

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO
CAMPUS UNIVERSITÁRIO DE SINOP
Programa De Pós-Graduação Em Ciência Em Saúde

**BIOTRANSFORMAÇÃO DO ÁCIDO GÁLICO E
AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIVIRAL FRENTE
AO HERPES SIMPLEX VÍRUS**

SÉRGIO LUIS FERNANDES DO NASCIMENTO

Sinop, Mato Grosso
Fevereiro, 2024

SÉRGIO LUIS FERNANDES DO NASCIMENTO

**BIOTRANSFORMAÇÃO DO ÁCIDO GÁLICO E
AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIVIRAL FRENTE
AO HERPES SIMPLEX VÍRUS**

**Orientadora: Prof.^a Dr. Carla Regina Andrighetti
Coorientadora: Prof.^a Dr Francine Pazini**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências em Saúde da Universidade Federal de Mato Grosso, *Campus* Universitário de Sinop, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Ciências em Saúde.

Sinop, Mato Grosso
Fevereiro, 2024

Dados Internacionais de Catalogação na Fonte.

D631b do Nascimento, Sérgio Luis Fernandes.

Biotransformação do ácido gálico e avaliação da atividade antiviral frente ao herpes simplex vírus [recurso eletrônico] / Sérgio Luis Fernandes do Nascimento. -- Dados eletrônicos (1 arquivo : 96 f., il. color., pdf). -- 2024.

Orientadora: Carla Regina Andrighetti.

Coorientadora: Francine Pazini.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Mato Grosso, Instituto de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências em Saúde, Sinop, 2024.

Modo de acesso: World Wide Web: <https://ri.ufmt.br>.

Inclui bibliografia.

1. Produtos Naturais. 2. Compostos fenólicos. 3. Bioconversão. 4. Herpes simplex vírus. 5. Virologia. I. Andrighetti, Carla Regina,

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Permitida a reprodução parcial ou total, desde que citada a fonte.



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO
PRÓ-REITORIA DE ENSINO DE PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS EM SAÚDE
FOLHA DE APROVAÇÃO

TÍTULO: "BIOTRANSFORMAÇÃO DO ÁCIDO GÁLICO E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIVIRAL FRENTE AO HERPES SIMPLEX VÍRUS"

AUTOR (A): Mestrando Sérgio Luis Fernandes do Nascimento

Dissertação defendida e aprovada em **29/02/2024**.

COMPOSIÇÃO DA BANCA EXAMINADORA

1. Presidente Banca Doutor(a) Carla Regina Andrighetti Fröhner
Instituição : UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO
2. Orientador(a) Doutor(a) Carla Regina Andrighetti Fröhner
Instituição : UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO
3. Examinador(a) Externo(a) Doutor(a) Eloana Benassi Ribeiro de Souza dos Santos
Instituição : Seduc - MT
4. Examinador(a) Interno(a) Doutor(a) WILSIONE JOSE CARNEIRO
Instituição : UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO
5. Examinador(a) Suplente Doutor(a) Thaiza Galhardo Silva Morceli
Instituição : Aprosoja MT
6. Examinador(a) Suplente Doutor(a) Cibele Bonacorsi
Instituição : Universidade Federal de Mato Grosso

SINOP, 29/02/2024.



Documento assinado eletronicamente por **CARLA REGINA ANDRIGHETTI, Docente da Universidade Federal de Mato Grosso**, em 11/03/2024, às 17:50, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **WILSIONE JOSE CARNEIRO, Docente da Universidade Federal de Mato Grosso**, em 13/03/2024, às 22:37, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Eloana Benassi Ribeiro de Souza dos Santos, Usuário Externo**, em 28/11/2024, às 19:06, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site http://sei.ufmt.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **6645603** e o código CRC **B9921F92**.

AGRADECIMENTOS

À Deus, por sua presença em todos os momentos felizes e amparo nos momentos de dificuldade;

À minha família, em especial aos meus pais por todo apoio e suporte, e por sempre me incentivarem nos meus projetos;

À minha grande companheira e parceira de vida, Nicolle, por todo carinho e amor a mim confiado;

A todos os meus amigos, por todo o companheirismo e acolhimento;

Aos meus colegas de laboratório, em especial à Geisiele de Oliveira Paukner e Bruna Gamba pelo auxílio na realização dos ensaios antivirais;

À Prof^a Dr^a Eloana Benassi Ribeiro de Souza dos Santos e ao Prof Dr Wilsione José Carneiro por aceitarem participar da banca avaliadora como membros titulares;

A Prof^a Dr^a Cibele Bonacorsi e Prof^a Dr^a Thaiza Galhardo Silva Morceli por aceitarem participar da banca avaliadora como membros suplentes;

Ao programa de Pós-Graduação em Saúde pela oportunidade e por todos os aprendizados;

À minha orientadora Carla Regina Andrighetti e minha co-orientadora Francine Pazini, por toda a confiança e paciência, por todos os ensinamentos e por sua orientação.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

RESUMO

O herpes vírus simplex (HSV) é um vírus altamente transmissível capaz de estabelecer latência, gerando infecções vitalícias. O número limitado de antivirais disponíveis para o tratamento de infecções por HSV ressalta a importância da busca por novas moléculas com atividade antiviral. Na busca por novos candidatos a fármacos, é importante investigar substâncias de origem natural, como o ácido gálico (AG), um ácido fenólico cujos estudos demonstraram atividade anti-HSV. A biotransformação é definida como uma reação química catalisada por enzimas, que se destaca como uma alternativa na busca de novas moléculas bioativas. O presente trabalho tem como objetivo produzir derivados do ácido gálico através da biotransformação, utilizando o fungo filamentosso *Beauveria bassiana* ATCC 7159 e avaliar a atividade antiviral frente aos vírus HSV-1 KOS e HSV-2 Cepa 333. Para tanto, foram realizados ensaios semipreparativos com culturas de *Beauveria bassiana* ATCC 7159 inoculadas em meio *peptone dextrose soy medium* (PDSM), a 27 °C e agitação de 200 rpm, adicionando o AG após 65 h de crescimento. A reação foi mantida por 168 h, e posteriormente o meio reacional foi filtrado e extraído com acetato de etila, e a biomassa extraída com acetona. Os extratos foram purificados através de cromatografia em coluna classica, cromatografia em camada delgada, dissolução fracionada e recristalização. A citotoxicidade frente as células Vero E6 foi avaliada por ensaio colorimétrico com sulforrodamina B, e a atividade anti-HSV foi determinada através de redução de placas de lise, utilizando duas estratégias metodológicas: pós-tratamento e ação virucida. A partir da biotransformação do ácido gálico, foi possível obter 3 derivados em quantidades suficientes para realização de testes biológicos. A avaliação da citotoxicidade revelou que o ácido gálico demonstrou um valor de concentração citotóxica a 50 % (CC₅₀) igual a 71,61 ± 7,02 µg/mL. Os derivados SL1 e SL3 apresentaram valores de CC₅₀ > 100 µg/mL. O derivado SL2 apresentou de CC₅₀ = 31,43 ± 2,40 µg/mL. O ensaio de pós-tratamento revelou que os derivados SL1, SL2 e SL3 apresentaram 14,7 % 38,7 % e 11,45 % de inibição da replicação do vírus HSV-1 cepa KOS, respectivamente, nas concentrações máximas não tóxicas testadas, enquanto o ácido gálico apresentou um valor de concentração efetiva a 50 % (CE₅₀) igual a 6,68 ± 1,15 µg/mL e um índice de seletividade (IS) igual a 10,44. No ensaio de avaliação da ação virucida verificou-se que o ácido gálico apresentou um valor de CE₅₀ = 10,92 ± 2,39 µg/mL com IS = 6,55 e os derivados SL2 e SL3 apresentaram valores de CE₅₀ iguais a 4,21 ± 0,74 e 13,73 ± 1,52, respectivamente, com IS = 7,46 para o derivado SL2 e 7,28 para o derivado SL3. O derivado SL1 apresentou somente 33,21 ± 3,54 % de inibição da infecciosidade residual. O derivado SL1 SL2 e SL3 não demonstraram atividade frente ao vírus HSV-2 cepa 333. Assim, conclui-se que através da biotransformação do ácido gálico através do fungo filamentosso *Beauveria bassiana* ATCC 7159 foram obtidos três derivados, e os derivados SL2 e SL3 apresentaram atividade virucida equivalente ao ácido gálico.

Palavras-chave: Bioconversão; Produtos naturais; Virucida, HSV

ABSTRACT

Herpes simplex virus (HSV) is a highly transmissible virus capable of establishing latency, generating lifelong infections. The limited number of antivirals available for the treatment of HSV infections highlights the importance of searching for new molecules with antiviral activity. In the search for new drug candidates, it is important to investigate substances of natural origin, such as gallic acid (GA), a phenolic acid whose studies have demonstrated anti-HSV activity. Biotransformation is defined as a chemical reaction catalyzed by enzymes, which stands out as an alternative in the search for new bioactive molecules. The present study aimed to produce gallic acid derivatives through biotransformation using the filamentous fungus *Beauveria bassiana* ATCC 7159 and to evaluate the antiviral activity against HSV-1 KOS and HSV-2 Strain 333 viruses. For this purpose, semipreparatory assays were performed with *Beauveria bassiana* ATCC 7159 cultures inoculated in peptone dextrose soy medium (PDSM) at 27 °C and shaking at 200 rpm, adding GA after 65 h of growth. The reaction was maintained for 168 h, and subsequently the reaction medium was filtered and extracted with ethyl acetate, and the biomass extracted with acetone. The extracts were purified by classical column chromatography, thin layer chromatography, fractional dissolution and recrystallization. Cytotoxicity against Vero E6 cells was evaluated by colorimetric assay with sulforhodamine B, and anti-HSV activity was determined by reduction of lysis plaques, using two methodological strategies: post-treatment and virucidal action. From the biotransformation of gallic acid, it was possible to obtain three derivatives in sufficient quantities for performing biological tests. The cytotoxicity evaluation revealed that gallic acid demonstrated a 50% cytotoxic concentration (CC₅₀) value equal to 71.61 ± 7.02 µg/mL. Derivatives SL1 and SL3 presented CC₅₀ values > 100 µg/mL. Derivative SL2 presented CC₅₀ = 31.43 ± 2.40 µg/mL. The post-treatment assay revealed that derivatives SL1, SL2 and SL3 presented 14.7%, 38.7% and 11.45% inhibition of HSV-1 strain KOS virus replication, respectively, at the maximum non-toxic concentrations tested, while gallic acid presented an effective concentration value at 50% (EC₅₀) equal to 6.68 ± 1.15 µg/mL and a selectivity index (SI) equal to 10.44. In the virucidal action evaluation assay, it was found that gallic acid presented an EC₅₀ value = 10.92 ± 2.39 µg/mL with IS = 6.55 and the derivatives SL2 and SL3 presented EC₅₀ values equal to 4.21 ± 0.74 and 13.73 ± 1.52, respectively, with IS = 7.46 for the derivative SL2 and 7.28 for the derivative SL3. The derivative SL1 presented only 33.21 ± 3.54% inhibition of residual infectivity. The derivatives SL1, SL2 and SL3 did not demonstrate activity against the HSV-2 strain 333 virus. Thus, it is concluded that through the biotransformation of gallic acid through the filamentous fungus *Beauveria bassiana* ATCC 7159, three derivatives were obtained, and the derivatives SL2 and SL3 presented virucidal activity equivalent to gallic acid.

Keywords: Bioconversion; Natural products; Virucidal, HSV

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura do HSV.....	14
Figura 2 - Estágios do ciclo de infecção do HSV.....	15
Figura 3 - Mecanismo de ação de análogos de nucleosídeo.....	16
Figura 4 - Estrutura aciclovir e penciclovir.....	17
Figura 5 - Estrutura básica de compostos fenólicos.....	21
Figura 6 - Ácido gálico.....	21
Figura 7 - Derivados obtidos pela biotransformação da criptotanshinona pelo fungo <i>Mucor rouxii</i> AS 3.3447.....	24
Figura 8 - Derivados obtidos pela biotransformação do ácido ferúlico por <i>Rhizopus oryzae</i>	25
Figura 9 - Biotransformação do ácido cafeico por <i>Aspergillus versicolor</i> AUMC480 e <i>Aspergillus awamori</i> AUMC58.....	25
Figura 10 - Biotransformação de ácido cafeico por <i>Candida albicans</i> MH356583 ..	26
Figura 11 - Derivados obtidos pela biotransformação da lovastatina por <i>Beauveria bassiana</i> AS 3.4270.....	27
Figura 12 - Biotransformação de resveratrol por <i>Beauveria bassiana</i> KCCM 60248	27
Figura 13 - Derivados obtidos pela biotransformação de 2'-Metilflavanona (1) por culturas de <i>Beauveria bassiana</i> KCH J1.5.....	28
Figura 14 - Derivados obtidos pela biotransformação da quercetina por <i>Beauveria bassiana</i>	28
Figura 15 - Derivados obtidos pela biotransformação do ácido gálico por <i>Beauveria sp</i>	29
Figura 16 - Derivados obtidos através da biotransformação do ácido gálico por <i>Beauveria bassiana</i>	30
Figura 17 - Ordem de polaridade de solventes.....	35
Figura 18 - Crescimento <i>Beauveria bassiana</i> ATCC 7159 em ágar batata inclinado	41
Figura 19 - Crescimento de <i>Beauveria bassiana</i> ATCC 7159 em PDSM durante ensaio de e ensaio semipreparativos.....	42
Figura 20 - Placa de CCD com ácido gálico, fração acetato de etila, fração cetônica, meio PDSM.....	44
Figura 21 - Esquema do processo de purificação dos derivados de ácido gálico	46
Figura 22 - Placas de CCD com ácido gálico e subfrações (agrupadas) obtidas por cromatografia CC1 e CC2.	47
Figura 23 - Compostos apolares obtidos por cromatografia CC3.....	48
Figura 24 - Derivados polares obtidos por cromatografia CC3.....	48
Figura 25 - Subfrações coletadas a partir da coluna cromatográfica CC4.....	49
Figura 26 - Subfrações recristalizadas e derivado SL1.....	50
Figura 27 - Subfração obtida por recristalização e derivado SL2.....	50
Figura 28 - Subfração e derivado SL3.....	51
Figura 29 - Frações obtidas por cromatografia (CC4) submetidas a CCD preparativa PP1 e PP2.....	51
Figura 30 - Amostras obtidas por placa preparativa PP1 e PP2.....	52
Figura 31 - Derivados obtidos pela biotransformação do ácido gálico com <i>Beauveria bassiana</i> ATCC 7159.....	53
Figura 32 - Citotoxicidade do ácido gálico e derivados SL1, SL2, SL3.....	54
Figura 33 - CC ₅₀ do ácido gálico e derivados SL1, SL2, SL3.....	55
Figura 34 - CE ₅₀ do ácido gálico e derivados SL1, SL2, SL3.....	56
Figura 35 - Índice de seletividade do ácido gálico e derivados SL1, SL2, SL3.....	57

LISTA DE ABREVIATURAS

AcEt	–	Acetato de etila
ATCC		American Type Culture Collection
µL	–	Microlitro
¹³ C	–	Carbono-13
¹ H	–	Hidrogenio
ABS	–	Absorbância
AcEt	–	Acetato de etila
ACV	–	Aciclovir
AG	–	Ácido gálico
ATB	–	Solução de antibiótico e antifúngicos
B.O.D	–	<i>Biochemical oxygen demand</i>
BDA	–	Ágar batata dextrose
CC	–	Cromatografia em coluna clássica
CC ₅₀	–	Concentração citotóxica para 50 % das células
CCD	–	Cromatografia em camada delgada
CE ₅₀	–	Concentração efetiva a 50 %
cm ²	–	Centímetros
CMC	–	Carboximetilcelulose
CMNT	–	Concentração máxima não tóxica
DMSO	–	Dimetilsulfóxido
DNA	–	Ácido desoxirribonucleico
g	–	Gramas
gB	–	Glicoproteína B
gD	–	Glicoproteína D
gH	–	Glicoproteína H
GH	–	Heterodímero de glicoproteína
gL	–	Glicoproteína L
h	–	Horas
HHV	–	Herpes vírus humano
HIV	–	Vírus da imunodeficiência humana

HMBC	–	Correlação de ligação múltipla heteronuclear
HSQC	–	Coerência quântica única heteronuclear
HSV	–	Herpes vírus simplex
HSV-1	–	Herpes simplex vírus tipo 1
HSV-2	–	Herpes simplex vírus tipo 2
HVEM	–	Mediador de entrada do herpes vírus
IR	–	Infeciosidade residual
IS	–	Índice de seletividade
IUBMB	–	União Internacional de Bioquímica E Biologia Molecular
Kpb	–	Quilobase
L-15	–	Leibovitz
mg	–	Miligramas
mL	–	Mililitro
MTT	–	Sal de tetrazólio
nm	–	Nanômetro
°C	–	Grau celsius
P.A.	–	Para análise
PBS	–	Tampão salina fosfato
PDSM	–	<i>Potato dextrose soy medium</i>
q.s.p		Quantidade suficiente para
Rf	–	Fator de retenção
RNA	–	Ácido ribonucleico
rpm	–	Rotação por minuto
SBF	–	Soro bovino fetal
SNC	–	Sistema nervoso central
SP	–	Ensaio semipreparativo
SRB	–	Sulforrodamina B
TCA	–	Ácido tricloroacético
UFP	–	Unidade formadora de placa
UV	–	Ultravioleta
VZV	–	Varicela-zoster

