DMP em pH 6,5 e 5,0, respectivamente, a 45 °C e o ABTS em pH 3,0 e 4,0 a 50 °C, respectivamente. A solução de enzima foi sempre adicionada por último. Os tubos de ensaio que continham solvente foram fechados com bolas de Gude, respeitando-se as respectivas temperaturas de incubação.

Os ensaios foram monitorados pelo produto oxidado formado medido espectrofotometricamente a 468 nm ($\epsilon = 10000.M^{-1}.cm^{-1}$) para o 2,6-DMP e 420 nm ($\epsilon = 36,000.M^{-1}.cm^{-1}$) para o ABTS. Os ensaios enzimáticos foram desenvolvidos em duplicata e os resultados apresentados representam a média das mesmas, tendo sido descontados as absorbâncias dos controles C₂ e C₄. A unidade

de enzima (U) foi definida como o número de μmol de substrato oxidado por minuto, por mL de solução enzimática, nas condições padrão do ensaio. A atividade de lacase foi calculada de acordo com a seguinte fórmula:

$$\frac{U}{\text{mL}} = \frac{\text{Abs}}{\varepsilon} \times \frac{1}{t} \times \frac{1}{VE} \times \text{FD} \times 1000$$

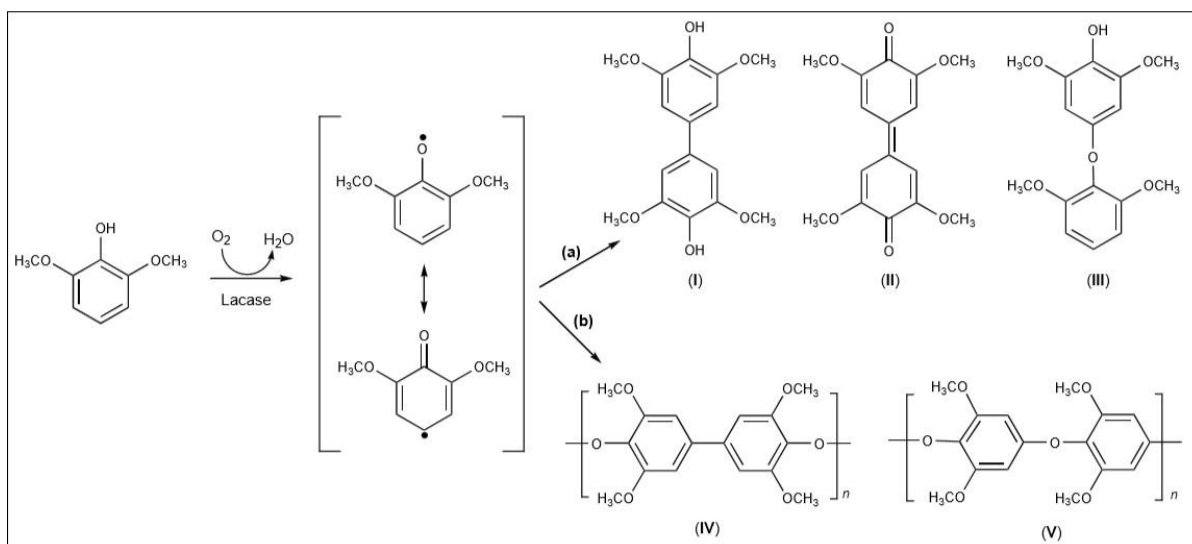
onde: ε é o coeficiente de extinção molar de cada substrato; t o tempo de incubação da enzima em minutos; VE é o volume de enzima usado no sistema de incubação (em mL); FD o fator de diluição da enzima; e 1000 é usado para a conversão em μmol da unidade de atividade enzimática.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Embora a literatura científica relate a síntese de dímeros de 2,6-dimetoxifenol pela catálise de lacases de diferentes fontes, a presente investigação foi motivada pela comparação dos compostos formados pela lacase ascomiceto *B. rhodina* MAMB-05 com a do basidiomiceto *P. ostreatus*, uma vez que a lacase do *B. rhodina* ainda não tinha sido aplicada em reações de síntese orgânica.

Os possíveis produtos obtidos por dimerização oxidativa de 2,6-DMP catalisados por lacase podem ser observados no Esquema 17a. Estes compostos são formados através de acoplamento Carbono-Carbono e Carbono-Oxigênio dos intermediários radicais, gerados pela oxidação biocatalisada do 2,6-DMP, dependendo da fonte de lacase e do pH do meio de reação. Outra possibilidade é a síntese de oligomeros ou polimeros através das mesmas reações de acoplamento (Esquema 17b) (IKEDA; UYAMA & KOBAYASHI, 1996; WAN; DU & MIYAKOSHI, 2008).

Esquema 17 – Reação via radicais livres do 2,6-DMP catalisada por lacase que leva a **(a)** três possíveis dímeros e **(b)** produtos poliméricos de acoplamento oxidativo



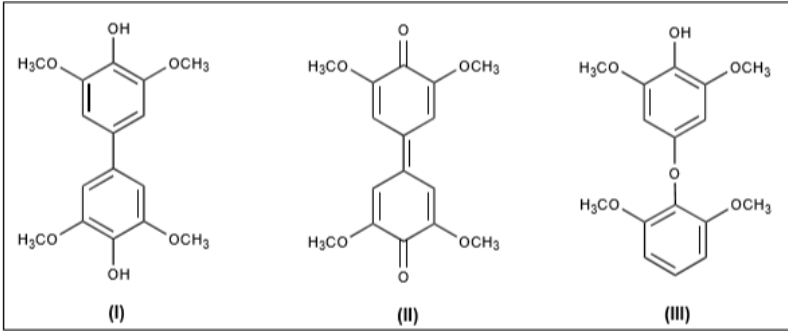
Fonte: o próprio autor

4.1 AVALIAÇÃO DOS PRODUTOS DE DIMERIZAÇÃO DE 2,6-DIMETOXIFENOL POR LACASE DE *BOTRYOSPHAERIA RHODINA*

A síntese de compostos a partir de 2,6-DMP catalisada com lacase

foi conduzida em dois valores de pH (3,0 e 6,5), baseada em estudos anteriores sobre os melhores valores de pH da lacase de *B. rhodina* MAMB-05 testada com os substratos ABTS e 2,6-DMP, respectivamente (DEKKER & BARBOSA, 2001). Nas reações realizadas a pH 3,0 com o 2,6-DMP como substrato (vide Figura 8), foram formados três produtos diméricos diferentes (I, II, III) dependendo do tempo de reação (Tabela 3). Estes foram caracterizados por RMN de ^1H , RMN de ^{13}C de estado sólido e espectrometria de massa de alta resolução (ESI-Q-TOF HRMS), respectivamente. Quando a reação de 2,6-DMP catalisada por lacase foi realizada a pH 6,5, foi sintetizado seletivamente o dímero I independente do tempo de reação. Nenhum outro produto dimérico foi detectado a pH 6,5, e nenhum produto polimérico foi sintetizado neste valor de pH, ou em pH 3,0. O 2,6-DMP que não reagiu foi detectado nos sobrenadantes decorrentes da mistura de reação em ambos os valores de pH e tempos reacionais avaliados, e foi identificado por CG-EM (vide apêndice 1 pg. 168).

Tabela 3 – Produtos da oxidação do 2,6-DMP catalisada por lacase de *B. rhodina* em diferentes valores de pH e tempos reacionais



Produtos de Oxidação (mg (%))					
pH	Tempo (h)	I	II	III	*2,6-DMP
3,0	48	nd	55 (5,2)	nd	462
	96	**	81 (7,7)	**	434
	144	nd	nd	nd	437
6,5	48	79 (7,4)	nd	nd	451
	96	91 (8,5)	nd	nd	442
	144	87 (8,1)	nd	nd	446

* 2,6-DMP remanescente

** 8 mg mistura dos dímeros I e III

nd = não detectado

Fonte: o próprio autor

A pH 3,0 em 48h de reação, foi obtido apenas o dímero II como

produto (sólido roxo), enquanto que em 96h foi formada uma mistura dos dímeros **II** (sólido roxo), **I** e **III**. Os compostos **I** e **III** foram recuperados após as lavagens do precipitado roxo (dímero **II**) com CH_2Cl_2 . Em tempos mais longos (144h), apenas o produto **I** (precipitado amarelo) foi obtido.

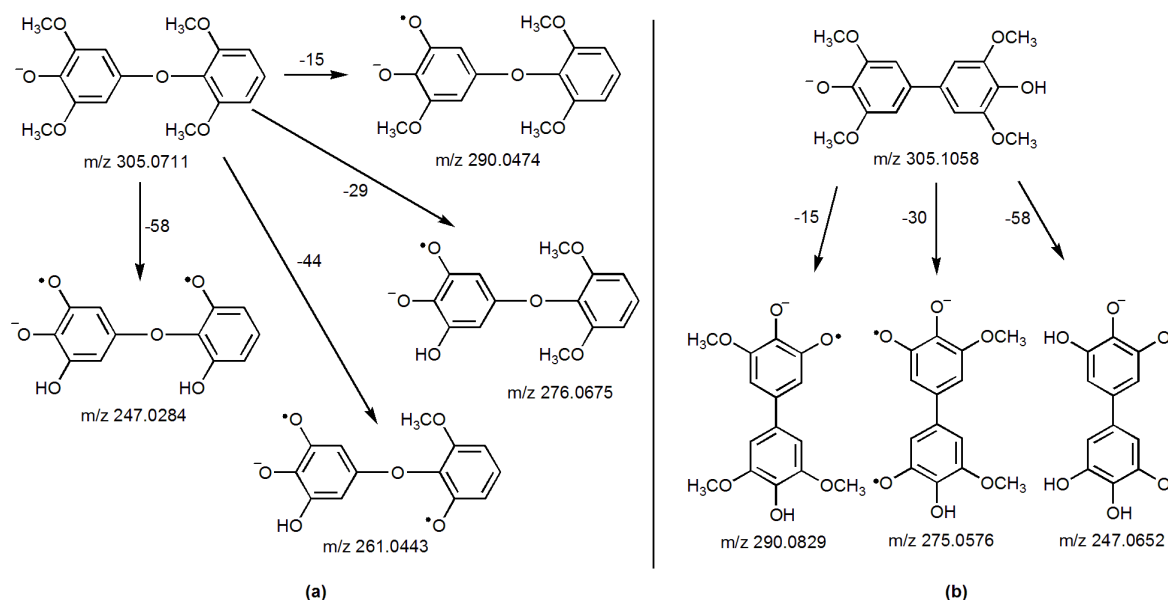
A elucidação da estrutura química do dímero **II** foi determinada como 3,3',5,5'-tetrametoxidifenilquinona (vide apêndice 2 pg. 178), por RMN de ^{13}C no estado sólido, uma vez que este composto foi insolúvel nos solventes deuterados convencionais. O sinal em 56,7 ppm pertence aos carbonos dos grupos metoxilas e os sinais equivalentes aos carbonos 3 e 5 aparecem a 103,4 ppm, enquanto o sinal em 133,2 corresponde ao carbono 4 e em 152,2 ppm aos carbonos 2 e 6. O último sinal em 173,8 ppm corresponde ao deslocamento químico do carbono 1, o que é consistente com o descrito na literatura científica para este composto (PUROHIT; PARVEZ & VERMA, 2007). O ponto de fusão determinado foi de 308-311 °C.

O dímero **I** foi caracterizado por RMN de ^1H como o 3,3',5,5'-tetrametoxibifenil-4,4'-diol (**TMBP**) (vide apêndice 2 pg. 180). O sinal em 3,98 ppm (singleto) foi atribuído aos 12H dos quatro grupos metoxilas, o sinal em 6,73 ppm (singleto) aos 4H do anel aromático e um sinal em 5,56 ppm (singleto) de baixa intensidade referido aos 2H dos grupos hidroxilas. A análise mostrou que esta estrutura era compatível com TMBP descrito na literatura, quando outras lacases foram utilizadas (ADELAKUN et al., 2012a; WAN; DU & MIYAKOSHI, 2008). O ponto de fusão determinado foi de 185-188 °C, de acordo com o descrito na literatura (WAN; DU & MIYAKOSHI, 2008).

A lacase de *B. rhodina* foi capaz de sintetizar o dímero **III** formado pela reação de acoplamento C–O. Este composto foi identificado no sólido amarelo escuro (**B**) obtido das lavagens com CH_2Cl_2 do precipitado roxo (**II**) a pH 3,0 em 96 h de reação. Inicialmente o sólido **B** foi analisado por CG-EM e revelou sinais amplos que se sobrepuseram (vide apêndice 1 pg. 170) . Um dos sinais foi equivalente ao do dímero **I**. A análise de CG-EM não permitiu a identificação de outro dímero ou qualquer outro composto devido à baixa resolução. A análise deste sólido **B** por espectrometria de massa de alta resolução (ESI-Q-TOF HRMS), operando no modo negativo $[\text{M}-\text{H}]^-$, mostra a presença de vários picos com diferentes relações massa/carga, entre os quais um pico de baixa intensidade em m/z 305.0711, de acordo com a fórmula molecular $\text{C}_{16}\text{H}_{17}\text{O}_6^-$ (vide apêndice 3 pg. 182). Quando o espectro MS/MS foi adquirido, as fragmentações foram observadas com m/z de

290.0474, 276.0675, 261.0443 e 247.0284 (vide apêndice 3 pg. 182). O mecanismo de fragmentação previsto está no Esquema 18a. O pico em m/z 290.0474 está relacionado à perda de 1 grupo metila; m/z 276.0675, perda de 1 grupo metila e 1 grupo metileno; m/z 261.0443, perda de 2 metilas e 1 grupo metileno; e m/z 247.0284 correspondeu à fragmentação de 2 grupos metila e 2 grupos metileno. A partir dos detalhes dos padrões de fragmentação, o pico em m/z 305.0711 presente no espectro de massa foi identificado como 4-(2,6-dimetoxi-fenoxi) -2,6-dimetoxifenol.

Esquema 18 – Principais fragmentações de massa de **(a)** 4-(2,6-dimetoxi-fenoxi) -2,6-dimetoxifenol (dímero III) e **(b)** TMBP (dímero I)



Fonte: o próprio autor

A fim de demonstrar que o composto obtido e identificado como dímero III não era o isômero TMBP (I), a análise por ESI-Q-TOF HRMS também foi realizada para o dímero I (amostra pura cristalina) operando em modo negativo, $[M-H]^-$. A análise apresentou um pico de íon em m/z 305.1058 $[M-H]^-$ (vide apêndice 3 pg. 182). O espectro MS/MS do isômero I apresentou fragmentos em m/z 290.0829, 275.0576 e 247.0652 (vide apêndice 3 pg. 182), um padrão de fragmentação com perda sucessiva de grupos metila e metileno (Esquema 18b). A partir das análises de ambos os espectros MS/MS, observou-se que os fragmentos de m/z 261.0443 e

m/z 276.0675 foram responsáveis pela diferenciação dos dois isômeros. Além dos padrões de fragmentação descritos para comprovar a síntese dos dois dímeros a partir da biocatálise com a lacase de *B. rhodina*, o pico de base (100%), que corresponde ao fragmento mais estável, também foi diferente para cada isômero. Para o composto **I**, o pico base foi em m/z 275.0576, enquanto que para o composto **III** estava em m/z 247.0284.

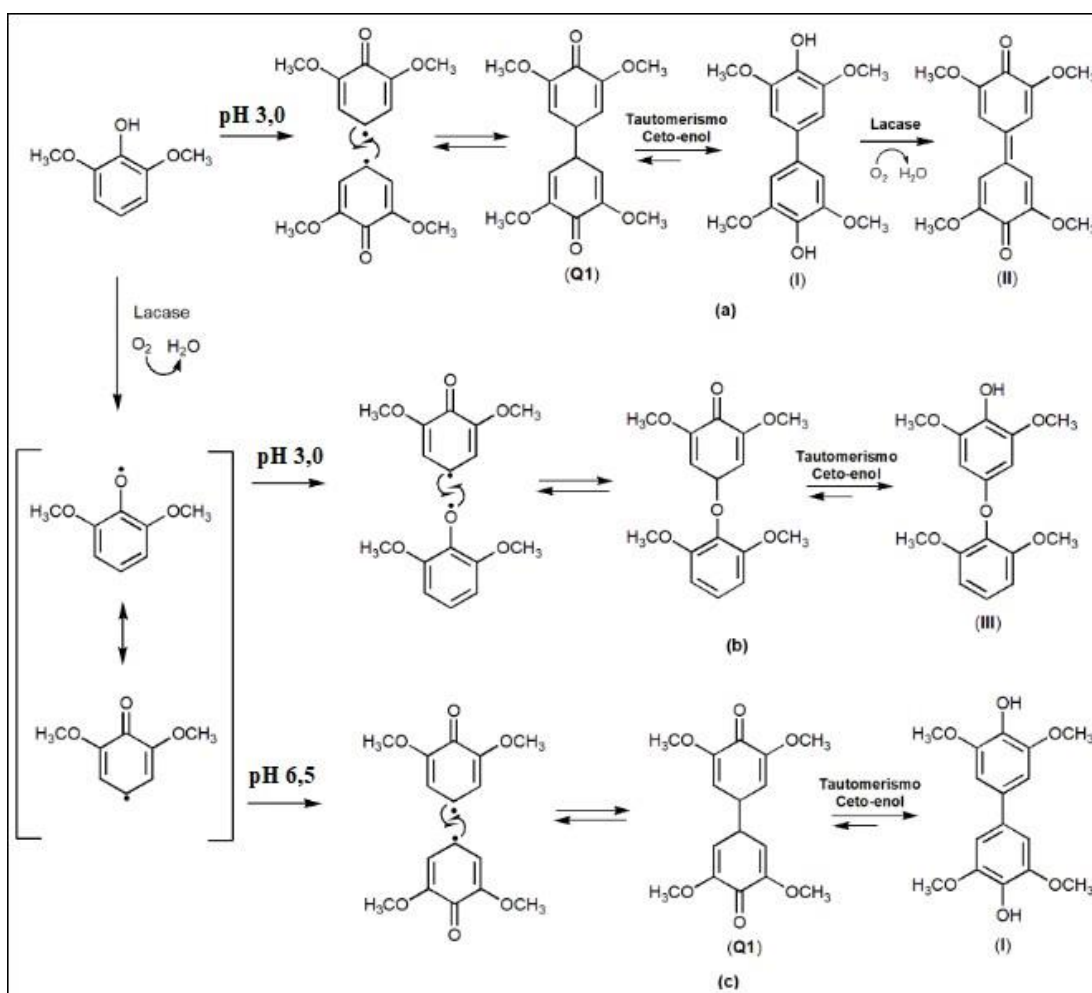
Os resultados obtidos com a lacase de *B. rhodina* a pH 3,0 e 2,6-DMP como substrato indicaram que a formação do produto dimérico **II**, a 48h, foi resultado da oxidação pela lacase através do mecanismo descrito por Engelmann e colaboradores (ENGELMANN; ILLNER & KRAGL, 2015). Em 96h, uma mistura dos dímeros **I** e **III** foi detectada nas lavagens com CH_2Cl_2 de dímero **II** e a presença de **III** não foi detectada em 144h. Isto sugere que foi instável e decomposto para 2,6-DMP nos tempos de reação mais altos, ou então, a quantidade formada foi muito baixa em relação ao dímero **I**, não podendo ter sido detectado. Em contraste, a formação de difenilquinona **II** não foi observada a pH 6,5; apenas o TMBP (**I**) foi sintetizado, sugerindo que a lacase não foi capaz de promover uma reação de oxidação adicional neste valor de pH.

Com base nos resultados obtidos nos dois diferentes valores de pH e tempos de reação, propôs-se um mecanismo pelo qual os três compostos diméricos (**I**, **II** e **III**) foram sintetizados a partir de 2,6-DMP (Esquema 19). Lacase catalisa a oxidação do 2,6-DMP para espécies radicais fenoxi, que formam espécies *para*-radical por meio de estabilização de ressonância. A pH 3,0, o acoplamento de duas espécies *para*-radical levou à formação da difenilquinona **I** por uma ligação carbono-carbono. O mecanismo (Esquema 19a) sugere que o primeiro passo resultou nas espécies em equilíbrio ceto-enol (**Q1** e **I**), sendo a forma enol (**I**) a mais estável devido à sua aromaticidade. Na sequência exibida, o dímero **I** sofreu uma reação de oxidação adicional catalisada pela lacase levando à formação do dímero **II**, como produto de oxidação final. A combinação de um radical fenoxi com uma espécie *para*-radical levou à síntese do composto **III**, por acoplamento através de ligações carbono-oxigênio (Esquema 19b). A pH 6,5, o dímero **I** foi imediatamente formado por acoplamento das duas espécies *para*-radical (Esquema 19c) e foi o único produto de oxidação formado.

A diferença para os produtos de oxidação carbono-carbono obtidos foi resultante do potencial redox da lacase de *B. rhodina* nos valores de pH

avaliados. O potencial redox desta enzima em relação ao Eletrodo Padrão de Hidrogênio foi de 0,898V em pH 3,0 e de 0,724V em pH 6,5 (vide apêndice 5 pg. 185-186). Como no maior valor de pH o seu potencial redox é menor, esta lacase não foi capaz de promover a etapa de oxidação adicional para a formação do dímero **II**, cessando a reação no dímero **I**. Enquanto que em pH 3,0, como o potencial redox é mais elevado, a lacase catalisou a reação de oxidação adicional de **I** formando o dímero **II**.

Esquema 19 – Mecanismo proposto para a síntese de dímeros de 2,6-DMP catalisados por lacase de *B. rhodina*. **(a)** acoplamento oxidativo C–C a pH 3,0, **(b)** acoplamento oxidativo C–O a pH 3,0 e **(c)** acoplamento oxidativo C–C a pH 6,5



Fonte: o próprio autor

A formação de bifenol **I** a partir do dímero **II** em pH 3,0 durante 144h ocorreu através de uma etapa de redução, que não poderia ser catalisada pela lacase, considerando que esta é uma enzima oxidativa. Possivelmente existe um

agente redutor, uma redutase, presente na preparação bruta da lacase de *B. rhodina*, utilizada como fonte de enzima, que esteja ativa em pH 3.0. Para avaliar a presença de algum agente redutor na mistura reacional alguns experimentos foram conduzidos usando o inibidor de lacase azida de sódio (NaN_3). No primeiro momento, uma reação controle contendo 2,6-DMP, tampão citrato-fosfato (pH 3,0) e solução de NaN_3 (20 mM) foi agitada durante 15 min a 37 °C, seguido da adição de lacase (3 U). Após 24h de reação, não houve a formação de produtos nestas condições, confirmando a inibição da lacase pela NaN_3 . Dois outros experimentos contendo 2,6-DMP, tampão citrato-fosfato (pH 3,0) e solução de lacase (3 U) foram mantidos sob agitação a 37 °C durante (i) 17h e o outro durante (ii) 46h. Nestes respectivos tempos, foi observado a formação de precipitado roxo, referente ao dímero II, em ambos os casos. À estas misturas foi então adicionada solução de azida de sódio (20 mM) e a reação prosseguiu até completar 144h. Em ambas as reações, o TMBP (dímero I) foi detectado pela análise por CG-EM, confirmando a formação do dímero I em 144h de reação. Para que o dímero II fosse convertido em I, um agente redutor, por exemplo, uma enzima redutase que não foi inibida pela azida de sódio, deve estar presente no extrato bruto de lacase, sendo esta responsável pela etapa de redução.

Não há relatos na literatura científica que descreva a síntese dos dímeros, bifenol (I) e difenilquinona (II), utilizando-se a mesma fonte de enzima no acoplamento oxidativo C–C de 2,6-DMP catalisado por lacase. As fontes de lacases estudadas para a produção de compostos diméricos únicos de 2,6-DMP incluíram as de plantas (WAN; DU & MIYAKOSHI, 2008), fungos (ADELAKUN et al., 2012a; KALLIO et al., 2009) extrato comercial de crustáceo fúngico (ENGELMANN; ILLNER & KRAGL, 2015) e bactérias (BETTS & KING, 1991). O dímero III, 4-(2,6-dimetoxifenoxi)-2,6-dimetoxifenol, também foi relatado como sendo formado a partir de 2,6-DMP usando uma lacase purificada em forma de cristal (rMaL) (KALLIO et al., 2009). A lacase de *B. rhodina* MAMB-05 foi diferente e produziu os dois dímeros de acoplamento C–C (I e II) e o produto de acoplamento C–O (III) através do controle das condições de reação como pH e tempo.

A síntese de diferentes produtos diméricos, bem como a sua distribuição, mostrou ser seletivamente dependente do pH e do tempo de reação (LLEVOT et al., 2016). Alguns estudos com diferentes compostos fenólicos mostraram que os produtos de dimerização oxidativa dependem do pH, bem como a

fonte de lacase, e as diferenças nas condições de reação afetaram os produtos diméricos formados (LAHTINEN et al., 2013; LEONOWICZ & EDGEHILI, 1984).

Concluindo, a reação do 2,6-DMP catalisada por lacase de *B. rhodina* MAMB-05 foi capaz de promover o acoplamento de C–C e C–O, levando à síntese de dois dímeros (II e III) no mesmo meio de reação a pH 3,0, mas a pH 6,5, levou à formação apenas de TMBP (I) independente do tempo de reação avaliado. Estes resultados demonstram que o controle regio-químico do acoplamento oxidativo, bem como o controle seletivo da síntese de bifenol e difenilquinona podem ser obtidos por variação no pH e no tempo de reação. Consequentemente, os resultados relatados aqui em comparação com os trabalhos publicados na literatura científica, demonstraram que uma lacase de uma única fonte (*B. rhodina* MAMB-05) sintetizou 3 diferentes produtos de dimerização oxidativa; dependendo do pH e do tempo de reação.

4.2 OTIMIZAÇÃO DA SÍNTESE DE 3,3',5,5'-TETRAMETOXIBIFENIL-4,4'-DIOL (TMBP) CATALISADA POR LACASE DE *BOTRYOSPHAERIA RHODINA*

A lacase de *B. rhodina* MAMB-05 catalisou a síntese seletiva de TMBP (dímero I) de 2,6-DMP como substrato a pH 6,5. Conforme indicado na Tabela 4, um esquema fatorial incompleto com 13 experimentos foi desenvolvido e o ponto central foi realizado em triplicata para estimar o erro de variância (VITHANAGE et al., 2015). As variáveis investigadas para a síntese de TMBP foram: tempo de reação em horas (72, 96, 120), concentração de 2,6-DMP em mmol (2,2, 3,5, 4,8) e concentração de lacase (1,5, 3,0, 4,5) em (U) unidade de enzima. A temperatura foi fixada a 37 °C. As variáveis codificadas e os rendimentos de TMBP obtidos para cada síntese do projeto fatorial estão apresentados na Tabela 4. Este é o primeiro trabalho que descreve a síntese de TMBP catalisada por lacase usando uma abordagem de design estatístico para otimização e avaliação de produtos e a influência destas variáveis na reação de oxidação.

De acordo com os resultados apresentados na Tabela 4, o maior rendimento de TMBP foi obtido no experimento 2, onde o tempo foi 120 h, a concentração de 2,6-DMP foi de 2,2 mmol e o número de unidades de lacase foi de 3,0.

Tabela 4 – Planejamento fatorial Box-Behnken com as três variáveis estudadas para otimizar as condições de síntese do TMBP (dímero I) com a lacase de *Botryosphaeria rhodina* MAMB-05 sobre o 2,6-DMP em pH 6,5

Variáveis codificadas					
Experimentos	X₁	X₂	X₃	Quantidade	Rendimento de
				TMBP (I) (mmol)	TMBP (I) (%)
1	-1	-1	0	0.23	10.4
2	1	-1	0	0.30	13.5
3	-1	1	0	0.21	4.3
4	1	1	0	0.28	5.8
5	-1	0	-1	0.19	5.4
6	1	0	-1	0.41	11.7
7	-1	0	1	0.44	12.7
8	1	0	1	0.35	10.1
9	0	-1	-1	0.10	4.8
10	0	1	-1	0.23	4.7
11	0	-1	1	0.17	7.5
12	0	1	1	0.26	5.4
13	0	0	0	0.31	9.0
14	0	0	0	0.30	8.6
15	0	0	0	0.36	10.2

Fatores	Valores Reais		
	-1	0	1
X₁ (tempo, h)	72	96	120
X₂ (2,6-DMP, mmol)	2.2	3.5	4.8
X₃ (lacase, U)	1.5	3.0	4.5

Fonte: o próprio autor

O modelo quadrático ajustado para o rendimento de TMBP contendo as variáveis independentes codificadas está representado pela equação 2, onde os coeficientes de regressão foram obtidos usando o software Statistica 9.0. A equação contém apenas termos significativos no nível de 5%. O rendimento estimado de TMBP está representado por Y , e x_1 representa o tempo de reação, x_2 , a concentração de 2,6-DMP; e x_3 , atividade de lacase.

$$Y = 9.27 + 1.04 x_1 - 2.00 x_2 + 1.14 x_3 + 1.80 x_1^2 - 2.57 x_2^2 - 2.23 x_1 x_3 \quad (2)$$

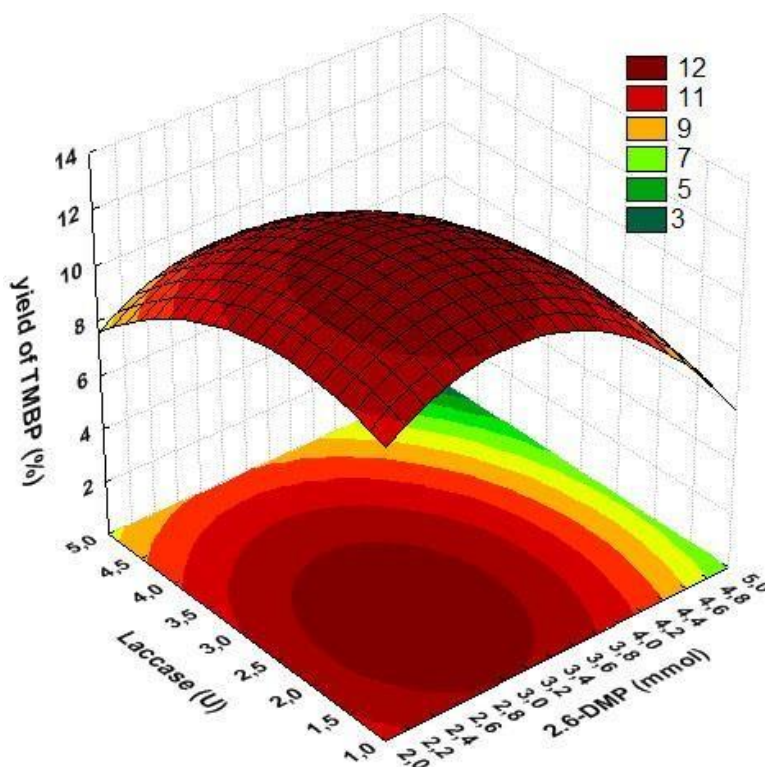
A análise de variância (ANOVA) mostrou que o modelo foi significativo ao nível de 5% e a falta de ajuste não foi significativa ($p = 0,16$). O valor R^2 foi 0.85, o que pode ser considerado apropriado, já que o valor R^2 deve ser superior a 0.80 para oferecer um bom ajuste do modelo aos dados experimentais (JOGLEKAR & MAY, 1987). A equação obtida sem termos significativos pode ser usada para propósitos preditivos e foi adequada para procedimentos de otimização, considerando não significante a falta de ajuste e o valor de R^2 . As variáveis de reação definindo a otimização de TMBP (dímero II) foram determinadas usando o Programa Statistica 9.0. As variáveis da reação que definem a otimização da síntese do TMBP pela lacase do *B. rhodina* MAMB-05 a pH 6,5 podem ser obtidas a partir da equação 2 usando-se um tempo de reação de 120 h, 2,85 mmol de 2,6-DMP e 2,25 unidades de lacase e resultou em um rendimento preditivo de 12,74% (vide apêndice 4 pg. 184).

A validação da equação preditiva que representa o rendimento médio (em triplicata) foi $11,93 \pm 0,49\%$. Ao aplicar o teste t para corridas experimentais únicas, não houve diferença significativa no nível de 5% entre o valor médio e o obtido pela análise do planejamento estatístico; isto é, 12,74%.

A superfície de resposta da região de combinação binária entre as variáveis originais das concentrações de lacase (U) e 2,6-DMP (mmol) pode ser observada na Figura 9. O gráfico em 3-D mostra as regiões de fronteira da resposta para as variáveis dependentes, e o rendimento do TMBP obtido através do modelo matemático, fixando a variável X_1 em 120h. Com base nos resultados da Figura 9, as melhores condições para a produção do TMBP, estimada com o melhor rendimento de 12%, foram obtidos com 2,6-3,4 mmol de 2,6-DMP e entre 1,35-3,38 U de lacase; valores próximos ao ponto central do projeto experimental.

O rendimento (12%) do produto de oxidação (TMBP) obtido a partir do modelo matemático foi baixo, entretanto lacases de outras fontes descritas na literatura apresentaram faixas de rendimento entre 8% e 19% obtidos com as lacases de *Pycnoporus coccineus* e *Rhus vernicifera*, respectivamente (WAN; DU & MIYAKOSHI, 2008) e um rendimento maior (22%) obtido com a lacase de *Trametes pubescens* (ADELAKUN et al., 2012a).

Figura 9 – Superfície de resposta tridimensional para a síntese do 3,3',5,5'-tetrametoxibifenil-4,4'-diol (TMBP) em função da concentração de 2,6-DMP (X2) e concentração de lacase em Unidade de enzima (X3). O tempo (X1) foi fixado em 120h, e a reação foi realizada a pH 6,5



Fonte: o próprio autor

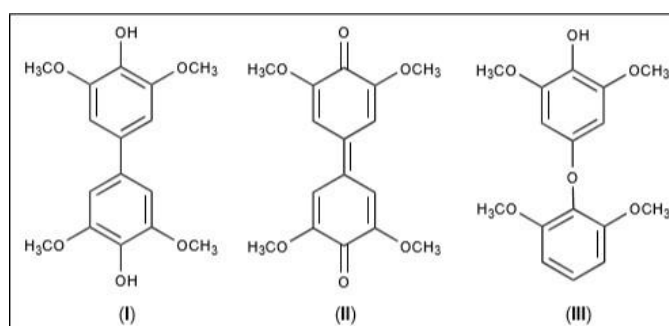
4.3 AVALIAÇÃO DOS PRODUTOS DE OXIDAÇÃO DO 2,6-DIMETOXIFENOL COM A LACASE DE *P. OSTREATUS* VARIEDADE FLORIDA

A síntese de compostos a partir de 2,6-DMP catalisada pela lacase de *P. ostreatus* foi conduzida em quatro valores de pH (3,0; 4,0; 5,0; 6,5). Os valores de pH de 4,0 e 5,0 foram escolhidos com base em uma observação anterior sobre os melhores valores de pH para esta lacase, usando-se ABTS e DMP como substratos, respectivamente (dados não publicados). A fim de comparar os produtos sintetizados pelas lacases de *P. ostreatus* e *B. rhodina* MAMB-05, também foram selecionados os valores de pH ótimo desta última enzima (pH 3,0 e 6,5) (DEKKER & BARBOSA, 2001).

A Tabela 5 apresenta os produtos de oxidação do 2,6-DMP resultantes da catálise com lacase de *P. ostrestus* nos diferentes valores de pH e

tempos de reação. Os resultados mostram que os dímeros de acoplamento carbono-carbono (I e II) e carbono-oxigênio (III) foram sintetizados de acordo com o valor de pH e o tempo reacional usado. A difenilquinona II e o TMBP (I) foram obtidos em todos os valores de pH e tempos reacionais avaliados, variando apenas o rendimento de cada composto. O dímero III foi produzido apenas em pH 5,0 durante 96 e 144h de reação.

Tabela 5 – Produtos da oxidação do 2,6-DMP catalisada pela lacase de *P. ostreatus* em diferentes valores de pH e tempos reacionais



Produtos de Oxidação				
pH	Tempo (h)	I (mg, (%))	II (mg, (%))	III (mg, (%))
3,0	48	5 (1,2)	29 (6,7)	nd
	96	27 (6,2)	21 (4,8)	nd
	144	13 (3,0)	46 (10,6)	nd
4,0	48	4 (1,0)	127 (29,3)	nd
	96	15 (3,4)	95 (22)	nd
	144	28 (6,4)	135 (31,1)	nd
5,0	48	2 (0,5)	127 (29,3)	nd
	96	*	199 (45,8)	*
	144	*	182 (42)	*
6,5	48	100 (22,8)	23 (5,3)	nd
	96	90 (20)	26 (6,0)	nd
	144	123 (28,1)	5 (1,2)	nd

* 0,002g mistura dos dímeros I e III

nd = não detectado

Fonte: o próprio autor

Os rendimentos obtidos para os produtos de dimerização oxidativa I e II chamam a atenção pela grande variação de acordo com o pH usado na reação com lacase de *P. ostreatus*. Em pH 3,0 a reação do 2,6-DMP não foi muito favorável, uma vez que os dois dímeros foram formados com baixo rendimento, conforme mostra a Tabela 5. O motivo pelo qual esta condição reacional não favoreceu a

catálise está relacionado com o uso do pH inapropriado para esta enzima, uma vez que o pH ótimo para este substrato é 5,0.

Quando a reação foi realizada em pH 4,0 e 5,0 a reação de oxidação foi favorável. O dímero **II** foi formado com rendimentos mais expressivos, variando de 22 a 45,8%. Acredita-se que nestas condições, o dímero **II** foi o produto principal em função do uso do pH ótimo da enzima, uma vez que sua síntese é resultado de uma oxidação adicional do dímero **I** catalisada pela lacase (Esquema 19a).

Em pH 6,5 o produto principal da reação enzimática foi o dímero **I**. Neste caso, a reação de oxidação adicional responsável pela formação de **II** não foi favorecida neste pH, muito provavelmente por não se tratar do pH ótimo desta enzima.

A estrutura dos dímeros **I** e **II** foi elucidada usando RMN de ^1H e CG-EM para o primeiro (vide apêndice 2 pg. 181 e 1 pg. 169) e RMN de ^{13}C para o último, conforme descrito no item 4.1 (vide apêndice 2 pg. 179). O ponto de fusão dos dímeros **I** e **II** foram determinados, sendo 185-188 °C e 308-311°C, respectivamente. Para a identificação do dímero **III** foi realizada primeiramente uma análise por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (CG-EM) (vide apêndice 1 pg. 171). O cromatograma obtido mostrou a presença de dois sinais, sendo o pico 2 referente ao TMBP (**I**), conforme mostra o espectro de massa. O pico 1 apresentou no seu espectro de massa um sinal m/z 292, que pode corresponder a estrutura do composto **III** sem um grupo metileno. A comparação desta análise de CG-EM com a obtida pela reação com lacase de *B. rhodina*, não pôde ser feita, uma vez que para essa última, foram observados sinais amplos e sobrepostos. Uma análise de espectrometria de massa de alta resolução por Ionização Electrospray/tempo de vôo (ESI-Q-HRMS), operando em modo negativo, foi requerida para elucidar de maneira inequívoca a estrutura química do composto referente ao pico 1. O espectro de massa apresentou um pico em m/z 305.0708, estando de acordo com a fórmula molecular $\text{C}_{16}\text{H}_{17}\text{O}_6^-$, e o espectro de MS/MS obtido apresentou fragmentações com m/z 290.0460, 276.0687 261.0419 e 247.0282, correspondentes às fragmentações obtidas na caracterização do composto **III** sintetizado pela ação da lacase de *B. rhodina* (vide apêndice 3 pg. 183). O sólido amarelo obtido na extração da fase aquosa em cada reação de oxidação, foi analisado por CG-EM e identificado como 2,6-DMP remanescente, com íon molecular 154 (vide apêndice 1 pg.168).

Ao comparar os resultados das duas enzimas estudadas (Tabela 6), foi observado que em pH 3,0 ambas as lacases levaram à síntese do dímero II. No entanto, o basideomiceto *P. ostreatus* promoveu a formação em maior quantidade, quando comparado com a lacase do ascomiceto *B. rhodina*. Diferentemente da lacase de *B. rhodina*, a do basidiomiceto *P. ostreatus* promoveu a síntese do dímero I em pH 3,0. Em pH 6,5 o dímero I foi o produto principal da catálise com a lacase do *P. ostreatus* com rendimentos de 20 a 28%, enquanto que na reação com a do *B. rhodina* este dímero foi o único produto, porém com rendimentos inferiores (7,5 a 8,5%). O dímero III foi sintetizado apenas nas reações com valores de pH 3,0 (96h) e 5,0 (96 e 144h) quando utilizadas as lacases de *B. rhodina* e *P. ostreatus*, respectivamente.

Tabela 6 – Comparação dos rendimentos dos produtos de oxidação do 2,6-DMP obtidos pela ação catalítica das lacases de *B. rhodina* e *P. ostreatus* em diferentes tempos de reação e valores de pH

pH	Tempo (h)	Produtos de Oxidação (%)					
		<i>B. rhodina</i>			<i>P. ostreatus</i>		
		I	II	III	I	II	III
3,0	48	nd	5,2	nd	1,2	6,7	nd
	96	*	7,7	*	6,2	4,8	nd
	144	nd	nd	nd	3,0	10,6	nd
4,0	48	-	-	-	1,0	29,3	nd
	96	-	-	-	3,4	22	nd
	144	-	-	-	6,4	31,1	nd
5,0	48	-	-	-	0,5	29,3	nd
	96	-	-	-	**	45,8	**
	144	-	-	-	**	42	**
6,5	48	7,4	nd	nd	22,8	5,3	nd
	96	8,5	nd	nd	20	6,0	nd
	144	8,1	nd	nd	28,1	1,2	nd

* 8 mg ** 0,002g mistura dos dímeros I e III

nd = não detectado

Fonte: o próprio autor

A lacase de *P. ostreatus* mostrou ser mais eficiente na síntese dos dímeros I e II. Para as lacases de *B. rhodina* e *P. ostreatus* o dímero II foi produzido com rendimentos de 7,7% e 45,8%, e o dímero I com 8,5% e 28%, respectivamente.

Os resultados das reações de oxidação enzimática do 2,6-DMP mostraram que o uso de diferentes lacases, neste caso, uma enzima de basidiomiceto (*P. ostreatus*) e outra de ascomiceto (*B. rhodina*) proporcionou a síntese dos três dímeros de acoplamento, havendo uma variação na distribuição dos produtos de acordo com o valor do pH do meio de reacional. Além da fonte de lacase e pH do meio, o tempo de reação também mostrou ser um fator que contribui para os produtos de oxidação formados. Assim, a síntese seletiva destes compostos pode ser controlada através da variação do pH, tempo de reação e da fonte de lacase.

4.4 COMPARAÇÃO DOS PRODUTOS DE OXIDAÇÃO DO 2,6-DIMETOXIFENOL CATALISADO PELA LACASE DE *B. RHODINA* USANDO SISTEMA LACASE-MEDIADOR, FLUXO DE OXIGÊNIO E COBRE

O alcance das oxidações catalisadas por lacases pode ser aumentado com o auxílio de mediador químico, através de um sistema lacase-mediador (SLM) (GIARDINA et al., 2010b; RIVA, 2006), expandindo o potencial catalítico da enzima sobre diferentes substratos. Neste sistema o mediador é rapidamente oxidado pela lacase, para atuar como um carregador de elétrons entre a enzima e o substrato alvo.

A avaliação e comparação dos produtos de oxidação do 2,6-DMP por lacases de *P. ostreatus* e *B. rhodina* mostraram que esta última, foi menos eficiente na síntese dos dímeros I e II. A partir destes resultados, foi proposto um estudo da oxidação deste substrato catalisado por um SLM, usando a lacase de *B. rhodina*, tendo como objetivo investigar os produtos formados nos valores de pH 3,0 e 6,5, e seus respectivos rendimentos.

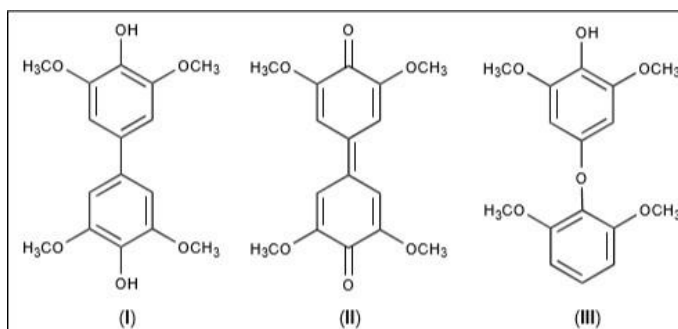
Foram selecionados como mediadores químicos os compostos sintéticos ABTS e TEMPO, comumente utilizados em sistema lacase-mediador, visto que apresentam maior eficiência do que os mediadores naturais. As reações de oxidação catalisadas pelo SLM foram conduzidas de acordo com as condições otimizadas para a síntese do TMBP em pH 6,5, mas com temperatura de 32 °C, devido ao ponto de fusão (36-38 °C) do composto TEMPO. Para cada mediador avaliado, também foi realizada uma reação controle contendo o substrato, água e o respectivo mediador, na ausência de lacase.

Um sistema controle de reações sem a presença de mediadores também foi efetuado paralelamente. Em pH 3,0 os dímeros de acoplamento I e II foram obtidos com 3% e 33% (6 e 65 mg) de rendimento, respectivamente. Em pH 6,5 a síntese seletiva do TMBP (I) foi obtida com rendimento de 12,6% (25 mg). O resultado do controle em pH 3,0 mostrou que o uso das condições reacionais otimizadas para a síntese do TMBP, quando aplicadas neste valor de pH, quadruplicou a produção do dímero II, que em 96h apresentava rendimento de 7,7% (dado apresentado na seção 4.1). A obtenção de 3% do dímero I, indica que em 120h de reação apenas uma pequena parte da difenilquinona II foi convertida ao bifenol I, através de uma etapa de redução catalisada por um agente redutor, presente no extrato bruto de lacase, conforme discutido na seção 4.1.

A Tabela 7 apresenta os produtos de oxidação do 2,6-DMP obtidos na catálise com os SLM e de seus respectivos controles. Os resultados mostram que em pH 3,0, o uso do mediador TEMPO aumentou a síntese do dímero II para 41,6%, demonstrando a eficiência do SLM. A redução do dímero II para o dímero I, não ultrapassou os 3% de rendimento. Estes dados de redução não estão apresentados na Tabela 7, uma vez que não são resultados da oxidação pela lacase.

Para o mediador ABTS em pH 3,0, foram observadas algumas variações nas reações realizadas. Na primeira reação foi confirmada a obtenção do dímero II, como único produto, com 49% de rendimento. Ao efetuar a reação pela segunda vez, nas mesmas condições reacionais, foi obtido 30% do dímero II e 15% do dímero I. Aqui, o composto I foi obtido pela redução do dímero II, uma vez que foi observado nas primeiras horas de reação a formação de um precipitado roxo, referente a II, e ao final de 120h haviam precipitado roxo e precipitado esbranquiçado no meio reacional. Em uma terceira reação, inicialmente também houve a formação de precipitado roxo, mas ao final de 120h somente precipitado esbranquiçado foi observado, indicando a redução de todo o dímero II para TMBP com 41% (81,2 mg) de rendimento. Isso sugere que o agente redutor, responsável pela redução do dímero II para o dímero I, está presente em diferentes concentrações na solução 1% do extrato bruto da lacase de *B. rhodina*, usada nas reações de oxidação do 2,6-DMP. Além disso, a presença do sistema lacase/ABTS proporcionou aumento no produto de oxidação, que variou de 41 a 49% de rendimento, uma vez que o produto de redução é derivado do produto de oxidação catalisado pelo SLM.

Tabela 7 – Produtos da oxidação do 2,6-DMP catalisada pelo SLM usando a lacase do *B. rhodina*



Produtos de Oxidação					
Mediadores	pH	I (mg, (%))	II (mg, (%))	III (mg, (%))	2,6-DMP* (mg)
ABTS	3,0	nd	**	nd	6,2
	6,5	8,5 (4,3)	85 (43)	nd	7,4
Controle		34 (17,2)	nd	nd	62
TEMPO	3,0	nd	82 (41,6)	nd	9,3
	6,5	18 (9,1)	68 (34,5)	nd	2,0
Controle		nd	50 (25,4)	nd	44

nd = não detectado

* 2,6-DMP remanescente

** Reação 1: (97 mg) 49%; Reação 2: (59,1 mg) 30%; Reação 3: nd

Fonte: o próprio autor

Os resultados obtidos em pH 6,5 indicam que os sistemas lacase-mediador avaliados, aumentaram o potencial catalítico da enzima, favorecendo a etapa de oxidação adicional responsável pela formação do dímero II (Esquema 19a). A eficiência de lacase/ABTS na oxidação do dímero I para o dímero II foi maior que lacase/TEMPO, com rendimentos de 43% e 34,5%, respectivamente. Este resultado pode ser consequência do mecanismo de oxidação envolvido para cada SLM. A oxidação pelo sistema lacase/ABTS ocorre por um mecanismo de transferência de elétrons, envolvendo o cátion radical (ABTS^{•+}) que é formado rapidamente. Enquanto para o sistema lacase/TEMPO a oxidação acontece por um mecanismo iônico, mais longo, envolvendo as etapas de ataque nucleofílico ao íon oxoamônio, formação de um aducto seguida da sua desprotonação para a formação do produto oxidado (Esquema 4b, pg 36). Quando a reação ocorreu na ausência de mediador, o produto de oxidação final, TMBP, foi obtido com 12,6% de rendimento.

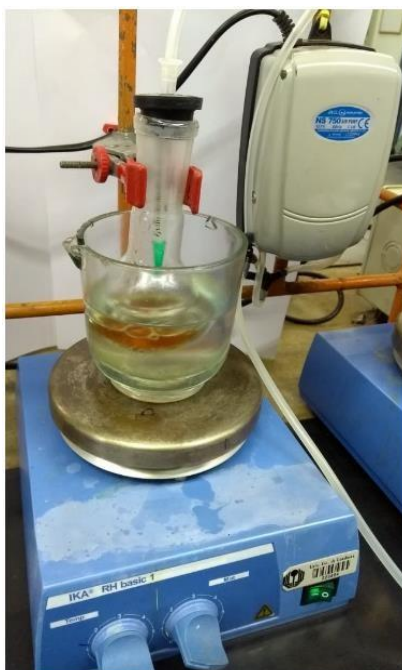
Nos sistemas controles, ou seja, na ausência de lacase, o ABTS foi capaz de produzir apenas o dímero I (17,2%). Em contra partida, o sistema lacase/ABTS levou a formação do dímero II como produto principal, em ambos os valores de pH. O mediador TEMPO sintetizou somente o dímero II (25,4%), enquanto o SLM elevou a sua síntese em 64 e 36% de rendimento em pH 3,0 e 6,5, respectivamente. Estes resultados demonstram que ao utilizar o SLM, a lacase foi responsável pela oxidação do 2,6-DMP, como consequência do aumento do seu potencial catalítico, quando combinada com um mediador. Além disso, as reações controles indicam que o TEMPO é um oxidante mais forte que o ABTS, promovendo dois eventos de oxidação.

De acordo com os resultados apresentados, os compostos avaliados ABTS e TEMPO foram mediadores eficientes para a lacase de *B. rhodina*, sugerindo o aumento do potencial redox desta enzima. A oxidação do 2,6-DMP para o dímero II foi maior para lacase/ABTS do que lacase/TEMPO em ambos os valores de pH analisados. Na literatura científica não é descrito a avaliação dos produtos de oxidação do 2,6-DMP catalisados pelos sistemas lacase/TEMPO e lacase/ABTS.

Visto que lacases são enzimas que catalisam a oxidação de substratos fenólicos com concomitante redução de oxigênio molecular à água, a presença de oxigênio no meio reacional se mostra essencial para o processo de biocatálise. Com o objetivo de aumentar a produção dos dímeros de oxidação do 2,6-DMP, novas reações foram avaliadas com a lacase de *B. rhodina*, intensificando-se o fluxo de oxigênio, borbulhando-se ar no meio reacional, com o auxílio de uma bomba de aquário, como mostra a Figura 10.

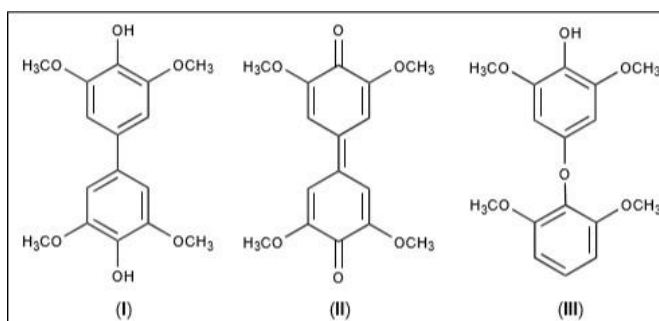
Os experimentos foram realizados em pH 3,0 e 6,5 com o borbulhamento de oxigênio por períodos de 5 e 24 horas contínuas e o tempo reacional foi de 120h à 37 °C. A Tabela 8 apresenta os resultados dos dímeros de acoplamento carbono-carbono obtidos para cada valor de pH e tempo de fluxo de oxigênio avaliados. O dímero de acoplamento carbono-oxigênio (III) não foi detectado.

Figura 10 – Reação de oxidação do 2,6-DMP catalisada pela lacase de *B. rhodina* com o borbulhamento de oxigênio no meio reacional



Fonte: o próprio autor

Tabela 8 – Produtos da oxidação do 2,6-DMP obtidos pela catálise da lacase de *B. rhodina* com borbulhamento de oxigênio no meio reacional



pH	Fluxo de O ₂ (h)	Produtos de Oxidação			2,6-DMP* (mg)
		I (mg, (%))	II (mg, (%))	III (mg, (%))	
3,0	5	nd	91,6 (46,5)	nd	4
	24	nd	90,2 (45,8)	nd	4,1
6,5	5	42,8 (21,6)	nd	nd	47
	24	43 (21,7)	nd	nd	45

nd = não detectado

* 2,6-DMP remanescente

Fonte: o próprio autor

Os resultados mostram que concentrações mais elevadas de oxigênio no meio reacional aumentou o rendimento dos produtos de oxidação. No entanto, não houve diferenças nos rendimentos entre os períodos de 5 e 24 horas de borbulhamento de oxigênio. Em pH 3,0 o dímero II foi sintetizado com um rendimento de 46,5%, ou seja, aumentou 40% em comparação com as condições normais, nas quais foi obtido 33% de rendimento. O dímero I proveniente da redução de II teve 1% de rendimento (dados não apresentados na Tabela 8). Em pH 6,5 o dímero I aumentou 72% o rendimento, passando de 12,6% nas condições normais, para 21,6% de rendimento quando aplicado o borbulhamento de oxigênio.

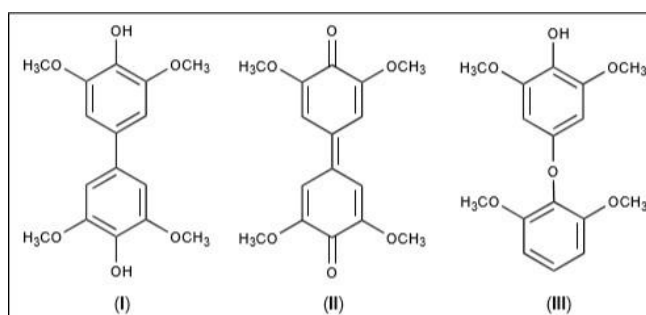
Conforme descrito na introdução deste trabalho, as lacases apresentam no seu sítio ativo uma região do cobre T1, responsável pela oxidação do substrato e um “cluster” trinuclear formado por cobre T2 e T3 onde ocorre a redução do oxigênio molecular à água. Para a função do ciclo catalítico destas enzimas a presença de oxigênio molecular é fundamental, o que foi confirmado com os experimentos realizados. A elevação da concentração de oxigênio no meio reacional proporcionou a síntese dos dímeros de acoplamento carbono-carbono com rendimentos superiores aos alcançados nas condições normais avaliadas.

Uma vez que os mediadores ABTS e TEMPO foram efetivos para a lacase de *B. rhodina*, assim como o aumento do fluxo de oxigênio contribuiu para melhorar o rendimento dos dímeros do 2,6-DMP, decidiu-se investigar a combinação do SLM com o borbulhamento de oxigênio no meio reacional. Os experimentos foram realizados nos valores de pH 3,0 e 6,5, contendo os sistemas lacase/ABTS e lacase/TEMPO, com 5 horas de borbulhamento de oxigênio e tempo reacional de 120h a 32 °C. A Tabela 9 mostra os resultados dos dímeros de oxidação do 2,6-DMP obtidos para cada SLM.

De acordo com os resultados apresentados na Tabela 9, em pH 3,0 o dímero II foi o produto de oxidação formado quando aplicado os dois SLM com fluxo de oxigênio. Para o sistema lacase/TEMPO o dímero II foi obtido com 43,1% de rendimento. Ao comparar a oxidação usado apenas o sistema lacase/TEMPO ou lacase com fluxo de oxigênio, os rendimentos de II foram 41,6 e 46,5% respectivamente, mostrando que não houve diferença considerável no rendimento da reação. Assim, este produto pode ser sintetizado usando lacase de *B. rhodina* associada ao fluxo de oxigênio, que tem um custo inferior ao respectivo mediador, garantindo rendimentos superiores a 40%. O dímero I foi obtido com 1,5% de

rendimento, pela redução do dímero **II**, dados não apresentados na tabela, uma vez que não são resultados da oxidação por lacase. Quando empregado o sistema lacase/ABTS com fluxo de oxigênio o TMBP (**I**) foi obtido 41% (81,2 mg) de rendimento, como resultado da redução do dímero **II**, etapa promovida por um agente redutor presente no extrato bruto da enzima. Apenas 1% do dímero **II** não foi convertido em TMBP. Isso indica que a presença do sistema lacase/ABTS proporcionou o aumento no produto de oxidação, uma vez que o produto de redução é derivado do produto de oxidação catalisado pelo SLM.

Tabela 9 – Produtos da oxidação do 2,6-DMP catalisada pelo SLM com borbulhamento de oxigênio no meio reacional



Mediadores	pH	Produtos de Oxidação			2,6-DMP* (mg)
		I (mg, (%))	II (mg, (%))	III (mg, (%))	
ABTS	3,0	nd	1,97 (1)	nd	8,8
	6,5	13,5 (6,8)	35,8 (18,2)	nd	38,7
TEMPO	3,0	3 (1,5)	85 (43,1)	nd	8,4
	6,5	1 (0,5)	31 (15,8)	nd	61

nd = não detectado

* 2,6-DMP remanescente

Fonte: o próprio autor

Em pH 6,5 para ambos os SLM com adição do fluxo de oxigênio, o produto principal foi a difenilquinona **II**, decorrente da oxidação adicional proporcionada pelo uso dos mediadores, uma vez que na ausência de mediador químico foi obtido seletivamente o TMBP. No entanto, o composto foi sintetizado com rendimentos inferiores (18,2 e 15,8%) quando comparado apenas com os sistemas lacase/TEMPO e lacase/ABTS (34,5 e 43%), respectivamente, sugerindo que o fluxo de oxigênio age de forma negativa na oxidação do 2,6-DMP contendo os sistemas lacase-mediador. Uma proposta para este resultado é que a presença de

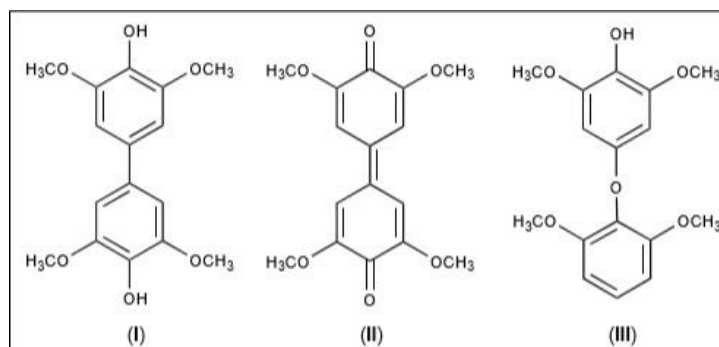
oxigênio em maior concentração estaria promovendo a oxidação dos mediadores, antes mesmo da lacase possibilitar esta oxidação, desfavorecendo a ação do SLM. Isso seria possível uma vez que em pH 6,5 a lacase de *B. rhodina* apresenta potencial redox menor que em pH 3,0. Entretanto, é necessária uma investigação mais detalhada para afirmar como o fluxo de oxigênio interfere nesta reação de oxidação.

Nas metaloenzimas, enzimas ligadas a íons metálicos, o cofator metal é normalmente o sítio ativo da enzima, responsável pela sua conformação estrutural e catalítica. Para as lacases, que são enzimas que apresentam átomos de cobre como cofatores no sítio ativo, estas são capazes de mudar seus estados de oxidação de Cu^+ e Cu^{2+} , catalisando reações de transferência de elétrons. Assim, foi avaliada a influência da adição do cofator cobre na reação de oxidação do 2,6-DMP catalisada pela lacase de *B. rhodina*, na presença e na ausência de fluxo de oxigênio. Como fonte do cofator foi usado sulfato de cobre ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$). Os resultados dos dímeros de oxidação do 2,6-DMP estão apresentados na Tabela 10.

Em pH 3,0, quando avaliada a catálise pela lacase com a adição do cofator cobre, houve diminuição no rendimento da difenilquinona **II** para 12,1%, quando comparada com a condição reacional normal, contendo apenas lacase, na qual foi obtido 33% de **II**. O dímero **I**, derivado da redução de **II**, teve 3% de rendimento. Em pH 6,5 o produto principal foi o dímero **II**, com 18,8%, mostrando que a combinação de lacase com o cofator favoreceu a reação adicional de oxidação, o que não acontece neste pH em condição reacional normal, onde foi sintetizado apenas o TMBP (**I**). A reação controle, que continha apenas cobre, promoveu a síntese dos dois produtos de acoplamento carbono-carbono, mas favoreceu a síntese do dímero **I**.

Ao avaliar o efeito do cofator cobre na oxidação do 2,6-DMP catalisada pela lacase na presença de fluxo de oxigênio, foi constatado que em pH 3,0 o dímero **II** foi obtido com rendimento (13,1%) muito próximo ao adquirido na ausência de fluxo de oxigênio. Em pH 6,5 os dímeros de acoplamento carbono-carbono (**I** e **II**) foram sintetizados com rendimentos mais elevados do que na ausência de fluxo de oxigênio, mostrando que maior concentração de oxigênio favoreceu a produção destes compostos.

Tabela 10 – Produtos da oxidação do 2,6-DMP catalisada por lacase de *B. rhodina* na presença de cobre e fluxo de oxigênio



	Produtos de Oxidação				
	pH	I (mg, (%))	II (mg, (%))	III (mg, (%))	2,6-DMP* (mg)
Cobre	3	5,9 (3)	23,8 (12,1)	nd	58
	6,5	15,4 (7,7)	37 (18,8)	nd	46,4
Cobre e Fluxo de Oxigênio	3	1,0 (0,5)	25,8 (13,1)	nd	35
	6,5	25,6 (12,9)	58 (29,4)	nd	6,4
Controle		25,2 (12,8)	15 (7,6)	nd	50

nd = não detectado

* 2,6-DMP remanescente

Fonte: o próprio autor

A estrutura do dímero **I**, obtido em cada reação de oxidação descrita acima, foi elucidada usando cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (CG-EM) (vide apêndice 1 pg.169). O dímero **II** teve seu ponto de fusão determinado (308-311 °C) e comparado com o valor obtido quando este dímero foi sintetizado pelas lacases de *P. ostreatus* e *B. rhodina* em condições reacionais normais, conforme descrito nos itens 4.1 e 4.3. O dímero de acoplamento carbono-oxigênio (**III**) não foi detectado nas análises CG-EM.

Nas reações do 2,6-DMP catalisadas pelo sistema lacase/TEMPO e quando associado este sistema com fluxo de oxigênio, ambos em pH 6,5, foi obtido um sólido amarelo escuro (1 mg) a partir da lavagem do precipitado roxo (dímero **II**). Este sólido também foi obtido em pH 3,0, pela catálise de lacase combinada com o cofator cobre e fluxo de oxigênio. Os sólidos obtidos nestas condições reacionais foram analisados por CG-EM. Nos cromatogramas obtidos, o pico 2 refere-se ao TMBP (**I**), conforme mostrado no espectro de massa, com íon molecular 306 e fragmentos em m/z 291, 263 e 248, um padrão de fragmentação com perda sucessiva de grupos metila e metileno (vide apêndice 1 pg. 172-177). O pico 3

apresentou sinal mais amplo no cromatograma, sendo obtido até três espectros de massas nessa região. O primeiro espectro de massa mostrou sinais em m/z 306, 292, 277, 263 e 249, seguindo um padrão de fragmentação com perda sucessiva de grupos metila e metileno (vide apêndice 1 pg. 172-177). Se o sinal em m/z 306 fosse o íon molecular, a estrutura química do composto corresponderia ao dímero de acoplamento carbono-oxigênio (III), visto que apenas os dímeros I e III apresentam este íon molecular. No entanto, de acordo com os resultados de oxidação com as lacases de *P. ostreatus* e de *B. rhodina* em condições normais de reação, no cromatograma o sinal referente ao dímero III aparece antes do sinal correspondente ao TMBP (I). Assim, sugere-se que o sinal em m/z 306 corresponda ao fragmento de algum composto com massa molecular superior a 306 g/mol, e que apresenta o mesmo padrão de fragmentação dos dímeros I e III. No segundo espectro de massa foram observados sinais em m/z 292, 277, 263 e 249, seguindo um padrão de fragmentação com perda sucessiva de grupos metila e metileno (vide apêndice 1 pg. 172-177). O último espectro de massa apresentou sinais em m/z 348, 318, 292, 277, e 249, que também segue um padrão de fragmentação com perda sucessiva de grupos metila e metileno (vide apêndice 1 pg. 172-177), que podem corresponder a um fragmento de algum composto com massa molecular superior a 348 g/mol. A análise dos espectros de massas referente ao pico 3, sugere a síntese de um ou mais produtos, diferentes dos dímeros já elucidados. É possível que oligômeros tenham sido sintetizados nas condições reacionais aplicadas, e que pela análise de CG-EM seja permitido identificar apenas fragmentos dos mesmos. Para a elucidação da(s) estrutura(s) química(s) é necessário análises futuras, como por exemplo, uma análise de espectrometria de massa de alta resolução dos sólidos obtidos.

Este conjunto de resultados para as reações de oxidação do 2,6-DMP catalisada pela lacase de *B. rhodina*, em diferentes condições reacionais, demonstra que há uma variação na distribuição dos produtos de acoplamento oxidativo, de acordo com o uso de mediadores de lacase, aumento da concentração de oxigênio no meio reacional, bem como na combinação de ambos. Além destes fatores, a adição do cofator desta enzima, o íon metálico cobre, na presença e na ausência de fluxo de oxigênio, também contribuiu na síntese dos produtos de oxidação, bem como na sua distribuição.

4.5 AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE CATALÍTICA DAS LACASES DE *B. RHODINA* E *P. OSTREATUS* EM SOLVENTES ORGÂNICOS

O uso exclusivo de água como solvente em reações de biocatálise restringe suas aplicações, limitando o desenvolvimento de diferentes processos, considerando que grande parte das substâncias orgânicas não são solúveis em meio aquoso. Para muitas lacases, a atividade catalítica não é mantida quando usado solvente orgânico como meio reacional (CRESTINI & ARGYROPOULOS, 1998; RODAKIEWICZ-NOWAK et al., 2000) Assim, a concentração ideal de solvente é necessária para solubilizar o substrato e não comprometer a atividade enzimática.

As atividades catalíticas das lacases dos fungos *B. rhodina* e *P. ostreatus* foram avaliadas na presença de concentrações crescentes de diferentes solventes orgânicos, usados como co-solventes. A atividade das lacases foi determinada utilizando o ABTS e o 2,6-DMP como substratos, na ausência e na presença de diferentes concentrações dos solventes (2,5, 5,0 e 10,0% v/v): metanol, etanol, dimetilsulfóxido (DMSO), acetato de etila, hexano, ciclohexano, clorofórmio, acetonitrila, tetraidrofurano (THF), dimetilformamida (DMF) e 1,4-dioxano.

A Tabela 11 mostra os resultados da atividade catalítica da lacase de *B. rhodina* nos respectivos substratos. As atividades são apresentadas em porcentagem da atividade residual na presença dos solventes orgânicos avaliados. Quando adicionados 2,5% (25 µL) dos solventes acetonitrila, DMSO, metanol e etanol ao meio reacional, a enzima manteve sua atividade catalítica acima de 70%. Ao aumentar a concentração dos solventes para 5,0 e 10,0% (50 e 100 µL), houve um decréscimo na atividade residual da lacase, com exceção do metanol, que manteve a mesma atividade quando usado 25 e 50 µL do solvente e ABTS como substrato. A diminuição da atividade de acordo com o aumento da concentração destes solventes foi observada tanto para o substrato ABTS quanto para o 2,6-DMP. Uma justificativa para a desestabilização desta lacase é o fato destes solventes serem hidrofílicos e interagirem com as moléculas de água, provocando a remoção da camada de hidratação da enzima, interferindo de forma indireta sobre a atividade catalítica. Assim, concentrações maiores de solvente removem mais a camada de hidratação da lacase e conseqüentemente afetam mais sua atividade.

Tabela 11 – Atividades residuais (%) da lacase de *B. rhodina* na presença de concentrações crescentes de solventes orgânicos sobre os substratos ABTS e 2,6-DMP

SOLVENTES	ABTS (%)				2,6-DMP (%)		
	0 µL	25 µL	50 µL	100 µL	25 µL	50 µL	100 µL
Acetonitrila	100	99	69	18	74	41	6
DMSO	100	85	80	48	93	78	65
THF	100	0	0	0	17	0	0
DMF	100	7	0	0	64	37	11
1,4-Dioxano	100	5	0	0	48	10	0
Metanol	100	73	73	51	81	61	36
Etanol	100	74	53	20	80	41	38
Acetato de etila	100	20	0	0	49	15	0
Hexano	100	97	96	96	96	94	91
Cicloexano	100	75	75	75	97	95	60
Clorofórmio	100	0	0	0	14	5	0

Fonte: o próprio autor

Os demais solventes hidrofílicos, THF, DMF e 1,4-dioxano comprometeram ao extremo a atividade da lacase do *B. rhodina*, principalmente quando usado ABTS como substrato. Essa diferença na atividade da lacase de *B. rhodina* entre os substratos, sugere que além da interação do solvente com a água, ocorreu uma interação do solvente com os substratos, diminuindo a sua disponibilidade no meio reacional, afetando a estabilidade da enzima. Logo, as moléculas destes solventes parecem ter sido mais fortemente associadas às moléculas de ABTS, em comparação com o 2,6-DMP, tornando a formação da ligação lacase-ABTS menos favorável. De acordo com o aumento da concentração do solvente no meio, houve um decréscimo na atividade, onde para o ABTS apenas 7 e 5% da atividade foi mantida quando usado 2,5% dos solventes DMF e 1,4-dioxano, e nas demais concentrações a enzima teve sua ação catalítica totalmente inibida, assim como para o THF em todas as concentrações. Para o 2,6-DMP os solventes THF, DMF e 1,4-dioxano mantiveram a atividade enzimática entre 17-0, 64-11 e 48-0%, respectivamente, de acordo como as concentrações avaliadas.

Para os solventes pouco polares, acetato de etila e clorofórmio, os resultados sugerem que ocorreu uma interação entre substrato e solvente. O resultado da atividade residual supõe que o ABTS e acetato de etila estão mais

fortemente associados, em relação ao 2,6-DMP, tornando a formação da ligação lacase-ABTS menos favorável, diminuindo a atividade enzimática. Com o aumento da concentração do solvente no meio reacional, houve um decréscimo na atividade. Na reação do ABTS, a presença de 2,5% de clorofórmio provocou a inibição completa da atividade, enquanto que para o 2,6-DMP o mesmo volume manteve atividade residual igual a 14%.

O hexano e cicloexano foram os melhores solventes para a reação de biocatálise da lacase de *B. rhodina* independente do substrato usado. O hexano manteve a atividade da enzima superior a 91%, mesmo quando usado a maior concentração de solvente para os dois substratos. O cicloexano preservou entre 97 a 60% a atividade da lacase de acordo com o aumento da concentração de solvente, quando usado o 2,6-DMP. Para o ABTS como substrato a atividade foi mantida em 75%, independente da concentração usada. Estes resultados indicam que estes solventes apresentaram menor interferência sobre a enzima.

Os resultados da atividade catalítica da lacase de *P. ostreatus*, usando como substratos ABTS e 2,6-DMP, em diferentes solventes orgânicos são mostrados na Tabela 12. As atividades são apresentadas em porcentagem da atividade residual na presença dos solventes avaliados.

Tabela 12 – Atividades residuais (%) da lacase de *P. ostreatus* na presença de concentrações crescentes de solventes orgânicos sobre os substratos ABTS e 2,6-DMP

SOLVENTES	ABTS (%)				2,6-DMP (%)		
	0 µL	25 µL	50 µL	100 µL	25 µL	50 µL	100 µL
DMSO	100	97	81	57	100	97	95
Metanol	100	88	88	88	98	84	82
Etanol	100	38	32	28	95	85	77
Hexano	100	88	84	103	100	104	106
Cicloexano	100	42	42	48	86	36	102
Clorofórmio	100	68	68	52	89	84	82
Acetado de etila	100	79	63	42	92	86	68

Fonte: o próprio autor

A atividade residual da lacase de *P. ostreatus* nas diferentes concentrações dos solventes DMSO e metanol foi superior a 80%, com exceção quando usado 10% de DMSO e o substrato ABTS. Para o substrato 2,6-DMP

ocorreu uma pequena diminuição na atividade da enzima de acordo com o aumento da concentração do solvente. A desestabilização desta lacase pode ser resultado da remoção da camada de hidratação da enzima, uma vez que estes solventes hidrofílicos interagem com as moléculas de água do meio. No entanto, o decréscimo na atividade residual desta lacase foi menor para a lacase de *B. rhodina*, o que sugere que a camada de hidratação desta última é maior, necessitando de maior disponibilidade de moléculas de água, sendo mais afetada pela interação entre solvente e água. Isto demonstra que a quantidade de água necessária para garantir a atividade catalítica é dependente de cada enzima.

Os resultados para o etanol, um solvente também hidrofílico, mostram que para o 2,6-DMP os resultados foram semelhantes aos observados para o metanol, enquanto para o ABTS ocorreu uma redução muito grande na atividade enzimática. Além da interação entre solvente e a água, esta diferença pode ser consequência de uma interação do solvente com o substrato. Assim, as moléculas de etanol são mais fortemente associadas às moléculas de ABTS, em comparação com as de 2,6-DMP, tornando a formação da ligação lacase-ABTS menos favorável, interferindo na atividade enzimática. De acordo com o aumento da concentração do solvente no meio, ocorreu um decréscimo na atividade.

Para os solventes pouco polares, acetato de etila e clorofórmio, os resultados sugerem que ocorreu uma solvatação entre substrato e solvente. Os valores da atividade residual da lacase de *P. ostreatus* supõe que as moléculas de ABTS estão mais fortemente associadas ao acetato de etila e clorofórmio, em relação ao 2,6-DMP, tornando a formação da ligação lacase-ABTS menos favorável, diminuindo a atividade enzimática. O aumento da concentração destes solventes no meio reacional causou um decréscimo na atividade catalítica. A estabilidade desta lacase chama atenção pela diferença com os resultados obtidos com a lacase de *B. rhodina*. Enquanto todas as concentrações de clorofórmio provocaram inibição completa da atividade da lacase de *B. rhodina* na reação com o ABTS, a lacase de *P. ostreatus* manteve entre 68 e 52% a atividade. Com o substrato 2,6-DMP foi mantida 89-82% da atividade da lacase de *P. ostreatus*, de acordo com o aumento da concentração de clorofórmio, enquanto a lacase de *B. rhodina* preservou apenas 14-5% da atividade residual. Para o acetato de etila a lacase de *P. ostreatus* também apresentou maior atividade residual, de 79-42% para o substrato ABTS e de

92-68% para o 2,6-DMP, enquanto que a lacase de *B. rhodina* manteve 20% e 49-15%, respectivamente.