SUMÁRIO

1	Introdução	11
1.1	Herpesvírus	11
1.1.1	Herpes simplex vírus	12
1.1.2	Tratamento	16
1.2	Produtos Naturais	18
1.3	Ácido gálico.....	20
1.4	Biotransformação.....	22
2	Objetivos	31
2.1	Objetivo geral	31
2.2	Objetivos específicos	31
3	Materiais e métodos	32
3.1	Meios de Cultura	32
3.1.1	Ágar batata	32
3.1.2	<i>Potato dextrose soy medium</i> (PDSM)	32
3.2	Biotransformação.....	32
3.2.1	Cultivo e manutenção das cepas	32
3.2.2	Biotransformação em escala semipreparativa	33
3.3	Métodos de separação.....	34
3.3.1	Cromatografia em camada delgada	34
3.3.2	Cromatografia em coluna	34
3.3.3	Dissolução fracionada e recristalização	35
3.4	Avaliação de atividade biológica.....	35
3.4.1	Cultivo e manutenção das células	35
3.4.2	Avaliação da citotoxicidade	36
3.4.3	Vírus	37
3.4.4	Análise estatística.....	40
4	Resultados	41
4.1	Biotransformação.....	41
4.1.1	Ensaio de biotransformação em escala semipreparativa	41
4.2	Análise e extração de derivados	44
4.3	Purificação dos derivados.....	45
4.4	Derivados obtidos	52
4.5	Avaliação da atividade biológica.....	53
4.5.1	Avaliação de citotoxicidade	53
4.5.2	Atividade antiviral.....	55
	Conclusão.....	58
	Referências.....	59
	Artigo	75

1 INTRODUÇÃO

1.1 Herpesvírus

A Família *Orthoherpesviridae* compreende um grande grupo de vírus de DNA envolto em fita dupla com genomas na faixa de 125–241 kpb contendo 70–170 genes, possuindo mais de 200 diferentes espécies já identificadas, que apesar da divergência evolutiva e biológica possuem características comuns, como estrutura comum de vírion (capsídeo), um processo central de replicação do genoma e vias de entrada e saída semelhantes e a capacidade de infectar de forma latente seus hospedeiros. Existem 8 diferentes tipos de herpesvírus capazes de infectar humanos que se manifestam de forma variada e promovem diversas patologias, divididos em 3 subfamílias *Alphaherpesvirinae*: herpes vírus simplex (HSV) tipo 1 e 2, varicela-zoster (VZV); *Gammaherpesvirinae*: vírus Epstein-Barr e herpes vírus humano 8 (HHV 8) e *Betaherpesvirinae*: citomegalovírus e os herpes vírus humano 6 e 7 (HHV 6, 7) (Gatherer *et al.*, 2021; Yuan *et al.*, 2018).

Todos os membros pertencentes a esta família apresentam um ciclo de replicação em duas fases, fase lítica (replicativa) e fase latente. Durante a fase lítica a maioria dos genes são expressos em cascata e as partículas virais infecciosas são liberadas em grande quantidade. A fase latente, por sua vez, é caracterizada por uma expressão gênica reduzida e ausência de produção de partículas virais (Magel; Tying, 2012).

Os membros da subfamília *Alphaherpesvirinae* possuem um ciclo de replicação mais curto em culturas celulares quando comparado às subfamílias *Betaherpesvirinae* e *Gammaherpesvirinae*. Além disso, os *Alfaherpesvirus* são neuroinvasivos, estabelecendo latência em células neuronais, enquanto os *Betaherpesvirus* infectam principalmente células mielomonocíticas e os *Gamaherpesvirus* possuem tropismo por células linfoides (células B e T) (Steiner; Benninger, 2018; Sucharita; Krishnagopal; Hurk, 2023).

Os *Alphaherpesvirinae*, HSV-1, HSV-2 e VZV, estabelecem latência em células não replicantes (neurônios), onde o genoma viral circulariza para formar um epissoma. Estes vírus expressam apenas alguns transcritos de RNA, nenhum dos quais é traduzido durante a latência. Como os neurônios não se dividem, não é necessário expressar uma proteína viral para ligar o genoma viral aos cromossomos durante a divisão celular de células infectadas de forma latente (Cohen, 2020).

Todos os herpesvírus humanos são disseminados através da saliva, por lesões cutâneas

ou mucosas, ou por secreções genitais infectando células epiteliais da mucosa orofaríngea ou do trato genital ou pele. Exceto o vírus varicela-zoster (VZV) que é transmitido por via respiratória ou por contato com lesões vesiculares, que podem infectar o epitélio da orofaringe, do trato respiratório superior ou da conjuntiva (Cohen, 2020; Steiner; Benninger, 2018).

1.1.1 *Herpes simplex vírus*

O herpes vírus simplex (HSV) é o vírus pertencente à família *Orthoherpesviridae* que possui maior incidência em humanos. De acordo com a Organização Mundial de Saúde, em 2016, 3,7 bilhões de pessoas com menos de 50 anos, o que corresponde a 67 % da população mundial tiveram contato com o vírus HSV-1, sendo a maioria delas adquirida durante a infância. Enquanto o HSV-2 afeta cerca de 491 milhões de pessoas com idade entre 15 e 49 anos (James *et al.*, 2020).

Os dois tipos de HSV existentes, compartilham uma homologia genômica de aproximadamente 70 %. O vírus HSV-1 está relacionado principalmente às infecções na boca, faringe, face, olhos e sistema nervoso central (SNC), já o vírus HSV-2 é geralmente responsável por infecções da região anogenital (Chayavichitsilp *et al.*, 2009; Steiner; Benninger, 2018; Tognarelli *et al.*, 2019).

Os principais sinais clínicos relacionados às infecções por HSV-1 são caracterizados por lesões vesiculares muco cutâneas na língua, lábios, gengiva, e palatos mole e duro. O HSV-2 por sua vez provoca majoritariamente lesões na região genital, períneo, nádegas, áreas perianais ou coxas (Cole, 2020).

A infecção primária por HSV ocorre quando um indivíduo soronegativo com danos nas superfícies mucosas ou pele é exposto ao vírus. Embora o contato direto com as lesões herpéticas resulte uma alta taxa de transmissão, o HSV também pode ser transmitido por secreções genitais ou orais, e superfícies mucosas de pessoas assintomáticas, o que facilita a sua disseminação (Johnston *et al.*, 2008; Magel; Tyring, 2012).

As infecções neonatais, apesar de raras, podem levar a morbidade e mortalidade, especialmente se houver disseminação ou envolvimento do sistema nervoso central. Nos recém-nascidos, as infecções se apresentam como uma doença dérmica, ocular e oral localizada, encefalite, infecção disseminada em múltiplos órgãos com ou sem encefalite, ou como pneumonite isolada. O risco de transmissão é maior em mulheres com herpes genital primário ou de primeiro episódio durante a gravidez. A transmissão do HSV de mãe para filho pode ocorrer durante o parto, correspondendo a 85 % dos casos. A transmissão durante o período

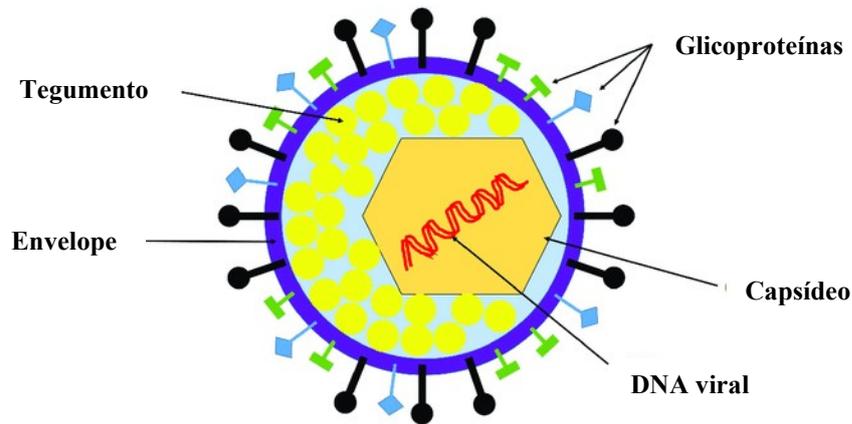
pós-natal representa 10 % dos episódios, enquanto a transmissão intrauterina corresponde a 5 %. Neste contexto, a prevenção da infecção materna, a detecção e a terapia antiviral precoce são as principais medidas para prevenir a transmissão do HSV de mãe para filho (Autore *et al.*, 2021; Bhatta *et al.*, 2018; James; Sheffield; Kimberlin, 2014; Jones, 2009).

O HSV é o segundo vírus que mais causa infecção em pacientes após o transplante de órgãos. A maioria dos casos são decorrentes de reativação do vírus latente e não de uma infecção primária, que apesar de incomum, já foi observada em receptores de transplante renal. O uso de imunossupressores para evitar a rejeição de órgãos sólidos, combinada à ausência de terapia profilática, pode ser um fator de risco para o receptor, aumentando as chances de reativação do HSV e em caso de imunodeficiência pode gerar quadros mais graves com complicações como encefalite, doença disseminada e hepatite (Lee; Zuckerman, 2019; Macesic *et al.*, 2017; Shiley; Blumberg, 2011).

O vírion do herpesvírus é genética e estruturalmente um dos maiores e mais complexos vírus conhecidos (YUAN *et al.*, 2018). Trata-se de um vírus envelopado com partícula viral esférica com tamanho médio de 186 nm de diâmetro e um genoma linear de DNA de fita dupla encerrado por um capsídeo icosaédrico composto por 162 capsômeros com uma montagem que requer o empacotamento ordenado de cerca de 4.000 subunidades de proteína nos hexônios, pentons e triplexes (Rechenchoski *et al.*, 2017).

O vírion é composto por três elementos estruturais, um nucleocapsídeo contendo o genoma de 152 kpb, o envelope, constituído por uma bicamada lipídica com aproximadamente 11 glicoproteínas virais incorporadas, das quais 4 (gB, gD, gH e gL) são essenciais para a entrada do vírus nas células, e o tegumento, uma região proteica entre o capsídeo e o envelope composto por mais de 20 proteínas que possui um papel fundamental na regulação do ciclo de replicação viral (Figura 1) (Grünewald *et al.*, 2003; Rechenchoski *et al.*, 2017).

Figura 1 - Estrutura do HSV



Fonte: Adaptado de Alandijany (2019)

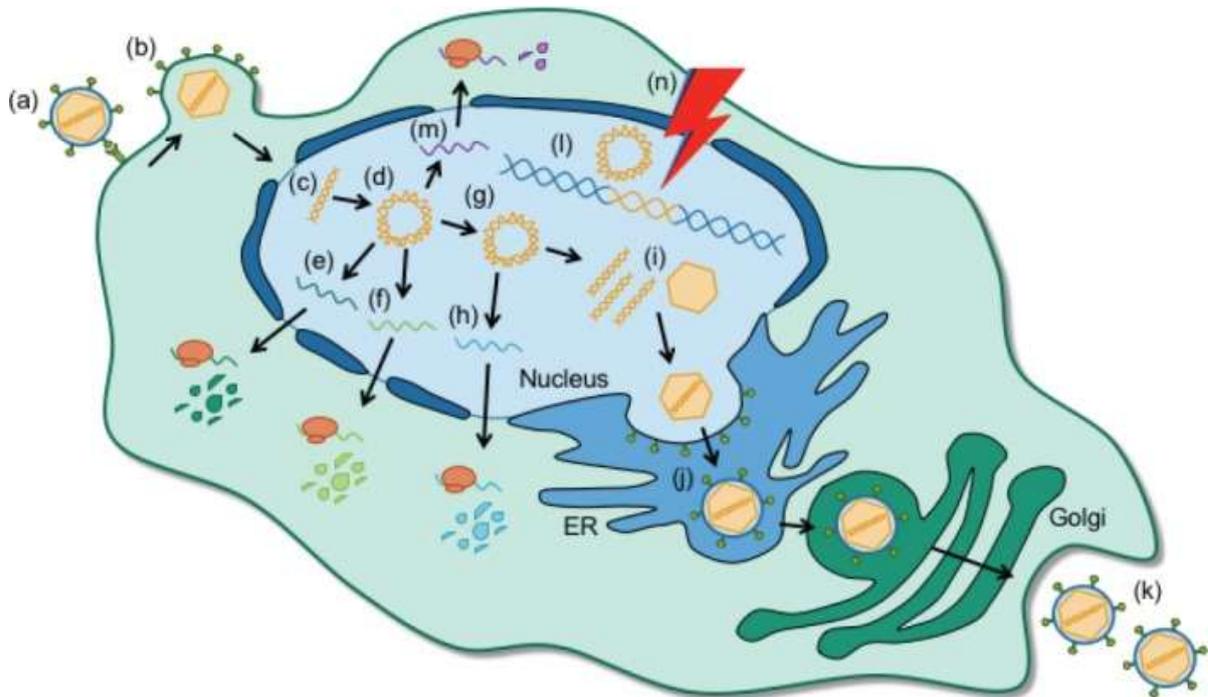
O HSV-1 e o HSV-2 possuem a capacidade de codificar ao menos 84 polipeptídeos diferentes dos quais, um mínimo de 47 não são necessários para a replicação viral em células cultivadas. No entanto, esses genes não são totalmente dispensáveis, pois complementam genes celulares que não são expressos em células terminalmente diferenciadas, ou modificam o metabolismo celular para garantir a produção de altos rendimentos virais. Os vírus mutantes sem esses genes são incapazes de sobreviver em seu ambiente natural (Zheng *et al.*, 2012)

O HSV entra nas células hospedeiras por meio de um mecanismo que envolve a interação de várias glicoproteínas na superfície do vírion. A ligação inicial do vírus a uma célula hospedeira é mediada pela glicoproteína D (gD), que se liga a receptores como nectinas, uma proteína de adesão celular expressa em vários tecidos, incluindo neurônios, funciona como um receptor de entrada, mediador de entrada do herpesvírus (HVEM) ou uma forma modificada de heparan sulfato. Após a ligação do complexo receptor gD ao gB, que sofre alterações conformacionais e interage com o heterodímero de glicoproteína GH-gI. Essa interação leva à fusão do envelope viral com a membrana da célula hospedeira, permitindo a entrada do vírus na célula (Connolly; Jardetzky; Longnecker, 2020).

Após o processo de fusão do envelope viral, o DNA é liberado no núcleo da célula, onde circulariza e transcreve sequencialmente. A replicação do HSV ocorre por meio de três ciclos de transcrição, resultando na produção de proteínas: proteínas imediatamente precoces que regulam principalmente a replicação viral, proteínas iniciais que sintetizam e empacotam o DNA e proteínas tardias, predominantemente compostas por proteínas do vírion. O DNA viral recém-sintetizado é empacotado em capsídeos traficado através do retículo endoplasmático e da rede trans Golgi, e liberado no espaço extracelular para infectar células vizinhas. Enquanto o DNA viral latente permanece como um epissoma circular (Figura 2) (Connolly; Jardetzky;

Longnecker, 2020; Hogestyn; Mock; Mayer-Proschel, 2018).

Figura 2 - Estágios do ciclo de infecção do HSV



Legenda: Ligação do vírus aos receptores de superfície celular (a); Fusão do envelope viral à membrana celular (b); Liberação do DNA no núcleo da célula (c); Circularização e transcrição sequencial (d) de proteínas imediatamente precoces (e) e precoces (f); Após replicação genômica (g), transcrições e proteínas tardias são expressas (h); DNA viral recém-sintetizado é empacotado em capsídeos (i) atravessa o retículo endoplasmático e rede *trans* Golgi (j); O vírus é liberado no espaço extracelular (k); O DNA viral latente permanece como um epissoma circular (l) e expressa de transcritos associados à latência (m); Fatores externos e internos, como exposição aos raios UV e estresse psicológico, podem fazer com que o vírus latente seja reativado (n).