A lacase de *P. ostreatus* apresentou atividade enzimática superior a 80% quando usado 2,5 e 5,0% de hexano, tendo ABTS como substrato. Quando o substrato foi o 2,6-DMP, 100% da atividade foi mantida com a adição de 2,5% do solvente. Nas demais concentrações de hexano, para ambos os substratos, a atividade calculada ultrapassou os 100%. No entanto, isso foi resultado de um aumento na absorvância das reações de oxidação dos substratos, podendo considerar que a atividade catalítica foi afetada, e que o uso destas concentrações não é apropriado. O mesmo foi observado quando usado 10% de cicloexano e 2,6-DMP como substrato. Para o uso de 2,5 a 10,0% de cicloexano para a oxidação do ABTS, a atividade residual foi inferior a 42%, diminuindo com o aumento da concentração do solvente. Para o 2,6-DMP a atividade foi de 86 e 36% quando usado 2,5 e 5,0% de cicloexano, respectivamente. Estes resultados sugerem que estes solventes hidrofóbicos, estão interagindo com os substratos, tornando a formação da ligação lacase-substrato menos favorável.

Os resultados da atividade residual para a lacase de *P. ostreatus* de acordo com o aumento da concentração de solvente orgânico, mostram que o DMSO e o metanol foram os melhores solventes para a reação de oxidação de ambos os substratos. O etanol, clorofórmio e acetato de etila também foram bons solventes na oxidação do 2,6-DMP, a atividade residual da lacase foi mantida em 77, 82 e 68% respectivamente, no maior volume de solvente. A estabilidade da lacase de *B. rhodina* foi maior nos solventes hexano, cicloexano e DMSO, para os dois substratos. Assim, foi estabelecido as concentrações mais apropriadas a serem usadas de cada solvente avaliado, sem comprometer de forma drástica a atividade enzimática.

Este conjunto de resultados da estabilidade das lacases de *B. rhodina* e *P. ostreatus* em diferentes solventes orgânicos, mostra que reações de biocatálise com as respectivas lacases são possíveis na presença de alguns solventes, em determinadas concentrações. Logo, estas duas lacases podem ser empregadas em síntese orgânica. Além do mais, as diferenças observadas na atividade enzimática de ambas as lacases, na presença dos solventes orgânicos, deixam em evidência o contraste entre a lacase do ascomiceto e do basidiomiceto,

indicando que as mesmas são compostas por isoenzimas diferentes, e, portanto, podem atuar de forma distinta em reações de biocatálise.

5 CONCLUSÃO

As lacases de *B. rhodina* MAMB-05 e *P. ostreatus* var Florida catalisaram a síntese de três produtos diméricos (I, II e III) a partir do 2,6-DMP, através dos acoplamentos C-C e C-O. A formação destes produtos foi dependente do pH e do tempo de reação utilizados. Em pH 3,0 a lacase do *B. rhodina* promoveu a síntese de II e III, enquanto que para a lacase de *P. ostreatus* a reação não foi favorável. Para esta última enzima, o dímero III foi produzido apenas em pH 5,0. O dímero I foi produzido exclusivamente pela lacase de *B. rhodina* e foi o produto principal obtido com a lacase de *P. ostreatus* a pH 6,5. Nos valores de pH 4,0 e 5,0 o dímero II foi o produto principal quando utilizado a lacase de *P. ostreatus* na reação. Estes resultados mostram que a síntese seletiva destes compostos pode ser controlada através da variação do pH, do tempo de reação e da fonte de lacase utilizada.

As condições otimizadas para a síntese do TMBP pelo delineamento fatorial incompleto 3³ resultou em um rendimento de TMBP de 11,93 ± 0,49%, usando lacase de *B. rhodina*, que foi confirmado pelo modelo matemático de 12%. Este foi o primeiro relato que descreveu a síntese do TMBP catalisada pela lacase usando uma abordagem de delineamento estatístico para otimização de produto.

O uso de sistemas lacase-mediador expandiram o potencial catalítico da lacase de *B. rhodina*. Os sistemas lacase/ABTS e lacase/TEMPO, em pH 3,0, aumentaram o rendimento do dímero II em comparação com a reação de oxidação contendo apenas lacase. Em pH 6,5 os SLM favoreceram a etapa de oxidação adicional responsável pela formação do dímero II, enquanto que a reação em condição normal promoveu a síntese seletiva do TMBP (I). A oxidação do 2,6-DMP para o dímero II foi maior para o sistema lacase/ABTS do que lacase/TEMPO em ambos os valores de pH avaliados.

A elevação da concentração de oxigênio na reação de oxidação do 2,6-DMP catalisada por lacase de *B. rhodina*, auxiliou na função do ciclo catalítico da enzima, aumentando os rendimentos dos dímeros I e II em 40 e 72%, respectivamente em comparação aos rendimentos alcançados em condições normais. Ao combinar os SLM com o aumento do fluxo de oxigênio na reação de oxidação a pH 3,0, o dímero II foi o produto formado quando aplicado os dois SLM, com rendimentos de 41 a 43%, similares aos obtidos usando apenas lacase e

borbulhamento de oxigênio (46,5%), bem como apenas o SLM (41,6%). Em pH 6,5 os SLM associados ao fluxo de oxigênio, levaram a síntese da difenilquinona II, decorrente da oxidação adicional proporcionada pelo uso dos mediadores químicos. No entanto, o rendimento foi inferior (15 a 18%) ao obtido usando apenas o SLM (34 a 43%), sugerindo que o oxigênio em maior concentração estaria promovendo a oxidação do mediador e desfavorecendo a ação do SLM.

A investigação do efeito do cofator cobre, e da combinação de cobre com fluxo de oxigênio na oxidação do 2,6-DMP catalisada com lacase de *B. rhodina*, mostrou que em pH 3,0 o produto de acoplamento oxidativo carbono-carbono foi o dímero II, com rendimentos de 12,1 e 13,1%, respectivamente. Em pH 6,5 os produtos de oxidação foram os dímeros I e II, sendo II o produto principal, decorrente da etapa de oxidação adicional favorecida pelo uso do cofator cobre. Estes dímeros foram obtidos com rendimentos mais elevados quando empregado o fluxo de oxigênio na reação, com aumento de 67% na síntese do dímero I e 56% para o dímero II.

As lacases de *B. rhodina* MAMB-05 e *P. ostreatus* var Florida mostraram perfis diferentes de estabilidade, na presença de solventes orgânicos, nas reações de oxidação dos substratos ABTS e 2,6-DMP. Para a lacase do ascomiceto *B. rhodina* a estabilidade enzimática foi maior para os solventes hexano, cicloexano e DMSO, com atividade residual igual a 96, 75 e 48% na maior concentração dos respectivos solventes, usando ABTS como substrato. Para o 2,6-DMP a atividade residual da enzima foi de 91, 60 e 65% para os solventes hexano, cicloexano e DMSO, respectivamente. Para a lacase do basidiomiceto *P. ostreatus* os melhores solventes foram o DMSO e o metanol, com 57 e 88% da atividade catalítica conservada no maior volume dos respectivos solventes, usando o ABTS, e 95 e 82% quando o substrato foi o 2,6-DMP. Ainda para o 2,6-DMP, em etanol, clorofórmio e acetato de etila a atividade residual da lacase foi mantida em 77, 82 e 68% respectivamente, na maior concentração dos solventes. Estes resultados sugerem que o uso dos solventes orgânicos pode ter afetado de forma indireta a atividade enzimática das lacases, pelas interações entre solvente e água, como também por interações entre solvente e substrato.

As lacases de *B. rhodina* e *P. ostreatus* podem ser uma alternativa de biocatalisadores para aplicação em síntese orgânica, uma vez que a atividade catalítica destas enzimas foi mantida na presença de solventes orgânicos. Assim, as

reações de biocatálise usando as respectivas lacases não estão limitadas ao uso de substratos hidrofílicos.

6 REFERÊNCIAS

ABDEL-MOHSEN, H. T.; CONRAD, J.; BEIFUSS, U. Laccase-catalyzed synthesis of catechol thioethers by reaction of catechols with thiols using air as an oxidant. **Green Chemistry**, v. 16, p. 90–95, 2014.

ADELAKUN, O. E. et al. Enzymatic modification of 2,6-dimethoxyphenol for the synthesis of dimers with high antioxidant capacity. **Process Biochemistry**, v. 47, n. 12, p. 1926–1932, 2012.

ARESKOGH, D. et al. Oxidative polymerisation of models for phenolic lignin end groups by laccase. **Holzforschung**, v. 64, n. 1, p. 21–34, 2010.

ASTOLFI, P. et al. New mediators for the enzyme laccase: mechanistic features and selectivity in the oxidation of non-phenolic substrates. **New Journal of Chemistry**, v. 29, p. 1308–1317, 2005.

BALDRIAN, P. Fungal laccases-occurrence and properties. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 30, n. 2, p. 215–242, 2006.

BARBOSA, A M.; DEKKER, R. F. H.; HARDY, G. E. S. Veratryl alcohol as an inducer of laccase by an ascomycete, *Botryosphaeria* sp., when screened on the polymeric dye Poly R-478. **Letters in Applied Microbiology**, v. 23, n. 2, p. 93–96, 1996.

BELL, G. et al. Biocatalyst behaviour in low- water systems. **Trends in Biotechnology**, v. 13, n. 11, p. 468–473, 1995.

BERTRAND, G. Coexistence of laccase and tyrosinase in certain fungi. **Comptes Rendus Hebdomadaires de Seances de l'Academie des Scineces**, v. 123, p. 463–465, 1896.

BERTRAND, T. et al. Crystal structure of a four-copper laccase complexed with an arylamine: Insights into substrate recognition and correlation with kinetics. **Biochemistry**, v. 41, n. 23, p. 7325–7333, 2002.

BETTS, W. B.; KING, J. E. Oxidative coupling of 2,6-dimethoxyphenol by fungi and bacteria. **Mycological Research**, v. 95, n. 5, p. 526–530, 1991.

BOURBONNAIS, R.; LEECH, D.; PAICE, M. G. Electrochemical analysis of the interactions of laccase mediators with lignin model compounds. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1379, n. 381–390, 1998.

CANNATELLI, M. D.; RAGAUSKAS, A. J. Two Decades of Laccases: Advancing Sustainability in the Chemical Industry. **Chemical Record**, v. 17, n. 1, p. 122–140, 2017.

CRESTINI, C.; ARGYROPOULOS, D. S. The Early Oxidative Biodegradation Steps of Residual Kraft Lignin Models with Laccase. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 6, p. 2161–2169, 1998.

D'ACUNZO, F. et al. A Mechanistic Survey of the Oxidation of Alcohols and Ethers with the Enzyme Laccase and Its Mediation by TEMPO. **European Journal of Organic Chemistry**, p. 4195–4201, 2002.

DEKKER, R. F. H.; BARBOSA, A. M. The effects of aeration and veratryl alcohol on the production of two laccases by the ascomycete *Botryosphaeria* sp. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 28, p. 81–88, 2001.

DEKKER, R. F. H.; BARBOSA, A. M.; SARGENT, K. The effect of ligni-related compounds on the growth and production of laccases by the ascomycete, *Botryosphaeria* sp.. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 30, p. 374–380, 2002.

DWIVEDI, U. N. et al. Structure-function relationship among bacterial, fungal and plant laccases. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 68, n. 2, p. 117–128, 2011.

ENGELMANN, C.; ILLNER, S.; KRAGL, U. Laccase initiated C-C couplings: Various techniques for reaction monitoring. **Process Biochemistry**, v. 50, n. 10, p. 1591–1599, 2015.

FABBRINI, M.; GALLI, C.; GENTILI, P. Comparing the catalytic efficiency of some mediators of laccase. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 16, n. July 2001, p. 231–240, 2002.

GALLI, C. et al. Concerted electron/proton transfer mechanism in the oxidation of phenols by laccase. **ChemBioChem**, v. 14, n. 18, p. 2500–2505, 2013.

GARAVAGLIA, S. et al. The structure of *Rigidoporus lignosus* laccase containing a full complement of copper ions, reveals an asymmetrical arrangement for the T3 copper pair. **Journal of Molecular Biology**, v. 342, n. 5, p. 1519–1531, 2004.

GAVEZZOTTI, P. et al. Synthesis of enantiomerically enriched dimers of vinylphenols by tandem action of laccases and lipases. **Advanced Synthesis and Catalysis**, v. 353, n. 13, p. 2421–2430, 2011.

GIANFREDA, L.; XU, F.; BOLLAG, J. M. Laccases: A Useful Group of Oxidoreductive Enzymes. **Bioremediation Journal**, v. 3, n. 1, p. 1–26, 1999.

GIARDINA, P. et al. Laccases: a never-ending story. **Cellular and Molecular Life Science**, v. 67, p. 369–385, 2010.

HAILING, P. J. Thermodynamic predictions for biocatalysis in nonconventional media: Theory, tests, and recommendations for experimental design and analysis. **Enzyme Microbial Technology**, v. 16, p. 178–206, 1994.

IKEDA, R.; UYAMA, H.; KOBAYASHI, S. Novel synthesis pathway to a poly(phenylene oxide), laccase-catalyzed oxidative polymerization of syringic acid. **Macromolecules**, v. 29, n. Scheme 1, p. 3053–3054, 1996.

JOGLEKAR, A. M.; MAY, A. T. Product excellence through desing of experiments. **Cereals Foods World**, v. 32, p. 854–868, 1987.

KALLIO, J. P. et al. Structure-Function Studies of a *Melanocarpus albomyces* Laccase Suggest a Pathway for Oxidation of Phenolic Compounds. **Journal of Molecular Biology**, v. 392, n. 4, p. 895–909, 2009.

KANG, J.; IRMAK, S.; WILKINS, M. Conversion of lignin into renewable carboxylic acid compounds by advanced oxidation processes. **Renewable Energy**, v. 135, p. 951–962, 2019.

KEDZIORA, K. et al. Laccase/TEMPO-mediated system for the thermodynamically disfavored oxidation of 2,2-dihalo-1-phenylethanol derivatives. **Green Chemistry**, v. 16, p. 2448–2453, 2014.

KENDRICK, B. **The fifth kingdom**. 3 rd ed. Newburyport, Focus Publishing, 2000.

KIM, J.; DORDICK, J. S. Pressure Affects Enzyme Function in Organic Media. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 42, p. 772–776, 1993.

KIRK, P. M. et al. **Dictionary of the Fungi**. 10 th ed. Wallingford, CAB International, 2008.

KLIBANOV, A. M. Why are enzymes less active in organic solvents than in water ? **Trends in Biotechnology**, v. 15, n. 3, p. 97–101, 1997.

KUNAMNENI, A. et al. Engineering and Applications of fungal laccases for organic synthesis. **Microbial Cell Factories**, v. 2 (32), p. 1–17, 2008.

LAHTINEN, M. et al. On the factors affecting product distribution in laccase-catalyzed oxidation of a lignin model compound vanillyl alcohol: experimental and computational evaluation. **Organic & Biomolecular Chemistry**, v. 11, n. 33, p. 5454, 2013.

LEE, S. K. et al. Nature of the intermediate formed in the reduction of O₂ to H₂O at the trinuclear copper cluster active site in native laccase. **Journal of the American Chemical Society**, v. 124, n. 21, p. 6180–6193, 2002.

LEONOWICZ, A.; EDGEHILI, R. U.; BOLLAG, J. M. The effect of pH on the transformation of syringic and vanillic acid by the laccase of *Rhizoctonia praticola* and *Trametes versicolor*. *Archives of Microbiology*, v. 137, p. 89–96, 1984.

LETTERA, V. et al. Low impact strategies to improve ligninolytic enzyme production in filamentous fungi: The case of laccase in *Pleurotus ostreatus*. **Comptes Rendus - Biologies**, v. 334, n. 11, p. 781–788, 2011.

LLEVOT, A. et al. Selective laccase-catalyzed dimerization of phenolic compounds derived from lignin: Towards original symmetrical bio-based (bis) aromatic monomers. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 125, p. 34–41, 2016.

MA, L.; PERSSON, M.; ADLERCREUTZ, P. Water activity dependence of lipase catalysis in organic media explains successful transesterification reactions. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 31, p. 1024–1029, 2002.

MADHAVI, V.; LELE, S. S. Laccase: Properties and applications. **BioResources**, v. 4, n. 4, p. 1694–1717, 2009.

MANDA, K. et al. Laccase-induced derivatization of unprotected amino acid L-tryptophan by coupling with p -hydroquinone. **Amino Acids**, v. 31, p. 409–419, 2006.

MARZORATI, M. et al. Selective laccase-mediated oxidation of sugars derivatives. **Green Chemistry**, v. 7, p. 310–315, 2005.

MATE, D. M.; ALCALDE, M. Laccase: a multi-purpose biocatalyst at the forefront of biotechnology. **Microbial Biotechnology**, v. 10, n. 6, p. 1457–1467, 2017.

MAYER, A. M.; STAPLES, R. C. Laccase: New functions for an old enzyme. **Phytochemistry**, v. 60, n. 6, p. 551–565, 2002.

MIKOLASCH, A. et al. Synthesis of 3-(3,4-dihydroxyphenyl)-propionic acid derivatives by N-coupling of amines using laccase. **Tetrahedron**, v. 58, p. 7589–7593, 2002.

MIKOLASCH, A. et al. Novel Cephalosporins Synthesized by Amination of 2,5-Dihydroxybenzoic Acid Derivatives Using Fungal Laccases II. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 55, n. 3, p. 412–416, 2007.

MOGHARABI, M.; FARAMARZI, M. A. Laccase and Laccase-Mediated Systems in the Synthesis of Organic Compounds. **Advanced Synthesis & Catalysis**, v. 356, n. 5, p. 897–927, 2014.

MOROZOVA, O. V. et al. “Blue” laccases. **Biochemistry (Moscow)**, v. 72, n. 10, p. 1136–1150, 2007.

NAVARRA, C. et al. Laccase-mediated oxidation of phenolic derivatives. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 65, n. 1–4, p. 52–57, 2010.

NIEDERMEYER, T. H. J.; MIKOLASCH, A.; LALK, M. Nuclear amination catalyzed by fungal laccases: Reaction products of *p*-hydroquinones and primary aromatic amines. **Journal of Organic Chemistry**, v. 70, n. 6, p. 2002–2008, 2005.

OTTO, B.; SCHLOSSER, D.; REISSER, W. First description of a laccase-like enzyme in soil algae. **Archives of Microbiology**, v. 192, n. 9, p. 759–768, 2010.

PALMER, A. E. et al. Spectroscopic studies and electronic structure description of the high potential type 1 copper site in fungal laccase: insight into the effect of the axial ligand. **Journal of the American Chemical Society**, v. 121, p. 7138–7149, 1999.

PALMIERI, G. et al. Atypical laccase isoenzymes from copper supplemented *Pleurotus ostreatus* cultures. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 33, n. 2–3, p. 220–230, 2003.

PARTRIDGE, J. et al. Activity and mobility of subtilisin in low water organic media: hydration is more important than solvent dielectric. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1386, p. 79–89, 1998.

PEZZELLA, C. et al. The *Pleurotus ostreatus* laccase multi-gene family: Isolation and heterologous expression of new family members. **Current Genetics**, v. 55, n. 1, p. 45–57, 2009.

PILZ, R. et al. Laccase-catalysed synthesis of coupling products of phenolic substrates in different reactors. **Applied Microbiol Biotechnol**, v. 60, p. 708–712, 2003.

PIONTEK, K.; ANTORINI, M.; CHOINOWSKI, T. Crystal structure of a laccase from the fungus *Trametes versicolor* at 1.90-Å resolution containing a full complement of coppers. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 40, p. 37663–37669, 2002.

POLAK, J.; JAROSZ-WILKOLAZKA, A. Fungal laccases as green catalysts for dye synthesis. **Process Biochemistry**, v. 47, n. 9, p. 1295–1307, 2012.

PUROHIT, C. S.; PARVEZ, M.; VERMA, S. Kinetic characterization of a bioinspired, heterogeneously active macromolecular catalyst for phenol oxidation and coupling reactions. **Applied Catalysis A: General**, v. 316, n. 1, p. 100–106, 2007.

QUIDEAU, S.; FELDMAN, K. S. Ellagitannin Chemistry. **Chemical Reviews**, v. 96, n. 1, p. 475–503, 1996.

REINHAMMAR B., MALMSTROM. B. G. Metal ions in biology; copper proteins. In: **“Blue” copper-containing oxidases**. Ed.: G. Spiro. New York: Wiley-Interscience, 1981. p. 109–149.

RIVA, S. Laccases: blue enzymes for green chemistry. **Trends in Biotechnology**, v. 24, n. 5, p. 219–226, 2006.

RODAKIEWICZ-NOWAK, S. M. et al. Effect of various water-miscible solvents on enzymatic activity of fungal laccases. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 11, p. 1–11, 2000.

RYU, K.; DORDICK, J. How Do Organic Solvents Affect Peroxidase Structure and Function ? **Biochemistry**, v. 31, p. 2588–2598, 1992.

SAMPAIO, T. C. DE et al. Solvent Effects on the Catalytic Activity of Subtilisin Suspended in Organic Solvents. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 50, p. 257–264, 1996.

SHARMA, A. et al. Bifunctional in vivo role of laccase exploited in multiple biotechnological applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 102, n. 24, p. 10327–10343, 2018.

SHARMA, P.; GOEL, R.; CAPALASH, N. Bacterial laccases. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 23, n. 6, p. 823–832, 2007.

SINGH, G. et al. Laccase from prokaryotes: A new source for an old enzyme. **Reviews in Environmental Science and Biotechnology**, v. 10, n. 4, p. 309–326, 2011.

SLOMCZYNSKI, D.; NAKAS, J. P.; TANENBAUM, S. W. Production and characterization of laccase from *Botrytis cinerea* 61-34. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 61, n. 3, p. 907–912, 1995.

SOLANO, F. et al. Dimethoxyphenol oxidase activity of different microbial blue multicopper proteins. **FEMS Microbiology Letters**, v. 204, n. 1, p. 175–181, 2001.

SOLOMON, E. I.; AUGUSTINE, A. J.; YOON, J. O₂ Reduction to H₂O by the multicopper oxidases. **Dalton Transactions**, v. 9226, n. 30, p. 3921, 2008.

STRONG, P. J.; CLAUS, H. Laccase: A Review of Its Past and Its Future in Bioremediation. **Critical Reviews in Environmental Science and Technology**, v. 41, p. 373–434, 2011.

SU, J. et al. Laccase: a green catalyst for the biosynthesis of poly-phenols. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 0, n. 0, p. 1–14, 2017.

THURSTON, C. F. The structure and function of fungal laccases. **Microbiology**, v. 1140, p. 19–26, 1994.

VALIVETY, R. H.; HAILING, P. J.; MACRAE, A. R. Reaction rate with suspended lipase catalyst shows similar dependence on water activity in different organic solvents. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1118, p. 218–222, 1992.

VASCONCELOS, A. F. D. et al. Optimization of laccase production by *Botryosphaeria* sp. in the presence of veratryl alcohol by the response-surface method. **Process Biochemistry**, v. 35, n. 10, p. 1131–1138, 2000.

VITHANAGE, L. N. G. et al. Value Adding of Poplar Hemicellulosic Prehydrolyzates: Laccase Production by *Botryosphaeria rhodina* MAMB-05 and Its Application in the Detoxification of Prehydrolyzates. **Bioenergy Research**, v. 8, n. 2, p. 657–674, 2015.

VOGEL, H. J. A convenient growth medium for *Neurospora crassa*. **Microbial Genetics Bulletin**, v. 13, p. 42–43, 1956.

VON NUSSBAUM, F. et al. Antibacterial natural products in medicinal chemistry - Exodus or revival? **Angewandte Chemie - International Edition**, v. 45, n. 31, p. 5072–5129, 2006.

WAN, Y.; DU, Y.; MIYAKOSHI, T. Enzymatic catalysis of 2,6-dimethoxyphenol by laccases and products characterization in organic solutions. **Science in China, Series B: Chemistry**, v. 51, n. 7, p. 669–676, 2008.

WEHTJE, E. et al. Water activity control in enzymatic esterification processes. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 21, p. 502–510, 1997.

WITAYAKRAN, S.; RAGAUSKAS, A. J. One-pot synthesis of 1,4-naphthoquinones and related structures with laccase. **Green Chemistry**, v. 9, n. 5, p. 475, 2007.

WITAYAKRAN, S.; RAGAUSKAS, A. J. Synthetic applications of laccase in green chemistry. **Advanced Synthesis and Catalysis**, v. 351, n. 9, p. 1187–1209, 2009.

WITAYAKRAN, S.; ZETTILI, A.; RAGAUSKAS, A. J. Laccase-generated quinones in naphthoquinone synthesis via Diels-Alder reaction. **Tetrahedron Letters**, v. 48, n. 17, p. 2983–2987, 2007.

XU, F. Oxidation of phenols, anilines, and benzenethiols by fungal laccases: Correlation between activity and redox potentials as well as halide inhibition. **Biochemistry**, v. 35, n. 23, p. 7608–7614, 1996.

XU, F. et al. A study of a series of recombinant fungal laccases and bilirubin oxidase that exhibit significant differences in redox potential, substrate specificity, and stability. **Biochimica et Biophysica Acta - Protein Structure and Molecular Enzymology**, v. 1292, n. 2, p. 303–311, 1996.

YOON, J. et al. The two oxidized forms of the trinuclear Cu cluster in the multicopper oxidases and mechanism for the decay of the native intermediate. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 104, n. 34, p. 13609–13614, 2007.

YOSHIDA, B. H. LXIII.-Chemistry of lacquer (Urushi). Part. I. *Journal of the Chemical Society, Transaction*, v. 43, p. 472-486, 1883.

YOSHITAKE, A. et al. N-linked carbohydrate chains protect laccase III from proteolysis in *Coriolus versicolor*. **Journal of General Microbiology**, v. 139, n. 1, p. 179–185, 1993.

ZAKS, A.; KLIBANOV, A. M. The Effect of Water on Enzyme Action in Organic Media. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 263, n. 17, p. 8017–8021, 1988.

CAPÍTULO II

Investigação da atividade anti-*Leishmania amazonensis* do 3,3',5,5'-tetrametoxibifenil-4,4'-diol (TMBP)

1 REVISÃO DE LITERATURA

1.1 LEISHMANIOSE

Leishmanioses são doença sinfecciosas causadas por mais de vinte espécies de protozoários pertencentes a ordem Kinetoplastida da família *Trypanozomatidae* e do gênero *Leishmania*.

As leishmanioses podem se manifestar por diferentes formas clínicas, incluindo as formas cutânea e mucocutânea que atacam a pele e as mucosas, e a forma visceral, que ataca os órgãos internos. A leishmaniose cutânea é dividida em três principais formas clínicas: leishmaniose cutânea localizada (LC), cutânea difusa (LCD) e cutaneomucosa (LCM) (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2007). Essas variações nas formas clínicas estão relacionadas com a espécie do parasito e de aspectos patológicos e imunológicos do paciente (GENARO, 2011). A leishmaniose cutânea (LC) é a forma mais frequente da doença enquanto a leishmaniose visceral (LV) causa quadros mais agressivos e muitas vezes fatais, quando não tratada. O Brasil está na lista dos dez países com 75% dos casos de LC e entre os seis países que concentram 90% dos casos de LV (WHO, 2016).

De acordo com a disposição geográfica, a LC pode ser classificada como do Velho Mundo, presente no Sul do Oriente Médio, da Europa, Sudeste Europeu, partes do sudoeste Asiático, Ásia Central e África, sendo provocada principalmente pelas espécies *L. aethiopica*, *L. donovani*, *L. infantum*, *L. major* e *L. tropica*. Muitas vezes benigna e auto-limitada. A LC do Novo Mundo é decorrente do México e América Latina, sendo conhecida como Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA), podendo se manifestar desde a formação de úlcera única até formas disseminadas na pele, podendo ou não acometer mucosas (WHO, 2016).

A Organização Mundial da Saúde (OMS) reconhece a Leishmaniose Tegumentar Americana como doença tropical negligenciada, considerando-se que está presente em 98 países, afeta mais de 12 milhões de pessoas e expõe outras 350 milhões ao risco de desenvolver uma das formas clínicas desta doença (DESJEUX, 2004; REITHINGER et al., 2007).

O Brasil possui altas taxas de notificação de LTA, sendo a área endêmica de maior extensão territorial no continente. Entre 2000 e 2013 foram relatados 345.722 casos de LTA no país (SINAN, 2015). Todos os estados

brasileiros são acometidos pela LTA, tendo sete espécies do parasito identificadas: *L. braziliensis*, *L. guyanensis*, *L. lainsoni*, *L. naiffi*, *L. lindenberg*, *L. amazonensis* e *L. shawi*, esta última situada apenas na região amazônica (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2007). No estado Paraná, circulam apenas *L. braziliensis* e *L. amazonensis* (LUZ, N. E. MEMBRIVE, E. A. CASTRO, J. DEREURE, F. PRATIONG, A. DEDET, A. PANDEY, 2000; SILVEIRA et al., 1990).

Os protozoários causadores da leishmaniose são caracterizados pela presença de uma única mitocôndria (LAINSON, 1987), com ciclo de vida heteroxeno, no qual os hospedeiros invertebrados são fêmeas hematófagas do gênero *Phlebotomus* - no Velho Mundo e *Lutzomyia* - no Novo Mundo, conhecidos popularmente como mosquito palha, plebotomus e cangalhinha. Por outro lado, os hospedeiros vertebrados são os humanos e outras espécies de mamíferos silvestres e domésticos (WHO, 2010).

Os protozoários do gênero *Leishmania* apresenta-se em duas formas evolutivas, promastigota e amastigota. As formas promastigotas são encontradas no tubo digestivo do inseto vetor e transmitida aos vertebrados no momento do repasto sanguíneo pela fêmea do flebotomíneo. Esta forma apresenta núcleo central, flagelo livre, essencial para a locomoção e sobrevivência do parasito, junto ao cinetoplasto (mitocôndria única que contém o DNA mitocondrial). Após a internalização de promastigotas por células do sistema monocítico fagocitário, o pH ácido do vacúolo parasitóforo aliado à temperatura do hospedeiro vertebrado promove a diferenciação das formas promastigotas em amastigotas intracelulares, estas formas não apresentam flagelo livre, são arredondadas e intracelulares obrigatórias (GLUENZ; GINGER & MCKEAN, 2010; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2007).

As principais células hospedeiras são os macrófagos que uma vez recrutados ao local da infecção, fagocitam parasitos livres, e transformam-se em células hospedeiras definitivas para a replicação do protozoário, tornam-se células efetoras responsáveis pela eliminação deste parasito. Contudo, parasitos do gênero *Leishmania* podem modular ou interferir nos mecanismos celulares antimicrobiano do hospedeiro vertebrado (HENARD et al., 2014), suprimindo as vias que desencadeiam respostas celulares e os macrófagos.

O tratamento da leishmaniose é baseada na eliminação das formas intracelulares (amastigotas) de *Leishmania* spp., no entanto, a localização do

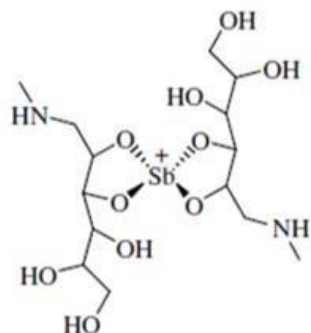
parasito dificulta a atuação dos fármacos, favorecendo a sobrevivência dos mesmos (CROFT & OLLIARO, 2011; RODRIGUES et al., 2006).

Os antimoniais pentavalentes como antimonato de meglumina (Glucantime®) e o estibogluconato de sódio (Pentostam®) (Figura 11) fazem parte dos medicamentos de primeira escolha utilizados no tratamento da leishmaniose. Embora sejam amplamente utilizados desde a década de 1940, apresentam alto custo, eficácia variável, alta toxicidade, causando efeitos adversos como: fadiga, aumento sérico de enzimas hepáticas, pancreatite, mialgia, pancitopenia, artralgia, disfunção gastrointestinal, dores musculares difusas, enrijecimento das articulações, arritmias, insuficiência renal reversível e cardiotoxicidade (SINGH & SIVAKUMAR, 2004; SUNDAR & CHAKRAVARTY, 2015). Além disso, antimoniais pentavalentes são de administração parenteral obrigatória e o tratamento requer na maioria das vezes aplicações diárias em ciclos de 28 dias (RATH et al., 2003). Somado a isso, esses fármacos apresentam sua eficácia variando de acordo com a região geográfica, espécies de *Leishmania* e apresentação clínica. O mecanismo de ação desse fármaco ainda não está completamente compreendido (SUNDAR; CHAKRAVARTY, 2015). Acredita-se que sua ação ocorra pela inibição de adenosina (ATP) e guanosina trifosfato (GTP ou AGP), através da interrupção da ação glicolítica e oxidativa de ácidos graxos nas formas amastigotas, reduzindo a eficiência da fosforilação da ADP a ATP resultando na diminuição da ATP intracelular (BERMAN, 1988; KOFF & ROSEN, 1994).

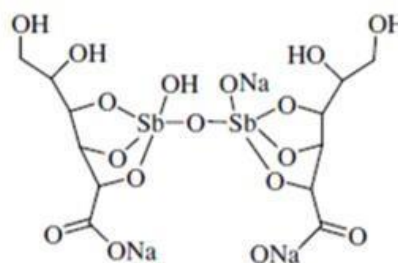
Os fármacos de segunda escolha como a Anfotericina B (AmB), Paromomicina, Pentamidina e Miltefosina (Figura 11), são empregados como alternativa terapêutica em casos de resistência do parasito, ou contraindicação aos antimoniais, mas não apresentam ação terapêutica favorável, requerendo maior tempo de tratamento, além da administração parenteral, exceto a Miltefosina que requer administração oral, e causam efeitos colaterais adversos (TIUMAN et al., 2011).

Figura 11 – Estruturas químicas de fármacos de primeira e segunda escolha usados no tratamento de leishmaniose

Fármaco de primeira escolha

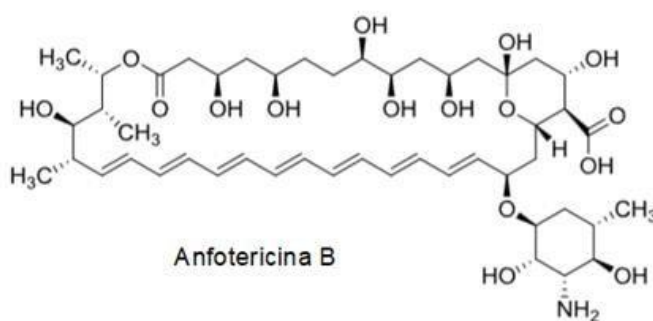


Antimoniato de meglumina

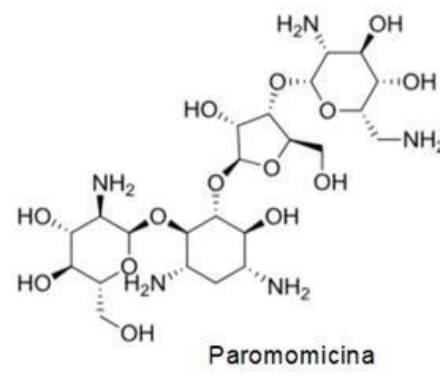


Estibogluconato de sódio

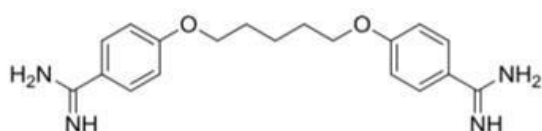
Fármacos de segunda escolha



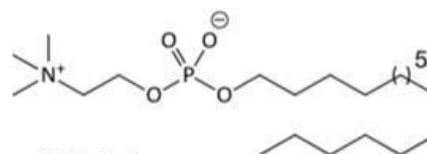
Anfotericina B



Paromomicina



Pentamidina



Miltefosina

Fonte: Carvalho et al., 2015.

A anfotericina B (AmB) é um antibiótico com atividade antifúngica e leishmanicida, proveniente de uma cepa de *Streptomyces nodusus*, sua eficiência é inferior aos fármacos de primeira escolha, limitando sua aplicação. A sua administração resulta em efeitos adversos como náuseas, vômitos, cefaléia, dor abdominal e insuficiência renal (BARRETT & CROFT, 2012; BRAY et al., 2003; SUNDAR & CHAKRAVARTY, 2015). Este agente quimioterápico, possui limitada solubilidade em água e baixa permeabilidade em membrana, em decorrência do seu elevado peso molecular e pela presença de muitos grupos doadores e aceptores de

ligação de hidrogênio. Como consequência, é fracamente absorvido, apresentando baixa biodisponibilidade oral ao paciente. Ainda que seu mecanismo de ação não seja completamente compreendido, há indícios que AmB atua através da ligação com o ergosterol da membrana celular, promovendo alteração na permeabilidade da membrana, resultando na saída de íons que provocam a morte celular (CEREGHETTI & CARREIRA, 2006).

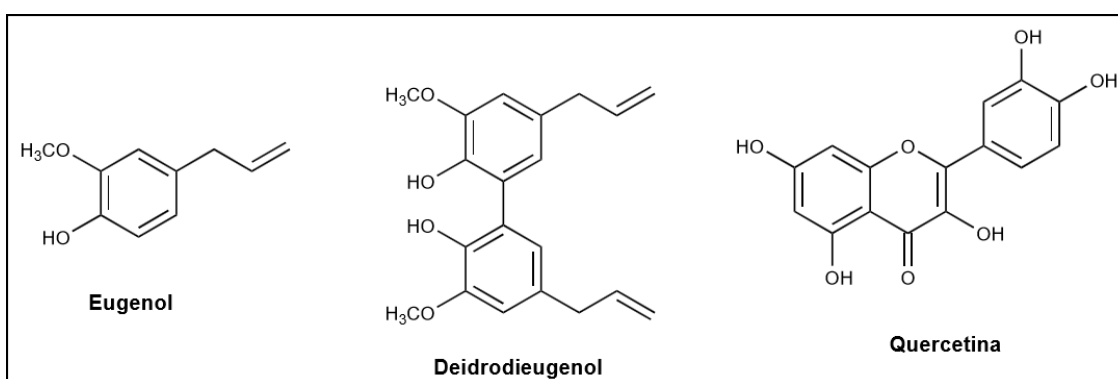
Deste modo, o tratamento terapêutico para a leishmaniose ainda é um grande desafio, uma vez que os agentes leishmanicidas disponíveis no mercado apresentam como citado anteriormente uma série de problemas, como resistência do parasito, elevada toxicidade com efeitos colaterais adversos, limitando sua utilização e, principalmente sua eficácia. Desta forma faz-se necessário a busca por novos fármacos, que apresentem estrutura e mecanismos de ação diferentes dos compostos já disponíveis, ação leishmanicida mais eficaz, com baixa toxicidade e ótima biodisponibilidade aos pacientes (GONTIJO, 2003).