Fonte: Adaptado de Hogestyn, Mock e Mayer-Proschel (2018)

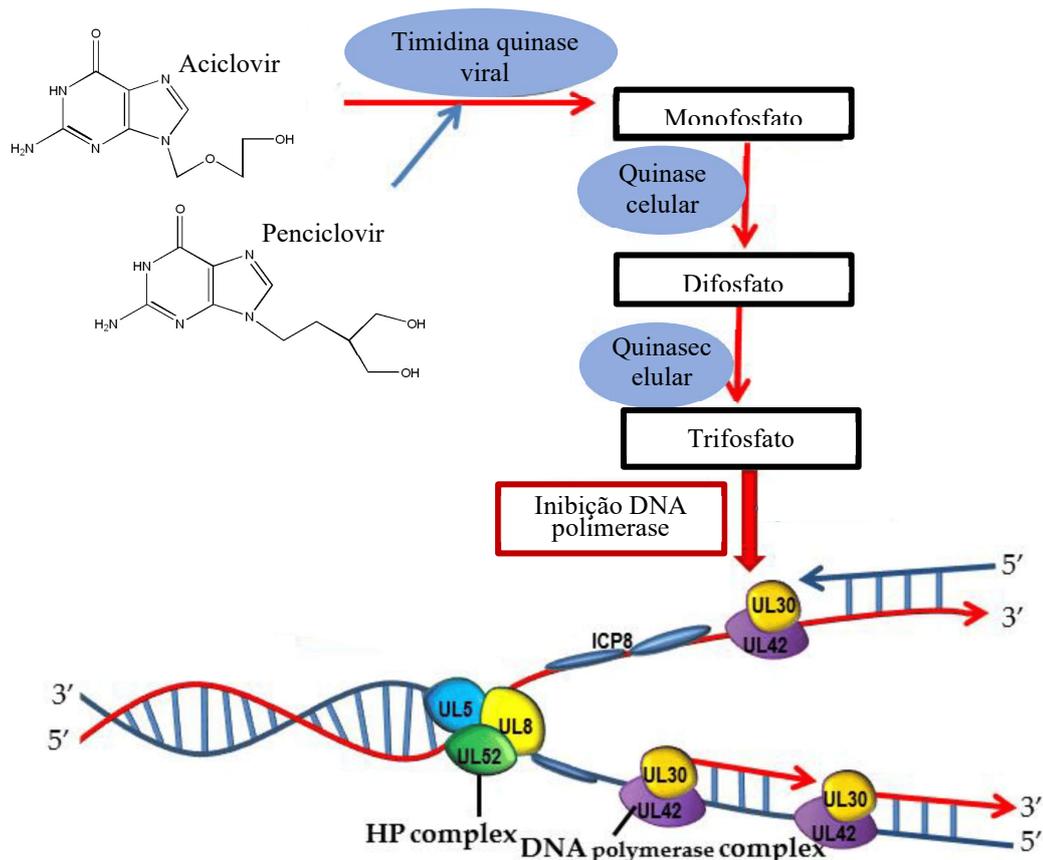
Após a infecção primária, o vírus migra através dos axônios para os gânglios sensoriais periféricos associados aos nervos que inervam o local de entrada do vírus, onde o genoma viral circulariza para formar um epissoma, iniciando assim a sua fase latente caracterizada pela ausência de replicação viral. Como os neurônios não se dividem, não é necessário expressar uma proteína viral para ligar o genoma viral aos cromossomos durante a divisão celular de células infectadas de forma latente (Cohen, 2020; Sauerbrei *et al.*, 2016).

Os mecanismos exatos de reativação não são totalmente compreendidos, mas vários fatores podem contribuir para esse processo, como estresse, alterações hormonais, radiação UV e imunossupressão. Modificações epigenéticas, como deposição e modificações de histonas, desempenham um papel na regulação da transição da latência para a reativação. Proteínas virais, como ICP0, podem participar da transição da latência para a replicação lítica, afetando as atividades celulares e a expressão gênica viral (Zhu; Viejo-Borbolla, 2021).

1.1.2 Tratamento

A maioria dos medicamentos usados para inibir o HSV são análogos de nucleosídeos que atuam diretamente na DNA polimerase viral. Essa enzima codificada pelo vírus desempenha uma função essencial na replicação do DNA viral e sua inibição impede a produção de vírions infecciosos. Para que estes fármacos exerçam a atividade primeiramente são expostos a uma série de enzimas do metabolismo celular, que os convertem em formas ativas. A fosforilação inicial de análogos de nucleosídeos antivirais ocorre por meio de uma enzima viral conhecida como timidina quinase, as di e trifosforilações subsequentes são executadas por quinases celulares (Figura 3). A necessidade de uma enzima viral para sua ativação, é uma das grandes vantagens do uso de análogos de nucleosídeos, uma vez que o fármaco é raramente ativado em células saudáveis (Sadowski *et al.*, 2021).

Figura 3 - Mecanismo de ação de análogos de nucleosídeo

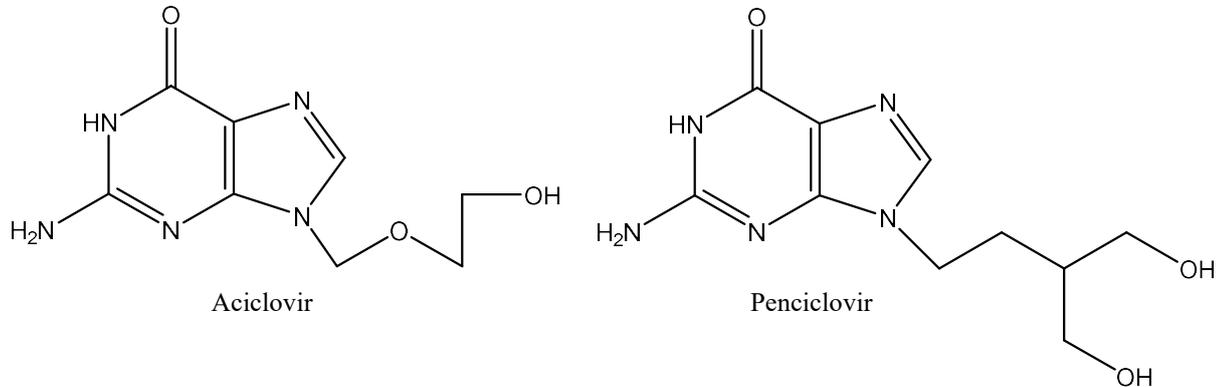


Fonte: Adaptado de Majewska, Mlynarczyk-Bonikowska (2022)

O aciclovir (Figura 4) foi o primeiro dos análogos de nucleosídeos licenciado para o tratamento de infecções por HSV, que pode ser administrado por via intravenosa, tópica ou por

via oral, e até hoje é usado como medicamento de primeira linha. Outros medicamentos desenvolvidos para o tratamento de infecções por HSV incluem o seu pró-fármaco, vanciclovir, e o penciclovir (Kuo *et al.*, 2023; Roizman; Whitley, 2013).

Figura 4 - Estrutura aciclovir e penciclovir



Fonte: Adaptado de Lerner *et al.* (2010)

O desenvolvimento de resistência medicamentosa é incomum em pacientes saudáveis, no entanto, pode ocorrer com maior frequência em hospedeiros imunodeficientes, visto que são expostos a terapias antivirais por longos períodos, e isto, somado à replicação viral contínua, aumenta o risco de surgimento de cepas resistentes aos medicamentos. O número limitado de antivirais disponíveis para o tratamento de infecções por HSV, e o fato de todos possuírem o mesmo alvo, dificulta ainda mais o manejo da resistência aos medicamentos contra HSV (Schalkwijk; Snoeck; Andrei, 2022).

A resistência do HSV ao aciclovir está relacionada a diferentes mecanismos, como uma completa deficiência na atividade da timidina quinase, uma redução na produção desta enzima, ou ainda a produção de timidina quinase viral com especificidade de substrato alterada, capaz de fosforilar apenas a timidina, não fosforilando o aciclovir, ou em casos mais raros por mutações no gene da DNA polimerase (Piret; Boivin, 2016).

Além do crescente número de cepas resistentes aos fármacos utilizados atualmente, os análogos de nucleosídeos possuem outra grande limitação em relação ao tratamento do herpes simplex vírus, pois não afetam o vírus em sua fase latente, uma vez que análogos de nucleosídeos necessitam da ação da enzima timidina quinase para serem ativados. E durante a latência dos *Alfaherpesvírus* a expressão de timidina quinase e consequentemente da DNA polimerase é reduzida uma vez que não há replicação viral (Singh; Goodyear; Breuer, 2019; Xie *et al.*, 2019).

Nos últimos anos houveram várias tentativas de desenvolver uma vacina para os vírus HSV que seja eficaz na prevenção da infecção ativa e da transmissão do vírus, evitando assim

as complicações causadas pela infecção destes vírus. Contudo, apesar do avanço no desenvolvimento de novas tecnologias, como por exemplo, as vacinas de mRNA, o uso de Herpesvírus atenuados e pesquisas sobre vacinas virais de deleção de glicoproteína D de ciclo único, ainda existem grandes desafios. Entre eles, a necessidade de desenvolver vacinas seguras para crianças na primeira infância, uma vez que a maioria das infecções por HSV ocorrem na adolescência (Krishnan; Stuart, 2021; Margulies, 2022).

1.2 Produtos naturais

Diversos autores definem produtos naturais, como substâncias químicas encontradas na natureza produzidas através do metabolismo primário e secundário de seres vivos (Bhatla; Lal, 2023; Elshafie; Camele; Mohamed, 2023; Umaru, 2023). No decorrer da evolução humana, por milhares de anos, diversos povos utilizaram produtos de origem natural obtidos a partir de plantas, animais, e microrganismos para fins medicinais (Chintoju *et al.*, 2015; Sorokina; Steinbeck, 2020).

Os metabolitos secundários são moléculas orgânicas produzidas por organismos vivos que não são necessários para o seu crescimento e desenvolvimento, no entanto desempenham um papel importante na sua adaptação e interação ambiental, protegendo os organismos de fatores externos, favorecendo relações mutualística, lhes conferindo vantagem evolutiva e a sobrevivência da espécie (Bruce; Bruce, 2022; Zandavar *et al.*, 2023).

No início do século XIX o isolamento da morfina a partir da papoula (*Papaverum sonniferum* L.) pelo farmacêutico alemão Friedrich Sertürner instigou a busca por moléculas bioativas em outras ervas medicinais e durante o século XIX, foi isolada uma grande quantidade de compostos de origem vegetal, principalmente alcalóides (por exemplo, quinina, cafeína, nicotina, codeína, atropina, colchicina, cocaína, capsaicina) (Bernardini *et al.*, 2018).

Outro importante marco para o desenvolvimento de fármacos de origem natural ocorreu em 1853, quando o químico francês Charles Frederic Gerhardt sintetizou o ácido acetilsalicílico a partir do ácido salicílico, uma substância encontrada na casca do salgueiro (*Salix alba* L), obtendo pela primeira vez um produto através de semissíntese. Até os dias atuais, o ácido acetilsalicílico possui grande relevância, sendo amplamente utilizado como analgésico, antitérmico e anticoagulante (Bernardini *et al.*, 2018; Moon *et al.*, 2022; Paddon; Keasling, 2014).

Os produtos de origem natural são amplamente utilizados no desenvolvimento de novos

medicamentos como fonte direta de agentes terapêuticos, como medicamentos puros ou fitomedicamentos, fonte de matéria-prima para desenvolvimento de medicamentos complexos e semissintéticos, protótipos para desenho de moléculas líderes e como marcadores taxonômicos para descoberta de novos medicamentos (Calixto, 2019).

Os produtos naturais ou derivados de produtos naturais (substâncias semissintéticas) correspondem 31,63 % dos fármacos desenvolvidos no período entre 1981 a setembro de 2019. Vale ressaltar que outros 35 % dos fármacos são inspirados em moléculas de origem natural, ou possuem farmacóforos inicialmente identificados em produtos naturais. Ao observar os fármacos antivirais desenvolvidos neste período, é possível notar que 63 % são derivados ou inspirados em moléculas obtidas a partir de fontes naturais (Newman; Cragg, 2020).

Ao longo dos últimos anos, diversos estudos vêm demonstrando que fontes naturais como animais, plantas, algas, fungos ou bactérias são ricas em diferentes compostos bioativos, como nucleosídeos, polissacarídeos, proteínas, e metabólitos secundários identificados como agentes ativos antivirais contra HSV-1 e HSV-2 através de diferentes mecanismos de ação (Hassan; Masarčíková; Berchová, 2015; Treml *et al.*, 2020; Van De Sand *et al.*, 2021).

Um exemplo de medicamento de origem vegetal usado no tratamento do HSV, é o fitoterápico Imunomax® (*Uncaria tomentosa*), produzido e patenteado pela empresa brasileira Herbarium Laboratório Botânico. A *Uncaria tomentosa*, popularmente conhecida como unha de gato, possui propriedades anti-inflamatórias, imunomoduladora e antiviral (Lima *et al.*, 2019; Passos, 2018).

Em um estudo duplo cego realizado por Caldas *et al.* (2010) utilizando o medicamento teste Imunomax® e o medicamento referência, Zovirax (Aciclovir), foi observado que ambos os medicamentos utilizados no estudo foram eficazes e seguros para o tratamento do herpes labial, não havendo diferença estatisticamente significativa nem na duração total do episódio nem no tempo de evolução inflamatória ou de formação de crosta, porém, em relação a intensidade da dor e sinais inflamatórios, a eficácia do medicamento teste foi significativamente superior à do Zovirax, proporcionando mais conforto aos pacientes. Este medicamento também se mostrou eficaz no tratamento do herpes genital, como descrito por Romero *et al.* (2010) e (2014).

No processo de descoberta e desenvolvimento, a obtenção de produtos naturais bioativos envolve etapas que incluem extração, isolamento, purificação e elucidação estrutural. Os procedimentos de extração, isolamento e purificação incluem a extração por partição, recristalização, dissolução fracionada e cromatografia. A extração por partição (líquido-líquido) é tradicionalmente utilizada como procedimento inicial para o processo de isolamento de

compostos. Este método tem como objetivo separar diferentes substâncias considerando seu coeficiente de partição e sua solubilidade em solventes orgânicos distintos e imiscíveis (Dias; Urban; Roessner, 2012; Simões *et al.*, 2016; Queiroz; Collins; Jardim, 2001)

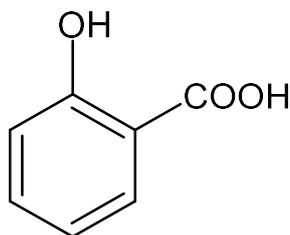
A recristalização baseia-se na influência da temperatura sobre o coeficiente de solubilidade de uma substância. Em temperatura elevada os compostos possuem maior solubilidade, permitindo a preparação de uma solução concentrada, que quando resfriada induz a precipitação da substância de menor solubilidade. Na dissolução fracionada a diferença de solubilidade dos componentes de uma mistura em um determinado solvente promove a sua solubilização parcial, permitindo a separação destes compostos. (Petrucci *et al.*, (2017); Visht; Chaturvedi, 2012).

A cromatografia é um método de separação amplamente utilizado na obtenção de produtos de origem natural. Este método é realizado em sistema composto por uma fase estacionária que permanece fixa e por uma fase móvel, que atravessa a fase estacionária carreando os componentes de uma amostra. A diferença de afinidade que um composto possui entre essas duas fases é responsável por uma diferença no deslocamento que resulta em sua separação. A interação entre a fase estacionária e fase móvel pode estar relacionada a mecanismos de troca iônica, absorção, adsorção de superfície, partição e exclusão de tamanho (Hage, 2018; Mallik; Chakravarti; Chakravarti, 2016).

1.3 Ácido gálico

Os compostos fenólicos são um amplo grupo de metabólitos secundários produzidos pelas plantas, conhecidos por suas propriedades antioxidantes, que possuem em sua estrutura básica um anel aromático com uma ou mais ligações do grupo hidroxila. Essa classe de substâncias é dividida em polifenóis, caracterizados pela presença de vários anéis fenólicos em sua estrutura e ácidos fenólicos que possuem um anel fenólico ligado a um grupo carboxila (Figura 5) e que podem ser encontrados na natureza conjugados a ésteres, éteres, açúcares simples, polímeros vegetais ou ácidos orgânicos (González-Burgos; Gómez-Serranillos, 2021; Kauffmann; Castro, 2023).

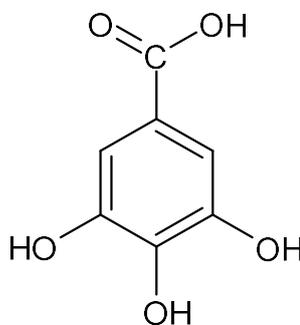
Figura 5 - Estrutura básica de compostos fenólicos



Fonte: Elaborado pelo próprio autor

O ácido gálico (ácido 3,4,5-trihidroxibenzóico) (Figura 6) é um ácido fenólico de baixo peso molecular constantemente encontrado na natureza como metabólito secundário em plantas. Sua estrutura é constituída por um anel aromático, um grupo ácido carboxílico e três grupos hidroxila que se encontram em uma posição meta e para em relação ao ácido carboxílico (Badhani; Sharma; Kakkar, 2015). Sua principal fonte é de origem vegetal, e pode ser encontrado em caules, flores, frutos raízes e folhas de diversas plantas, possuindo uma alta distribuição no reino vegetal (Bai *et al.*, 2021; Fernandes; Salgado, 2016). O ácido gálico também pode ser obtido através da hidrólise de taninos obtidos em grande quantidade a partir de plantas, ou ainda através de processos de fermentação (Choubey *et al.*, 2018).

Figura 6 - Ácido gálico



Fonte: Elaborado pelo autor.

A atividade antioxidante do ácido gálico e de seus derivados, consiste em uma ação terapêutica amplamente estudada por diversos autores (Al Zahrani; El-Shishtawy; Asiri, 2020; Gnawali; Acharya; Rajbhandari, 2013; Kalita; Kar; Handique, 2012). Além disso, possuem outras atividades biológicas como a sua ação anti-inflamatória (Queiroz *et al.*, 2019; Seo *et al.*, 2016; Tsang *et al.*, 2016), atividade citotóxica em diferentes tipos de câncer (Jiang *et al.*, 2022)(Jiang *et al.*, 2022), efeitos antidiabéticos (Punithavathi *et al.*, 2011) e atividade antimicrobiana frente a diversas cepas de microrganismos (Kim; Je, 2015; Sarjit; Wang; Dykes, 2015; Sorrentino *et al.*, 2018).

A atividade antiviral do ácido gálico, tem sido relatada por vários autores, em ensaios realizados com diversos vírus de DNA e RNA. Entre os diferentes vírus inibidos *in vitro* pelo ácido gálico e de derivados de galato, podemos citar vírus da hepatite B e C; vírus influenza A e B, vírus da imunodeficiência humana (HIV), e diferentes tipos de herpesvírus humano (Chen *et al.*, 2015; Chojnacka *et al.*, 2021; Hsu *et al.*, 2015; Lee *et al.*, 2016; Long *et al.*, 2021; Šudomová *et al.*, 2022; Wu *et al.*, 2017).

1.4 Biotransformação

Uma das principais estratégias na busca por novos candidatos a fármacos é a produção de análogos de um composto biologicamente ativo com potencial atividade já conhecida. Neste contexto, a biotransformação torna-se uma importante alternativa na busca por diferentes compostos químicos bioativos (Choi *et al.*, 2018).

A biotransformação pode ser definida como modificações na estrutura de compostos orgânicos através de enzima ou sistema enzimático, que levam à formação de novas moléculas (Smitha, Singh e Singh, 2017).

Os microrganismos são utilizados em processos catalíticos há mais de 100 anos pelos seres humanos, contudo, somente a partir da década de 70 a biotransformação se tornou um importante alvo de estudo pela comunidade científica. Isto, devido à alta seletividade das enzimas e ao amplo espectro de reações que são capazes de catalisar, como por exemplo, hidrólises, oxidações, redução, reação de adição e remoção de água, amônia e cianeto, halogenação, desalogenação, substituição aromática nucleofílica, sulfatação e glicuronidação (Faber, 2018).

O processo de bioconversão pode ser realizado de duas formas, através do uso de enzimas isoladas ou células inteiras. Ao utilizar enzimas isoladas, a principal vantagem é o aumento da seletividade, uma vez que neste processo não há influência de outras enzimas presentes nas células que podem realizar reações secundárias. O uso de células inteiras possui como vantagem o seu menor custo, dispensando processos de purificação enzimática. Nas células inteiras, as barreiras celulares proporcionam maior estabilidade às enzimas, o que permite reações em meios não aquosos. Além disso, a presença de um sistema enzimático intacto dispensa necessidade de adição de cofatores exógenos e possibilita reações em cascata que geram derivados de maior complexidade. (Pinto *et al.*, 2020; Yang *et al.*, 2020).

As enzimas envolvidas no processo de biotransformação são classificadas pela União

Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular (IUBMB) de acordo com as reações que catalisam em oxidorreduções que promovem reações de oxidação e redução, hidrolases que são capazes de hidrolisar diversas ligações, liases que catalisam a adição ou remoção de grupos químicos através de reações não hidrolíticas, isomerases que promovem rearranjos intramoleculares ou reações de isomerização, ligases que catalisam reações de condensação e translocases promovem a translocação de íons ou moléculas através da célula com hidrólise de ATP (Loughlin, 2000; Singh *et al.*, 2020).

A biotransformação atende aos critérios de química verde, mostrando-se como uma alternativa sustentável aos métodos de síntese clássica, visto que as enzimas são derivadas de recursos renováveis, são biodegradáveis, reagem em solventes aquosos sob condições moderadas, e geram baixas quantidades de subprodutos residuais (Bell *et al.*, 2021; Sheldon & Woodley, 2018). Além de suas vantagens ambientais, a bioconversão ainda se destaca por ser altamente seletiva, já que as enzimas apresentam quimiosseletividade e estereosseletividade, sendo capazes de realizar reações que dificilmente seriam alcançadas por procedimentos sintéticos tradicionais (Faber, 2018).

De acordo com Liese, Seelbach e Wandrey (2006), a principal diferença entre os processos de fermentação e biotransformação é o número de etapas catalíticas. A biotransformação ocorre em poucas etapas enquanto o processo de fermentação é realizado através de várias etapas consecutivas, resultando em uma maior diferença entre o substrato e o produto obtido.

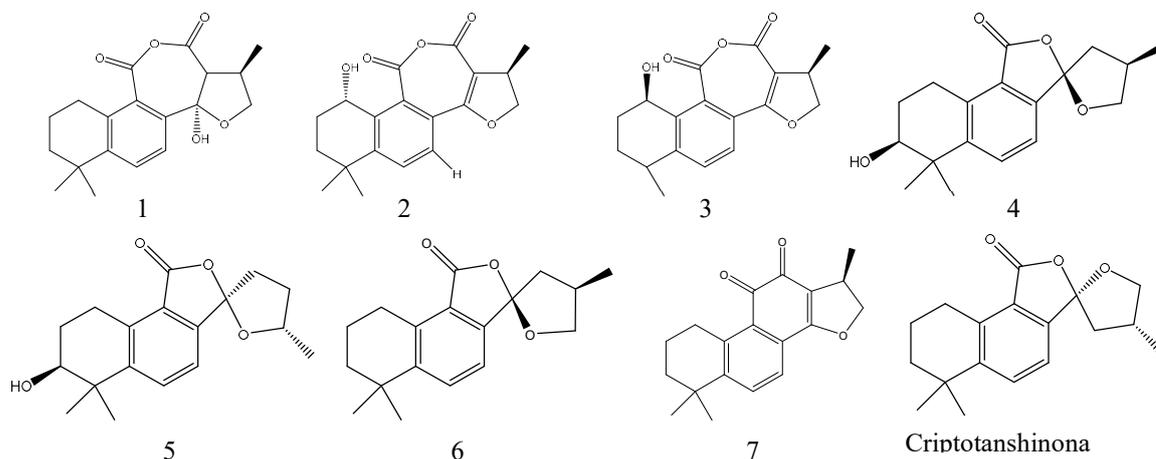
Os fungos filamentosos estão entre os microrganismos mais utilizados em processos biocatalíticos devido ao seu rico sistema enzimático que possibilita modificações estruturais seletivas em diversas moléculas gerando metabólitos de interesse farmacêutico. O aumento da utilização de fungos como biocatalisadores para a transformação química de produtos naturais e medicamentos é verificado, já que os mesmos podem simplificar ou permitir a produção de compostos químicos complexos ou substâncias intermediárias usadas em processos de semissíntese (Hegazy *et al.*, 2015).

O uso de fungos em processos de bioconversão teve grande impulso a partir de 1952, após Murray e Perterson utilizarem culturas de *Rhizopus arrhizatus*, ATCC 11145 para obter derivados 11 α -hidroxilado da progesterona, utilizado na produção de corticosteróides. Desde então, os fungos tem desempenhado um papel importante na produção industrial de derivados esteroidais, pois são necessárias reações de hidroxilação regio e estereosseletivas específicas, dificilmente obtidas por síntese clássica, que demanda um grande número de etapas e custo elevado (Aly *et al.*, 2011; Hull *et al.*, 2017).

Os fungos são comumente utilizados na biotransformação de produtos naturais, como flavonóides, taninos, fitoesteróis, cumarinas e ácidos fenólicos, através de diversas reações que incluem hidroxilação, oxidação e redução, hidrólise, metilação e desmetilação, rearranjos estruturais, clivagem de anéis e conjugação com pequenas moléculas, permitindo a obtenção de diferentes compostos fenólicos bioativos (Aguirre-Pranzoni *et al.*, 2011; Arunrattiyakorn *et al.*, 2018; Alvarado *et al.*, 2003; Parshikov; Sutherland, 2015; Rajak; Singh; Banerjee, 2017).

He *et al.* (2017) realizou a biotransformação da criptotanshinona pelo fungo *Mucor rouxii* AS 3.3447 através de um complexo processo de degradação e rearranjo na estrutura do substrato, gerando 7 metabólitos (Figura 7), dos quais 2 (1 e 3) mostraram promissora atividade antiviral frente ao vírus influenza A, e uma redução da atividade citotóxica em comparação com a criptotanshinona.

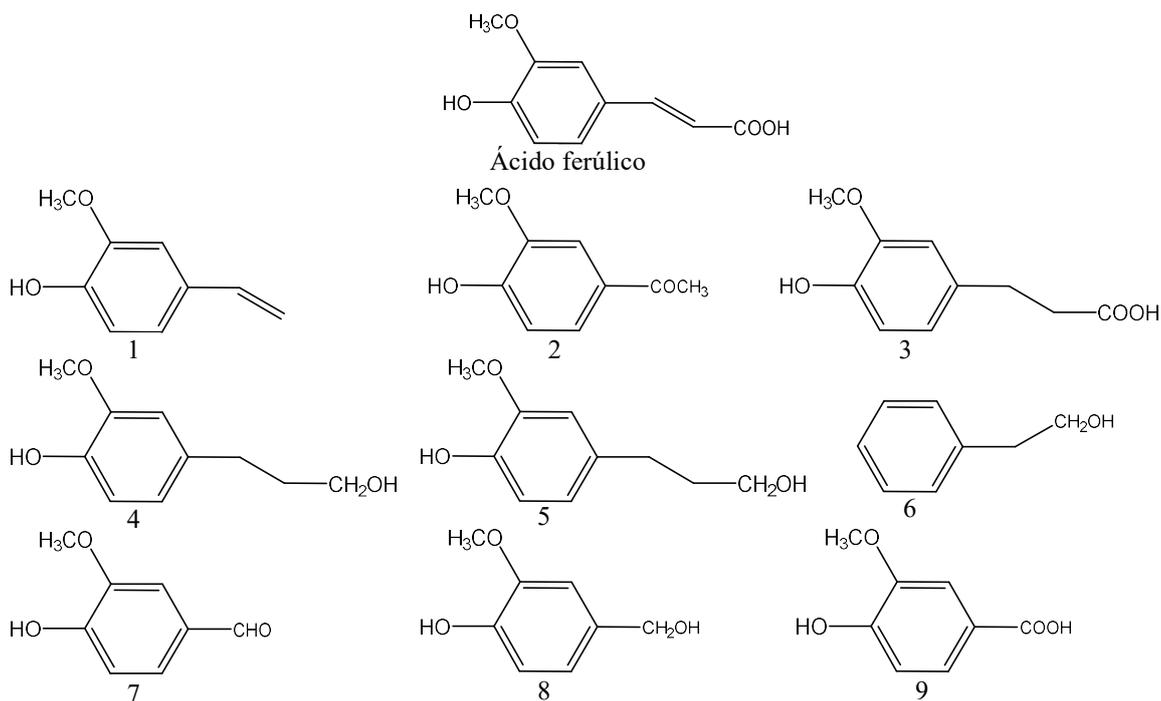
Figura 7 - Derivados obtidos pela biotransformação da criptotanshinona pelo fungo *Mucor rouxii* AS 3.3447



Fonte: Adaptado de He *et al.* (2017)

A bioconversão de ácidos fenólicos já foi abordada por diversos autores (Brunati *et al.*, 2004; El-Salam *et al.*, 2019; Rocheleau; Al-Harhi; Ouellet, 2019; Torres-Mancera *et al.*, 2013). Shanker *et al.* (2007) realizou a biotransformação do ácido ferúlico utilizando culturas do fungo *Rhizopus oryzae*. Por meio deste processo foi possível obter 4-vinilguaiacol (1), acetovanilona (2), ácido dihidroferúlico (3), álcool coniferílico (4), álcool dihidroconiferílico (5), e em menor quantidade o álcool feniletílico (6), vanilina (7), álcool vanílico (8) e ácido vanílico (9) (Figura 8), através de reações que incluem descarboxilação, isomerização, hidratação, oxidação e redução.

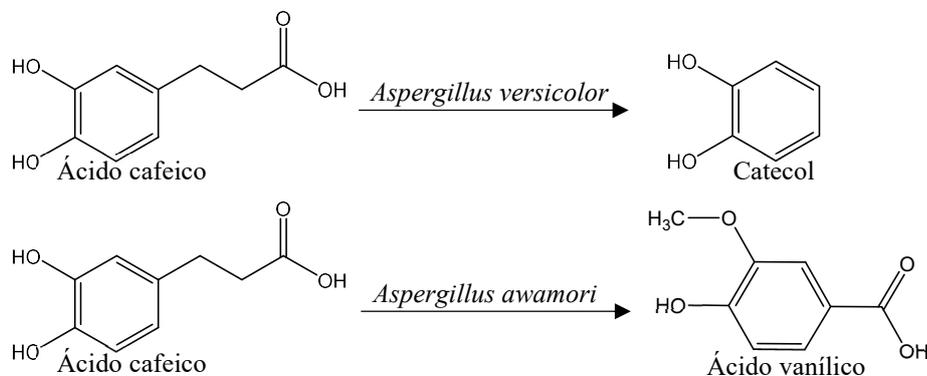
Figura 8 - Derivados obtidos pela biotransformação do ácido ferúlico por *Rhizopus oryzae*



Fonte: Adaptado de Shanker *et al.* (2007)

Ibrahim *et al.* (2020) realizou a bioconversão de ácido cafeico com diferentes cepas, obtendo catecol a partir das culturas de *Aspergillus versicolor* AUMC480, e ácido vanílico através da biotransformação por *Aspergillus awamori* AUMC58 (Figura 9). A avaliação da atividade antimicrobiana revelou que catecol apresentou forte atividade frente a *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*, e ácido vanílico teve a maior atividade contra *Salmonella typhi*.

Figura 9 - Biotransformação do ácido cafeico por *Aspergillus versicolor* AUMC480 e *Aspergillus awamori* AUMC58

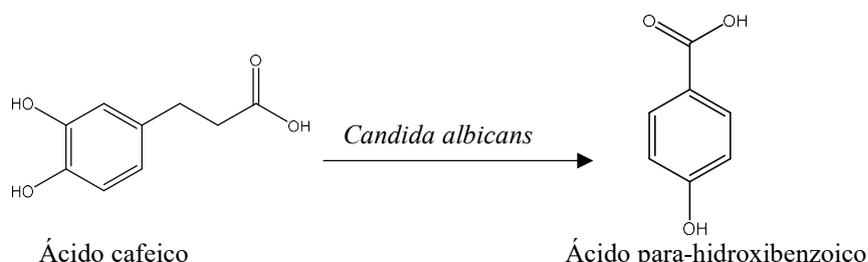


Fonte: Elaborado pelo autor

Singab *et al.* (2018) realizou a biotransformação de ácido cafeico utilizando culturas de

Candida albicans MH356583 obtendo o ácido para-hidroxibenzoico (Figura 10). A avaliação de atividade biológica demonstrou que o metabólito obtido possui promissora atividade antibacteriana frente a *Staphylococcus aureus* e atividade citotóxica frente a células de adenocarcinoma colorretal derivado de cólon humano (Caco-2).

Figura 10 - Biotransformação de ácido cafeico por *Candida albicans* MH356583

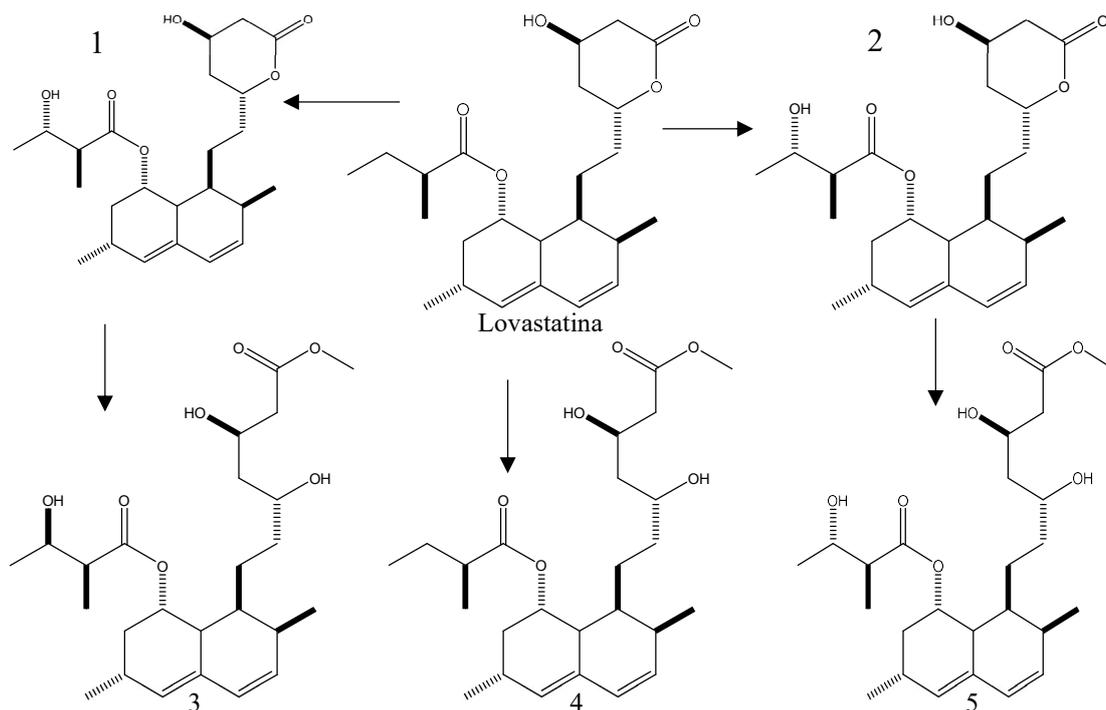


Fonte: Adaptado de Singab *et al.* (2018)

Beauveria bassiana é um fungo filamentosso entomopatogênico comumente utilizado como agente de controle biológico. Além de seu uso no manejo de insetos, essa espécie é frequentemente utilizada como biocatalisador de células inteiras. A grande diversidade de reações catalisadas por *Beauveria bassiana*, incluem hidroxilação, sulfoxidação, desalquilação, glicosilação, acetilação, redução e hidrólise de uma ampla gama de substratos como aminas aromáticas, terpenos e terpenóides, polifenóis e esteróides (Grogan; Holland, 2000; Kozłowska *et al.*, 2018).