Atualmente, vários estudos têm sido desenvolvidos na busca de agentes quimioterápicos alternativos para leishmaniose. Investigações voltadas para terapias com produtos naturais derivados de plantas, mostram que extratos contendo compostos fenólicos apresentam ação leishmanicida. Segundo estudos, a ação antileishmanial destes compostos estaria relacionada com a sua atividade antioxidante, que protegeria o organismo do hospedeiro vertebrado, acometido pela doença, dos danos decorrentes do estresse oxidativo causados pela leishmaniose (ALMEIDA et al., 2013).

Neste sentido, extratos de *J. gossypifolia* L., que possuem na sua constituição metabólitos secundários como flavonóides e compostos fenólicos, com atividade antioxidante, apresentaram inibição de formas promastigotas de *L. infantum* (MARTINS et al., 2018). Extratos de folhas de *Caryocar coriaceum*, que apresentam entre os metabólitos secundários alcalóides, fenóis, flavonóides e taninos, demonstraram atividade leishmanicida sobre formas promastigotas de *L. amazonensis* (TOMIOTTO-PELLISIER et al., 2018). Um estudo avaliando a propolis brasileira, mostrou a sua ação sobre formas promastigotas de *L. braziliensis* e efeitos imunomoduladores em macrófagos murinos, sugerindo que tais resultados estejam associados com a presença de compostos fenólicos encontrados na amostra de própolis (DA SILVA et al., 2013). Estudos com o óleo essencial de *Ocimum gratissimum* e seu principal componente eugenol (Figura 12), um composto

fenólico, demonstraram que ambos foram capazes de inibir a viabilidade das formas promastigota e amastigota de *L. amazonensis* (NAKAMURA et al., 2006). O deidrodieugenol (Figura 12), derivado do eugenol, também foi descrito com atividade leishmanicida contra formas promastigotas de *L. amazonensis* (RODRIGUES et al., 2016). Foi demonstrado que a quercetina (Figura 12), um flavonóide polifenólico, inibiu a proliferação de formas promastigotas de *L. amazonensis* (FONSECA-SILVA et al., 2011).

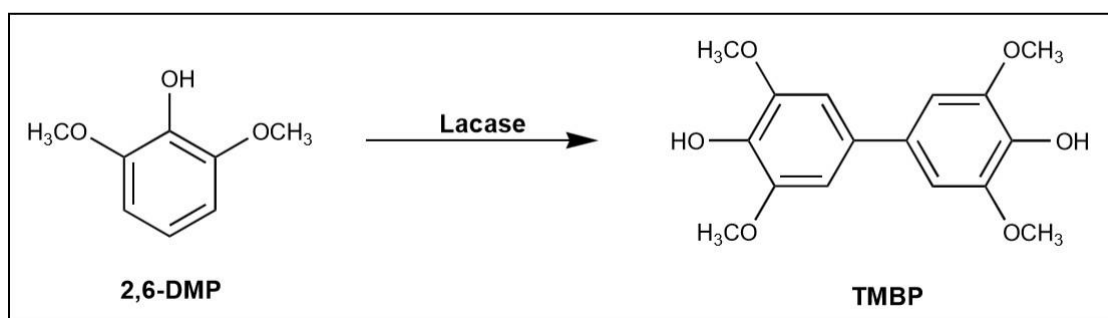
Figura 12 – Estutura química do eugenol, deidrodieugenol e quercetina



Fonte: o próprio autor

Baseando-se nas evidências experimentais descritas para o uso de compostos fenólicos como agentes leishmanicidas, acreditamos que o TMBP, um composto fenólico, derivado do 2,6-DMP através de biocatálise pelas lacases de *B. rhodina* e *P. ostreatus* (Esquema 20), possa exercer ação leishmanicida sobre formas promastigotas e amastigotas de *Leishmania amazonensis*.

Esquema 20 – Reação de síntese do TMBP a partir do 2,6-DMP catalisada por lacases de *B. rhodina* e *P. ostreatus*



Fonte: o próprio autor

1.2 ANTIOXIDANTES

Um antioxidante pode ser descrito como um composto capaz de inibir a oxidação *in vitro* e reduzir o estresse oxidativo *in vivo* (CORNELLI, 2009). O estresse oxidativo é causado pelo desequilíbrio entre a produção de agentes oxidantes e os sistemas antioxidantes no organismo, de modo que os últimos ficam sobrecarregados (KATSIKI & MANES, 2009). Os radicais livres são átomos, íons ou moléculas que possuem elétrons desemparelhados, são instáveis e reagem com outras moléculas. As espécies reativas de oxigênio (EROs), incluem radicais livres como o hidroperoxila (HO_2^{\cdot}), radical hidroxila (OH^{\cdot}), óxido nítrico (NO), ânion superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$), e espécies como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e oxigênio singleto ($^1\text{O}_2$) (LÜ et al., 2010). Essas espécies são geradas a partir de processos metabólicos normais ou patogênicos.

As EROs agem como mediadores da transferência de elétrons em diferentes processos bioquímicos, com a finalidade de eliminar o agente agressor por oxidação (OLIVEIRA; VALENTIM & GOULART, 2009). No entanto, quando presentes em concentrações acima do normal, efeitos adversos como danos celulares e ativação de caminhos de sinalização específicos são causados, levando ao desenvolvimento de doenças cardiovasculares, câncer, distúrbios endocrinológicos e neurológicos, relacionados ao estresse oxidativo (CORNELLI, 2009)). Normalmente essas doenças são desenvolvidas por mecanismos que envolvem alterações oxidativas em moléculas consideradas críticas (LAGUERRE; LECOMTE & VILLENEUVE, 2007).

Os antioxidantes podem ser classificados de acordo com o mecanismo de atuação, podendo ser antioxidantes de prevenção, antioxidantes sequestradores e antioxidantes de recuperação. Os antioxidantes de prevenção agem como primeira linha de defesa combatendo a produção de EROs, através da diminuição de peróxido de hidrogênio e hidroperoxídeos lipídicos à água e hidróxidos lipídicos, respectivamente. Os antioxidantes sequestradores, como muitos compostos fenólicos e aminas aromáticas, removem rapidamente os agentes oxidantes ativos, evitando que essas espécies ataquem moléculas biológicas, agindo como segunda linha de defesa. Como terceira linha de defesa, muitas enzimas atuam reparando os danos provocados pelos radicais livres, são os antioxidantes de recuperação (NIKI, 2010).

Os antioxidantes podem apresentar atividade direta ou indireta. A atividade direta está relacionada com a capacidade que a molécula possui de inibição em cadeia, enquanto a atividade indireta se refere a interferência em processos que promovem a formação de espécies reativas. Anti-inflamatórios não-esteroidais, estatinas, esteroides e alguns anti-hipertensivos são exemplos de antioxidantes indiretos (CORNELLI, 2009).

Alguns antioxidantes também podem agir como pró-oxidantes de acordo com sua concentração e da natureza das moléculas adjacentes. Os efeitos pró-oxidantes podem ser favoráveis quando promovem moderado estresse oxidativo, resultando no aumento dos níveis de defesa antioxidante, levando à proteção celular (HALLIWELL, 2008).

Substâncias, como os compostos fenólicos apresentam capacidade antioxidante atribuída ao poder redutor do grupo hidroxila ligado ao anel aromático característico de sua estrutura química (CROZIER; JAGANATH & CLIFFORD, 2006; PEREIRA et al., 2012). Desta forma, compostos fenólicos atuam reduzindo as espécies reativas, neutralizando e sequestrando radicais livres. Os compostos intermediários gerados pela ação dos antioxidantes fenólicos são estáveis, uma consequência da distribuição de carga no anel aromático.

Os ensaios para quantificar a ação antioxidante de uma substância podem ser classificados de acordo com as reações químicas ou mecanismos envolvidos. Os métodos são baseados na transferência de elétrons (SET) ou na transferência de átomos de hidrogênio (HTA) (HUANG et al., 2002; PRIOR; WU & SCHAICH, 2005).

Os métodos baseados em SET medem a capacidade de um antioxidante de transferir elétrons para promover a redução de qualquer composto, incluindo carbonilas, metais e radicais. Estas reações são dependentes do solvente e do pH. Nesses ensaios, o antioxidante reage com o agente oxidante, que na maioria das vezes é um indicador fluorescente ou colorimétrico, que muda de cor ao ser reduzido. O grau de alteração de cor é correlacionado com a concentração de antioxidante presente na amostra (ZULUETA; ESTEVE & FRÍGOLA, 2009).

Os métodos baseados na transferência de átomos de hidrogênio medem a habilidade do antioxidante em eliminar os radicais livres por doação de um átomo de hidrogênio. Estas reações são independentes do solvente e do pH. Os ensaios de HTA normalmente incluem um fornecedor de radicais livres, uma sonda

molecular oxidável e um antioxidante (HUANG et al., 2002), envolvidos em reações de competição, em que o substrato e o antioxidante competem pelos radicais peroxil (ROO^{\cdot}) gerados termicamente através da decomposição de compostos azo (ZULUETA; ESTEVE & FRÍGOLA, 2009).

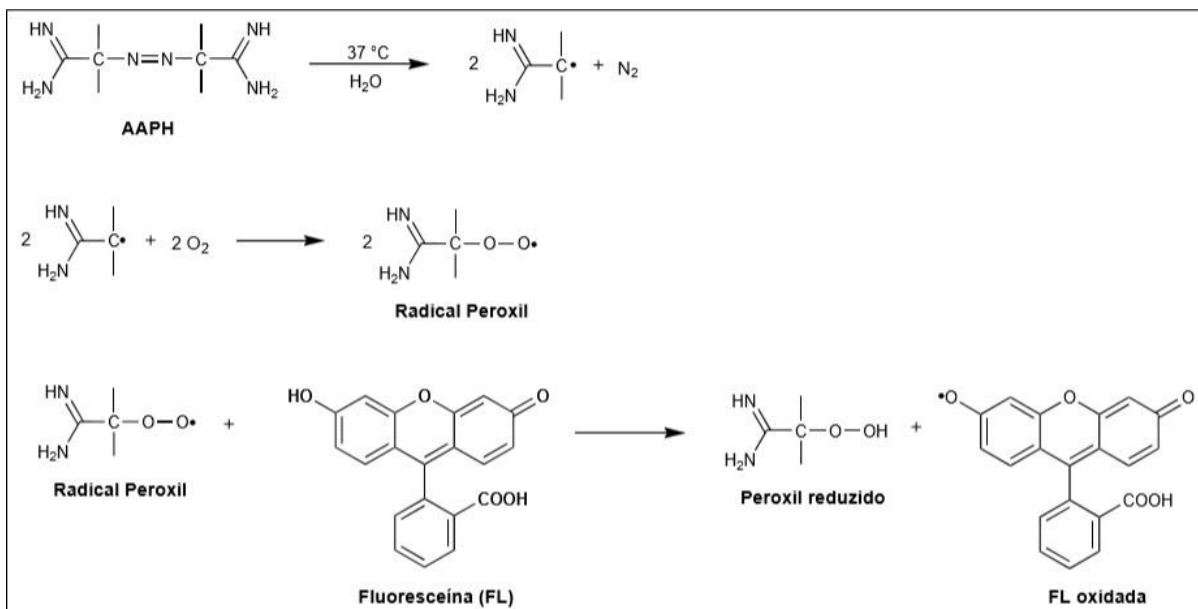
O ensaio ORAC (*Oxygen radical absorbance capacity* – Capacidade de Absorção do Radical Oxigênio) é um método direto para determinar a capacidade antioxidante, baseado na transferência de átomos de hidrogênio. Este método se baseia na propriedade fluorescente de uma sonda marcadora, como a fluoresceína (FL). Neste ensaio, o radical peroxil é gerado termicamente *in situ* por meio do AAPH [dicloreto de 2,2'-azobis(2-amidinopropano)], estes radicais livres na presença de oxigênio atmosférico formam radicais peroxil que reagem com o indicador fluorescente, fluoresceína, para formar um produto não fluorescente (Esquema 21), que pode ser medido por espectrofotometria com máxima emissão de fluorescência em 528 nm (ROGINSKY & LISSI, 2005). O antioxidante presente na amostra precisa reagir com os radicais peroxil mais rapidamente do que a sonda marcadora, para proteger a mesma da oxidação. A atividade antioxidante é resultado da quebra da cadeia pela transferência de hidrogênio, medindo a inibição das oxidações decorrentes dos radicais peroxil (PRIOR; WU & SCHAICH, 2005). O ensaio ORAC oferece uma avaliação completa, onde o tempo e o grau de inibição são determinados à medida que a reação se completa (OU; HAMPSCH-WOODILL & PRIOR, 2001).

O método original ORAC foi desenvolvido pela primeira vez por CAO *et al.*, (1993) e posteriormente algumas melhorias e modificações foram feitas por OU *et al.*, (2001). As modificações realizadas contam com a substituição da sonda marcadora β -phycoerythrins (PEs), um pigmento fluorescente de alga vermelha, pela fluoresceína. Em comparação com a PEs, a FL não interage com antioxidantes polifenólicos, apresenta ótima foto-estabilidade. Em seguida, um método foi desenvolvido e validado para determinar o ORAC de substâncias antioxidantes lipofílicas, usando aleatoriamente o álcool desnaturado beta ciclodextrina para melhorar a solubilidade (HUANG et al., 2002).

O ensaio ORAC proporciona uma fonte controlada de radicais peroxil que simulam reações de antioxidantes com lipídeos em sistemas alimentares e fisiológicos. O método pode ser utilizado para identificar tanto antioxidantes hidrofílicos quanto hidrofóbicos (PRIOR et al., 2003), contudo a reação ORAC é

sensível à temperatura, requerendo rigoroso controle de temperatura (PRIOR; WU & SCHAICH, 2005).

Esquema 21 – Reação do radical peroxil com a fluoresceína durante o ensaio ORAC



Fonte: o próprio autor

Embora o composto fenólico TMBP tenha tido sua atividade antioxidante relatada na literatura por métodos baseados na transferência de elétrons, pelos ensaios de DPPH (2,2'-diphenyl-1-picrylhydrazyl), TEAC (Trolox equivalente antioxidante activity) e FRAP (Ferric reducing antioxidant power) (ADELAKUN et al., 2012), o método ORAC baseado em radicais peroxil é mais significativo biologicamente, pois como citado acima refletem os meios fisiológicos. Assim, neste trabalho, a capacidade antioxidante do TMBP foi avaliada pelo método de transferência de átomos de hidrogênio, através da inibição das oxidações decorrentes dos radicais peroxil.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar a ação leishmanicida do 3,3',5,5'-tetrametoxibifenil-4,4'-diol (TMBP) sobre formas promastigotas e amastigotas de *L. amazonensis* e determinar sua atividade antioxidante pelo método ORAC.

2.2 Objetivos Específicos

Avaliar a atividade antioxidante do TMBP pelo ensaio ORAC.

Avaliar *in silico* o TMBP pelas regras de Lipinski.

Avaliar a atividade antileishmanicida *in vitro* sobre as formas promastigota de *L. amazonensis*.

Determinar os mecanismos de morte envolvidos durante a ação direta do TMBP sobre as formas promastigotas da *L. amazonensis*.

Determinar a viabilidade de macrófagos peritoneais murinos e eritrócitos ovinos tratados com TMBP.

Avaliar a atividade leishmanicida *in vitro* do TMBP sob as formas amastigotas de *L. amazonensis*.

3 METODOLOGIA

3.1 ENSAIO DA CAPACIDADE DE ABSORÇÃO DO RADICAL OXIGÊNIO (ORAC)

O método ORAC descrito por Huang et al. (2002) com algumas modificações foi utilizado para avaliar a capacidade antioxidante do TMBP. A solução estoque de fluoresceína ($1,0 \cdot 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$) foi preparada em tampão de PBS (pH 7,4) e mantida a 4°C , no escuro. A solução de fluoresceína $6,45 \cdot 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$ foi preparada diariamente, diluindo a solução estoque em tampão PBS. A solução do reagente AAPH (88,0 mM) foi preparada em tampão PBS. Em placa de 96 poços de paredes pretas, foi adicionada 4,0 μL dos padrões ácido ascórbico (568-1130 μM) e ácido gálico (17,6-29,4 μM) ou do composto TMBP (2-10 μM) a ser avaliado, seguido da adição de 186 μL de solução de fluoresceína. A placa foi coberta com uma tampa e incubada sob agitação durante 15 min a 40°C . Após esta etapa, a reação foi iniciada com 10 μL de solução de AAPH (88,0 mM). Na sequência, a reação foi novamente incubada sob agitação durante 90 min a 40°C . Após a incubação, a placa foi mantida à temperatura ambiente durante 5 min para esfriar, e a fluorescência foi medida num leitor de microplacas (Victor X3, Perkin Elmer, Finlândia). Filtros de excitação em 485 nm e filtros de emissão em 528 nm foram utilizados. As medições finais de fluorescência foram expressas relativas ao controle. Para os ensaios de controle, os compostos testados foram substituídos pelo correspondente volume de tampão PBS, sob condições idênticas (valor considerado como 100%). A capacidade de absorção do radical oxigênio pelas substâncias foi expressa em termos de EC_{50} , que representa a concentração de amostra necessária para sequestrar 50% dos radicais, foi calculada através do gráfico % de radical sequestrado *versus* concentração da amostra. Todas as determinações foram realizadas em triplicata.

3.2 ESTUDO IN SILICO POR ANÁLISE MOLINSPIRATION

Para o estudo *in silico* do TMBP, a sua estrutura química foi projetada na plataforma Molinspiration *online property calculation toolkit* (www.molinspiration.com), para o desenvolvimento de cálculos de parâmetros relacionados à biodisponibilidade oral de acordo com a regra de Lipinski (LIPINSKI,

2004). Esta análise verifica a capacidade de uma molécula ser um bom fármaco de acordo com quatro parâmetros múltiplos de cinco: MM - peso molecular (≤ 500), miLogP - lipofilicidade (≥ 5), nON - número de aceptores de ligação de hidrogênio (≤ 10), nOHNH - número de doadores de ligação de hidrogênio (≤ 5) e PSA - transporte e absorção de drogas. Para ser um candidato a fármaco a molécula só pode apresentar violação em apenas uma das regras de Lipinski (LIPINSKI, 2004).

A partir do dado de PSA foi possível calcular a porcentagem teórica de absorção oral do composto através da equação 3:

$$\%ABS = 109 - (0,345 \times PSA) \quad (3)$$

3.3 MANUTENÇÃO DAS FORMAS PROMASTIGOTAS DE *L. AMAZONENSIS*

As formas promastigotas de *Leishmania (L.) amazonensis* (MHOM/BR/1989/166MJO) foram mantidas em meio de cultura 199 (GIBCO Invitrogen, New York, EUA) suplementado com 10% de soro bovino fetal (SBF) (GIBCO invitrogen, New York, EUA), tampão HEPES 1M, urina humana 1%, L-glutamina 1%, estreptomicina com penicilina (GIBCO Invitrogen) e 10% de bicarbonato de sódio, em estufa do tipo B.O.D. a 25 °C, em frasco de cultura 25 cm². Nos experimentos foram usadas formas promastigotas na fase estacionária de crescimento (cultura de 5 dias).

3.4 ENSAIO ANTIPROMASTIGOTA

Os experimentos foram desenvolvidos no laboratório de Protozoologia Experimental do Departamento de Ciências Patológicas no Centro de Ciências Biológicas (CCB), da UEL.

As formas promastigotas de *L. amazonensis* (1×10^6 células/mL) foram inoculadas com meio 199 e tratadas com diferentes concentrações de TMBP (0,03; 0,24; 0,49; 0,98; 1,95; 3,9; 7,8 e 15,6 μ M). Após a incubação por períodos de 24, 48 e 72h a 24 °C, os parasitos foram contados em uma câmara de Neubauer com o auxílio de um microscópio. Como controle negativo, utilizou-se promastigotas de *L. amazonensis* mantidas em meio de cultura sem tratamento. Para controle do diluente utilizou-se DMSO 0,015% e como controle positivo as formas promastigotas

foram tratadas com Anfoterecina B (1 μM) (DOS SANTOS et al., 2012). Os experimentos foram realizados em triplicata.

3.5 DETERMINAÇÃO DO VOLUME DE CÉLULAS PARASITAS

As formas promastigotas (1×10^6 células/mL) foram tratadas com 50 $\mu\text{g/mL}$ de TMBP (0,03; 0,24; 0,49; 0,98; 1,95; 3,9; 7,8 e 15,6 μM) por um período de 24h a 24 °C, e posteriormente lavadas com PBS. Na sequência, os parasitos foram analisados em um citômetro de fluxo individual BD Accuri™ C6 Plus. Os histogramas adquiridos e o FSC-H (Forward Scatter Height) representam o volume da célula. Um total de 10.000 eventos foram obtidos na região que correspondia aos parasitos. Como controle utilizou-se promastigotas mantidas apenas com meio de cultura.

3.6 DETERMINAÇÃO DO POTENCIAL DA MEMBRANA MITOCONDRIAL

Para a avaliação do potencial interno da membrana mitocondrial foi realizada a técnica de coloração com éster etílico de tetrametilrhodamina (TMRE) (Sigma, St. Louis, MO, EUA). As formas promastigota (1×10^6 células/mL) foram previamente tratadas durante 24h com 50 $\mu\text{g/mL}$ de TMBP (IC_{50} e duas vezes a concentração do IC_{50}), em seguida foram lavadas e incubadas em 25 nM de TMRE por um período de 30 min a 25 °C, lavadas mais uma vez com PBS e imediatamente analisadas em um leitor de microplacas de fluorescência (Victor X3, Perkin Elmer, Finlândia). Uma solução (100 μM) de Carbonilcianeto *m*-clorofenil-hidrazona (CCCP) (Sigma, St. Louis, MO, EUA) foi utilizada para induzir a despolarização das membranas mitocondriais interna como controle positivo. As leituras foram desenvolvidas em um comprimento de onda de excitação de 480 nm e em um comprimento de onda de emissão de 580 nm.

3.7 DETERMINAÇÃO DA GERAÇÃO DE EROS EM PROMASTIGOTAS

A avaliação da produção de Espécies Reativas de Oxigênio (EROs) em formas promastigotas de *L. amazonensis*, foi desenvolvida através da incubação de 1×10^6 parasitos com 40 $\mu\text{g/mL}$ de TMBP (IC_{50} e duas vezes a concentração do

IC₅₀) ou apenas o meio 199 (controle) durante 24 h. Na sequência, os parasitos foram lavados com PBS (pH 7,4) e incubados com 10 µM da sonda diacetato 2',7'-diclorofluoresceína (H₂DCFDA) (Sigma St. Louis, MO, USA) diluídos em DMSO e encubados no escuro por 45 minutos à 25°C. As espécies reativas de oxigênio foram mensuradas através do aumento na fluorescência causada pela conversão do corante diclorohidrofluoresceína não fluorescente para o altamente fluorescente 2,7-diclorofluoresceína, em um comprimento de onda de excitação de 488 nm e um comprimento de onda de emissão de 530 nm, em um leitor de microplacas de fluorescência (Victor X3, PerkinElmer, Finlândia). Como controle positivo foi usado H₂O₂.

3.8 VIABILIDADE DE MACRÓFAGOS PERITONEAIS

A avaliação dos efeitos citotóxicos do TMBP em macrófagos peritoneais (Comitê de Ética para Experimentação Animal da Universidade Estadual de Londrina: 4496.2018.81) foi realizada de acordo com o descrito por MOSMANN, (1983), que se baseia na oxidação mitocondrial do MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio) (Sigma, St. Louis, MO, EUA). Macrófagos (5x10⁵ célula/mL) foram recuperados a partir da cavidade peritoneal de camundongos BALB/c com PBS gelado suplementado com 3% de SBF e, em seguida, cultivados em meio RPMI 1640 (10% de SBF) durante 24 horas (37 °C, 5 % de CO₂). As células aderentes foram incubadas com TMBP (0,03; 0,06; 0,12; 0,24; 0,49; 0,98; 1,95; 3,90; 7,80; 15,6; 31,3; 62,5 e 125 µM) e cultivadas durante 24 h, sob as mesmas condições. Após este período, a cultura foi lavada com PBS, adicionado MTT (5 mg/mL) e incubados por um período de quatro horas. O produto MTT (cristais de formazan) foi diluído com 300 µL de dimetilsulfóxido (DMSO) (Sigma, St. Louis, MO, EUA), transferidos para placa de 96 poços e a leitura foi realizada por espectrofotômetro (Thermo Scientific, Multiskan GO) à 550 nm.

3.9 ÍNDICE DE SELETIVIDADE (SI)

A eficácia do TMBP nas formas promastigotas de *L. amazonensis* foi expressa como concentração mínima de inibição para 50% dos parasitas (IC₅₀) e citotoxicidade de macrófagos peritoneais como a concentração citotóxica para

causar morte a 50% das células (CC_{50}). IC_{50} e CC_{50} foram determinados por regressão não linear (GraphPad Software, Inc., EUA, 5,00). O grau de seletividade do TMBP foi expresso como $SI = CC_{50}$ do TMBP nos macrófagos peritoneais/ IC_{50} do TMBP nos promastigotas.

3.10 ATIVIDADE HEMOLÍTICA

Com o propósito de avaliar a toxicidade do TMBP, foi realizada a mensuração de sua capacidade hemolítica. Para isso, sangue de ovinos (Comitê de Ética para Experimentação Animal da Universidade Estadual de Londrina: 4496.2018.81) foi coletado em tubo de vácuo heparinizado, e os eritrócitos foram lavados 3 vezes com PBS (1000 rpm por 10 minutos). Em placas de 96 poços preparou-se uma suspensão de hemácias 2% em PBS. Os tratamentos com TMBP (0,03; 0,06; 0,12; 0,24; 0,49; 0,98; 1,95; 3,90; 7,80; 15,6; 31,30; 62,50; 125 μ M) foram incubados 1:1 num volume final de 200 μ L, com suspensão de eritrócitos a 2% durante 3 horas a 37 °C à 5% de CO_2 . PBS foi usado como controle negativo, DMSO 0,015% como controle de diluente e água destilada como controle positivo para hemólise. As placas foram centrifugadas (1000 rpm por 10 minutos), os sobrenadantes recolhidos e analisados por leitura da absorbância a 550 nm.

3.11 ENSAIO ANTIAMASTIGOTA

Macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c (5×10^5 células/poço) foram distribuídos em placas de 24 poços contendo lamínulas de vidro de 13 mm de diâmetro, incubados com 500 μ L de meio RPMI 1640 por 24 horas em estufa à 37°C e 5% CO_2 . Após o período de aderência, o sobrenadante foi removido. As células fagocíticas que permaneceram nas lamínulas foram infectadas com formas promastigotas de *Leishmania (L.) amazonensis* ($2,5 \times 10^6$ promastigotas/poço), mantidas por 2 horas em estufa com 5% de CO_2 nas mesmas condições descritas acima, a fim de ocorrer fagocitose. Após a infecção, as formas promastigotas não internalizadas foram retiradas por lavagem com PBS e as células infectadas foram tratadas com IC_{50} e duas vezes IC_{50} de TMBP (0,86 e 1,72 μ M), meio RPMI 1640 (controle) ou DMSO (controle de diluente) por 24 horas (37°C, 5% CO_2). Decorrido esse período, o sobrenadante foi removido, as lamínulas contendo

as células foram fixadas com metanol e coradas com Giemsa (Laborclin, Pines-PR Brazil), para análise por microscopia ótica e determinação do índice fagocítico e o número de amastigotas por macrófagos. Como controle positivo foi usado Anfotericina B.

3.12 TRATAMENTO ESTATÍSTICO

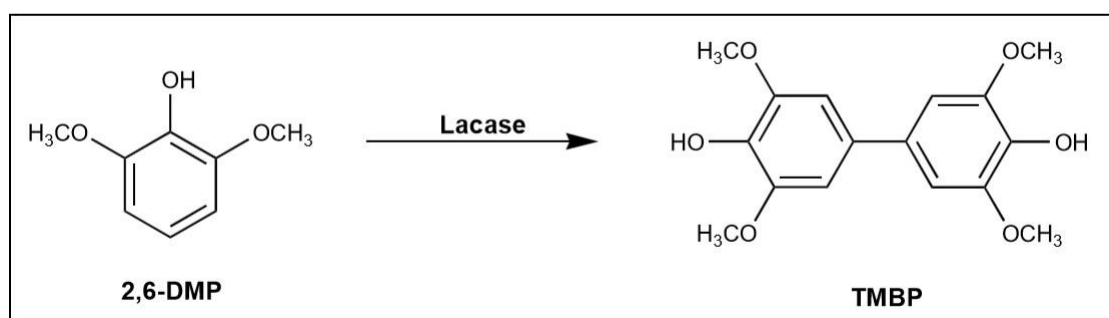
As análises estatísticas dos dados foram por ANOVA seguida por teste de Tukey para comparações múltiplas. Os dados foram analisados usando-se o software estatístico GraphPad Prism (GraphPad Software, Inc., EUA, 500,288). Valor de $p \leq 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 ENSAIO DA CAPACIDADE DE ABSORÇÃO DO RADICAL OXIGÊNIO (ORAC)

A atividade antioxidante do TMBP, um composto fenólico obtido pela biocatálise do 2,6-DMP por lacases de *B. rhodina* e *P. ostreatus* (Esquema 22), já havia previamente sido descrita na literatura através dos testes DPPH, TEAC e FRAP (Tabela 13) (ADELAKUN et al., 2012). Estes são métodos espectrofotométricos comumente empregados para determinar a capacidade antioxidante de compostos e são baseados na transferência de elétrons.

Esquema 22 – Reação de síntese do TMBP a partir do 2,6-DMP catalisada por lacases de *B. rhodina* e *P. ostreatus*



Fonte: o próprio autor

Tabela 13 – Atividade antioxidante do TMBP descrita na literatura científica

	EC₅₀ DPPH (μM)	Valor TEAC* (μM TEAC eqv)	Valor FRAP** (μM)
TMBP	415	1667	2724

*A atividade antioxidante equivalente do Trolox (TEAC) do antioxidante é definida como a concentração da solução de Trolox (μM) com um potencial antioxidante equivalente à solução 1,0 μM da substância sob investigação.

**O FRAP (poder antioxidante redutor de ferro) da amostra é a concentração de solução ascórbica (μM) com capacidade de reduzir o Fe³⁺ ao Fe²⁺ com um potencial antioxidante equivalente à solução 1,0 μM da amostra sob investigação.

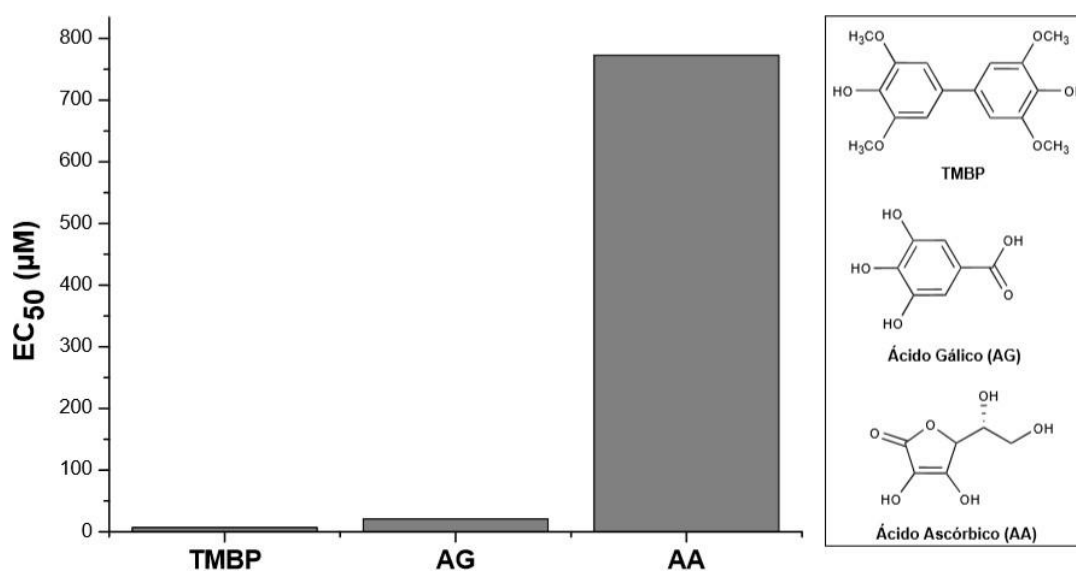
Fonte: Adelanukan et al. 2012

O ensaio da capacidade de absorção do radical oxigênio (ORAC), baseado na transferência de átomos de hidrogênio, no qual o antioxidante e a sonda fluoresceína competem por radicais peroxil gerados termicamente pelo AAPH (HUANG et al., 2002), é mais significativo biologicamente, uma vez que refletem os

meios fisiológicos. No presente trabalho, a propriedade antioxidante do TMBP foi avaliada pelo método ORAC.

Os resultados dos ensaios *in vitro* mostraram que o TMBP foi capaz de eliminar os radicais peroxil de uma forma dose dependente, permitindo determinar o valor de EC_{50} , um parâmetro amplamente usado para medir a capacidade antioxidante. Quanto menor o valor de EC_{50} , maior a capacidade antioxidante e vice-versa. A Figura 13 mostra o resultado de EC_{50} para o TMBP e para os antioxidantes ácido ascórbico (AA) e ácido gálico (AG), usados como referência. O TMBP apresentou a maior atividade antioxidante, com valor de EC_{50} igual a 6,9 μM , valor três vezes maior do que o padrão ácido gálico (EC_{50} 20,6 μM) e 112 vezes maior que o ácido ascórbico (EC_{50} 772,5 μM).

Figura 13 – Avaliação da atividade antioxidante do TMBP e dos padrões ácido gálico (AG) e ácido ascórbico (AA) pelo ensaio ORAC



Fonte: o próprio autor

A ação do ácido gálico, um composto fenólico, e de seus derivados sobre os radicais livres é bem estabelecida na literatura (BADHANI; SHARMA & KAKKAR, 2015), com inúmeras atividades biológicas descritas (KUBO; FUJITA; NIHEI, 2004; LEAL et al., 2009; LOCATELLI et al., 2012; SAVI et al., 2005). Estes compostos, também apresentam atividade inibitória sobre protozoários, sendo relatada a ação leishmanicida do ácido gálico e de seus ésteres de alquila (galatos de alquila) sobre amastigotas intracelulares de *L. amazonensis*. O ácido gálico foi pouco ativo sobre as formas amastigotas, com inibição inferior a 30% dos parasitos,

enquanto seus derivados galatos de alquila, a taxa de inibição variou de 70-84% (TONINI, 2013).

Baseando-se nas evidências experimentais descritas para o uso de compostos fenólicos como agentes leishmanicidas, com sua ação relacionada a capacidade antioxidante, acreditamos que o TMBP, que possui atividade antioxidante três vezes maior que o ácido gálico, possa exercer ação leishmanicida sobre formas promastigotas e amastigotas infectadas com *Leishmania amazonensis*.

4.2 ATIVIDADE LEISHMANICIDA DO TMBP

Segundo a OMS a leishmaniose é uma doença tropical negligenciada, que acomete milhões de pessoas em diversos países. O tratamento contra a leishmaniose tegumentar americana (LTA) está baseado em medicamentos tóxicos, de difícil administração e de baixa eficácia, impulsionando assim a descoberta por tratamentos alternativos.

Nos últimos anos, compostos fenólicos despertaram interesse devido aos benefícios que podem trazer a saúde, baseados na sua atividade antioxidante. De acordo com relatos da literatura científica, alguns compostos fenólicos apresentaram ação leishmanicida, como é o caso do eugenol e seu derivado deidrodieugenol (NAKAMURA et al., 2006; RODRIGUES et al., 2016). Flavonóides fenólicos como a quercetina e a luteolina, são descritos com efeito antileishmanial em espécies de *L. amazonensis* e *L. donovani* (FONSECA-SILVA et al., 2016; MITTRA et al., 2000). Neste contexto, o composto bifenólico TMBP que possui atividade antioxidante, pode ser um agente leishmanicida. Assim, uma investigação da ação antileishmanial do TMBP em *L. amazonensis* foi proposta.

O conhecimento prévio da influência da estrutura química e dos parâmetros farmacocinéticos de uma molécula no início de uma pesquisa é importante para o desenvolvimento de um candidato a fármaco (KELLER; PICHOTA & YIN, 2006; LIPINSKI, 2004). A “Regra dos 5” introduzida por Lipinski e colaboradores em 1997 é uma das análises mais importantes e conhecidas para o planejamento de fármacos. A regra de Lipinsk tem por objetivo prever a influência que a estrutura química apresenta na absorção de um composto por via oral.

O estudo *in silico* foi realizado para a obtenção de uma análise preliminar sobre as propriedades do TMBP e comparar com os fármacos anfotericina

B e Glucantime® (antimoniato de meglumina) comumente utilizados no tratamento de infecções por espécies de *Leishmania*. Na Tabela 14 são apresentados os valores das regras de Lipinski e da área de superfície polar (PSA) calculados para estas substâncias. Os resultados mostram que o TMBP não apresentou qualquer violação dos valores teóricos às regras de Lipinski, sugerindo que não haveria problemas quanto a sua biodisponibilidade oral. Sendo o valor de PSA 77,39 Å², dentro do padrão estipulado (≤ 140 Å²), teoricamente o TMBP apresenta uma boa permeabilidade na membrana plasmática celular com 82,3% de absorção, segundo a equação 3.