A transformação microbiana da lovastatina foi realizada por Qiao *et al.*, (2012), utilizando culturas de *Beauveria bassiana* AS 3.4270, nas quais ocorreram a formação de cinco derivados (1–5) (Figura 11), através de reações que incluíram hidroxilação, hidrólise de lactona e metilação.

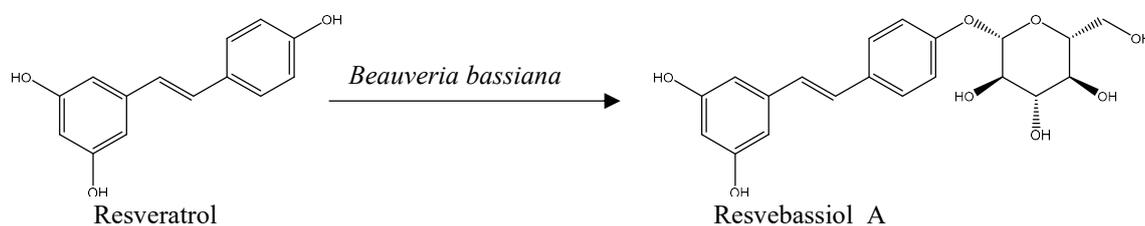
Figura 11 - Derivados obtidos pela biotransformação da lovastatina por *Beauveria bassiana* AS 3.4270



Fonte: Adaptado de Qiao *et al.* (2012)

Diversos autores relatam a capacidade da *Beauveria bassiana* biotransformar compostos fenólicos, gerando derivados inéditos com atividade biológica (Magar; Sohng, 2020; Penso *et al.*, 2014; Sordon *et al.*, 2019; Xie *et al.*, 2018). Em um estudo conduzido por Ha *et al.* (2021), o resveratrol, um polifenol com potencial atividade antioxidante, foi biotransformado por culturas de *Beauveria bassiana* KCCM 60248, gerando o derivado metilglicosilado, resvebassiol A (Figura 12).

Figura 12 - Biotransformação de resveratrol por *Beauveria bassiana* KCCM 60248

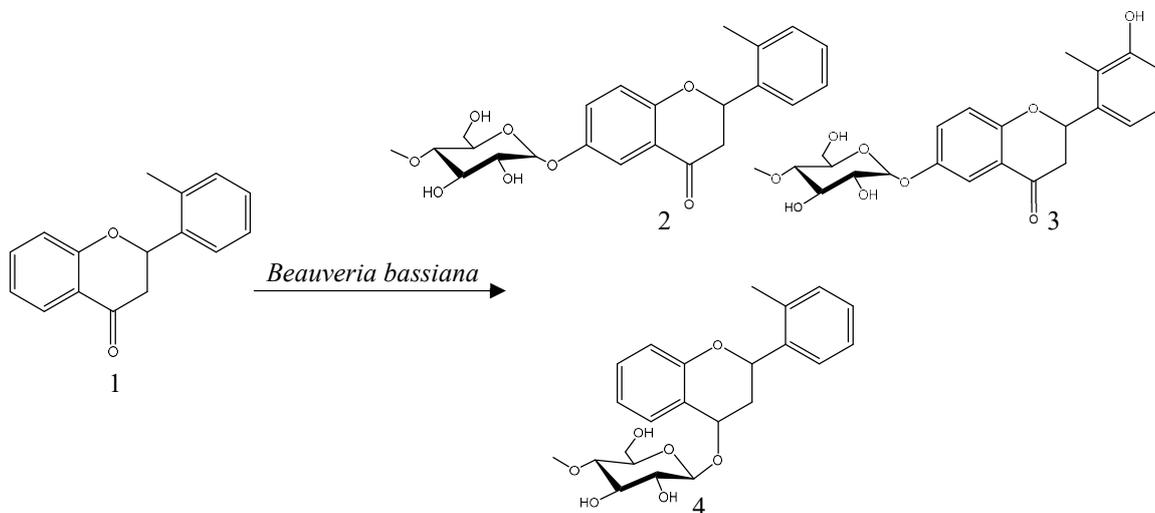


Fonte: Adaptado de Ha *et al.* (2021)

Krawczyk-Łebek *et al.* (2021), produziu flavonoides glicosilados, através da biotransformação fúngica de 2'-metilflavanona (1) catalisada por cepas de *Beauveria bassiana* KCH J1.5, obtendo derivados 2'-metilflavanona 6-*O*- β -D-(4''-*O*-metil)-glucopiranosídeo (2), 3'-hidroxi-2'-metilflavanona 6-*O*- β -D-(4''-*O*-metil)-glucopiranosídeo (3) e 2-(2'-

metilfenil)-cromano 4- *O* - β - D- (4'' -*O* -metil)-glucopiranosídeo (4) (Figura 13).

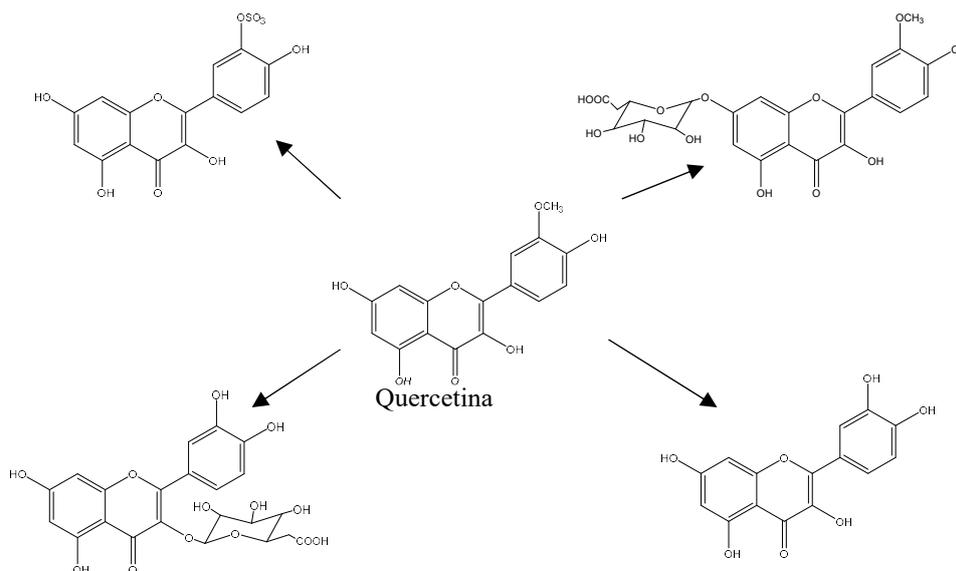
Figura 13 - Derivados obtidos pela biotransformação de 2'-Metilflavanona (1) por culturas de *Beauveria bassiana* KCH J1.5



Fonte: Adaptado de Krawczyk-łebek *et al.* (2021)

Costa *et al.* (2008), realizou a biotransformação da quercetina por *Beauveria bassiana*, obtendo derivados através de glucuronidação, sulfatação e metilação (Figura 14), indicando que os fungos selecionados expressam enzimas metabólicas de fase II que fazem parte do metabolismo de xenobióticos em humanos, o que possibilita o uso deste microrganismo como modelo microbiano para imitar o metabolismo de mamíferos.

Figura 14 - Derivados obtidos pela biotransformação da quercetina por *Beauveria bassiana*

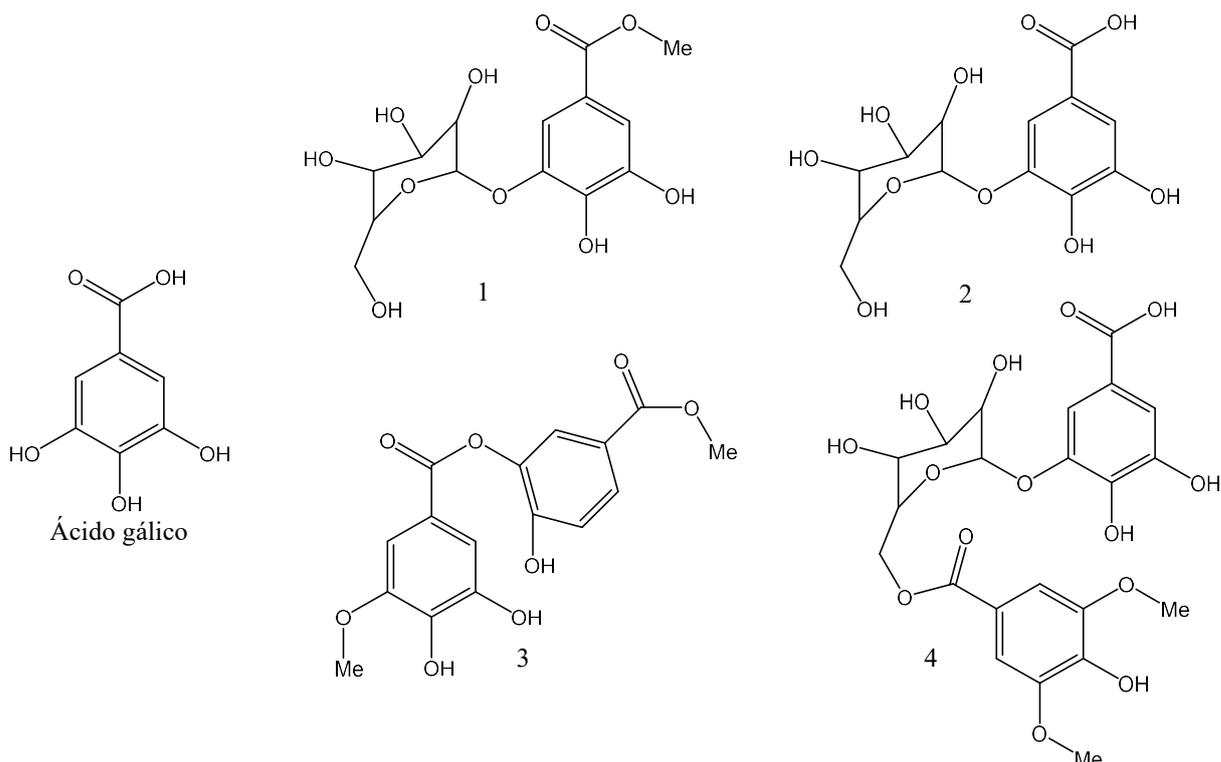


Fonte: Adaptado de Costa *et al.* (2008)

A bioconversão do ácido gálico por espécies de *Beauveria*, foi realizada por diferentes

autores. SILVA (2015) realizou a biotransformação do ácido gálico utilizando cepas de *Beauveria* sp. isoladas a partir de solo do Cerrado brasileiro, obtendo quatro derivados: ácido benzoico, 3-O-metil β -glucopiranosil-galatoester (1); ácido gálico 3-O- β -glucopiranoside (2); ácido 3,4-Diidroxi-5-metoxi-benzoico 2-hidroxi-5-metoxicarbonil-fenil ester (3) e ácido benzóico,4-[[6-O-(3,4-diidroxi-5-metoxibenzoico)- α -D-glucopiranosideo]oxi]-3-hidroxi-5metoxi (4) (Figura 15).

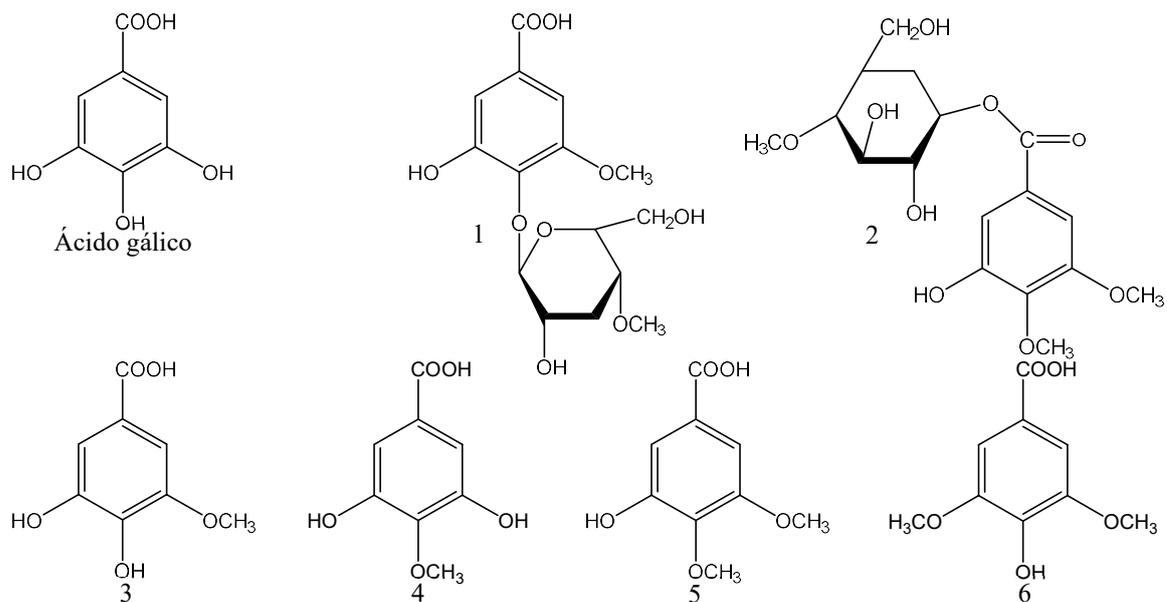
Figura 15 - Derivados obtidos pela biotransformação do ácido gálico por *Beauveria* sp.



Fonte: Adaptado de SILVA (2015)

A biotransformação do ácido gálico por *Beauveria bassiana*, realizada por Hsu *et al.* (2007), resultou na obtenção de seis derivados, dos quais dois foram identificados como compostos glicosilados inéditos: ácido 4-(3,4-di-hidroxi-6-hidroximetil-5-metoxi-tetrahidropiran-2-iloxi)-3-hidroxi-5-metoxi-benzóico (1) e ácido 3-hidroxi-4,5-dimetoxi-benzóico 3,4-di-hidroxi-6-hidroximetil-5-metoxi-tetrahidropiran-2-il éster (2). Além disso, foram isolados outros quatro compostos conhecidos: ácido 3-O-metilgálico (3), ácido 4-O-metilgálico (4), ácido 3,4-O-dimetilgálico (5) e ácido 3,5-O-dimetilgálico (6) (Figura 16).

Figura 16 - Derivados obtidos através da biotransformação do ácido gálico por *Beauveria bassiana*



Fonte: Adaptado de Hsu *et al.*, (2007)

Neste contexto, a biotransformação do ácido gálico por *Beauveria bassiana* ATCC 7159 mostra-se como uma alternativa para produção de moléculas funcionalizadas com potencial atividade frente ao vírus HSV-1 e HSV-2.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

- Produzir derivados do ácido gálico a partir da biotransformação utilizando *Beauveria bassiana* ATCC 7159 e avaliar a atividade antiviral do ácido gálico e dos derivados formados.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar crescimento das culturas de *Beauveria bassiana* ATCC 7159
- Produzir metabólitos do ácido gálico em escala semipreparativa utilizando o fungo *Beauveria bassiana* ATCC 7159;
- Desenvolver método cromatográfico
- Isolar os derivados obtidos, através de processos de cromatografia em coluna clássica (CC), cromatografia em camada delgada (CCD), dissolução fracionada e recristalização;
- Avaliar a citotoxicidade do ácido gálico e dos derivados frente a células Vero E6;
- Avaliar a potencial atividade antiviral do ácido gálico e dos derivados frente aos vírus HSV-1 cepa KOS e HSV-2 cepa 333, através do ensaio de redução de placas de lise utilizando duas estratégias metodológicas: pós-tratamento e ação virucida.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Meios de cultura

3.1.1 Ágar batata

Para cultivo e manutenção dos fungos, foi utilizado o meio de cultura sólido ágar batata, preparado através da diluição de ágar batata dextrose (BDA) em água destilada na concentração de 39 g/1000 mL com aquecimento em micro-ondas de 3 em 3 minutos e agitação com auxílio de bastão de vidro até completa solubilização. Após solubilização foram transferidos 4,5 mL do meio de cultura para tubos de ensaio que foram autoclavados durante 15 minutos a 120 °C. Posteriormente, os tubos foram mantidos inclinados e protegidos da luz até sua total solidificação e estocados em geladeira (4 °C).

3.1.2 *Potato dextrose soy medium (PDSM)*

Para realização do ensaio semipreparativo foi utilizado o meio líquido *Potato Dextrose Soy Medium* (PDSM) que contém: glicose anidra 20 g, cloreto de sódio 5 g, fosfato de potássio monobásico 5 g, lecitina de soja 5 g, peptona 5 g e extrato de levedura 3 g, diluídos em água destilada q.s.p. 1 L. Após preparo foram distribuídos 100 mL do meio em erlenmeyers de boca larga de 250 mL, que foram autoclavados a 120 °C por 15 minutos.

3.2 Biotransformação

3.2.1 *Cultivo e manutenção das cepas*

A linhagem de fungo filamentosos utilizada neste estudo, foi estocada em ágar batata inclinado a uma temperatura de 2-4 °C.

Anteriormente a cada experimento, foram preparadas subculturas por meio do repique dos estoques de *Beauveria bassiana* ATCC 7159 com solução de glicerol 25 % em tubo de ensaio com ágar batata inclinado, que foram incubados a 27 °C em câmara *Biochemical oxygen demand* (B.O.D) por 7 dias.

3.2.2 Biotransformação em escala semipreparativa

Para realização do ensaio em escala semipreparativa foram utilizadas subculturas de *Beauveria bassiana* ATCC 7159 cultivadas conforme descrito na seção 3.2.1 Após sete dias de crescimento, os fungos foram ressuspensos com solução estéril de glicerol 25 % e uma gota da suspensão de esporos foi transferida para erlenmeyers contendo 100 mL de meio de cultura PDSM. As culturas foram incubadas por 65 h a 27 °C e agitação constante de 200 rpm, em incubadora shaker Tecnal TE-424.

Com o objetivo de garantir a viabilidade das culturas, características macroscópicas, como crescimento, coloração, dispersão das hifas e formação de halos de crescimento, foram observadas e comparadas com dados da literatura.

Após 65 h de crescimento, foi adicionado a cada erlenmeyers 1,0 mL de solução de ácido gálico solubilizado em álcool etílico P.A. em uma concentração de 30 mg/mL. Após a adição do substrato, os fungos foram novamente incubados a 27 °C com agitação mecânica de 200 rpm por 168 h.

A linhagem de fungo utilizada nesse estudo, o meio de cultura e o tempo ideal para bioconversão do ácido gálico foram determinados através de *screening* realizado previamente pela equipe do laboratório, no qual os fungos *Cunninghamella echinulata* ATCC 9244, *Aspergillus alliaceus* NRRL 315, *Aspergillus candidus* ATCC 2023, *Cunninghamella elegans* ATCC 36112, *Rhizopus arrhizus* ATCC11145, *Mortierella isabelina* NRRL 1757 e *Beauveria bassiana* ATCC7159 foram inoculados em erlenmeyers contendo 100 mL de PDSM e após 65 h de crescimento foi adicionado o substrato. Em seguida foram retiradas alíquotas a cada 24 h, que foram analisadas por cromatografia em camada delgada (CCD), para observar a formação de derivados.

Após o período de bioconversão, o meio reacional foi filtrado com auxílio de gaze e funil de vidro sinterizado, gerando uma massa fúngica e um filtrado aquoso que foi supersaturado com cloreto de sódio em temperatura ambiente.

A fração aquosa supersaturada, foi novamente filtrada em filtro qualitativo e em seguida submetida ao processo de extração por partição com acetato de etila. Este processo foi realizado adicionando a fração aquosa e o solvente orgânico acetato de etila em funil de separação, submetido a agitação. A fração acetato de etila foi coletada em Erlenmeyer contendo sulfato de sódio anidro, filtrada e o solvente foi removido por meio de secagem em evaporador rotativo a vácuo. Este processo foi repetido até total extração.

Para obtenção de possíveis derivados presentes na massa fúngica, a mesma foi extraída

4 vezes com 100 mL de acetona P.A. em agitador magnético por 20-40 minutos e seca em evaporador rotativo.

3.3 Métodos de separação

3.3.1 *Cromatografia em camada delgada*

A cromatografia em camada delgada foi realizada utilizando cromatofolhas de alumínio DC-Fertigfolien ALUGRAM® Xtra SIL G/UV254, de 20x20 cm, sílica gel 60 F254, com espessura da camada de sílica de 0,20 mm (placa analítica) como fase estacionária. Como fase móvel foram utilizadas diferentes misturas de solventes de acordo com a polaridade dos metabólitos analisados.

Para observação das placas foi utilizado câmara de luz ultravioleta 254 e 365 nm. Também foram utilizados como reveladores vapor de Iodo e vanilina sulfúrica.

A cromatografia em camada delgada preparativa foi realizada utilizando cromatofolhas de alumínio DC-Fertigfolien ALUGRAM® Xtra SIL G/UV254, de 20x20 cm, sílica gel 60 F254 previamente saturada com fase móvel clorofórmio/acetato de etila/acetona/ácido fórmico (8:3:2:1). Após a eluição, as placas foram observadas em câmara UV nos comprimentos de onda de 254 e 365 nm, as bandas foram demarcadas com grafite e foi realizado a raspagem da sílica, que foi extraída com álcool metílico em agitador magnético por 30 minutos à temperatura ambiente.

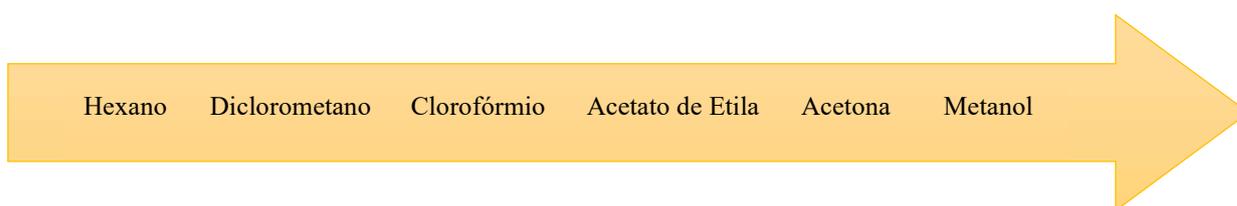
3.3.2 *Cromatografia em coluna*

O método de cromatografia em coluna foi realizado utilizando sílica gel 40-63 µm (230-400 mesh; Sigma) como fase estacionária. Como fase móvel foram utilizadas misturas de solventes contendo acetato de etila, metanol, clorofórmio, ácido fórmico, diclorometano, hexano e acetona em diferentes proporções. As amostras foram coletadas em frascos de vidro e o processo de separação foi acompanhado por CCD. As frações obtidas que possuíam substâncias com mesmo fator de retenção (Rf) foram agrupadas e secas em evaporador rotativo.

3.3.3 Dissolução fracionada e recristalização

A dissolução fracionada foi empregada como purificação adicional dos compostos formados, após os métodos cromatográficos empregados. Inicialmente, foram adicionados solventes orgânicos até solubilização parcial da amostra e em seguida a porção solúvel foi retirada com auxílio de pipeta de pasteur de vidro. Este processo foi repetido com diferentes solventes em ordem de polaridade crescente (Figura 13). As frações obtidas foram analisadas por CCD e agrupadas conforme o Rf dos compostos presentes.

Figura 17 - Ordem de polaridade de solventes



Fonte: Elaborado pelo autor

Também foi empregado o método de recristalização, no qual a amostra foi totalmente solubilizada e posteriormente precipitada através de refrigeração abaixo de 4 °C, ou pela adição de solvente no qual a amostra possui menor solubilidade, formando assim um precipitado. Em seguida o solvente foi removido com pipeta de pasteur de vidro e as amostras obtidas foram analisadas por CCD.

3.4 Avaliação de atividade biológica

3.4.1 Cultivo e manutenção das células

Células originárias de rim de macaco *Cercopithecus aethiops* (células Vero E6) foram utilizadas nos experimentos de avaliação da citotoxicidade e da atividade antiviral. Estas células foram cultivadas em frascos de cultura de 75 cm² contendo 10 mL de meio de cultura Leibovitz (L-15 – Sigma-Aldrich) suplementado com 5 % de soro fetal bovino (SBF – Sigma – Aldrich) e 1 % de solução de antibiótico e antifúngicos (ATB/ solução de 10.000 UI penicilina, 10.000 mg estreptomicina, 25 mg anfotericina B – Sigma – Aldrich) e mantidas a 37 °C em estufa. Periodicamente foi realizado a manutenção destas células, na qual o meio de cultura presente foi descartado e as células foram lavadas 3 vezes com Tampão fosfato (PBS), então foi adicionado uma solução de tripsina para que as células descolassem da parede do frasco de

cultura. A suspensão de célula foi homogeneizada com auxílio de pipeta de pasteur para evitar a aglutinação das células e garantir maior homogeneidade do tapete celular. Posteriormente, foi adicionado 10 mL de meio L-15 + 5 % de SBF e 1 % de ATB, incubando novamente as células em estufa a 37 °C.

3.4.2 Avaliação da citotoxicidade

A avaliação da citotoxicidade foi realizada através do ensaio colorimétrico com Sulforrodamina B (SRB), *in vitro*, descrito por (Vichai; Kirtikara, 2006)(Vichai; Kirtikara, 2006)(Vichai; Kirtikara, 2006)(Vichai; Kirtikara, 2006)(Vichai; Kirtikara, 2006)(Vichai; Kirtikara, 2006). Assim, uma suspensão de células Vero E6, contendo aproximadamente 9×10^4 células/mL, foi obtida através da tripsinização de um frasco de cultura celular. Essa suspensão foi distribuída em uma placa de 96 cavidades (100 µL por cavidade). Após 24 h de incubação, a 37 °C, o meio de cultura foi retirado e foram adicionadas as amostras diluídas em L15 + 1 % de ATB em 8 concentrações diferentes, preparadas em diluição seriada (1:2). Em 4 poços foi adicionado controle com L-15 + ATB 1 % + dimetilsulfóxido (DMSO) 1 % (controle celular com DMSO), e em 8 cavidades foi adicionado apenas L-15 + ATB 1 % para controle celular. A placa foi incubada em uma estufa a 37 °C por 72 h.

Após este período, o meio foi removido das cavidades e as células foram fixadas adicionando 100 µL de solução de ácido tricloroacético (TCA) 10 % resfriado, e a placa foi incubada a 4 °C por uma hora. Após o período de incubação o TCA foi removido e as células foram lavadas 4 vezes com água destilada gelada. Após este procedimento, a placa foi reservada em temperatura ambiente por 24 h para secagem.

Posteriormente, foi adicionado 100 µL de sulforrodamina B em cada cavidade por 30 minutos em temperatura ambiente e em seguida a placa foi lavada com ácido acético 1 % 4 vezes para remoção do corante não ligado às proteínas celulares.

Para realizar a leitura, foi adicionado 100 µL de solução tris base 10mM em cada cavidade e a placa foi agitada por 5 minutos em agitador de mesa para solubilizar o corante ligado às proteínas celulares. Em seguida foi realizado a leitura em espectrofotômetro a 510 nm. Para a determinação do percentual de viabilidade celular de cada amostra, foi calculada a porcentagem em relação a absorbância (ABS) do controle celular pela fórmula:

$$\% \text{ Inibição} = \frac{\text{ABS A}}{\text{ABS CC}} \times 100$$

A concentração capaz de reduzir em 50 % a viabilidade celular (CC_{50}) foi calculado através de análise de regressão, usando como referência os controles celulares, com o programa GraphPad Prism 8.

3.4.3 *Vírus*

Nos experimentos foram utilizados os vírus:

- Herpes simplex vírus tipo 1 (HSV-1) cepa KOS foi gentilmente cedido pela Prof^a. Dr^a. Cláudia Maria Oliveira Simões da Universidade Federal de Santa Catarina;
- Herpes simplex vírus tipos 2 (HSV-2) cepa 333 foi gentilmente cedido pelo Prof. Dr. Tomas Bergstrom, da Universidade de Gotemburg (Suécia).

3.4.3.1 *Preparo das suspensões virais*

A metodologia seguida para preparação das suspensões-estoques foi seguida conforme descrita por Simões, Amoros e Girre (1999), com algumas adaptações conforme exigência de cada vírus e metodologias padrão do laboratório.

As células Vero E6 foram cultivadas em 10 mL de meio de cultura L-15 + 1 % de ATB suplementadas com 5 % de SFB em frascos de cultura de 75 cm², 24 h antes da infecção viral. Posteriormente, o meio de cultura foi removido e a monocamada de células foi lavada três vezes com PBS. A monocamada celular foi então inoculada com 500 µL de suspensão viral + 500 µL de meio L-15 e 1 % de ATB e a garrafa foi incubada a 37 °C por uma hora com homogeneização a cada 15 minutos, para facilitar a adsorção e penetração viral. Após esse período, o excesso da suspensão viral foi removido e foram adicionados 10 mL de meio L-15 + 1 % de ATB e a garrafa foi novamente incubada, monitorando diariamente o efeito citopático viral. Ao observar a infecção total da monocamada celular, a garrafa foi submetida a congelamento a - 80 °C. Posteriormente, foi descongelada e congelada 3 vezes, para total rompimento das membranas celulares e liberação das partículas virais. A suspensão viral foi centrifugada a 4 °C por 3 minutos a 4000 rpm, para separação dos resíduos celulares. A suspensão viral presente no sobrenadante, foi aliquotada em tubos estéreis, titulada e armazenada a - 80 °C.

3.4.3.2 *Titulação viral*

As titulações virais foram realizadas pelo método de placas de lise, seguindo a metodologia de Burleson, Chambers e Wiedbrauk (1992).

As células Vero E6 (2×10^5 células /mL) foram cultivadas em placas de 24 cavidades em meio L-15 + 1 % de ATB + SBF 5 % e incubadas a 37 °C, por 24 horas. Posteriormente, as células foram infectadas com 400 µL de suspensão viral em diluições seriadas na ordem de 1:10 (10^{-2} a 10^{-9}) em duplicatas. As placas foram incubadas a 37 °C por uma hora com homogeneização periódica a cada 15 minutos. Em seguida, removeu-se a suspensão viral e foi adicionada a cada cavidade 1mL do da solução meio L-15 (2x) + carboximetilcelulose (CMC) a 1,5 % na proporção de 1:1 + 1 % de ATB. Posteriormente, as células foram incubadas a 37 °C por três dias para o HSV-1 e dois para o HSV-2. Após o período de incubação, o meio foi retirado e as células foram fixadas e coradas com adição de 200 µL de preto de naftaleno por 40 minutos com agitação constante. O corante foi aspirado e após a secagem em temperatura ambiente, o número de focos de infecção foi observado com auxílio do microscópio estereoscópio.

Após a contagem do número de placas de lise, o título viral foi determinado em unidades formadoras de placas por mL (UFP/mL), através da fórmula

$$TV = NP \times \frac{1}{d} \times \frac{1}{v}$$

TV = Título viral; NP = número médio de placas de lise da última diluição que apresentou focos; d = última diluição em que foram contadas as placas de lise; V = volume da diluição viral utilizada para infectar a monocamada celular (mL).

3.4.3.3 Avaliação da atividade antiviral – método de redução de placas de lise

O ensaio de redução de placas de lise – Pós-tratamento foi realizado seguindo a metodologia proposta por Burleson, Chambers e Wiedbrauk (1992), onde as células Vero E6 (2×10^5 células/mL) foram cultivadas em placas de 24 poços em meio L-15 + 1 % de ATB + SBF 5 % e incubadas a 37 °C, por 24 horas. Após este período, o meio de cultura foi retirado e foi adicionado 400 µL de suspensão viral (50 a 100 UPF por cavidade) preparada em L-15 + ATB 1 % em cada cavidade. A placa foi incubada por uma hora com agitação intermitente a cada 15 minutos. Em seguida, a suspensão viral foi aspirada e foi adicionado 1 mL das diferentes concentrações de cada amostra, a partir da concentração máxima não tóxica, diluídas seriadamente (razão 1:2) em uma solução (1:1) de meio L-15 (2x) + CMC (1,5 %), com 1 % ATB. Posteriormente, as placas foram incubadas a 37 °C, por 72 h para o HSV-1 Cepa KOS e 48 h para o HSV-2 Cepa 333. Para o controle viral somente foi adicionada a solução (1:1) de

meio L-15 (2X) + CMC 1,5 % com 1 % de ATB. Foi utilizado como controle positivo o fármaco aciclovir (ACV – Sigma®) a uma concentração de 15 µg/mL. Após o período de incubação, as amostras foram retiradas e as células foram fixadas e coradas adicionando 200 µL preto de naftaleno e as placas foram mantidas sob agitação durante 40 minutos em temperatura ambiente, e em seguida o corante foi retirado.