Tabela 14 – Regras de Lipinski e área de superfície polar do TMBP e dos fármacos anfotericina B e antimoniato de meglumina

	PSA (≤ 140 Å ²)	MM (g/mol) (≤ 500)	miLogP (≤ 5)	nON (≤ 10)	nOHNH (≤ 5)	Nº violações
TMBP	77,4	306,31	2,44	6	2	0
Anfotericina B	319,61	924,09	-2,49	18	13	3
Antimoniato de meglumina	113,17	195,22	-2,68	6	6	1

PSA = área superficial polar

MM = massa molecular

miLogP = lipofilicidade

nON = número de aceptores de ligação de hidrogênio

nOHNH = número de doadores de ligação de hidrogênio

Fonte: o próprio autor

Os resultados do estudo *in silico* do TMBP demonstra que este deve possuir parâmetros farmacocinéticos desejáveis do ponto de vista da triagem de substâncias, visando o desenvolvimento de novos fármacos. Sugere que não há problemas com a biodisponibilidade oral deste composto, diferente dos fármacos disponíveis no mercado para o tratamento de leishmaniose. Fármacos como a Anfotericina B e Glucantime® (antimoniato de meglumina) apresentaram violação às regras de Lipinski, como observado na Tabela 14.

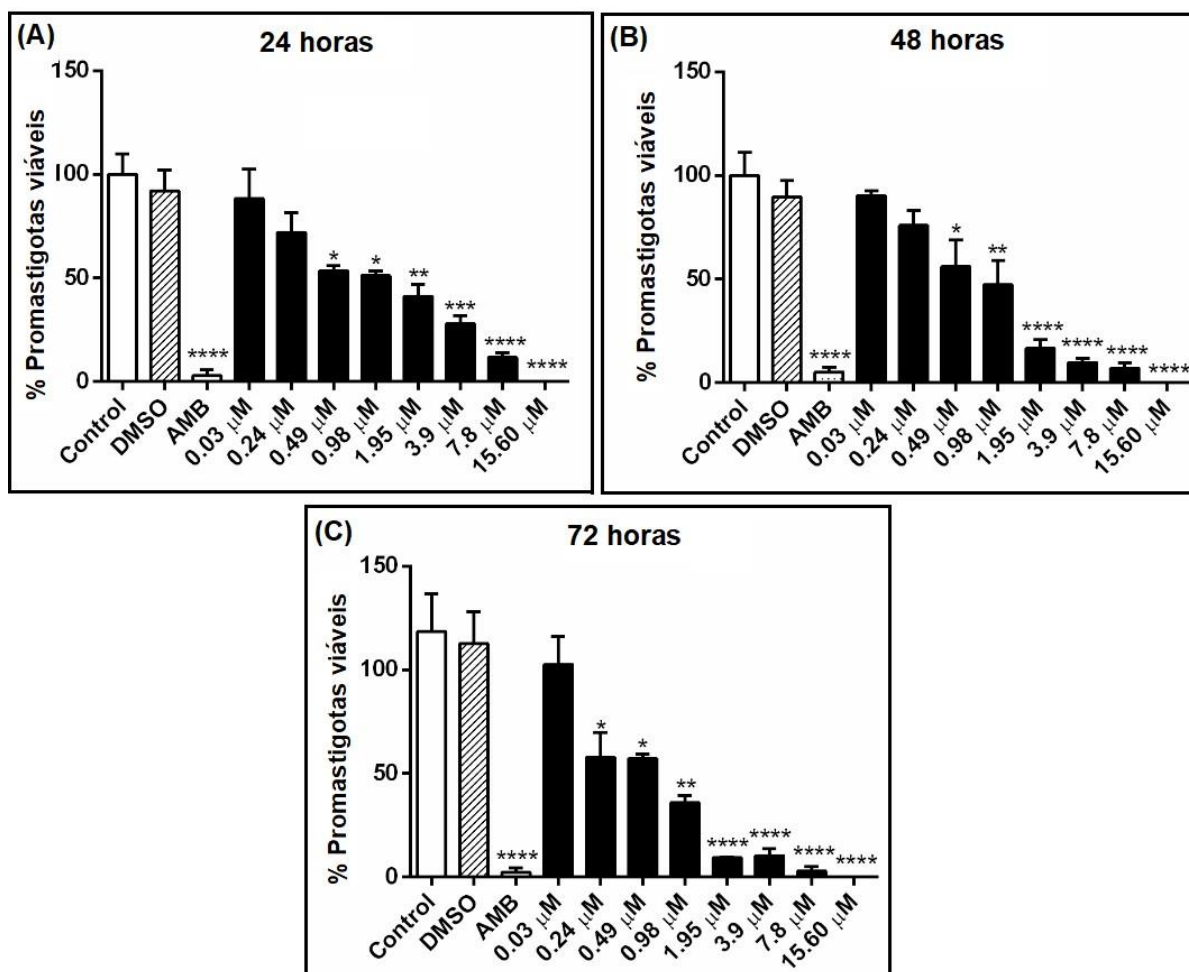
De acordo com Drugs for Neglected Diseases Initiative (DNDi), o tratamento ideal para a leishmaniose deverá ser oral, de baixo custo, curta duração, seguro e eficaz (DON & IOSET, 2014; KATSUNO et al., 2015). O candidato a fármaco não deve se citotóxico ($IS > 10$) e precisa apresentar concentração inibitória de 50% (IC_{50}) menor que 10 μ M contra *Leishmania* ssp intracelular.

Para determinar os efeitos do TMBP sobre a viabilidade de *L. amazonensis*, foi investigada a atividade direta sobre formas promastigotas, incubando os parasitos com diferentes tempos e concentrações de TMBP. Após 24h as concentrações de 0,49; 0,98; 1,95; 3,9; 7,8 e 15,6 μM inibiram em 47,5; 48,8; 58,8; 72,1, 88,4 e 100%, respectivamente, a proliferação dos parasitos em relação ao grupo controle (Figura 14A). O IC_{50} para o TMBP às 24h de tratamento foi de 0,86 μM . Do mesmo, após 48h de tratamento houve um aumento na inibição da viabilidade dos parasitos, nas concentrações de 0,98; 1,95; 3,9 e 7,8 μM reduziram em 52,7; 83,4; 90,1 e 93,1%, respectivamente, quando comparadas ao controle (Figura 14B). Ao final de 72h, a diminuição na proliferação de promastigotas foi mais pronunciada e significativa a partir da concentração de 0,24 μM de TMBP. As concentrações de 0,24; 0,49; 0,98; 1,95; 3,9 e 7,8 eliminaram em 61; 61,4; 82,8; 98,4; 99,2 e 99,7%, respectivamente, a viabilidade dos parasitos em relação ao grupo controle (Figura 14C).

Estes resultados atestam a atividade leishmanicida do TMBP contra formas promastigotas de *L. amazonensis*, mostrando que o efeito deste composto está diretamente relacionado com a dose utilizada, portanto dose-dependente, para a inibição do parasito.

Associado aos dados de viabilidade das formas promastigota de *L. amazonensis* a análise de citômetro de fluxo, indicou ainda uma redução do volume celular de parasitos tratados com 1,95 a 15,6 μM de TMBP (Figura 15). O FSC-H (Forward Scatter Height) é a medida da dispersão frontal da luz no citômetro de fluxo de fluídos, que corresponde ao volume da célula. O histograma mostra que para as concentrações mencionadas o volume celular foi menor para as amostras tratadas com TMBP (linha vermelha) em comparação com amostras controles (linha preta).

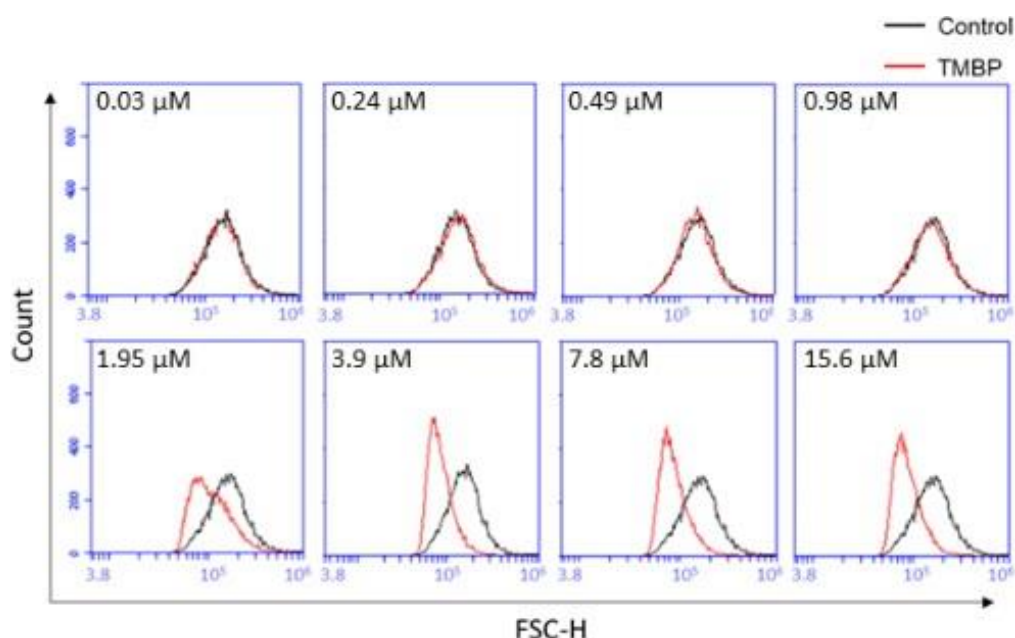
Figura 14 – Atividade leishmanicida do TMBP (0.03- 15.6 μM) sobre formas promastigotas de *L. amazonensis* em **(A)** 24h de tratamento **(B)** 48h de tratamento **(C)** 72h de tratamento. (AmB 1 μM) controle positivo e DMSO (0,015%) diluente. Os valores representam a média \pm SEM de três experimentos independentes realizados em duplicata. Diferença significativa em relação ao controle * ($p \leq 0,05$), ** ($p \leq 0,01$), *** ($p \leq 0,001$), **** ($p \leq 0,0001$)



Fonte: o próprio autor

Uma vez que o efeito antipromastigota do TMBP foi confirmado, foram avaliados os mecanismos de ação envolvidos na morte dos parasitos através da investigação da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e da integridade mitocondrial nos parasitos. As concentrações de 0,86 μM (IC_{50}) e 1,72 μM , referente a duas vezes o valor do IC_{50} , foram usadas nesses experimentos.

Figura 15 – Volume celular em formas promastigotas de *L. amazonensis* tratadas com TMBP. FSC-H foram considerados uma função do tamanho da célula. A linha preta corresponde ao grupo controle (parasitos não tratados) e a área da linha vermelha corresponde ao grupo tratado



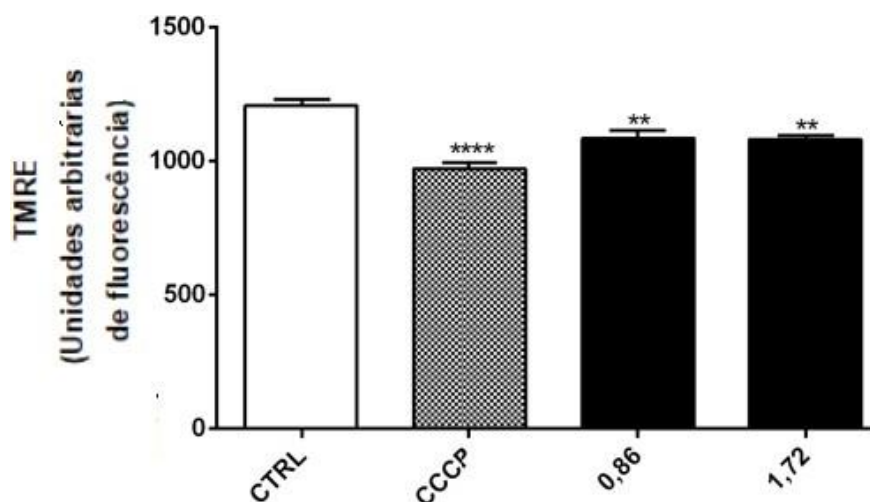
Fonte: o próprio autor

Em função da sua única mitocôndria, os parasitos do gênero *Leishmania* requerem a manutenção da integridade mitocondrial para a sua subsistência (KOWALTOWSKI & VERCESI, 1999). Uma vez que a mitocôndria é responsável pela respiração e o principal local para formação de ATP celular através da fosforilação oxidativa, a mesma tornou-se um alvo antiparasitário promissor (FIDALGO & GILLE, 2011; MONZOTE & GILLE, 2010). Estudos mostram que modificações da integridade mitocondrial causadas por drogas como, antimônio e inibidores de SMT (sterol methenyl transferase), estão relacionadas à sobrevivência celular de *L. donovani* (MEHTA & SHAHA, 2006) e *L. amazonensis* (RODRIGUES et al., 2007), respectivamente.

Para avaliar se o TMBP induz alteração na integridade da membrana mitocondrial de promastigotas de *L. amazonensis*, foi utilizada a sonda TMRE, um marcador fluorescente que se complexa com mitocôndrias ativas. Como controle positivo foi usado o CCCP, para induzir a despolarização da membrana mitocondrial interna do parasito. Verificou-se que o tratamento com TMBP diminuiu a intensidade

da fluorescência total do TMRE em relação ao grupo controle, indicando perda da integridade desta organela (Figura 16). Da mesma forma, foi observada uma diminuição na fluorescência após o tratamento com o agente de despolarização mitocondrial, CCCP. Esses resultados sugerem que o TMBP inibe a viabilidade de promastigotas de *L. amazonensis* afetando a função mitocondrial do parasito.

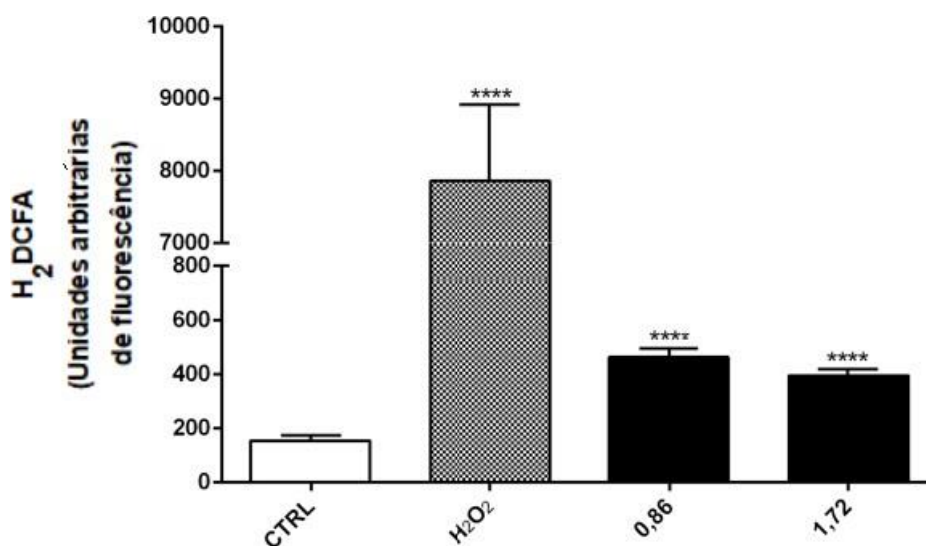
Figura 16 – Análise do mecanismo de morte em formas promastigotas de *L. amazonensis* submetidos a tratamentos com TMBP (0,86 e 1,72 μM) por 24h e analisadas por ensaio de TMRE para análise fluorométrica do potencial de membrana mitocondrial. (CTRL) Controle (parasitos não tratados) e (CCCP) controle positivo. Diferença significativa em relação ao controle ** ($p \leq 0.01$), **** ($p \leq 0.0001$)



Fonte: o próprio autor

As espécies reativas de oxigênio são produzidas em células infectadas por patógenos com o objetivo de eliminar a infecção. Além disso, as EROs podem ser geradas como uma resposta a certas drogas, como por exemplo drogas antiparasitários, na morte de parasitos em células infectadas (MEHTA & SHAHA, 2006). Os níveis de EROs foram determinados usando H_2DCFDA , uma sonda fluorescente capaz de detectar principalmente H_2O_2 e os radicais hidroxilas que fluorescem após a formação da diclorofluoresceína (MYHRE et al., 2003). A Figura 17 mostra que os níveis de EROs nas células tratadas com TMBP foram mais elevados em comparação com o grupo controle, o mesmo foi observado para o controle positivo, H_2O_2 . Esses resultados demonstram que o TMBP promoveu o aumento de EROs nas formas promastigotas de *L. amazonensis*.

Figura 17 – Análise do mecanismo de morte em formas promastigotas de *L. amazonensis* submetidos a tratamentos com TMBP (0,86 e 1,72 μM) por 24h usando sonda fluorescente H_2DCFDA para a medição de espécies reativas de oxigênio. (CTRL) Controle (parasitos não tratados) e (H_2O_2) controle positivo. Diferença significativa em relação ao controle **** ($p \leq 0.0001$)



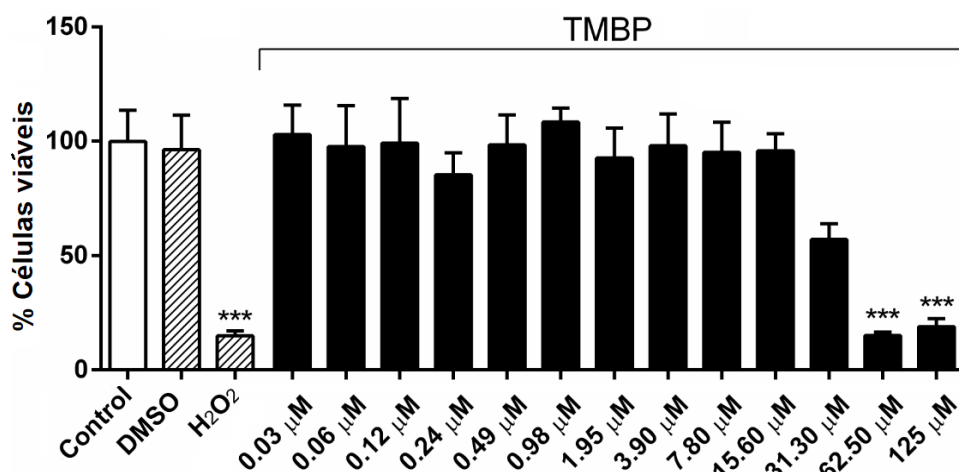
Fonte: o próprio autor

Em conjunto, os resultados mostram que o efeito leishmanicida do TMBP sobre formas promastigota de *L. amazonensis* está associado com a produção de EROS e a disfunção mitocondrial, causando a morte do parasito. Mecanismos estes, também descritos por MEHTA e SHAHA (2006), quando usaram o metalóide antimônio sobre formas promastigotas de *L. donovani*, e também por Fonseca-Silva e colaboradores (2011) quando avaliaram a quercetina sobre formas promastigotas de *L. amazonensis*.

A fim de investigar o efeito do TMBP sobre formas amastigotas de *L. amazonensis*, previamente foi avaliada sua ação citotóxica sobre macrófagos murinos e eritrócitos de carneiro. Foi verificado que as concentrações de 0,03 a 15,60 μM não alteraram a viabilidade mitocondrial de macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c (Figura 18). Além disso, foi calculado o valor de CC_{50} para este composto, cuja concentração foi 53,93 μM . A partir dos valores de IC_{50} e CC_{50} foi determinado o índice de seletividade do TMBP, o qual foi 62,70. Os resultados da atividade hemolítica (Figura 19), expressos em porcentagem de viabilidade, apontam que as concentrações de TMBP testadas também não causaram a hemólise de

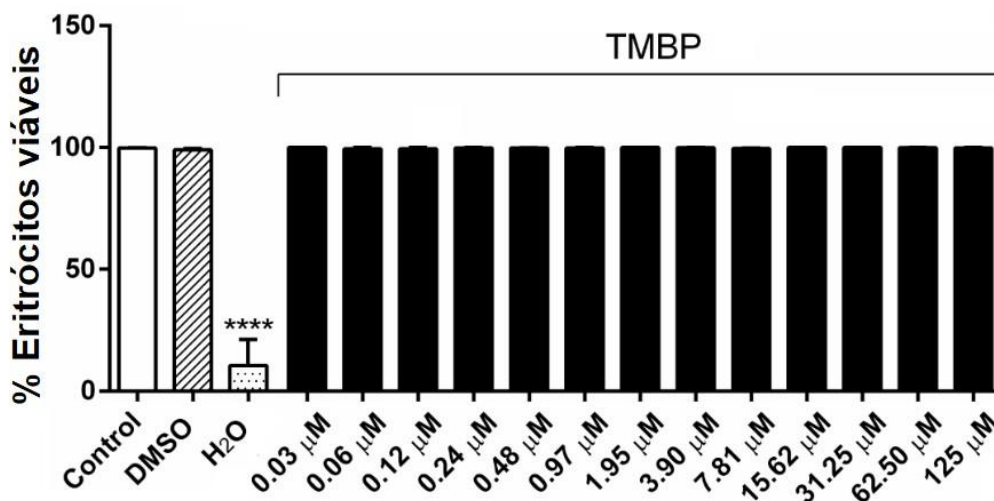
eritrócitos.

Figura 18 – Viabilidade de macrófagos tratados com TMBP. Macrófagos peritoneais de camundongo BALB/c tratados com TMBP (0,03-125 μ M). Controle negativo (meio RPMI 1640), controle positivo (H_2O_2) e DMSO 0,015% (controle diluente). Os valores representam a média \pm SEM de três experimentos independentes realizados em duplicata. Diferença significativa em relação ao controle *** ($p \leq 0,001$)



Fonte: o próprio autor

Figura 19 – Viabilidade de eritrócitos tratados com TMBP. Eritrócitos ovinos tratados com TMBP (0,03-125 μ M). Hemólise verificada pela leitura da absorbância a 550 nm. Como controle foi utilizado PBS (não-hemólise), e controle positivo indica a exposição à água destilada. Os valores representam a média \pm SEM de três experimentos independentes realizados em duplicata. Diferença significativa em relação ao controle **** ($p \leq 0,0001$)

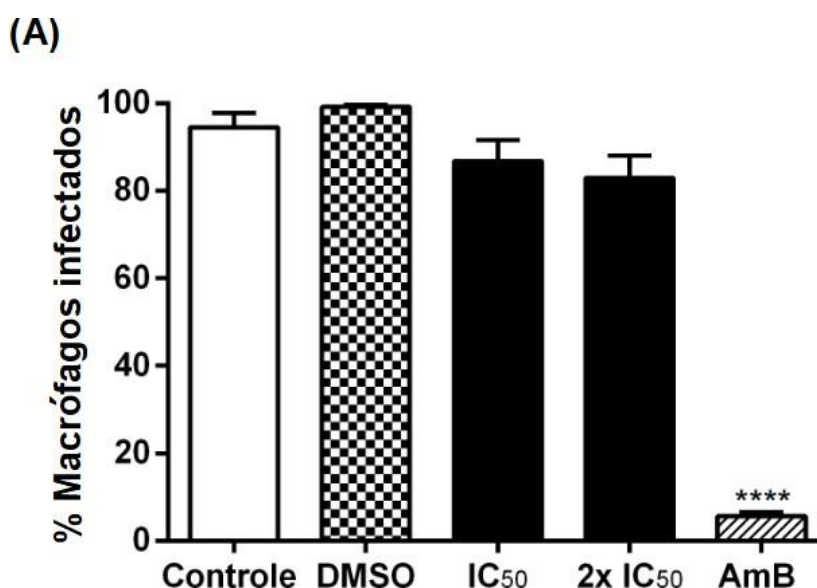


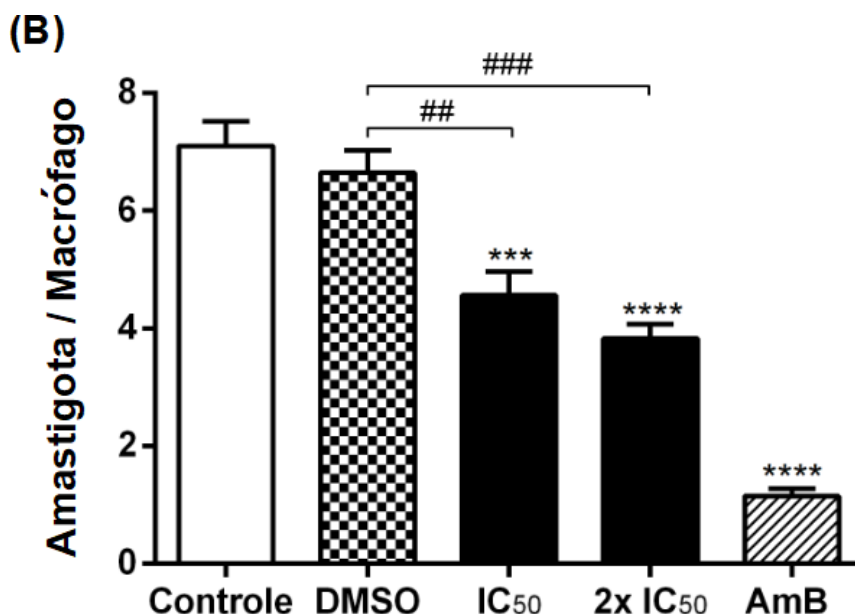
Fonte: o próprio autor

O IS de um composto é um parâmetro amplamente usado para expressar a eficácia e segurança *in vitro* de um composto na inibição de um parasito (FERREIRA et al., 2018; PINTO & TEMPONE, 2018). Neste sentido, o TMBP, investigado no presente trabalho, apresentou IS 62,70 vezes seletividade pelos parasitos que pelas células hospedeiras.

Uma vez que o TMBP foi capaz de diminuir a proliferação das formas promastigotas, e não foi toxico para os macrófagos, optou-se por investigar o seu efeito contra as formas amastigotas intracelulares. Os resultados mostram não haver diminuição estatisticamente significativa na porcentagem de células infectadas (Figura 20A), contudo houve redução no número de parasitas intracelulares por macrófago (Figura 20B). As duas concentrações de TMBP diminuíram significativamente o número médio de amastigotas por macrófagos em 35,2 e 46,2% ($p \leq 0,001$ e $p \leq 0,0001$), quando comparado com o controle.

Figura 20 – Macrófagos infectados por *L. amazonensis* tratados com TMBP (IC_{50} (0,86 μ M) e $2xIC_{50}$ (1,72 μ M)). **(A)** Porcentagem de macrófagos infectados **(B)** Avaliação da quantidade de amastigotas por macrófago. Controle negativo (meio RPMI 1640), controle positivo (AmB 1 μ M) e DMSO 0,015% (controle diluente). Os valores representam a média \pm SEM de três experimentos independentes realizados em duplicata. Diferença significativa em relação ao controle negativo *** ($p \leq 0,001$), **** ($p \leq 0,0001$). Diferença significativa em relação ao controle diluente ## ($p \leq 0,01$), ### ($p \leq 0,001$)





Fonte: o próprio autor

A localização intracelular das formas amastigotas no interior dos macrófagos é um dos principais desafios dos fármacos no tratamento da leishmaniose. Isto porque o composto necessita se difundir através da membrana celular para atingir o seu alvo (CROFT & OLLIARO, 2011). Os tratamentos com o TMBP agiram sobre o parasito intracelular, diminuindo a quantidade de formas amastigotas viáveis nos macrófagos, portanto o composto foi capaz de se difundir pela membrana celular, atuando diretamente sobre o alvo, sem provocar efeitos tóxicos consideráveis para a célula hospedeira.

Neste estudo, o TMBP apresentou efeito leishmanicida contra as formas promastigotas e amastigotas de *L. amazonensis*, e não apresentou efeito citotóxico aos macrófagos peritoneais e eritrócitos ovinos, sendo que os mecanismos de morte celular foi resultado da formação de espécies reativas de oxigênio, bem como pela despolarização mitocondrial.

5 CONCLUSÃO

A avaliação da atividade antioxidante do TMBP (EC_{50} 6,9 μ M) pelo método ORAC mostrou que este composto possui capacidade antioxidante três vezes maior que o padrão ácido gálico (EC_{50} 20,6 μ M) e 112 vezes maior que o ácido ascórbico (EC_{50} 772,5 μ M).

O estudo *in silico* do TMBP demonstrou que este composto apresenta propriedades farmacológicas desejáveis do ponto de vista da triagem de substâncias, visando o desenvolvimento de novos fármacos.

A avaliação *in vitro* da atividade leishmanicida do TMBP apresentou inibição de 100% na viabilidade de formas promastigotas de *L. amazonensis*, de maneira dose-dependente, após 24 horas de reação com IC_{50} igual a 0,86 μ M. A morte celular induzida pelo TMBP sobre promastigotas foi atribuída à geração de espécies reativas de oxigênio, bem como pela disfunção mitocondrial. As concentrações de TMBP avaliadas sobre promastigotas não alteraram a viabilidade mitocondrial de macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c, como também, não causaram hemólise de eritrócitos ovinos, indicando que o composto não é tóxico. O TMBP foi capaz de agir no parasito intracelular, diminuindo a quantidade de formas amastigotas viáveis dentro dos macrófagos, sugerindo que ele é capaz de se difundir pela membrana celular, atuando diretamente sobre o alvo, sem provocar efeitos tóxicos consideráveis para a célula hospedeira. Desta forma, esta molécula apresenta potencial terapêutico para o tratamento de infecções por *Leishmania*.

6 REFERÊNCIAS

ADELAKUN, O. E. et al. Enzymatic modification of 2,6-dimethoxyphenol for the synthesis of dimers with high antioxidant capacity. **Process Biochemistry**, v. 47, n. 12, p. 1926–1932, 2012.

ALEXOPOULOS, C. J.; MIMS, C. W.; BLACKWELL, M. **Introductory Micology**. 4 th ed. New York: John Wiley e Sons, Inc., 1996.

ALMEIDA, B. F. M. et al. Leishmaniasis causes oxidative stress and alteration of oxidative metabolism and viability of neutrophils in dogs. **The Veterinary Journal**, v. 198, p. 599–605, 2013.

BADHANI, B.; SHARMA, N.; KAKKAR, R. Gallic acid : a versatile antioxidant with promising therapeutic and industrial applications. **RSC Advances**, v. 5, p. 27540–27557, 2015.

BARRETT, M. P.; CROFT, S. L. Management of trypanosomiasis and leishmaniasis. **British medical Bulletin**, v. 22, p. 175–196, 2012.

BERMAN, J. D. Chemotherapy for leishmaniasis: Biochemical mechanisms, clinical efficacy, and future strategies. **Reviews of Infectious Diseases**, v. 10, n. 3, p. 560–586, 1988.

BRAY, P. G. et al. Pentamidine uptake and resistance in pathogenic protozoa: past, present and future. **Trends in Parasitology**, v. 19, n. 5, p. 232–239, 2003.

CEREGHETTI, M.; CARREIRA, E. M. Amphotericin B : 50 Years of Chemistry and Biochemistry. **Synthesis**, v. 6, p. 914–942, 2006.

CORNELLI, U. Antioxidant use in nutraceuticals. **Clinics in Dermatology**, v. 27, p. 175–194, 2009.

CROFT, S. L.; OLLIARO, P. Leishmaniasis chemotherapy — challenges and opportunities. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 17, p. 1478–1483, 2011.

CROZIER, A.; JAGANATH, I. B.; CLIFFORD, M. N. **Plant Secondary Metabolites: Occurrence, Structure and Role in the Human Diet**. Blackwell Publishing, 2006. pp. 1-24. ISBN 1405125098

DA SILVA, S. S. et al. Brazilian Propolis Antileishmanial and Immunomodulatory Effects. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2013, p. 1-7, 2013.

DESJEUX, P. Leishmaniasis: Current situation and new perspectives. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v. 27, n. 5, p. 305–318, 2004.

DON, R. O. B.; IOSET, J. Screening strategies to identify new chemical diversity for drug development to treat kinetoplastid infections. **Parasitology**, v. 1, p. 140–146, 2014.

DOS SANTOS, A. O. et al. Copaiba oil: An alternative to development of new drugs against leishmaniasis. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2012, 2012.

DWIVEDI, U. N. et al. Structure-function relationship among bacterial, fungal and plant laccases. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 68, n. 2, p. 117–128, 2011.

EGER, I. **Potencial quimioterapêutico de diferentes derivados do ácido gálico para o tratamento da infecção pelo *Trypanosoma cruzi*: avaliação in vitro e in vivo**. 2010, 127 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia e Biociências) - Universidade Federal de Santa Catarina: Florianópolis, 2010.

FERREIRA, D. D. et al. Efficacy of sertraline against *Trypanosoma cruzi*: an in vitro and in silico study. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v. 24:30, p. 1–12, 2018.

FIDALGO, L. M.; GILLE, L. Mitochondria and trypanosomatids: Targets and drugs.

Pharmaceutical Research, v. 28, n. 11, p. 2758–2770, 2011.

FONSECA-SILVA, F. et al. Oral Efficacy of Apigenin against Cutaneous Leishmaniasis: Involvement of Reactive Oxygen Species and Autophagy as a Mechanism of Action. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 2, p. 1–16, 2016.

GENARO, O. Leishmaniose Tegumentar Americana. In: Neves DP, Melo AL, Linardi PM, Vitor RWA. **Parasitologia Humana**. 12. ed. São Paulo: Atheneu, 2011.

GLUENZ, E.; GINGER, M. L.; MCKEAN, P. G. Flagellum assembly and function during the *Leishmania* life cycle. **Current Opinion in Microbiology**, v. 13, n. 4, p. 473–479, 2010.

GONTIJO, B. Leishmaniose tegumentar americana American cutaneous leishmaniasis. **Medicina Tropical**, v. 36, n. 13, p. 71–80, 2003.

HALLIWELL, B. Are polyphenols antioxidants or pro-oxidants? What do we learn from cell culture and in vivo studies? **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 476, p. 107–112, 2008.

HENARD, C. A. et al. *Leishmania amazonensis* Amastigotes Highly Express a Tryparedoxin Peroxidase Isoform That Increases Parasite Resistance to Macrophage Antimicrobial Defenses and Fosters Parasite Virulence. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 7, p. e3000, 2014.

HUANG, D. et al. Development and Validation of Oxygen Radical Absorbance Capacity Assay for Lipophilic Antioxidants Using Randomly Methylated -Cyclodextrin as the Solubility Enhancer. **Jounal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 1815–1821, 2002.

KATSIKI, N.; MANES, C. Is there a role for supplemented antioxidants in the prevention of atherosclerosis ? **Clinical Nutrition**, v. 28, p. 3–9, 2009.

KATSUNO, K. et al. Hit and lead criteria in drug discovery for infectious diseases of the developing world. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 14, n. 11, p. 751–758, 2015.

KELLER, T. H.; PICHOTA, A.; YIN, Z. A practical view of “druggability”. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 10, n. 4, p. 357–361, 2006.

KOFF, A. B.; ROSEN, T. Treatment of cutaneous leishmaniasis. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 31, n. 5, p. 693–708, 1994.

KOWALTOWSKI, A. J.; VERCESI, A. E. Mitochondrial damage induced by conditions of oxidative stress. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 26, n. 3–4, p. 463–471, 1999.

KUBO, I.; FUJITA, K. I.; NIHEI, K. I.; NIHEI, A. Antibacterial Activity of Alkyl Gallates against *Bacillus subtilis* The antifungal activity of a series of alkyl gallates against. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 52, p. 1072–1076, 2004.

LAGUERRE, M.; LECOMTE, J.; VILLENEUVE, P. Evaluation of the ability of antioxidants to counteract lipid oxidation: Existing methods, new trends and challenges. **Progress in Lipid Research**, v. 46, p. 244–282, 2007.

LAINSON, R.; SHAW, J. Evolution, classification and geographical distribution. In: **The leishmaniases in biology and medicine**. London: Academic Press, 1987. p. 1–120.

LEAL, P. C. et al. Relation between lipophilicity of alkyl gallates and antifungal activity against yeasts and filamentous fungi. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 19, n. 6, p. 1793–1796, 2009.

LIPINSKI, C. A. Lead- and drug-like compounds: The rule-of-five revolution. **Drug Discovery Today: Technologies**, v. 1, n. 4, p. 337–341, 2004.

- LOCATELLI, C. et al. Antimetastatic activity and low systemic toxicity of tetradecyl gallate in a preclinical melanoma mouse model. **Investional New Drugs**, v. 30, p. 870–879, 2012.
- LÜ, J. et al. Chemical and molecular mechanisms of antioxidants : experimental approaches and model systems. **Molecular Medicine**, v. 14, n. 4, p. 840–860, 2010.
- LUZ, N. E. MEMBRIVE, E. A. CASTRO, J. DEREURE, F. PRATIONG, A. DEDET, A. PANDEY, V. T. S. *Lutzomyia whitmani* (Diptera: Psychodidae) as vector of *Leishmania* (V.) *braziliensis* in Paraná state, southern Brazil. **An Trop Med Parasit**, v. 94, n. 6, p. 623–631, 2000.
- MARTINS, G. V et al. Estudo Químico e Avaliação das Atividades Antioxidante , Anti-acetilcolinesterase e Antileishmanial de Extratos de *Jatropha gossypifolia* (Pião Roxo). **Revista Virtual de Quimica**, v. 10, n. 1, p. 21–36, 2018.
- MEDEIROS, M. L. et al. Efficient Antioxidant Formulations for Use in Biodiesel. **Energy and Fuels**, v. 28, n. 2, p. 1074–1080, 2014.
- MEHTA, A.; SHAHA, C. Mechanism of metalloid-induced death in *Leishmania* spp .: Role of iron , reactive oxygen species , Ca 2+, and glutathione. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 40, p. 1857–1868, 2006.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Manual Anual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana. Série A. Normas e Manuais Técnicos**. 2. ed. Brasília-DF: Editora do Ministério da Saúde, 2007.
- MITTRA, B. et al. Luteolin, an abundant dietary component is a potent anti-leishmanial agent that acts by inducing topoisomerase II-mediated kinetoplast DNA cleavage leading to apoptosis. **Molecular medicine (Cambridge, Mass.)**, v. 6, n. 6, p. 527–541, 2000.
- MONZOTE, L.; GILLE, L. Mitochondria as a Promising Antiparasitic Target. **Current Clinical Pharmacology**, v. 5, n. 1, p. 55–66, 2010.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, n. 1–2, p. 55–63, 1983.

NAKAMURA, U. T. et al. Antileishmanial activity of Eugenol-rich essential oil from *Ocimum gratissimum*. **Parasitology International**, v. 55, p. 99–105, 2006.

NIKI, E. Assessment of Antioxidant Capacity in vitro and in vivo. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 49, p. 503–515, 2010.

NIMSE, B. S.; PAL, D. Free radicals, natural antioxidants, and their reaction mechanisms. **RSC Advances**, v. r, p. 27986–28006, 2015.