A quantificação foi realizada através da contagem visual com o auxílio de uma lupa do número de focos virais. O percentual de inibição de replicação viral é calculado com base na média aritmética do controle viral que indica 100 % de replicação viral através da seguinte fórmula:

$$\% \text{ Inibição} = 100 - \frac{n^{\circ} \text{Focos na amostra}}{n^{\circ} \text{Focos no controle viral}} \times 100$$

A concentração efetiva a 50 % das (CE₅₀) foi obtida por análise de regressão através do programa GraphPad. Com base nos valores de CE₅₀ e CC₅₀ foi calculado o índice de seletividade (IS):

$$\text{IS} = \frac{\text{CC}_{50}}{\text{CE}_{50}} \times 100$$

3.4.3.4 Avaliação da atividade virucida

A infecciosidade residual foi determinada pelo método de placas de lise proposto por Ekblad *et al.* (2010). Assim, células Vero E6 (2x10⁵ células/mL) foram cultivadas em placas de 24 cavidades em meio L-15 + ATB 1 % + SBF 5 % e incubadas a 37 °C, por 24 horas.

Foram utilizados 50 µL de diferentes concentrações decrescentes das amostras (razão 1:2) + 50 µL da suspensão viral contendo 4,0x10⁴ UFP/mL. As soluções obtidas foram então incubadas por 30 minutos. Após este período, 10 µL de cada solução foi adicionada a 990 µL de L-15 + 1 % de ATB, a fim de se obter concentrações não inibitórias das amostras. Como controle viral foram utilizadas as suspensões virais tratadas apenas com meio L-15 e submetidos às mesmas condições que as amostras.

O meio de cultura da placa preparada com 24 horas de antecedência foi aspirado e as células foram lavadas com 500 µL de PBS gelado. O PBS foi aspirado e as células foram infectadas com 400 µL da suspensão viral tratada com a amostra. A placa foi incubada por uma hora a 37 °C com agitação periódica a cada 15 minutos. Após o período de incubação, a

suspensão viral foi removida, as células foram lavadas cuidadosamente com PBS gelado e foi adicionado 1mL da solução (1:1) de meio L-15 (2X) + CMC 1,5 %, com 1 % de ATB. Estas células foram então incubadas a 37 °C, por 72 h para o HSV-1 Cepa KOS e 48 h para o HSV-2 Cepa 333. Após o período de incubação o meio foi retirado e as células foram fixadas e coradas com adição de 200 µL de preto de naftaleno, com agitação constante, por 40 minutos.

A quantificação foi realizada através da contagem visual da placa de lise nos diferentes tratamentos e nos controles virais, e a infecciosidade residual (IR) foi calculada com base no controle viral pela fórmula:

$$\% \text{ IR} = \frac{\text{n}^{\circ}\text{Focos na amostra}}{\text{n}^{\circ}\text{Focos no controle viral}} \times 100$$

A concentração efetiva a 50 % (CE₅₀) com calculada com base na porcentagem de inibição da formação de placa de lise (100 - % IR) através de análise de regressão através do programa GraphPad. Com base nos valores de CE₅₀ e CC₅₀ foi calculado o índice de seletividade.

3.4.4 *Análise estatística*

Os valores de CC₅₀ e CE₅₀ foram estimados por meio de curvas concentração-resposta por análise de regressão utilizando o programa GrafPad Prism 8. Os experimentos foram realizados em duplicata ou triplicata e os resultados expressos por meio da média de dois ou três experimentos independentes testados e desvio padrão.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Biotransformação

4.1.1 Ensaio de biotransformação em escala semipreparativa

Os aspectos macroscópicos do fungo *Beauveria bassiana* estão de acordo com a avaliação de crescimento realizada por Deb, Rajesh e Monika (2017) e Wargane *et al.* (2019), possuindo um aspecto suave, algodinoso e coloração branco amarelada (Figura 18). De acordo com Oliveira *et al.* (2011) e Yadav, Vaghasiya e Thakar (2020) culturas de *Beauveria bassiana* ATCC 7159 incubadas a uma temperatura de $26 \pm 2^\circ\text{C}$ em meio ágar batata, apresentam uma alta densidade de esporos fúngicos, estando de acordo com as condições empregadas neste trabalho e podendo ser consideradas adequadas para o crescimento do fungo e manutenção da linhagem de *Beauveria bassiana* ATCC 7159.

Figura 18 - Crescimento *Beauveria bassiana* ATCC 7159 em ágar batata inclinado



Fonte: Elaborado pelo autor.

Foram realizados 4 ensaios semipreparativos (SP), nas mesmas condições descritas no item 3.2.2. Os fungos utilizados nos ensaios apresentaram um aspecto de massa amorfa com micélios dispersos, coloração levemente amarelada e presença de halos de crescimento (Figura 19). Tais características são descritas por outros autores em culturas de *Beauveria bassiana* em meio líquido PDSM (Cordeiro, 2019; Nóbrega, 2016).

Figura 19 - Crescimento de *Beauveria bassiana* ATCC 7159 em PDSM durante ensaio de e ensaio semipreparativos



Fonte: Elaborado pelo autor

Diversos fatores podem influenciar o processo de bioconversão, como a morfologia do fungo, agitação mecânica, meio de cultura, escolha das cepas, concentração e veículo para adição de substrato, fase de crescimento do fungo e a temperatura. Portanto é necessário avaliar e controlar as condições de cultivo, para garantir melhor rendimento nos processos de biotransformação, bem como garantir a padronização dos metabólitos obtidos (El Enshasy, 2022; Prasad *et al.*, 2011; Qin; Dong, 2023; Varalaxmi; Vidyavathi, 2015).

A escolha do meio de cultura adequado para o processo de biotransformação é uma etapa de grande importância, já que um meio de cultura rico em nutrientes é essencial para o crescimento do fungo e formação de biomassa. Diversos estudos demonstram que a fonte de carbono e nitrogênio escolhidas para suplementar o meio de cultura exerce influência direta na morfologia do fungo e no rendimento do processo de bioconversão (Ito; Reshi, 2014; Khani *et al.*, 2016; Mo; Xu; Zhang, 2005). De acordo com Prasad *et al.* (2008), o aumento da taxa de bioconversão pode estar relacionada com aumento do crescimento dos micélios ou à indução de enzimas responsáveis pela biotransformação.

O meio de cultura PDSM, utilizado como meio reacional para a biotransformação do ácido gálico, também foi empregado em vários trabalhos de biotransformação nos quais os autores relatam seu uso para o crescimento de culturas de *Beauveria bassiana* (Gomes *et al.*, 2013; Moreira *et al.*, 2022; Penso *et al.*, 2014). Esse meio de cultura é rico em nutrientes e

fornece glicose como fonte de carbono e extrato de levedura e peptona como principais fontes de nitrogênio (Souza *et al.*, 2016; Fang *et al.*, 2019).

As enzimas necessitam de faixas de temperatura muito específicas para obterem rendimento máximo. O aumento excessivo da temperatura pode desnaturar proteínas, fazendo com que as enzimas percam sua capacidade de catalisar reações químicas. Por outro lado, temperaturas baixas reduzem a atividade enzimática (Venisetty; Keshetty; Ciddi, 2011).

O crescimento de fungos filamentosos também pode ser afetado pela temperatura. No presente trabalho, a temperatura de 27 °C, adotada para o cultivo de cepas de *Beauveria bassiana* se mostrou adequada para o crescimento fúngico e está de acordo com a faixa de temperatura considerada ideal por outros estudos que demonstram que a maioria das cepas de *Beauveria bassiana* são sensíveis a temperaturas superiores a 30 °C, reduzindo sua viabilidade celular, e que em temperaturas inferiores a 25 °C há uma redução da sua taxa de crescimento (Borisade; Magan, 2014; Mwamburi; Laing; Miller, 2015).

Os níveis de oxigênio podem afetar a transcrição e/ou síntese de diferentes enzimas, resultando em alterações no metabolismo celular e no crescimento do fungo. Deste modo fornecer quantidades adequadas de oxigênio ao meio é essencial para otimizar o rendimento do processo de bioconversão. Em culturas submersas a oxigenação pode ser realizada através da agitação mecânica. O aumento da velocidade de agitação resulta em uma maior solubilidade do oxigênio, melhorando a taxa de bioconversão. Porém, velocidades elevadas de agitação podem provocar a supressão das atividades enzimáticas ou oxidação do produto de interesse pelo excesso de oxigênio. Além disso, os fungos são particularmente sensíveis à força de cisalhamento, e podem ter sua estrutura e morfologia alteradas (De Carvalho, 2016; Yan *et al.*, 2016).

A condição de agitação de 200 rpm empregada neste estudo pode ser considerada apropriada para o fornecimento de oxigênio e crescimento adequado das cepas de *Beauveria bassiana*, tal velocidade de agitação também foi utilizada com sucesso por outros autores em processos de biotransformação fúngica (Carneiro *et al.*, 2010; Pazini, 2006).

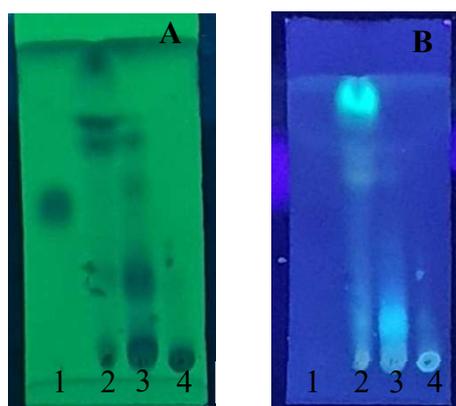
Em culturas submersas, os fungos filamentosos podem apresentar diferentes formas de crescimento, classificados em massa amorfa é caracterizado pela formação de micélios com hifas homogeneamente dispersas, e pellets, caracterizados por micélios formados por uma rede de hifas ramificadas e parcialmente entrelaçadas, que resulta em agregados esféricos estáveis. O aspecto de crescimento é influenciado por diversos fatores que incluem agitação mecânica, a espécie de fungo filamentoso, concentração e viabilidade de esporos utilizados durante a inoculação e o meio de cultura (Papagianni, 2004; Wucherpfennig *et al.*, 2010).

Apesar de culturas com morfologia peletizada possuírem melhores propriedades reológicas, os fungos com micélios dispersos apresentam melhores difusão de nutrientes e de substrato, o que resulta em melhores taxas de crescimento e pode otimizar o rendimento das reações (Amanullah *et al.*, 2000; Veiter; Rajamanickam; Herwig, 2018). Portanto os aspectos morfológicos observados durante os ensaios, pode ser considerado adequado para a biotransformação do ácido gálico.

4.2 Análise e extração de derivados

A partir da extração do meio reacional, foram geradas as frações acetato de etila e fração cetônica. Em ambas as frações, foi possível observar por CCD o consumo do substrato ácido gálico e a formação de derivados após 168 h de incubação (Figura 20).

Figura 20 - Placa de CCD com ácido gálico, fração acetato de etila, fração cetônica, meio PDSM



Legenda: Ácido gálico (1); Fração acetato de etila (2); Fração cetônica (3); Meio PDSM (4). Fase móvel: Clorofórmio/Acetato de etila/Acetona/Ácido fórmico (8:3:2:1). Revelação em luz UV 254 nm (A) e 365 nm (B).
Fonte: Elaborado pelo autor

A extração por partição é um processo fundamental como o primeiro passo da separação de compostos de extratos brutos de produtos naturais, sendo essencial para o processo de isolamento. Este método é baseado na separação de substâncias de acordo com seu coeficiente de partição (Otsuka, 2006).

A extração direta da massa fúngica com acetona é um importante processo para obter derivados internalizados nas células fúngica, reduzindo a perda de metabólitos, com conseqüente melhora do rendimento global. No entanto, através desse processo diversas substâncias são extraídas juntamente aos metabólitos, além de poder acontecer o acúmulo de água proveniente das células fúngicas, o que dificulta o processo de secagem por

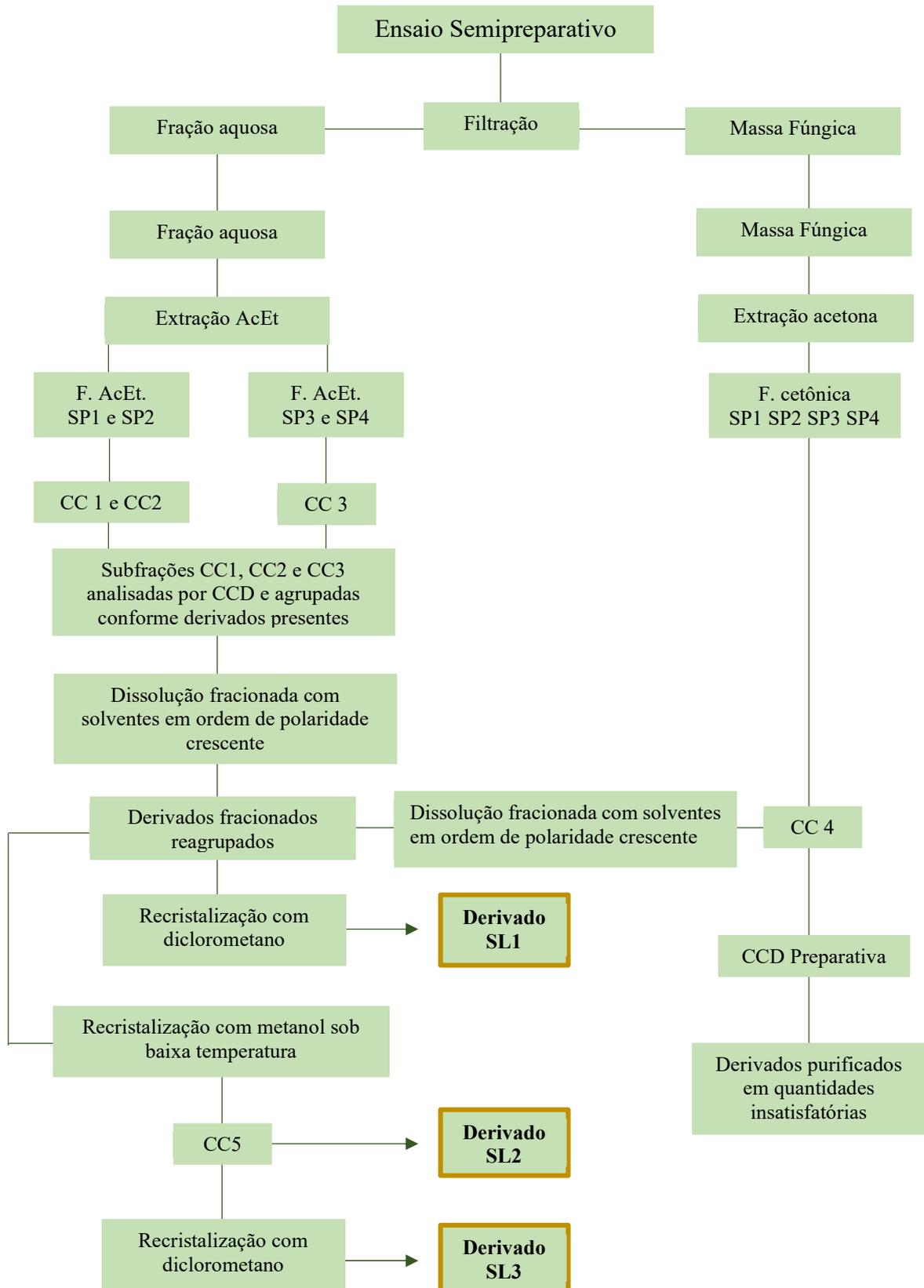
rotaevaporação.

4.3 Purificação dos derivados

Um dos principais desafios nos estudos de produtos naturais, é o isolamento das moléculas de interesse, uma vez que estes compostos possuem diferentes padrões estruturais e propriedades físico-químicas, e normalmente são encontrados em matrizes complexas junto a diversos compostos (Talapatra; Talapatra, 2015). De acordo com Sarker e Nahar (2012), um protocolo apropriado para extração e isolamento só pode ser elaborado depois que os compostos alvo estiverem estabelecidos, portanto, para a purificação de produtos naturais desconhecidos é necessário desenvolver métodos piloto de extração e isolamento para descobrir o mecanismo mais adequado para a amostra.

O processo de purificação dos derivados obtidos por biotransformação do ácido gálico é ilustrado na Figura 21.