OLIVEIRA, A. C.; VALENTIM, I. B.; GOULART, M. O. F. Fontes vegetais naturais de antioxidantes. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 689–702, 2009.

OU, B.; HAMPSCH-WOODILL, M.; PRIOR, R. L. Development and Validation of an Improved Oxygen Radical Absorbance Capacity Assay Using Fluorescein as the Fluorescent Probe. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, p. 4619–4626, 2001.

PEREIRA, M. C. et al. Characterization and Antioxidant Potential of Brazilian Fruits from the Myrtaceae Family. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, p. 3061–3067, 2012.

PINTO, E. G.; TEMPONE, A. G. Activity of the antiarrhythmic drug amiodarone against *Leishmania (L.) infantum*: an in vitro and in vivo approach. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v. 24:29, p. 1–6, 2018.

PRIOR, R. L. et al. Assays for Hydrophilic and Lipophilic Antioxidant Capacity (oxygen radical absorbance capacity (ORAC FL)) of Plasma and Other Biological and Food Samples. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, p. 3273–3279, 2003.

- PRIOR, R. L.; WU, X.; SCHAICH, K. Standardized Methods for the Determination of Antioxidant Capacity and Phenolics in Foods and Dietary Supplements. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 4290–4302, 2005.
- RATH, S. et al. Antimoniais Empregados no Tratamento da Leishmaniose: Estado da Arte. **Quimica Nova**, v. 26, n. 4, p. 550–555, 2003.
- REITHINGER, R. et al. Cutaneous leishmaniasis. **Clinics in Dermatology**, v. 25, n. 2, p. 203–11, 2007.
- RODRIGUES, L. C. et al. Synthesis and Antileishmanial Activity of Natural Dehydrodieugenol and Its Mono- and Dimethyl Ethers. **Chemistry Biodiversity**, v. 13, p. 870–874, 2016.
- RODRIGUES, A. M. et al. Fatores associados ao insucesso do tratamento da leishmaniose cutânea com antimoniato de meglumina. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 39, n. 2, p. 139–145, 2006.
- RODRIGUES, J. C. F. et al. Sterol Methenyl Transferase Inhibitors Alter the Ultrastructure and Function of the *Leishmania amazonensis* Mitochondrion Leading to Potent Growth Inhibition. **Protist**, v. 158, p. 447–456, 2007.
- ROGINSKY, V.; LISSI, E. A. Review of methods to determine chain-breaking antioxidant activity in food. **Food Chemistry**, v. 92, p. 235–254, 2005.
- RYU, K. Effect of antioxidants on the oxidative stability and combustion characteristics of biodiesel fuels in an indirect-injection (IDI) diesel engine. **Journal of Mechanical Science and Technology**, v. 23, p. 3105–3113, 2009.
- SAVI, L. et al. Evaluation of Anti-herpetic and Antioxidant Activities, and Cytotoxic and Genotoxic Effects of Synthetic Alkyl-Esters of Gallic Acid. **Arzneimittelforschung**, v. 55, n. 1, p. 66–75, 2005.

SILVEIRA, T. G. V. et al. An autochthonous case of cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania* (*Leishmani*) *amazonensis* Lainson & Shaw, 1972 From the North of Paraná state, Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 85, n. 4, p. 475–476, 1990.

SISTEMA DE INFORMAÇÃO DE AGRAVOS DE NOTIFICAÇÃO (Brasil).
LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA - **Casos confirmados Notificados no Sistema de Informação de Agravos de Notificação - Sinan Net**. Disponível em: <http://portalsinan.saude.gov.br/dados-epidemiologicos-sinan>. Acesso em 17/12/18.

SINGH, S.; SIVAKUMAR, R. Challenges and new discoveries in the treatment of leishmaniasis. **Journal of Infection and Chemotherapy**, v. 10, p. 307–315, 2004.

SUNDAR, S.; CHAKRAVARTY, J. An update on pharmacotherapy for leishmaniasis. **Expert Opinion Pharmacother**, v. 16, n. 2, p. 237–252, 2015.

TASDEMIR, D. et al. Antitrypanosomal and Antileishmanial Activities of Flavonoids and Their Analogues: In Vitro, In Vivo, Structure-Activity Relationship, and Quantitative Structure-Activity Relationship Studies. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 50, p. 1351–1364, 2006.

TIUMAN, T. S. et al. Recent advances in leishmaniasis treatment. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 15, n. 8, p. 525–532, 2011.

TOMIOTTO-PELLISIER, F. et al. Caryocar coriaceum extracts exert leishmanicidal effect acting in promastigote forms by apoptosis-like mechanism and intracellular amastigotes by Nrf2/HO-1/ferritin dependent response and iron depletion. Leishmanicidal effect of Caryocar coriaceum leaf extracts. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 98, p. 662–672, 2018.

TONINI, M. L. **Desenvolvimento de um teste colorimétrico para triagem da atividade leishmanicida de compostos utilizando *Leishmania amazonensis* expressando a enzima beta-galactosidase**. 2013, 118f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia e Biociências) - Universidade Federal de Santa Catarina: Florianópolis, 2013.

WHO. Control of the Leishmaniasis. **Technical Reports Series**, v. 201, 2010.

WHO. Leishmaniasis in high-burden countries: an epidemiological update based on data reported in 2014. **Weekly Epidemiological Record**, n. 83, p. 285–296, 2016.

ZULUETA, A.; ESTEVE, M. J.; FRÍGOLA, A. ORAC and TEAC assays comparison to measure the antioxidant capacity of food products. **Food Chemistry**, v. 114, p. 310–316, 2009.

CAPÍTULO III

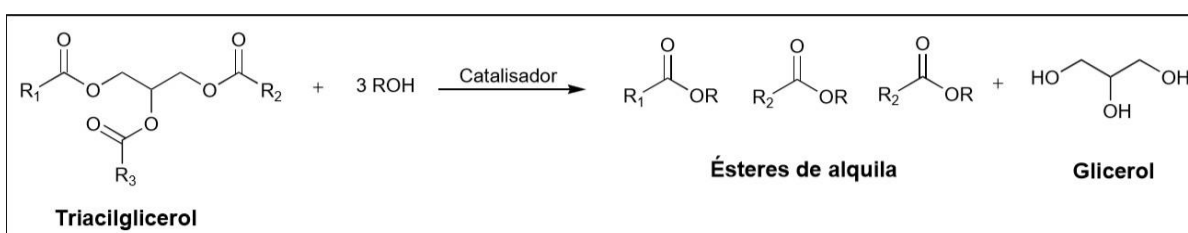
Aplicação do 3,3',5,5'-tetrametoxibifenil-4,4'-diol (TMBP) como aditivo antioxidante para biodiesel de soja

1 REVISÃO DE LITERATURA

A busca crescente por fontes de energia mais sustentáveis e limpas e a diminuição da disponibilidade de combustíveis fósseis, em oposição ao aumento da demanda mundial de energia, levou ao desenvolvimento de novas tecnologias para melhorar a rede de distribuição de biocombustíveis, da produção ao uso final do consumidor. Nesse contexto, o biodiesel é um importante substituto sustentável para os motores a diesel, uma vez que pode ser produzido utilizando várias fontes de ácidos graxos como matéria-prima, inclusive algumas que não teriam aproveitamento pelo setor industrial (ORIVES et al., 2014).

O biodiesel é produzido a partir de triglicerídeos através de uma reação de transesterificação. Este processo envolve a reação de uma molécula de triglicerídeo com três moléculas de um álcool de cadeia curta, na presença de um catalisador, levando a obtenção de três moléculas de ésteres de alquila (biodiesel) e uma de glicerol (Esquema 23). Os constituintes químicos que compõem este biocombustível variam de acordo com a matéria-prima que lhe deu origem, podendo ser obtidos a partir do óleo de soja, algodão, girassol, palma ou amendoim (óleos vegetais), gorduras animais como banha e óleo de peixe ou então de óleos alimentares usados.

Esquema 23 – Reação de transesterificação para a obtenção do biodiesel (mistura de ésteres graxos de alquila)

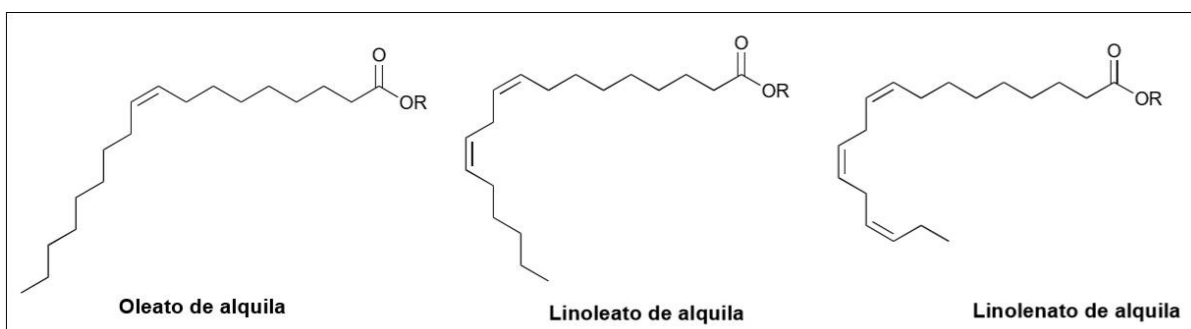


Fonte: o próprio autor

A composição do biodiesel interfere diretamente na sua estabilidade oxidativa, uma vez que os processos oxidativos estão relacionados com a suscetibilidade à degradação das cadeias insaturadas dos ésteres alquílicos. A maioria dos tipos de biodiesel produzidos incluem em suas composições grandes quantidades dos ésteres oleato, linoleato e linolenato de alquila (KNOTHE, 2007),

todos com cadeia insaturada (Figura 21). A interação com o ambiente pode promover a oxidação e, conseqüentemente, provocar mudanças nas suas características físicas, como o aumento da viscosidade, decorrente de reações de polimerização nas cadeias insaturadas levando a formação de produtos de maior peso molecular (DINKOV et al., 2009; JAIN & SHARMA, 2011).

Figura 21 – Estrutura química dos principais ésteres alquílicos presentes na composição do biodiesel



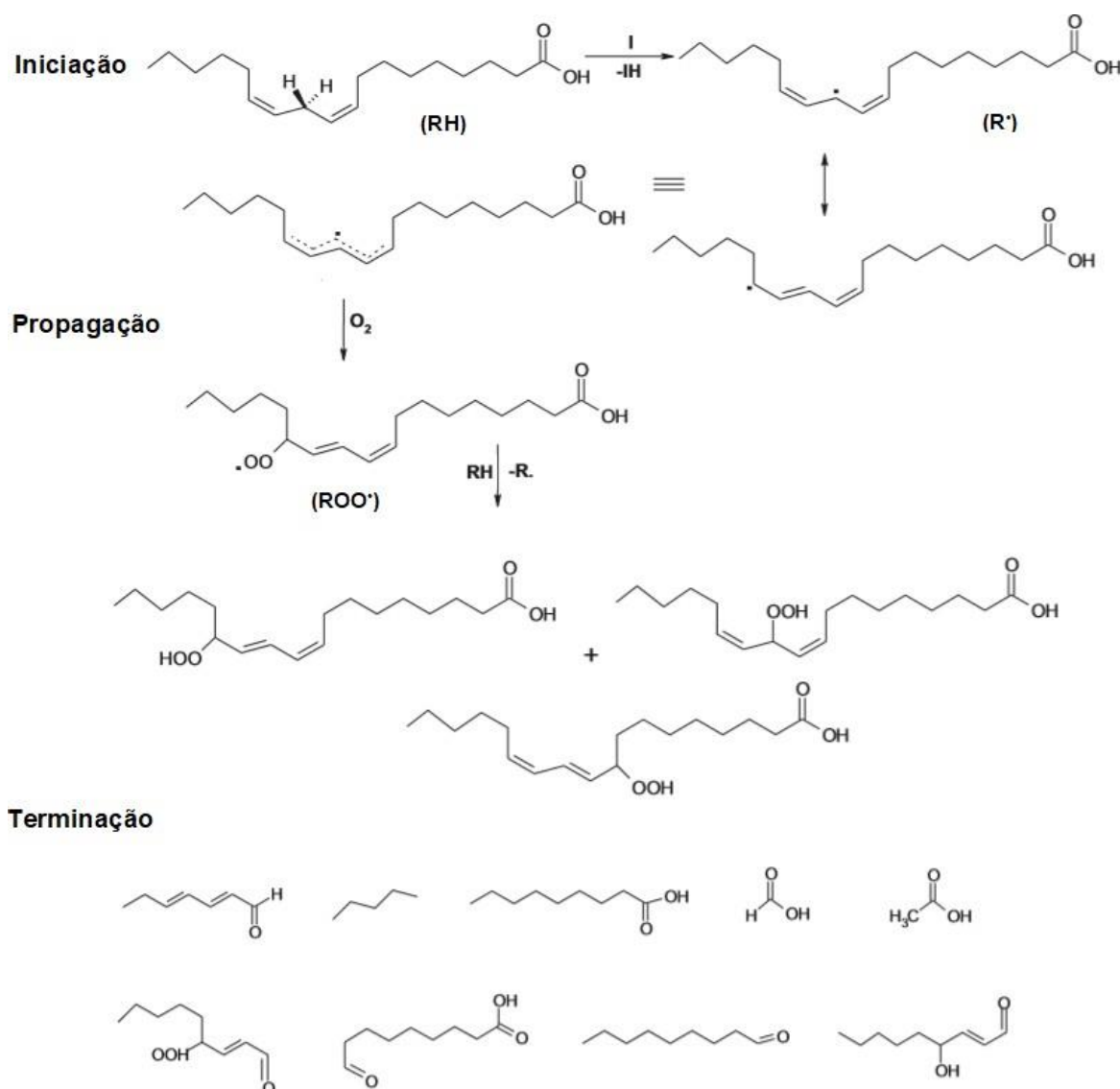
Fonte: o próprio autor

No mecanismo de oxidação do biodiesel, conhecido por auto-oxidação, os ésteres alquílicos de ésteres de ácidos graxos reagem com o oxigênio do ar. Nesta reação, os hidrogênios alílicos de suas cadeias insaturadas levam à formação de radicais livres e de outros compostos indesejados, que além de comprometerem a qualidade do biodiesel, podem causar problemas no motor do veículo (GALVAN et al., 2013; RAMALHO & JORGE, 2006). Quanto maior a quantidade de insaturações nos constituintes do biodiesel, maior à tendência a oxidação, levando à produção de compostos de decomposição.

A auto oxidação do biodiesel é uma reação radicalar em cadeia que ocorre por um mecanismo envolvendo etapas de iniciação, propagação e terminação (Esquema 24). Na etapa de iniciação, os hidrogênios alílicos das moléculas dos ésteres de ácido graxo que são mais reativos, são abstraídos na forma de radicais hidrogênios, formando radicais oxidantes (R^{\bullet}), que na presença de oxigênio formam os radicais peróxidos (ROO^{\bullet}) na etapa de propagação. Nesta segunda etapa acontece a reação em cadeia, propagada pelos radicais peróxidos pela abstração adicional de hidrogênio a partir de moléculas de ésteres de ácidos graxos, dando origem aos hidroperóxidos (LOOH) que são os produtos primários da oxidação, e a

radicais de carbono. O processo de propagação continua através dos novos radicais livres de carbono até a etapa de terminação que fornece produtos estáveis. Na etapa de terminação, a cisão e rearranjos de peróxidos resultam na produção de aldeídos e demais compostos de decomposição (YAAKOB et al., 2014).

Esquema 24 – Mecanismo de oxidação do éster metílico do ácido linoleico presente no biodiesel



Fonte: Yaakob et al, 2014

A estabilidade oxidativa do biodiesel é a medida da sua resistência à oxidação, propriedade esta que afeta sua estabilidade durante o armazenamento e transporte. É expressa pelo período de indução (PI), determinado pelo tempo necessário para o biocombustível sofrer oxidação repentina (RYU, 2009). O PI pode

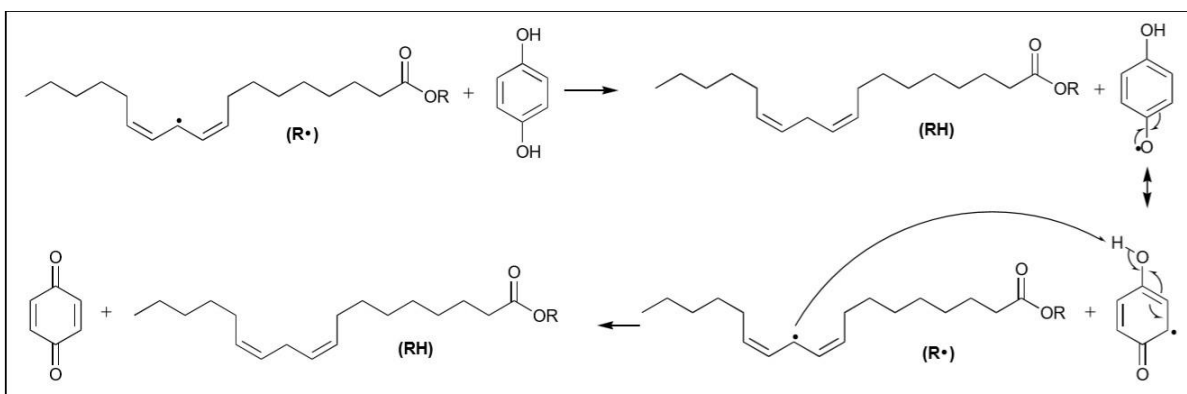
ser determinado utilizando métodos de ensaio de estabilidade oxidativa, como o teste de oxidação acelerada pelo método Rancimat (JAIN & SHARMA, 2010; PULLEN & SAEED, 2012). Neste teste a amostra de biodiesel é exposta em contato com fluxo de ar a temperatura de 110 °C, resultando na oxidação prematura da amostra, em intervalos de tempo reduzidos para horas em vez de semanas ou meses. A determinação do PI é feita através do monitoramento da condutividade da água destilada, onde os vapores de ácidos voláteis de cadeia curta, como o ácido fórmico, conduzem a um aumento da condutividade da água. Desta forma, o PI indica o tempo decorrente entre o início da medição e o aumento acentuado dos produtos de oxidação, que aumentam a condutividade da água. O PI mínimo requerido pela EN (European Standards) 14112 é de 6 horas baseado no método Rancimat (EN 14112) (JAIN & SHARMA, 2010; PULLEN & SAEED, 2012).

Para garantir a qualidade do biodiesel é necessário o uso de aditivos antioxidantes, que são substâncias usadas com a finalidade de retardar a oxidação e inibir a formação de radicais livres, aumentando a estabilidade oxidativa e retardando o período de indução (RYU, 2009). Os antioxidantes mais efetivos são aqueles que interrompem a formação de radicais livres, por conterem em sua estrutura química grupos funcionais capazes de doarem radical hidrogênio para a espécie oxidada e serem estabilizados por ressonância. Assim, o uso de compostos fenólicos, conhecidos como antioxidantes terminadores de cadeia, inibem e/ou retardam as reações de oxidação por meio da remoção ou inativação dos radicais livres (MEDEIROS et al., 2014; NIMSE & PAL, 2015; SANTOS et al., 2011). A ação antioxidante de compostos fenólicos na oxidação do biodiesel é resultado da doação de radical hidrogênio ao radical do éster de ácido graxo (R^*), impedindo a reação em cadeia pela interrupção do radical peróxido, impedindo a formação de hidroperóxidos, bem como a formação de demais radicais de ésteres de ácido graxo (Esquema 25) (BADHANI; SHARMA & KAKKAR, 2015).

Dentre os antioxidantes sintéticos o BHT, butil-hidroxi-anisol (BHA) e *terc*-butil hidroquinona (TBHQ) (Figura 22) são amplamente aplicados comercialmente como aditivos para a conservação de biodiesel e de outros materiais graxos. A reação em cadeia de oxidação vai sendo interrompida e o antioxidante consumido. A eficácia de um antioxidante pode ser avaliada comparando o seu efeito em relação à melhoria na estabilidade à oxidação, o qual pode ser caracterizado utilizando métodos de ensaio de estabilidade oxidativa, pelo método

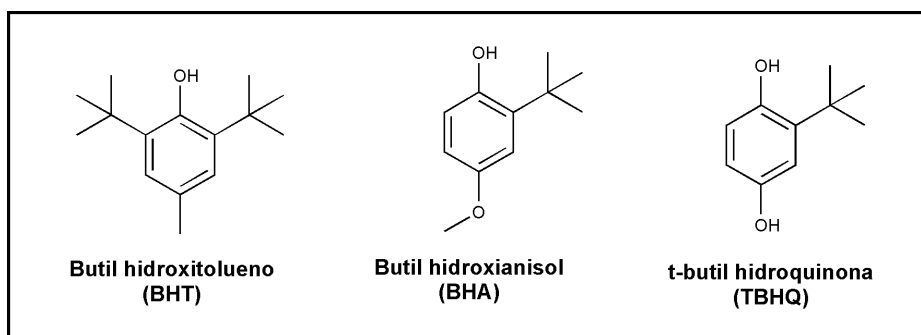
Rancimat (JAIN & SHARMA, 2010; PULLEN & SAEED, 2012). A estabilidade térmica de uma molécula também é uma propriedade importante quando esta é aplicada como um aditivo antioxidante. Os compostos BHT, BHA e TBHQ apresentam eventos de decomposição a partir de 173,2, 196,6 e 207 °C, respectivamente (SILVA et al., 2018).

Esquema 25 – Mecanismo proposto para a ação de antioxidantes fenólicos



Fonte: o próprio autor

Figura 22 – Estrutura química dos principais aditivos antioxidante comerciais usado em biodiesel

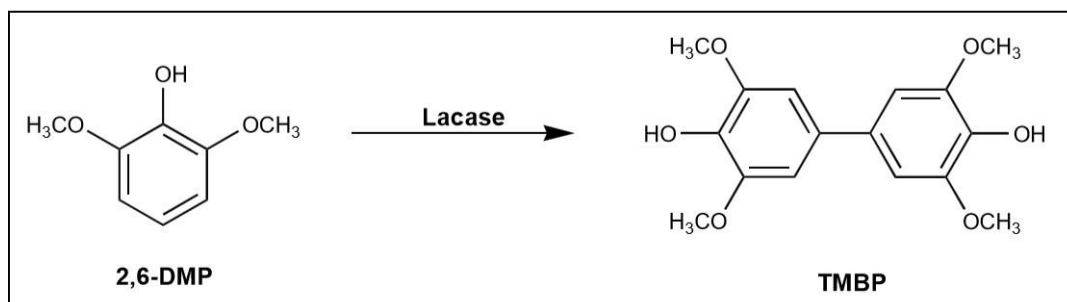


Fonte: o próprio autor

Além dos antioxidantes convencionais, extratos naturais vêm sendo estudados para aplicação em biodiesel pois podem ser obtidos com o mínimo de consumo de reagentes e de produção de resíduos, corroborando com a ideia de sustentabilidade inerente ao uso de biocombustíveis (COPPO et al., 2014; SPACINO et al., 2016). Neste contexto, outra alternativa seria a obtenção de novos compostos fenólicos, com atividade antioxidante, através de estratégias sintéticas menos agressivas ao ambiente, como por exemplo, a partir da catálise por lacases. Assim o

composto fenólico TMBP, sintetizado através da biocatálise do 2,6-DMP por lacases de *B. rhodina* e *P. ostreatus* (Esquema 26), e que apresenta boa atividade antioxidante, foi avaliado como um aditivo antioxidante para o biodiesel de soja.

Esquema 26 – Reação de síntese do TMBP a partir do 2,6-DMP catalisada por lacases de *B. rhodina* e *P. ostreatus*



Fonte: o próprio autor

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar a ação antioxidante do 3,3',5,5'-tetrametoxibifenil-4,4'-diol (TMBP) em biodiesel de soja e comparar com o antioxidante comercial butil hidroxitolueno (BHT).

2.2 Objetivos Específicos

Determinar o período de indução de amostras de biodiesel de soja na presença e na ausência do TMBP e BHT, usando o método Rancimat.

Determinar as constantes de velocidade de reação contendo TMBP e BHT.

Determinar os parâmetros cinéticos e termodinâmicos das reações de oxidação contendo TMBP e BHT.

Análise termogravimétrica do TMBP.

3 METODOLOGIA

3.1 AÇÃO ANTIOXIDANTE DO 3,3',5,5'-TETRAMETOXIBIFENIL-4,4'-DIOL (TMBP) EM BIODIESEL

Os experimentos foram desenvolvidos no Laboratório de Pesquisa de Análise de Combustíveis do Departamento de Química, da Universidade Estadual de Londrina. Uma amostra de biodiesel comercial refinado a partir de óleo de soja produzido pela reação de transesterificação-metanol/metóxido de sódio e livre de antioxidantes sintéticos foi usada nos testes de ação antioxidante do TMBP.

O dímero TMBP (0,136 mmol) foi adicionada a uma amostra de biodiesel (30 g), avaliada separadamente e comparada utilizando-se as quantidades molares equivalentes do antioxidante comercial, butil hidroxitolueno (BHT). Uma amostra controle contendo apenas biodiesel foi avaliada paralelamente.

A determinação da estabilidade oxidativa das amostras de biodiesel contendo os antioxidantes foi realizada de acordo com o Padrão Europeu pelo método acelerado (EN 14112) utilizando-se um instrumento Rancimat Modelo 873 (Metrohm®, Herisau, Suíça), o período de indução (PI; h) foi medido a 110, 115, 120 e 125 °C (EN 14112: European Committee for Standardization Automotive Fuels, 2003) (BUOSI et al., 2016).

3.2 ANÁLISE TERMOGRAVIMÉTRICA (TGA)

A caracterização térmica dos compostos TMBP e BHT foi realizada no equipamento Thermometric Analyzer Perkin-Elmer, modelo TGA 4000. A análise foi realizada em atmosfera de N₂, fluxo de 20 mL min⁻¹ a 25-350 °C, com taxa de aquecimento de 10 °C min⁻¹.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O composto fenólico TMBP, que apresentou atividade antioxidante superior aos padrões testados pelo método ORAC (dados apresentados no capítulo II), foi selecionado para avaliação como aditivo antioxidante para biodiesel, com a finalidade de aumentar a estabilidade oxidativa do biodiesel de soja.

A determinação da estabilidade oxidativa do biodiesel pelo método acelerado (EN14112) é um padrão internacional aceito que é medido a 110 °C pelo método Rancimat e requer um valor mínimo de 6h para o período de indução, estabelecido pela legislação (EN 14214) (EN 14214: European Committee for Standardization Automotive Fuels, 2008) (BUOSI et al., 2016; JAIN & SHARMA, 2010). A metodologia acelerada foi testada para o dímero TMBP com a finalidade de avaliar a sua ação antioxidante medindo-se a estabilidade oxidativa de amostras de biodiesel (ésteres de metilo acilico de soja) na presença e na ausência deste composto. Isso forneceu informações sobre o valor do período de indução, que está relacionado ao tempo necessário para que a amostra comece a ser degradada por ação oxidativa.

Uma amostra de biodiesel contendo TMBP apresentou um período de indução de 6,67h, enquanto a amostra de controle (sem antioxidante adicionado) mostrou um PI de 3,67h. Ao aplicar o teste t para amostras únicas, houve uma diferença significativa no nível de 5% entre os valores relatados acima, com desvio padrão de 0,64 e $p = 0,015$. Estes resultados indicaram que o TMBP retardou o processo de oxidação do biodiesel. O período de indução da amostra contendo TMBP foi superior ao mínimo de 6h estabelecido pela legislação (EN 14214) atestando a eficácia da ação antioxidante do TMBP.

A eficiência antioxidante do TMBP foi comparada ao antioxidante sintético comercial BHT, um composto fenólico comumente usado como antioxidante em biodiesel (BUOSI et al., 2016; JAIN & SHARMA, 2010). A ação antioxidante do BHT avaliada pelo teste de estabilidade oxidativa resultou em um valor de PI de 6.28h. Ao aplicar o teste t para amostras únicas, não houve diferença significativa no nível de 5%, com desvio padrão de 0,89 e $p = 0,65$. Este resultado demonstrou que o TMBP apresentou uma capacidade antioxidante superior ao BHT.

Além da temperatura de 110 °C, usada para determinar a estabilidade do biodiesel pelo método acelerado, também foram mensurados os

períodos de indução nas temperaturas de 115, 120 e 125 °C, para avaliar a estabilidade oxidativa que o TMBP proporciona ao biodiesel.

A Tabela 15 apresenta os valores de período de indução, das amostras com adição de TMBP, de BHT, e da amostra controle nas 4 temperaturas de análise. Para todas as temperaturas observa-se que tanto o BHT quanto o TMBP foram capazes de retardar a oxidação do biodiesel, resultando em PI mais elevados. Adicionalmente, é possível observar que, quando comparado ao BHT, o TMBP foi capaz de retardar mais o processo oxidativo nas temperaturas de 110, 115 e 120 °C. A 125 °C, as duas amostras contendo antioxidantes apresentaram períodos de indução semelhantes.

Tabela 15– Períodos de indução de amostras de biodiesel com e sem adição de antioxidantes

T / °C	TMBP	BHT	Controle
110	6,67	6,28	3,67
115	4,49	4,33	2,58
120	2,94	2,77	1,76
125	2,08	1,94	1,26

Fonte: o próprio autor

Os resultados mostram que a adição de igual quantidade de TMBP ou de BHT garantem um PI mínimo de 6h, requerido para a estabilidade oxidativa, salientando inclusive, um valor superior do TMBP quando comparado com o BHT.

Além dos períodos de indução, o equipamento Rancimat forneceu os dados de condutividade elétrica (Λ) em relação ao tempo (t), a cada temperatura de ensaio, que foram utilizados para as determinações dos parâmetros envolvidos no processo de oxidação do biodiesel.

Os dados de condutividade elétrica (Λ) em relação ao tempo (t) foram ajustados considerando-se a cinética de velocidade da reação de pseudo-primeira ordem e as constantes de velocidade foram determinadas de acordo com a equação 4.

$$\ln \Lambda_0 = k(t_f - t_i) + \ln \Lambda \quad (4)$$

Onde, Λ é a condutividade no tempo t , Λ_0 é a condutividade inicial, t_i e t_f correspondem ao tempo inicial e final, respectivamente.

As constantes de velocidade de reação, k , para cada temperatura estão apresentadas na Tabela 16. O processo de oxidação é dependente da temperatura e desta forma ao elevar a temperatura do ensaio há também o aumento no valor de k . As constantes de velocidade da reação de oxidação das amostras de biodiesel, nas quais foram utilizadas substâncias antioxidantes, estas foram sempre menores do que aquelas obtidas para as amostras controle, comprovando a ação inibidora de processos oxidativos tanto do BHT, quanto do TMBP. Entretanto, a diminuição das constantes de velocidade em relação aos controles foi mais pronunciada com o uso do TMBP, mostrando que a velocidade da reação de oxidação diminuiu em 51,3 %, 44,0 %, 43,6 % e 40,7 %, enquanto que para o BHT a diminuição foi de 26,6 %, 24,0 %, 17,9 % e 17,5 % nas temperaturas de 110, 115, 120 e 125 °C, respectivamente. Estes resultados mostraram a eficácia do TMBP como antioxidante para o biodiesel.

Tabela 16 – Comparação das constantes de velocidade do TMBP, BHT e amostra controle das reações de oxidação nas temperaturas de 110, 115, 120 e 125 °C

Temperatura / °C	TMBP k/h^{-1}	BHT k/h^{-1}	Controle k/h^{-1}
110	0,3483	0,5247	0,7148
115	0,5830	0,7909	1,0408
120	0,8784	1,2794	1,5575
125	1,2771	1,7757	2,1534

Fonte: o próprio autor

A partir da aplicação das constantes de velocidade na equação de Arrhenius (Eq. 5) e na equação de Eyring (Eq. 6), foi possível determinar os parâmetros cinéticos e termodinâmicos para a reação de oxidação do biodiesel. Os valores obtidos podem ser visualizados na Tabela 17.

$$\ln(k) = \ln A - E_a/RT \quad (5)$$

Onde, k é a constante de velocidade (h^{-1}), A é o fator pré-exponencial (h^{-1}), E_a representa a energia de ativação ($kJ mol^{-1}$), R é a constante do gás ideal ($8,31447 J K^{-1}mol^{-1}$) e T é a temperatura absoluta (K).

$$\ln(k/T) = [\ln(k_B/h) + (\Delta S^\ddagger/R)] - (\Delta H^\ddagger/R)(1/T) \quad (6)$$

Onde, k_B é a constante de Boltzmann ($1,38065 \times 10^{-23} \text{ J K}^{-1}$), h é a constante de Planck ($6,62608 \times 10^{-34} \text{ J s}$), ΔH^\ddagger é a entalpia de ativação (kJ mol^{-1}) e ΔS^\ddagger é a entropia de ativação ($\text{J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$).

Tabela 17 – Parâmetros cinéticos e termodinâmicos das reações de oxidação utilizando TMBP, BHT e amostra controle de biodiesel

Parâmetros		TMBP	BHT	Controle
Cinético	$E_a/\text{kJ mol}^{-1}$	109,27	104,95	94,10
Termodinâmicos	$\Delta H^\ddagger/\text{kJ mol}^{-1}$	106,03	101,69	90,86
	$\Delta S^\ddagger/\text{J K}^{-1}\text{mol}^{-1}$	21,33	13,19	-12,55

Fonte: o próprio autor

Os valores de energia de ativação representam a energia mínima requerida para que uma reação ocorra, e desta forma, quanto maior for a energia de ativação para a oxidação do biodiesel, menor a susceptibilidade do biocombustível se oxidar durante a estocagem (BORSATO et al., 2014). Entre os dois compostos avaliados a energia de ativação com o TMBP foi maior em comparação à da amostra controle, indicando que sua presença tem influência no retardo da oxidação do biodiesel.

As reações envolvidas na oxidação de ácidos graxos e, analogamente, dos ésteres metílicos de ácidos graxos que compõem o biodiesel, ocorrem via formação de complexos ativados (TAN et al., 2001). Os parâmetros de entalpia, entropia e energia livre de Gibbs para a formação desse estado de ativação, fornecem informações sobre o quanto um composto interfere no processo oxidativo do biodiesel. Estas informações podem ser utilizadas como parâmetros para avaliar os mecanismos de oxidação na presença ou ausência de antioxidantes.

Desta forma, pode-se observar na Tabela 17, que a entalpia de formação dos complexos ativados é mais alta quando se faz o uso do TMBP, se comparado às amostras controle e com BHT, indicando que a presença do TMBP

torna mais difícil a formação dos complexos ativados, existentes no mecanismo de reação de oxidação do biodiesel.

A entropia de ativação representa o nível de desordem do sistema durante a formação do complexo ativado, ou seja, quanto mais organizado estiver o sistema, mais complexos ativados estão sendo formados, e maior a chance de a reação de oxidação ocorrer. Como a variação de entropia é inversamente proporcional à organização do sistema, tem-se que valores mais negativos representam maior organização devido a maior quantidade de complexos ativados formados, e conseqüentemente, uma maior susceptibilidade à oxidação. A amostra controle apresentou valor negativo para o ΔS^\ddagger indicando que o sistema se tornou mais organizado durante a oxidação, e mais complexos ativados foram formados. A amostra contendo BHT apresentou valor positivo indicando que menos complexos ativados foram formados durante a ativação. Finalmente, a amostra contendo TMBP foi a que resultou nos maiores valores de entropia de ativação, cerca de 61,7% maior que o BHT, menos complexos ativados formados em relação às duas outras amostras, logo a amostra de biodiesel está menos susceptível a oxidação (CHOI et al., 2011; ONG et al., 2013).

A análise termogravimétrica do TMBP mostrou a ocorrência de um único evento de degradação a 271,1 °C correspondendo a uma perda de massa de 78,4%. O BHT apresentou um primeiro evento de decomposição a 173,2 °C com perda de massa de 26,0%, e um segundo evento correspondendo a 74,0% de perda de massa na temperatura de 212,8 °C. Esta análise mostrou que os antioxidantes utilizados não sofreram decomposição significativa nas temperaturas utilizadas nos ensaios de estabilidade oxidativa pelo método acelerado Rancimat. Também foi possível observar que o TMBP se mostrou mais estável termicamente do que o BHT às temperaturas acima de 200 °C, não perdendo sua capacidade antioxidante, por degradação térmica, até mesmo em temperaturas mais extremas.

Estes resultados sugerem que o composto fenólico TMBP pode ser uma nova alternativa de aditivo antioxidante para garantir a estabilidade oxidativa do biodiesel, e sua aplicação estaria corroborando com a ideia de sustentabilidade inerente ao uso de biocombustíveis, uma vez que pode ser obtido pela síntese catalisada por lacase, considerada uma metodologia limpa.

5 CONCLUSÃO

A estabilidade oxidativa do biodiesel de soja após a adição do TMBP foi determinada pelo método acelerado (EN 14112), que mostrou um período de indução superior ao mínimo de 6 horas a 110 °C como é requerido pela norma EN 14214 da Comissão Europeia para a padronização de combustíveis automotivos. A eficácia da ação antioxidante do TMBP foi avaliada através da determinação dos parâmetros cinéticos e termodinâmicos de oxidação. Os resultados indicaram que a reação de oxidação do biodiesel se tornou menos espontânea na presença do TMBP, e a análise termogravimétrica mostrou que sua ação antioxidante não foi comprometida em função da degradação térmica, indicando um único evento de degradação, e somente acima de 270 °C, a qual foi superior aos dos antioxidantes usados comercialmente, que possuem eventos de degradação em menores valores.

6 REFERÊNCIAS

BADHANI, B.; SHARMA, N.; KAKKAR, R. Gallic acid : a versatile antioxidant with promising therapeutic and industrial applications. **RSC Advances**, v. 5, p. 27540–27557, 2015.

BORSATO, D. et al. Kinetic and thermodynamic parameters of biodiesel oxidation with synthetic antioxidants: Simplex centroid mixture design. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 25, n. 11, p. 1984–1992, 2014.

BUOSI, G. M. et al. Oxidative stability of biodiesel from soybean oil: Comparison between synthetic and natural antioxidants. **Fuel**, v. 181, p. 759–764, 2016.

CHOI, C. S. et al. Transesterification kinetics of palm olein oil using supercritical methanol. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 58, n. 3, p. 365–370, 2011.

COPPO, R. L. et al. Effect of natural antioxidants on oxidative stability of biodiesel from soybean oil. applying simplex-centroid design. **Journal of Biobased Materials and Bioenergy**, v. 8, n. 5, p. 545–551, 2014.

DINKOV, R. et al. Effect of commercially available antioxidants over biodiesel/diesel blends stability. **Fuel**, v. 88, n. 4, p. 732–737, 2009.

EN 14112: European Committee for Standardization Automotive Fuels. Fat and Oil Derivatives. Fatty Acid Methyl Esters (FAME). Determination of oxidation stability (accelerated oxidation test). 2003.

EN 14214: European Committee for Standardization Automotive Fuels. Fatty Acid Methyl Esters (FAME) for Diesel Engines. Requirements and Test Methods. 2008.

GALVAN, D. et al. Determination of the kinetics and thermodynamics parameters of biodiesel oxidation reaction obtained from an optimized mixture of vegetable oil and animal fat. **Energy and Fuels**, v. 27, n. 11, p. 6866–6871, 2013.

JAIN, S.; SHARMA, M. P. Stability of biodiesel and its blends - review.pdf.

Renewable and Sustainable Energy Reviews, v. 14, n. 2, p. 667–678, 2010.

JAIN, S.; SHARMA, M. P. Optimization of long-term storage stability of *Jatropha curcas* biodiesel using antioxidants by means of response surface methodology.

Biomass and Bioenergy, v. 35, n. 9, p. 4008–4014, 2011.

KNOTHE, G. Some aspects of biodiesel oxidative stability. **Fuel processing Technology**, v. 88, p. 669–677, 2007.

MEDEIROS, M. L. et al. Efficient Antioxidant Formulations for Use in Biodiesel.

Energy and Fuels, v. 28, n. 2, p. 1074–1080, 2014.

ONG, L. K. et al. Transesterification of leather tanning waste to biodiesel at supercritical condition: Kinetics and thermodynamics studies. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 75, p. 11–20, 2013.

ORIVES, J. R. et al. Multiresponse optimisation on biodiesel obtained through a ternary mixture of vegetable oil and animal fat: Simplex-centroid mixture design application. **Energy Conversion and Management**, v. 79, p. 398–404, 2014.

PULLEN, J.; SAEED, K. An overview of biodiesel oxidation stability. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 16, n. 8, p. 5924–5950, 2012.

RAMALHO, V. C.; JORGE, N. Antioxidantes utilizados em óleos, gorduras e alimentos gordurosos. **Quimica Nova**, v. 29, n. 4, p. 755–760, 2006.

RYU, K. Effect of antioxidants on the oxidative stability and combustion characteristics of biodiesel fuels in an indirect-injection (IDI) diesel engine. **Journal of Mechanical Science and Technology**, v. 23, p. 3105–3113, 2009.

SANTOS, N. A. et al. Caffeic Acid : An Efficient Antioxidant for Soybean Biodiesel Contaminated with Metals. **Energy and Fuels**, v. 25, p. 4190–4194, 2011.

SILVA, E. T. et al. Modelling of relative protection factor of antioxidants TBHQ , BHT and BHA in mixture with biodiesel. **Acta Scientiarum**, v. 40, p. e35108, 2018.

SPACINO, K. R. et al. Relative protection factor optimisation of natural antioxidants in biodiesel B100. **Industrial Crops and Products**, v. 80, p. 109–114, 2016.

TAN, C. P. et al. Application of Arrhenius kinetics to evaluate oxidative stability in vegetable oils by isothermal differential scanning calorimetry. **JAOCS, Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 78, n. 11, p. 1133–1138, 2001.

YAAKOB, Z. et al. A review on the oxidation stability of biodiesel. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 35, p. 136–153, 2014.

APÊNDICES

Lacases de *Botryosphaeria rhodina* e *Pleurotus ostreatus* na oxidação do 2,6-dimetoxifenol e avaliação da ação antioxidante do 3,3',5,5'-tetrametoxibifenil-4,4'-diol em biodiesel e atividade leishmanicida *in vitro*

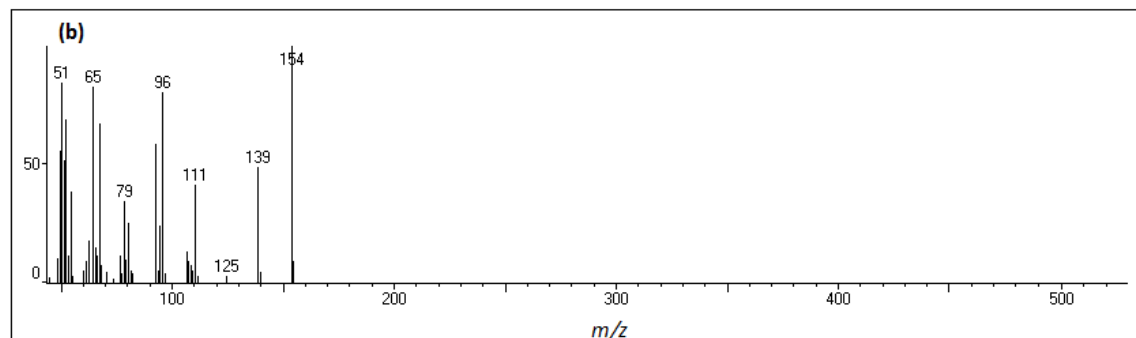
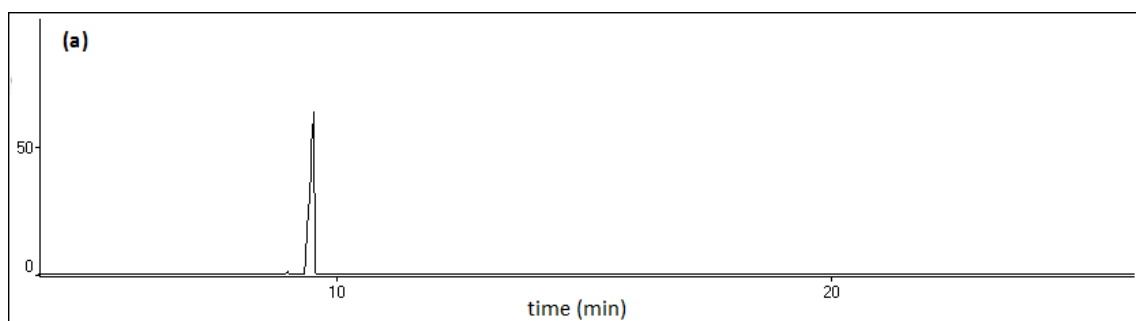
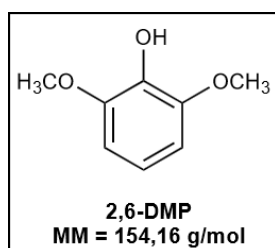
Jéseka Gabriela Schirmann

1. Cromatogramas e espectros de massas obtidos por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (CG-EM)
2. Espectros de RMN de ^1H e ^{13}C
3. Espectros de massas de alta resolução (MS/MS)
4. Variáveis de reação que definem a otimização da síntese de TMBP
5. Voltamogramas cíclicos do potencial redox da lacase de *B. rhodina*

APÊNDICE 1

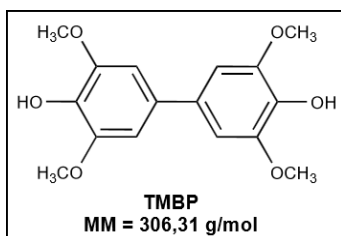
Cromatogramas e espectros de massas obtidos por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (CG-EM)

Figura 23 – Dados de CG-EM para o 2,6-dimetoxifenol obtidos no equipamento GCMS-QP5000. **(a)** Cromatograma gasoso, **(b)** Espectro de massa

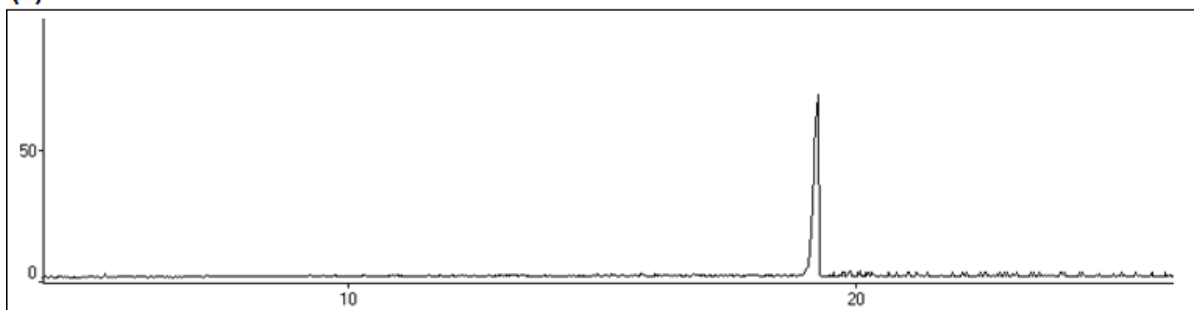


Fonte: o próprio autor

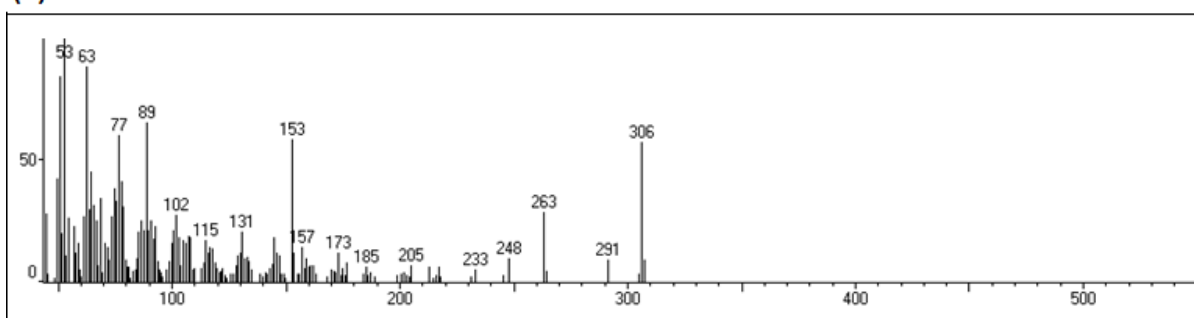
Figura 24 – Dados de CG-EM para o 3,3',5,5'-tetrametoxibifenil-4,4'-diol (TMBP) (obtidos no equipamento GCMS-QP5000). **(a)** Cromatograma gasoso, **(b)** Espectro de massa



(a)

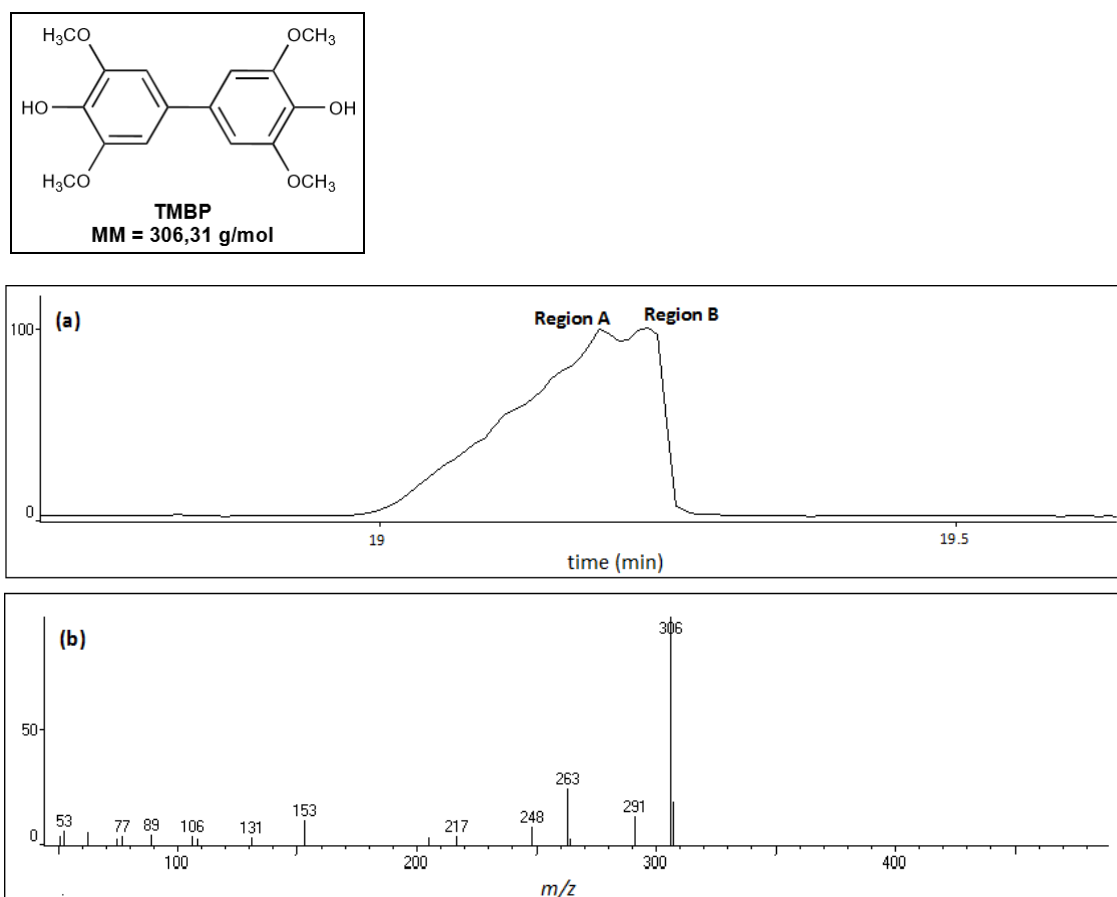


(b)



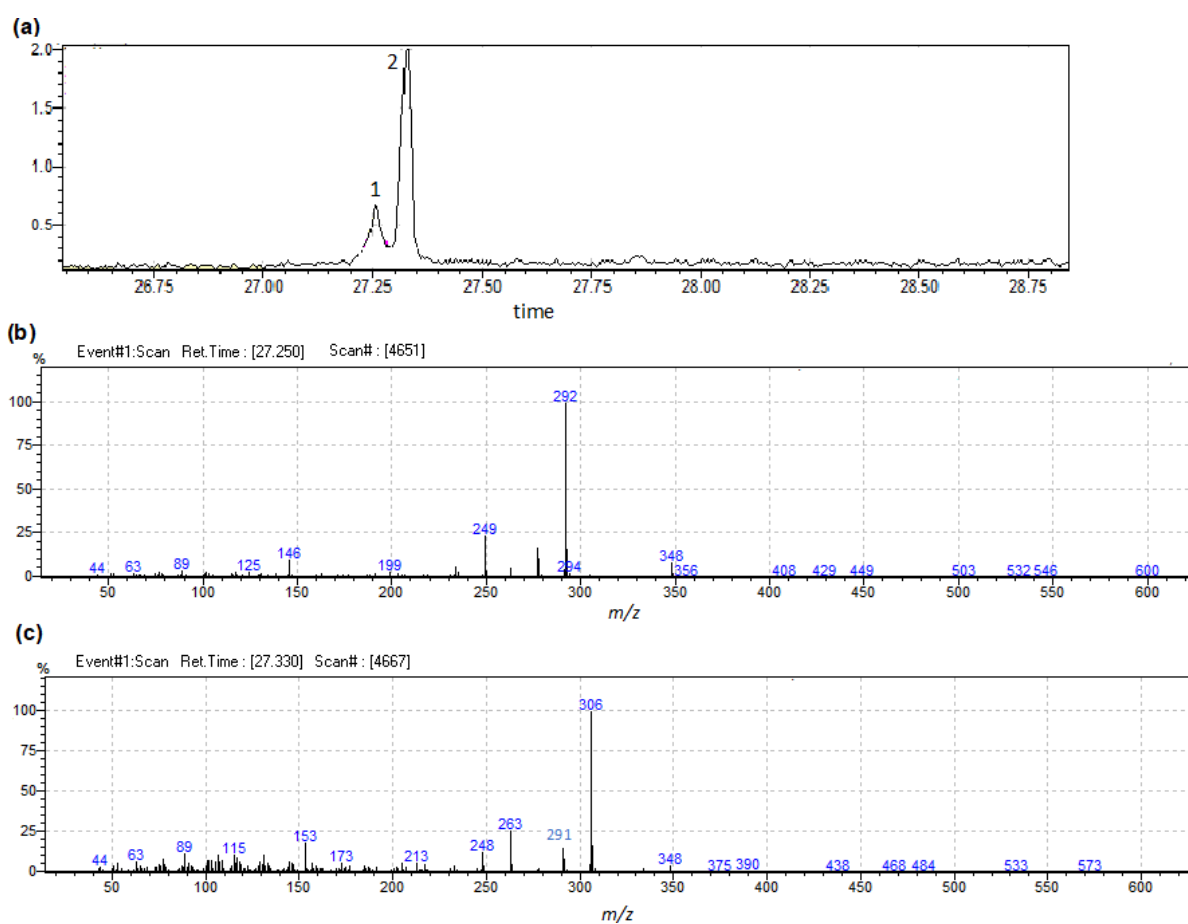
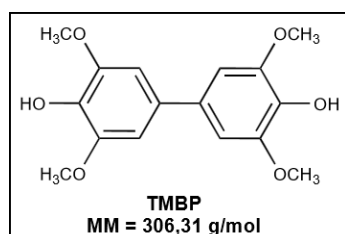
Fonte: o próprio autor

Figura 25– Dados de CG-EM (obtidos no equipamento GCMS-QP5000) para o sólido de cor amarela escura B (ver Figura 8 do texto) obtido às 96 h (pH 3,0) por lacase de *B. rhodina*. **(a)** Cromatograma gasoso, **(b)** Espectro de massa do TMBP identificados na região B indicada no cromatograma gasoso



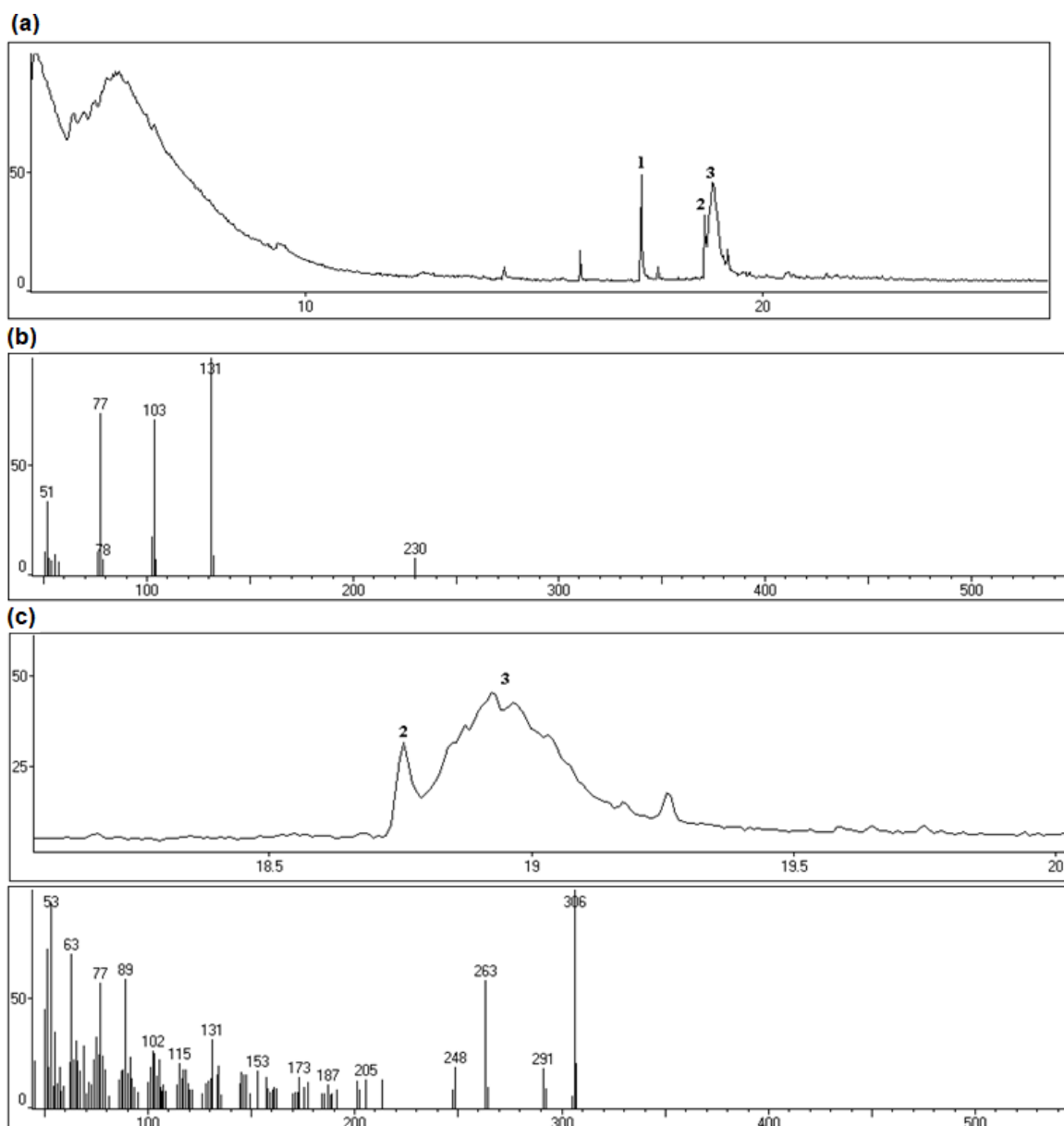
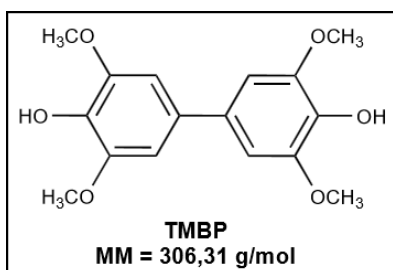
Fonte: o próprio autor

Figura 26 – Dados de CG-EM (obtidos no equipamento GCMS-QP2010) para os produtos obtidos a pH 5,0 (96 e 144h) por lacase de *P. ostreatus*. **(a)** Cromatograma gasoso, **(b)** espectro de massa do pico 1 **(c)** espectro de massa do pico 2 (TMBP) observados no cromatograma



Fonte: o próprio autor

Figura 27– Dados de CG-EM (obtidos no equipamento GCMS-QP5000) para o sólido de cor amarelo escuro obtido pelo sistema lacase/TEMPO em pH 6,5. **(a)** Cromatograma gasoso, **(b)** Espectro de massa do pico 1 **(c)** Espectro de massa do TMBP (I), identificado no pico 2 no cromatograma gasoso



Fonte: o próprio autor

Figura 28 – Dados de CG-EM (obtidos no equipamento GCMS-QP5000) para o sólido de cor amarelo escuro obtido pelo sistema lacase/TEMPO em pH 6,5. **(a)** Cromatograma gasoso, **(b)** Espectros de massas do pico 3 no cromatograma gasoso

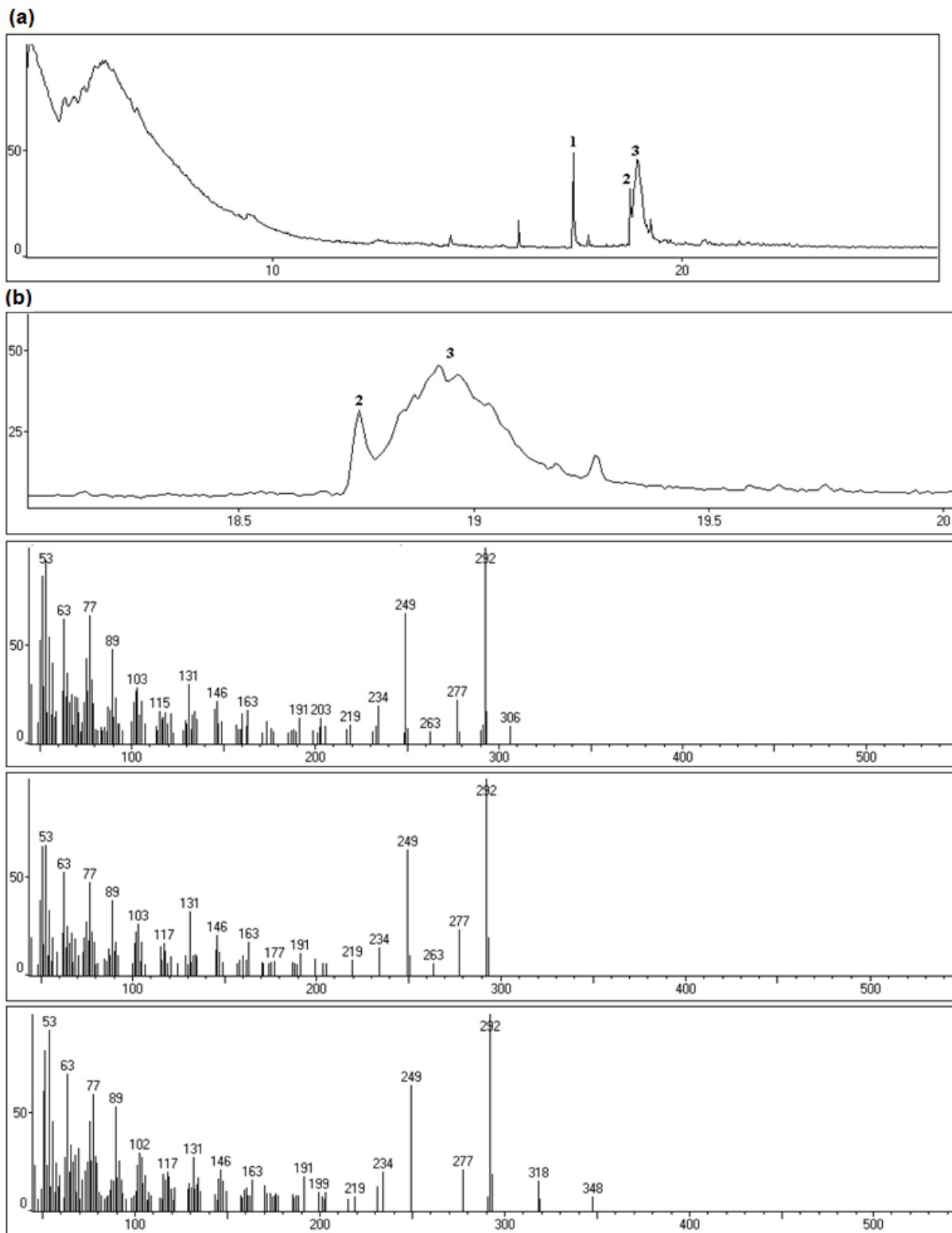
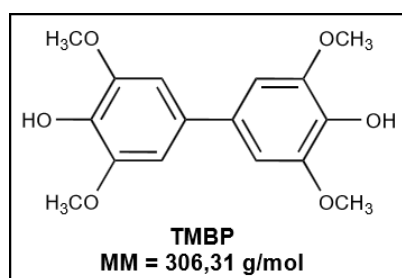
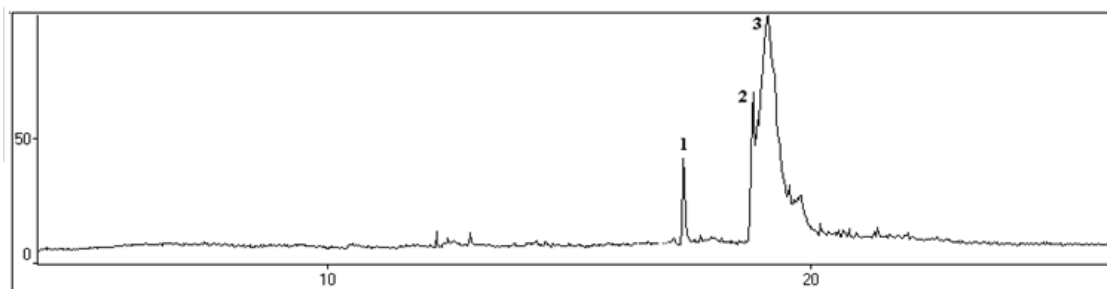


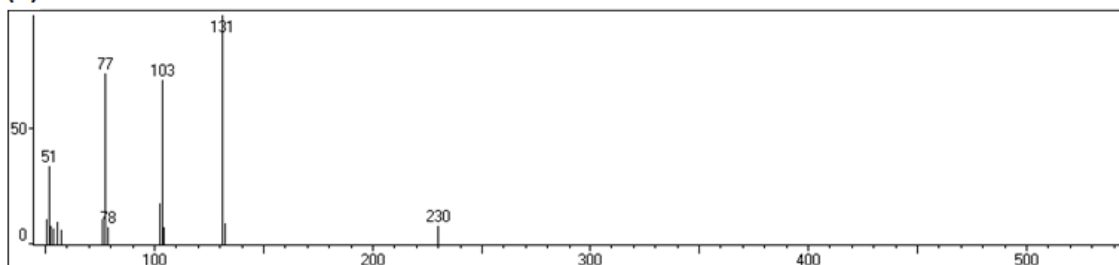
Figura 29– Dados de CG-EM (obtidos no equipamento GCMS-QP5000) para o sólido de cor amarelo escuro obtido pelo sistema lacase/TEMPO com fluxo de oxigênio em pH 6,5. **(a)** Cromatograma gasoso, **(b)** Espectro de massa do pico 1 **(c)** Espectro de massa do TMBP (I), identificado no pico 2 no cromatograma gasoso



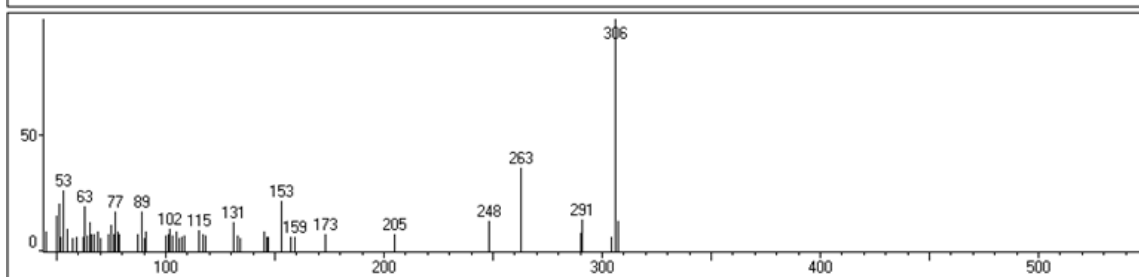
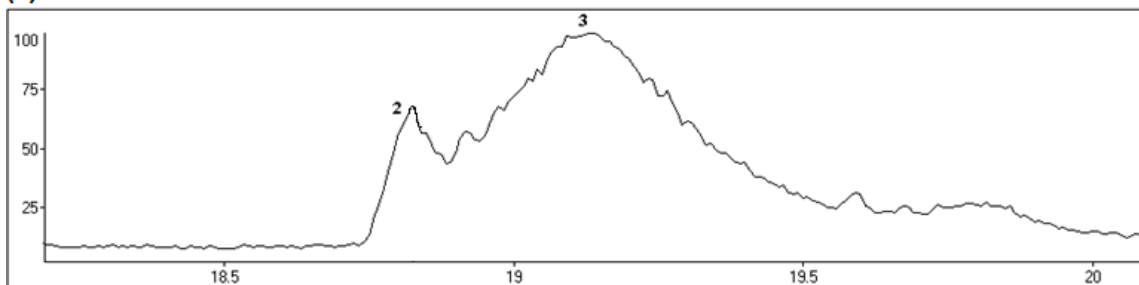
(a)



(b)

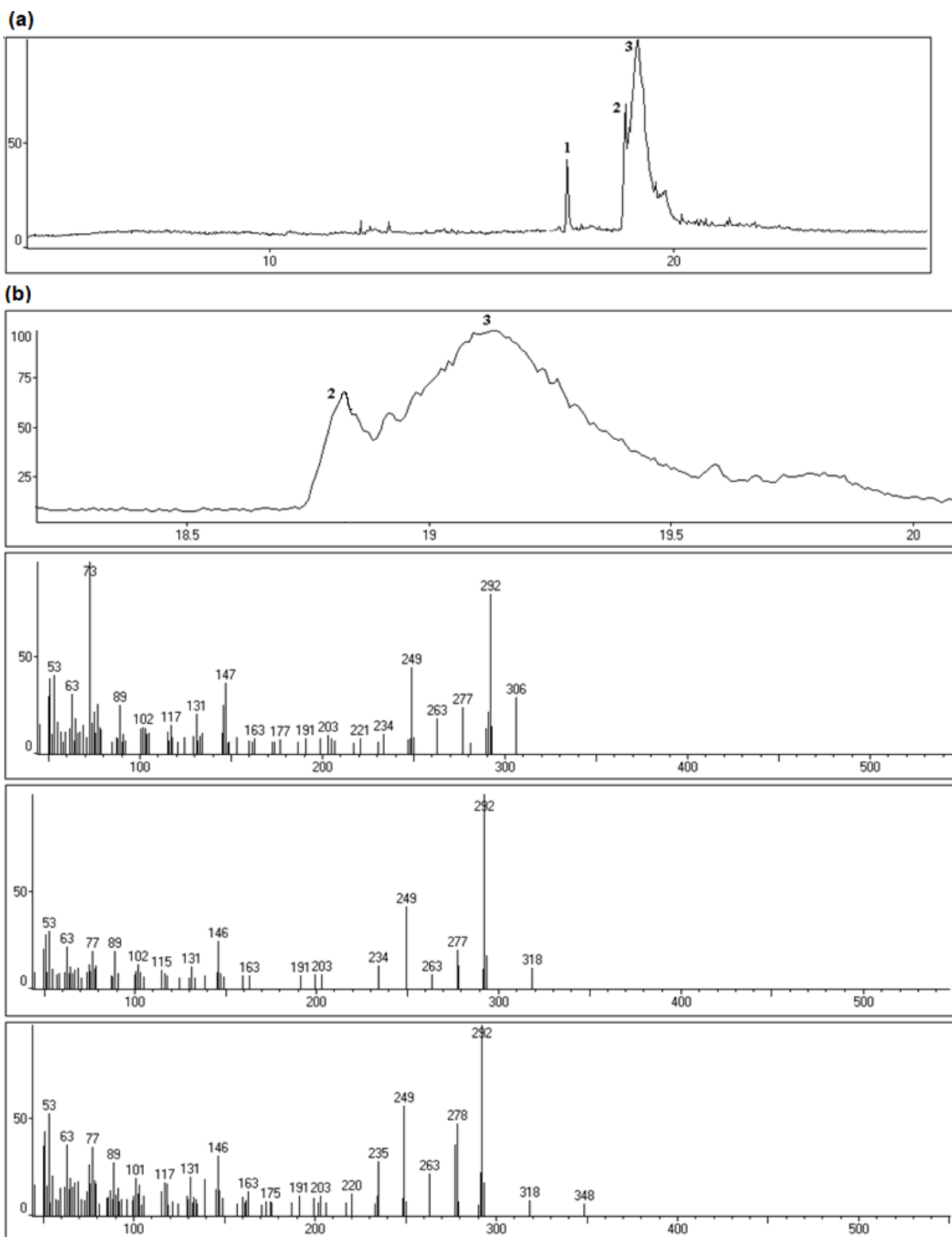


(c)



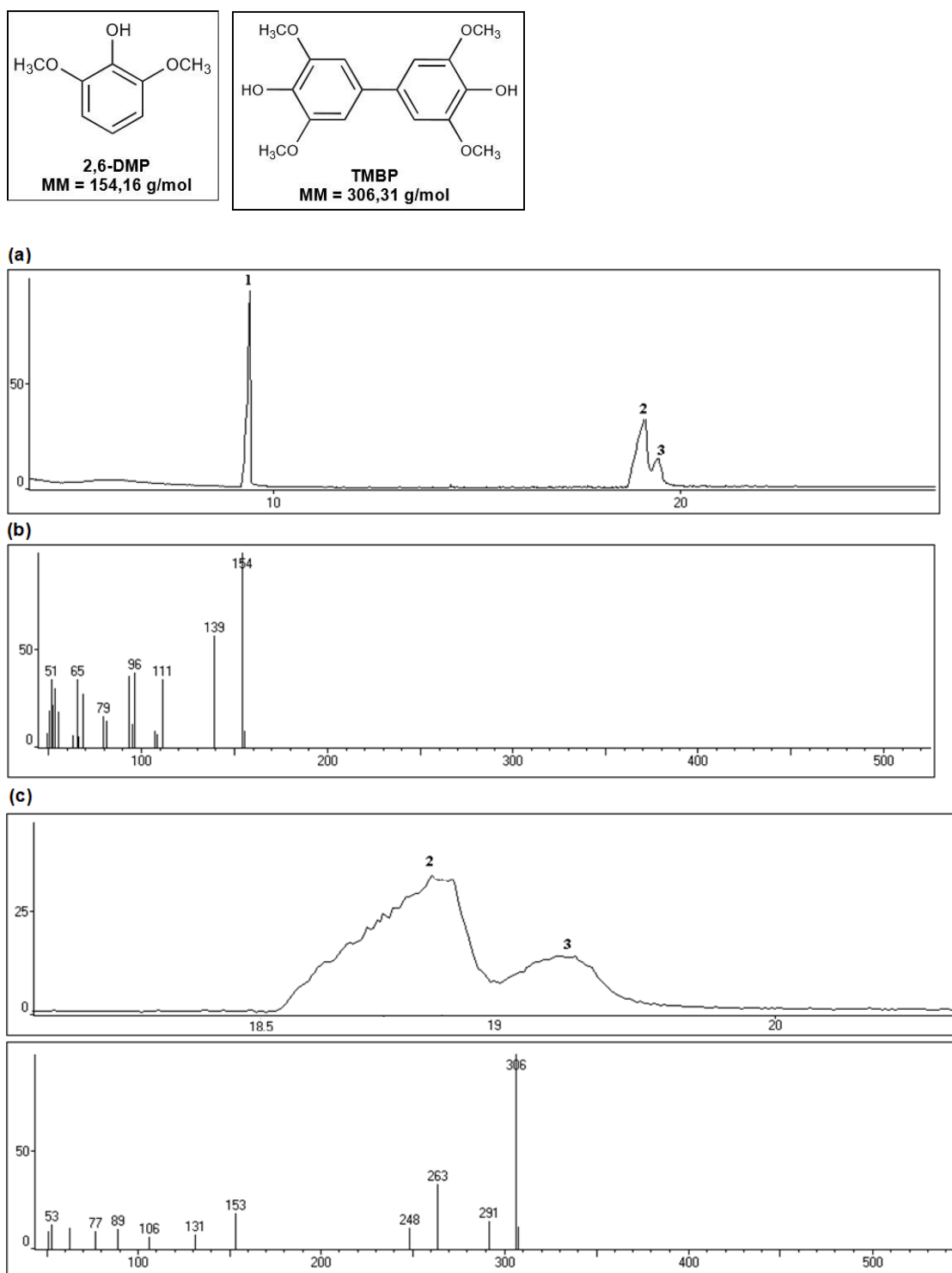
Fonte: o próprio autor

Figura 30 – Dados de CG-EM (obtidos no equipamento GCMS-QP5000) para o sólido de cor amarelo escuro obtido pelo sistema lacase/TEMPO com fluxo de oxigênio em pH 6,5. **(a)** Cromatograma gasoso, **(b)** Espectros de massas do pico 3 no cromatograma gasoso



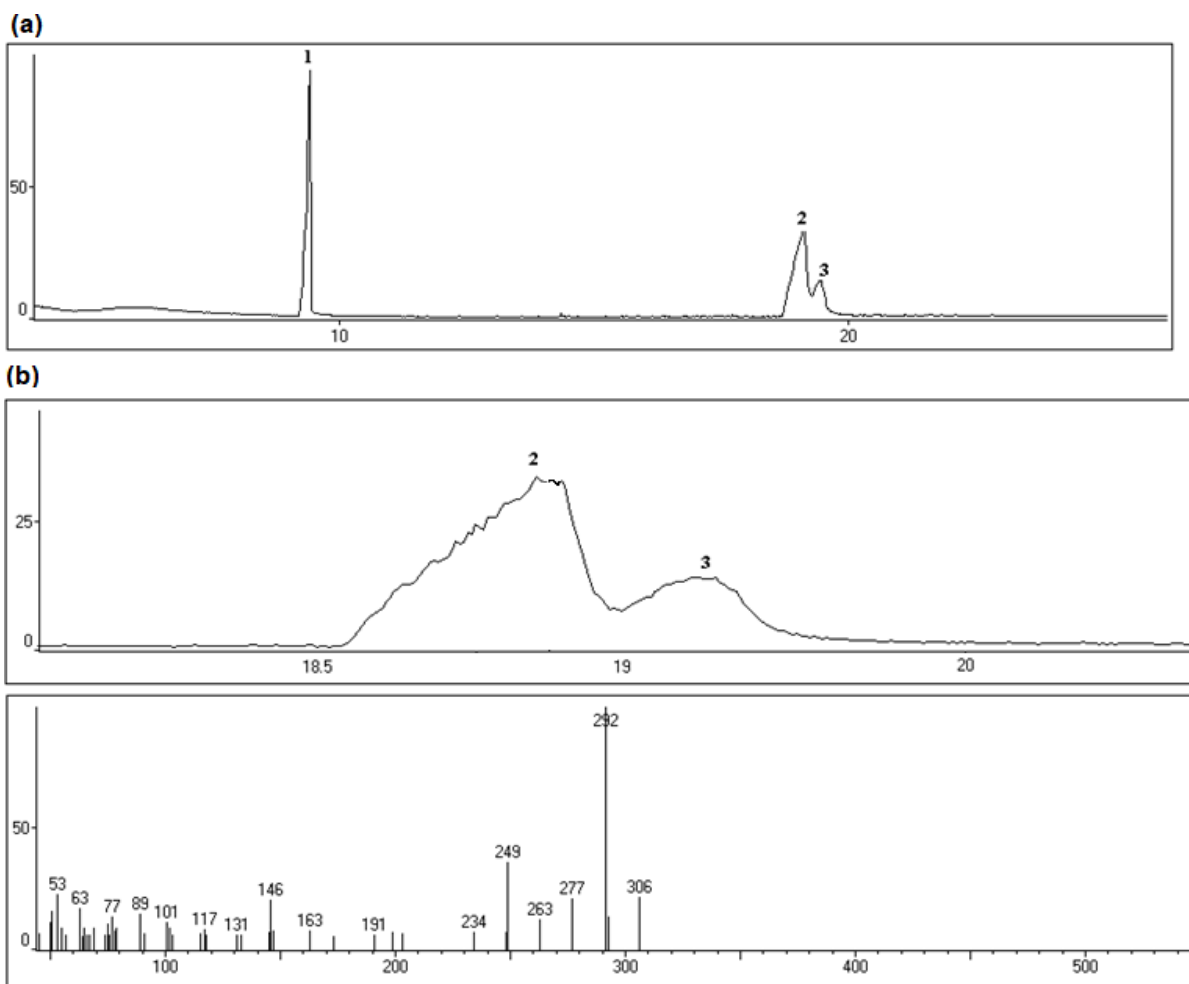
Fonte: o próprio autor

Figura 31 – Dados de CG-EM (obtidos no equipamento GCMS-QP5000) para o sólido de cor amarelo escuro obtido pela lacase combinada com cofator cobre e fluxo de oxigênio em pH 3,0. **(a)** Cromatograma gasoso, **(b)** Espectro de massa do 2,6-DMP, identificado no pico 1, **(c)** Espectro de massa do TMBP (I), identificado no pico 2 no cromatograma gasoso



Fonte: o próprio autor

Figura 32 – Dados de CG-EM (obtidos no equipamento GCMS-QP5000) para o sólido de cor amarelo escuro obtido pela lacase combinada com cofator cobre e fluxo de oxigênio em pH 6,5. **(a)** Cromatograma gasoso, **(b)** Espectros de massas do pico 3 no cromatograma gasoso

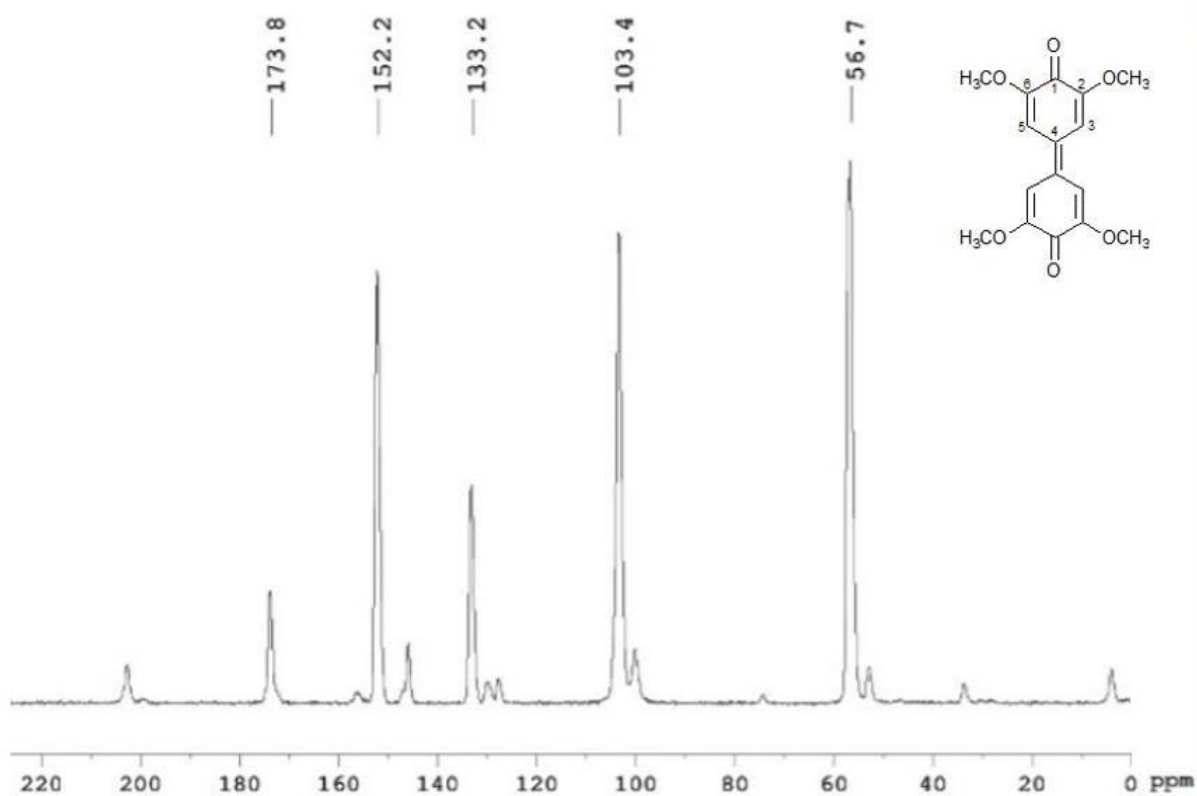


Fonte: o próprio autor

APÊNDICE 2

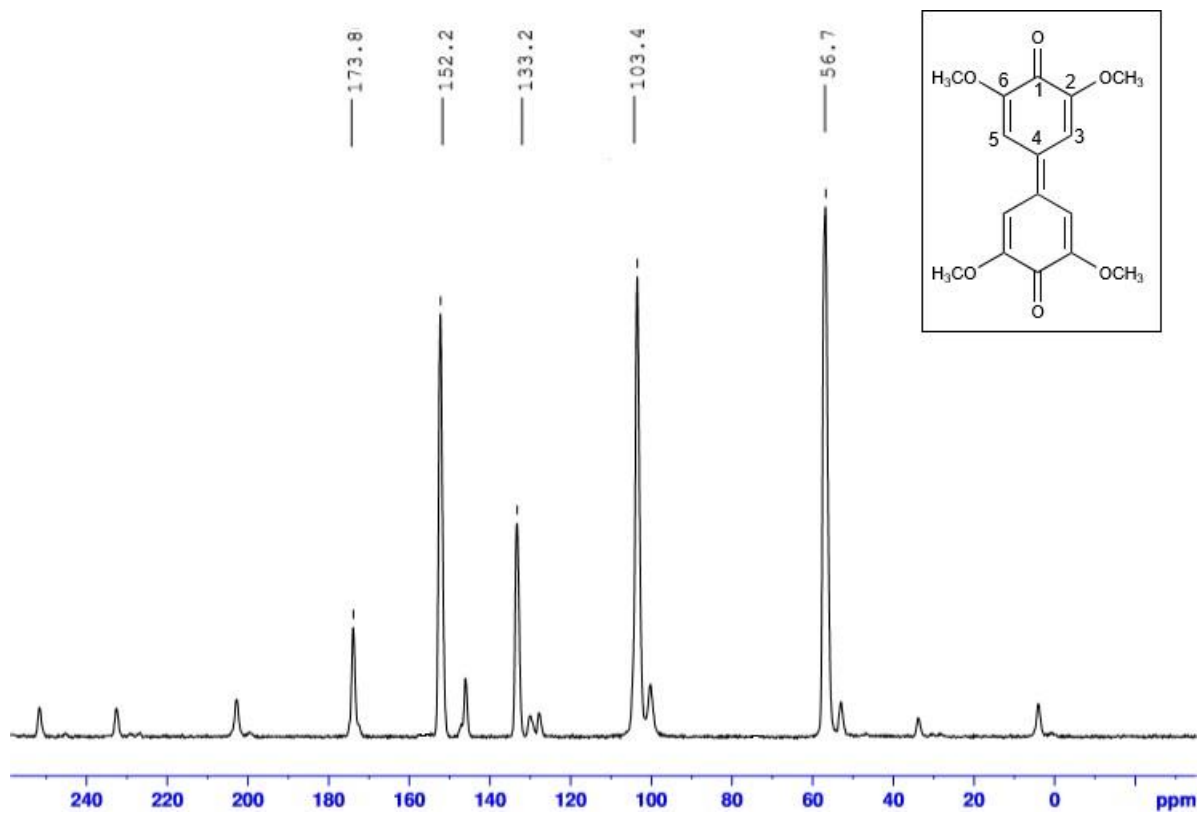
Espectros de RMN de ^1H e ^{13}C

Figura 33 – Espectro de RMN de ^{13}C (estado sólido) do dímero 3,3',5,5'-tetrametoxidifenilquinona (II) formado durante a oxidação do 2,6-dimetoxifenol catalisada pela lacase de *B. rhodina*



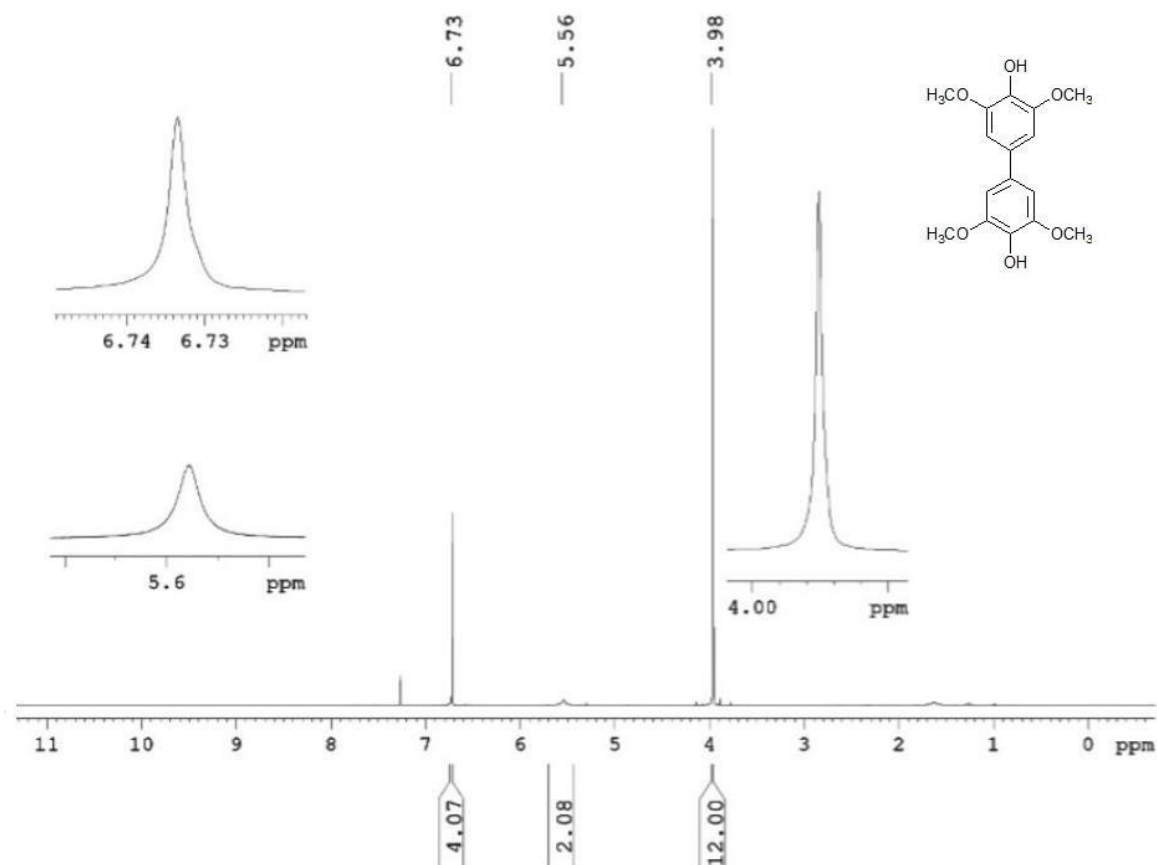
Fonte: o próprio autor

Figura 34– Espectro de RMN de ^{13}C (estado sólido) do dímero 3,3',5,5'-tetrametoxidifenilquinona (II) formado durante a oxidação do 2,6-dimetoxifenol catalisada pela lacase de *P. ostreatus*



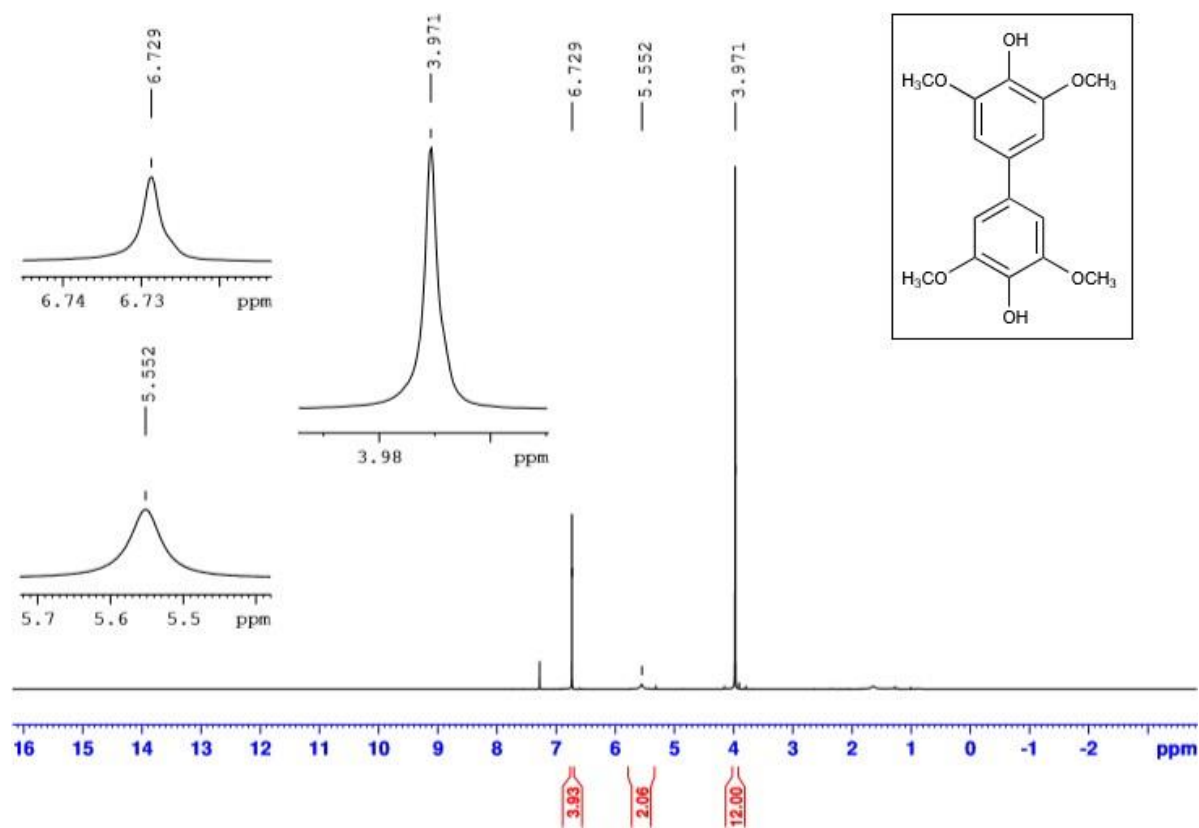
Fonte: o próprio autor

Figura 35 – Espectro de RMN de ^1H do dímero 3,3',5,5'-tetrametoxibifenil-4,4'-diol (**I**) formado durante a oxidação do 2,6-dimetoxifenol catalisada pela lacase de *B. rhodina*



Fonte: o próprio autor

Figura 36 – Espectro de RMN de ^1H do dímero 3,3',5,5'-tetrametoxibifenil-4,4'-diol (**I**) formado durante a oxidação do 2,6-dimetoxifenol catalisada pela lacase de *P. ostreatus*

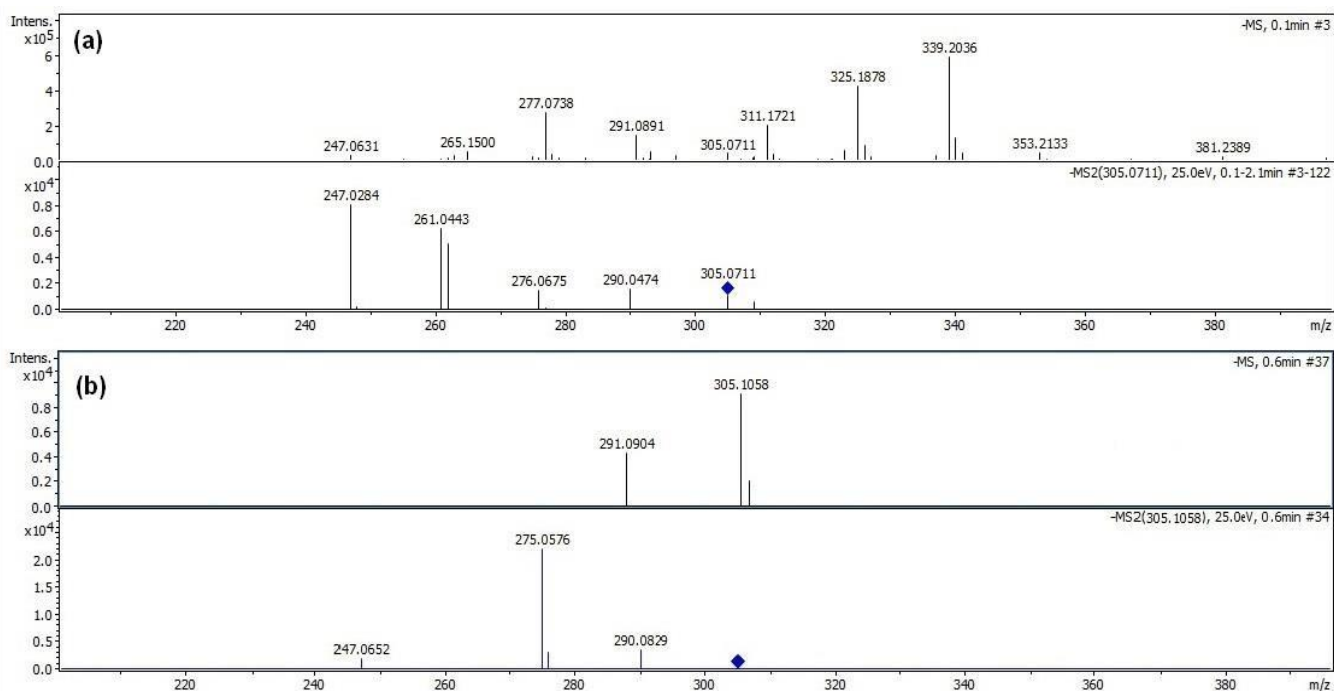
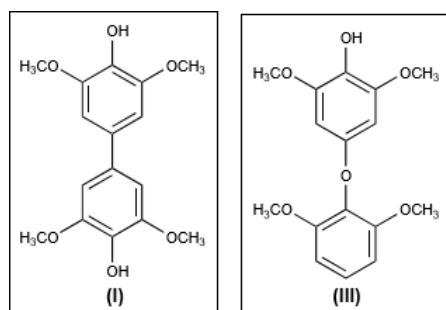


Fonte: o próprio autor

APÊNDICE 3

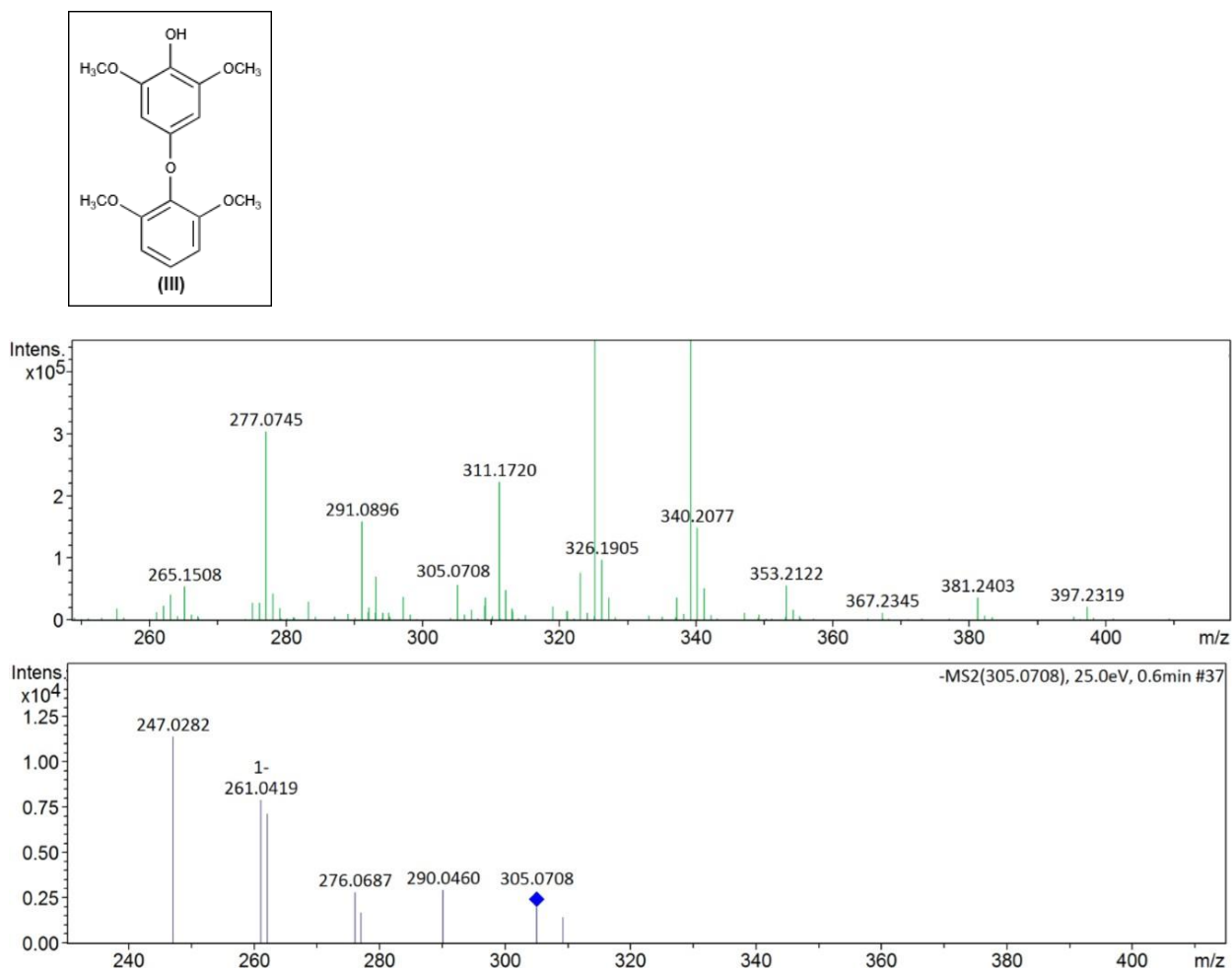
Espectro de massa de alta resolução (MS/MS)

Figura 37 – Espectros de MS/MS dos dímeros de 2,6-dimetoxifenol obtidos durante a reação de oxidação catalisada pela lacase de *B. rhodina*, **(a)** dímero **III** (4-(2,6-dimetoxi-fenoxi) -2,6-dimetoxifenol), e **(b)** dímero **I** (3,3',5 5'-tetrametoxi-bifenil-4,4'-diol). Painéis superiores mostram os produtos de síntese. Os painéis inferiores mostram os produtos de fragmentação do principal produto sintetizado



Fonte: o próprio autor

Figura 38 – Espectro de MS/MS do dímero 4-(2,6-dimetoxi-fenoxi de 2,6-dimetoxifenol (**III**) obtido durante a reação de oxidação do 2,6-dimetoxifenol catalisada pela lacase de *P. ostreatus*. Painel superior mostra os produtos de síntese. Painel inferior mostra as fragmentações do dímero **III**

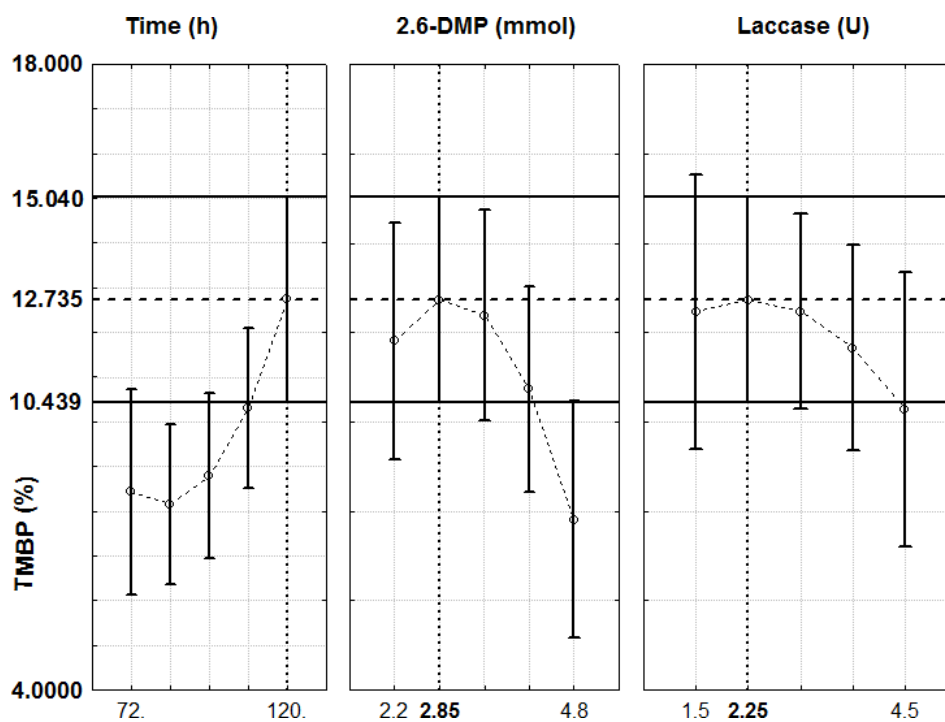


Fonte: o próprio autor

APÊNDICE 4

Variáveis de reação que definem a otimização da síntese de TMBP

Figura 39 – Quadro que define as variáveis de reação para a otimização de condições para a síntese de TMBP pela lacase de *Botryosphaeria rhodina* MAMB-05 em pH 6,5



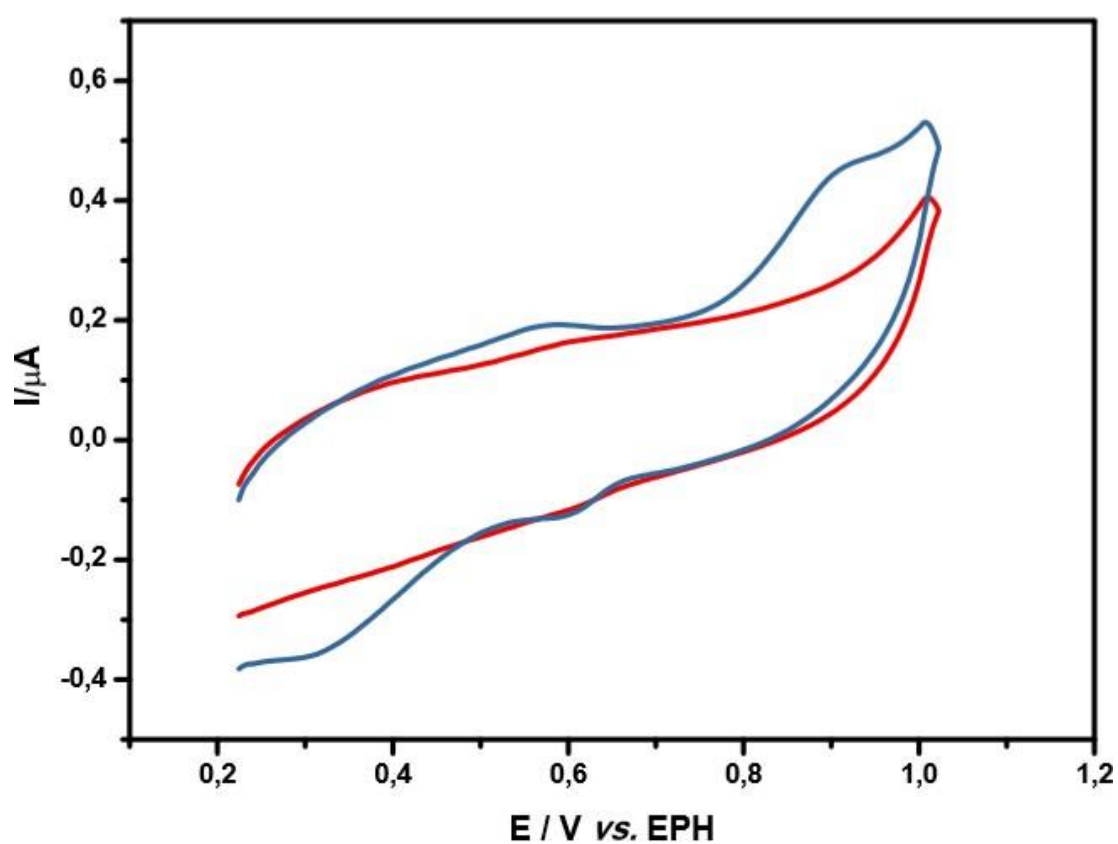
Fonte: o próprio autor

APÊNDICE 5

Voltamogramas cíclicos do potencial redox da lacase de *B. rhodina*

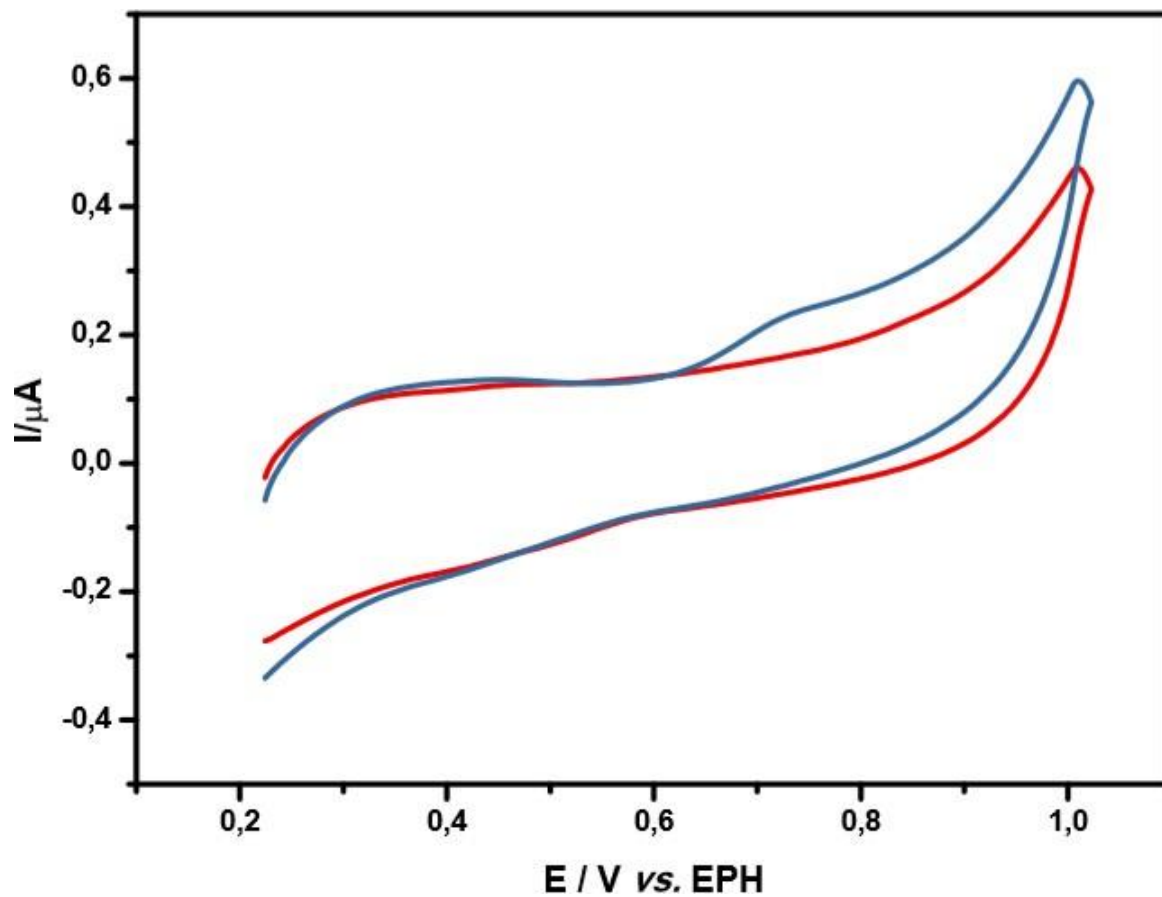
Figura 40 – Voltamograma cíclico para solução tampão citrato-fosfato (pH 3,0) (linha vermelha) e Lacase 1,5 mg mL⁻¹ em solução tampão citrato-fosfato (pH 3,0) (linha azul), empregando um eletrodo de carbono vítreo.

Parâmetro VC: $\nu = 50 \text{ mV s}^{-1}$



Fonte: o próprio autor

Figura 41 – Voltamograma cíclico para solução tampão citrato-fosfato (pH 6,5) (linha vermelha) e Lacase 1,5 mg mL⁻¹ em solução tampão citrato-fosfato (pH 6,5) (linha azul), empregando um eletrodo de carbono vítreo. Parâmetro VC: $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$



Fonte: o próprio autor

ANEXO

Publicações

Publicações em periódicos:

Selective control for the laccase-catalyzed synthesis of dimers from 2,6-dimethoxyphenol: Optimization of 3,3',5,5'-tetramethoxy-biphenyl-4,4'-diol synthesis using factorial design, and evaluation of its antioxidant action in biodiesel

(Applied Catalysis A, General 555 (2018) 88–97)

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0926860X18300814>

3,3',5,5'-tetramethoxy-biphenyl-4,4'-diol: A new antioxidant enhancing oxidative stability of soybean biodiesel

(Fuel 237 (2019) 593-596)

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0016236118317575>

Depósito de pedido de patente:

SCHIRMANN, J. G.; DEKKER, A. M. B.; DEKKER, R. F. H.; ANGILELLI, K.

G.; BORSATO, D. Aplicação de 3,3',5,5'-tetrametoxibifenil-4,4'-diol como aditivo antioxidante para biodiesel. 2018, Brasil.

Patente: Privilégio de Inovação. Número do registro: BR1020180074784, título: "Aplicação de 3,3',5,5'-tetrametoxibifenil-4,4'-diol como aditivo antioxidante para biodiesel", Instituição de registro: INPI - Instituto Nacional da Propriedade Industrial, Depositante (s): Aneli de Melo Barbosa Dekker; Universidade Estadual de Londrina, Depósito: 10/04/2018