Figura 21 - Esquema do processo de purificação dos derivados de ácido gálico

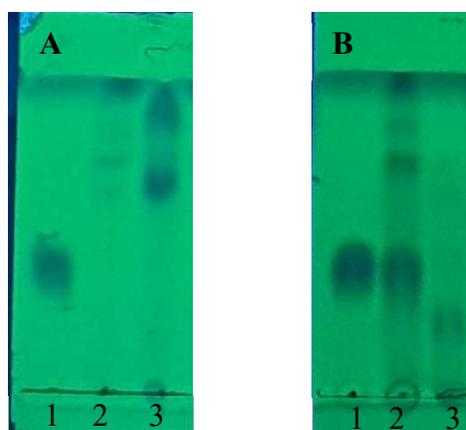


Fonte: Elaborado pelo autor

Para purificação dos derivados obtidos foi utilizado inicialmente cromatografia em coluna, na qual a fase móvel utilizada foi uma mistura de solventes orgânicos. A escolha da fase móvel foi determinada através de testes utilizando CCD em estudos prévios realizados pela equipe do laboratório.

A fase móvel de escolha para as colunas cromatográficas 1 (CC1) e 2 (CC2), realizadas com as frações acetato de etila dos ensaios SP1 e SP2 respectivamente, foi uma mistura de solventes contendo clorofórmio/acetato de etila/acetona/ácido fórmico (8:3:2:1). As subfrações coletadas a partir das colunas cromatográficas CC1 e CC2 foram comparadas e agrupadas conforme os derivados presentes (Figura 22).

Figura 22 - Placas de CCD com ácido gálico e subfrações (agrupadas) obtidas por cromatografia CC1 e CC2.

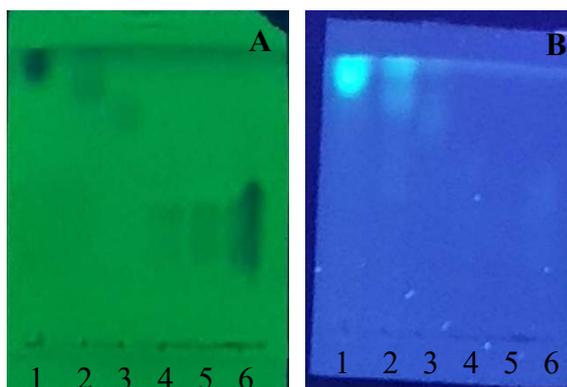


Legenda: **A:** Ácido gálico (1), subfração 1 (2), subfração 2 (3); **B:** Ácido gálico (1), subfração 3 (2), subfração 4 (3). Fase móvel: clorofórmio/acetato de etila/acetona/ácido fórmico (8:3:2:1). Visualização em 254 nm
Fonte: Elaborado pelo autor

As frações acetato de etila dos ensaios SP3 e SP4 foram associadas para realização da coluna cromatográfica CC3. Na tentativa de melhorar o processo de purificação por cromatografia em coluna foram utilizadas três fases móveis em sequência, sendo clorofórmio/acetato de etila/metanol (60:30:4), acetona/metanol/acetato de etila/diclorometano (2:0,5:0,5:2) e acetona/metanol/acetato de etila/diclorometano/água (2:0,6:0,5:0,8:0,2).

Inicialmente foi utilizado a fase móvel clorofórmio/acetato de etila/metanol (60:30:4) para melhor separação dos derivados apolares como observado na Figura 19, a fase móvel empregada gerou frações com derivados apolares melhores separados se comparado à fase móvel clorofórmio/acetato de etila/acetona/ácido fórmico (8:3:2:1) representadas na Figura 23.

Figura 23 - Compostos apolares obtidos por cromatografia CC3

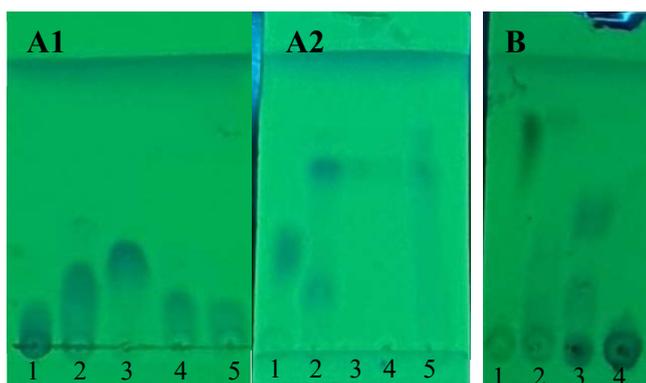


Legenda: Placa de CCD com subfração 1 (1), subfração 2 (2), subfração 3 (3), subfração 4 (4), subfração 5 (5), subfração 6 (6) em fase móvel: clorofórmio/acetato de etila/metanol (60:30:4). Visualização em 254 nm (A) e 365 nm (B). Subfrações coletadas a partir da coluna cromatográfica CC3.

Fonte: Elaborado pelo autor

Após a coleta das frações que continham os derivados apolares e a observação da presença de ácido gálico em algumas frações, a fase móvel foi trocada para acetona/metanol/acetato de etila/diclorometano (2:0,5:0,5:2) com o intuito de separar os produtos mais polares (Figura 24-A2). Como alguns derivados estavam ficando retido na linha de aplicação devido a polaridade mais alta, após a separação utilizando a fase móvel acetona/metanol/acetato de etila/diclorometano (2:0,5:0,5:2) foi utilizado acetona/metanol/acetato de etila/diclorometano/água (2:0,6:0,5:0,8:0,2) (Figura 24-B).

Figura 24- Derivados polares obtidos por cromatografia CC3



Legenda: **Figura A:** Placa de CCD com ácido gálico (1), subfração 7 (2), subfração 8 (3), subfração 9 (4), subfração 10 (5). Fase móvel clorofórmio/acetato de etila/metanol (60:30:4) (A1); Fase móvel acetona/metanol/acetato de etila/diclorometano (2:0,5:0,5:2) (A2). **Figura B:** Ácido gálico (1), subfração 11 (2), subfração 12 (3), subfração 13 (4) em fase móvel acetona/metanol/acetato de etila/diclorometano/água (2:0,6:0,5:0,8:0,2). Visualização em 254 nm. Subfrações coletadas a partir da coluna cromatográfica CC3.

Fonte: Elaborado pelo autor

Para purificação inicial da fração cetônica, dentre as fases móveis testadas, a que demonstrou melhor separação dos derivados foi acetona/metanol/acetato de etila/diclorometano

(2:0,5:0,5:2) e, portanto, foi escolhida para a coluna cromatográfica CC4 (Figura 25).

Figura 25 - Subfrações coletadas a partir da coluna cromatográfica CC4



Legenda: Placa de CCD com derivados polares purificados por cromatografia em coluna a partir da fração cetônica. Fase móvel: Acetona/metanol/acetato de etila/diclorometano (2:0,5:0,5:2). Visualização em 254 nm. Fonte: Elaborado pelo autor.

Como as condições empregadas na separação da fração cetônica não purificaram adequadamente os produtos, as subfrações obtidas na coluna CC4 foram analisadas por CCD utilizando diferentes fases móveis para que as mesmas pudessem ser agrupadas e posteriormente purificadas. Para separação dos compostos de menor polaridade foram testadas como fase móvel clorofórmio/acetato de etila/acetona/ácido fórmico (8:3:2:1) e acetona/metanol/acetato de etila/diclorometano (2:0,5:0,5:2), e para substâncias mais polares acetona/metanol/acetato de etila/diclorometano/água (2:0,6:0,5:0,8:0,2).

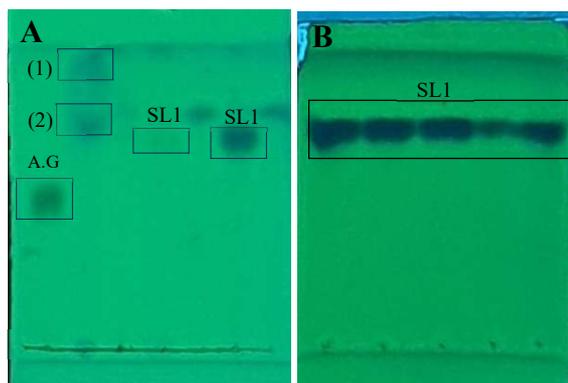
Considerando que os processos iniciais de cromatografia em coluna das frações acetato de etila e cetônica não geraram derivados puros foi necessário realizar purificação adicional das subfrações obtidas. Inicialmente foi realizada a dissolução fracionada de todas as subfrações e estas foram agrupadas conforme a polaridade dos derivados para posterior separação por cromatografia em camada delgada preparativa, cromatografia em coluna, e recristalização.

O método de recristalização é amplamente utilizado no processo de purificação de amostras, e se baseia na diferença de solubilidade que amostras possuem com base em sua polaridade (Hermanto; Chow; Tan, 2012).

As subfrações obtidas por cromatografia em coluna foram submetidas a purificação adicional por recristalização, onde foram solubilizadas parcialmente em diferentes solventes.

As subfrações contendo derivados mais apolares que o ácido gálico, foram inicialmente tratadas com hexano, para remoção de impurezas de menor polaridade. Em seguida foram recristalizadas com diclorometano, a partir do qual foi possível obter o derivado SL1 (precipitado) (Figura 26).

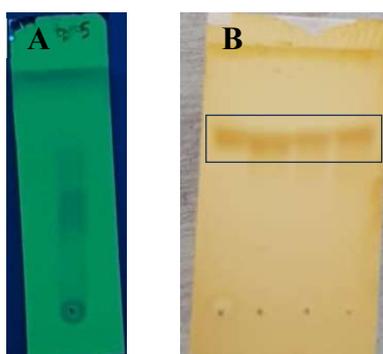
Figura 26 - Subfrações recristalizadas e derivado SL1



Legenda: A: Ácido gálico (A.G), derivados apolares (1), (2) e SL1. B: Derivado apolar 3 (SL1) obtido por recristalização com diclorometano (B). Fase móvel: clorofórmio/acetato de etila/acetona/ácido fórmico (8:3:2:1). Visualização em 254 nm.
Fonte: Elaborado pelo autor

O processo de recristalização foi repetido com todas as amostras, utilizando hexano, diclorometano, clorofórmio, acetato de etila, acetona e metanol em ordem de polaridade crescente. As amostras foram comparadas por CCD e agrupadas conforme os derivados presentes. As frações solúveis em diclorometano e clorofórmio foram posteriormente recristalizadas com metanol sob baixa temperatura, o sobrenadante foi aspirado e purificado por cromatografia em coluna CC5, utilizando como fase móvel acetato de etila/hexano/diclorometano/metanol/clorofórmio/ácido fórmico (1:1:1,5:0,5:1:0,15). Através dessa coluna cromatográfica foi possível obter o derivado SL2 (Figura 27).

Figura 27 - Subfração obtida por recristalização e derivado SL2

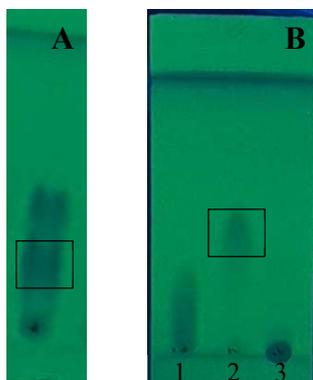


Legenda: Fração purificada por recristalização (A). Derivado obtido por cromatografia revelado em vapor de Iodo (B). Fase móvel clorofórmio/acetato de etila/metanol (60:30:4)
Fonte: Elaborado pelo autor

A partir da coluna cromatográfica (CC5) foi obtida uma amostra contendo principalmente 2 derivados, que foram submetidos a recristalização. A fração foi solubilizada em acetona e posteriormente foi acrescentado diclorometano. A amostra foi resfriada abaixo de

4 °C e a porção solúvel foi evaporada e tratada com hexano para remoção de impurezas, dando origem ao derivado SL3 (Figura 28).

Figura 28- Subfração e derivado SL3



Legenda: **A:** Fração obtida por cromatografia CC5 contendo derivado SL3. Fase móvel: Acetato de etila/hexano/diclorometano/metanol (1:1:3:0,2). **B:** Ácido gálico (1), derivado SL3 (2), meio PDSM (3). Fase móvel clorofórmio/acetato de etila/metanol (60:30:4).

Fonte: Elaborado pelo autor

Duas frações obtidas a partir da coluna CC4 foram submetidas a cromatografia em camada delgada preparativa realizadas em duas diferentes placas preparativas 1 (PP1) e 2 (PP2) utilizando como fase móvel clorofórmio/acetato de etila/acetona/ácido fórmico (8:3:2:1) (Figura 29).

Figura 29- Frações obtidas por cromatografia (CC4) submetidas a CCD preparativa PP1 e PP2



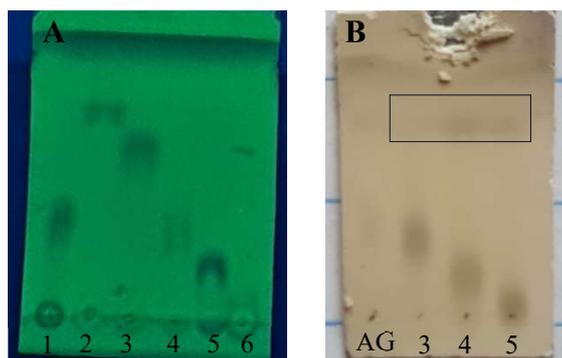
Legenda: **A:** subfrações submetidas a placa preparativa 1 (1) e (2). **B** Bandas submetidas a processo de remoção e extração da sílica nas placas preparativas PP1 (**B1**) e PP2 (**B2**). Fase móvel: clorofórmio/acetato de etila/acetona/ácido fórmico (8:3:2:1). Amostras

Fonte: Elaborado pelo autor

Através das placas preparativas foi possível obter compostos com maior grau de pureza em relação à fração inicial, porém em pequenas quantidades: amostra 1 teve um rendimento total de 13 mg, a amostra 2 teve um rendimento de 1,8 mg, amostra 3 de 8,2 mg, e as amostras 4 e 5 tiveram um rendimento total de 23,5 e 13,2 mg respectivamente. As amostras 1 e 2

apresentaram maior grau de pureza, no entanto em quantidades insuficientes para elucidação estrutural e testes biológicos. As amostras 3, 4 e 5 apresentaram impurezas ao serem revelados com vanilina sulfúrica (Figura 30). De acordo com Zhang, Lin e Ye (2018), uma das limitações da cromatografia de adsorção em sílica é quimissorção irreversível, que pode acontecer principalmente em produtos naturais de alta polaridade. Isso resulta em uma menor taxa de recuperação do produto, com conseqüente redução do rendimento.

Figura 30- Amostras obtidas por placa preparativa PP1 e PP2



Legenda: Placa A: ácido gálico, amostras 1, 2, 3 4 e 5. Fase móvel: acetona/metanol/acetato de etila/diclorometano (2:0,5:0,5:2). Visualização em 254 nm; Placa B: Ácido gálico; amostras 3, 4 e 5. Fase móvel: acetona/metanol/acetato de etila/diclorometano (2:0,5:0,5:2). Revelada com vanilina sulfúrica.

Fonte: Elaborado pelo autor

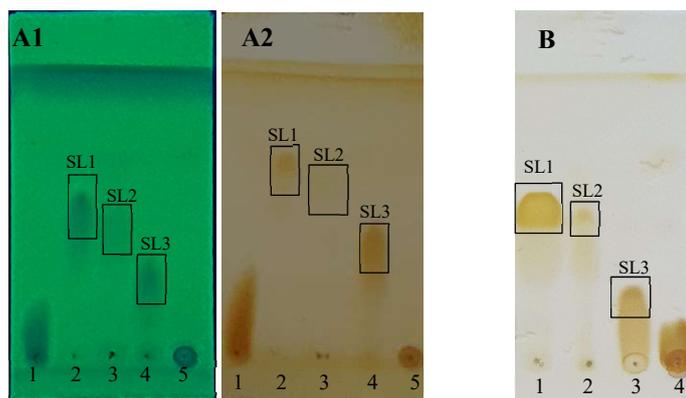
4.4 Derivados obtidos

Foram obtidos três derivados com quantidades suficientes para realização dos ensaios de atividade antiviral e elucidação estrutural.

A Figura 31 mostra que os 3 derivados obtidos possuem Rf diferentes entre si, e que são produtos distintos dos compostos presentes no meio de cultura. Ao realizar CCD com fase móvel diclorometano/acetato de etila/metanol (8:1:0,7) o derivado SL1 possui Rf 0,55, o derivado SL2 possui Rf 0,39 e o derivado SL3 possui Rf 0,27. Todos os derivados são visíveis no comprimento de onda de 254 nm e apresentam coloração amarelada quando revelados com iodo ressublimado. O iodo é um revelador universal, capaz de identificar compostos com duplas ligações (Simões *et al.*, 2016).

Estão em andamento as análises espectrométricas de ressonância magnética nuclear de ^1H , HSQC, HMBC e ^{13}C , e espectrometria de massa para elucidação estrutural dos derivados SL1, SL2 e SL3.

Figura 31- Derivados obtidos pela biotransformação do ácido gálico com *Beauveria bassiana* ATCC 7159



Legenda: **Figura A:** Ácido gálico (1), SL1 (2), SL2 (3), SL3 (4), PDSM (5). Fase móvel diclorometano/acetato de etila/metanol (8:1:0,7). Visualização em 254 nm (A1) e revelação com iodo ressublimado (A2). **Figura B:** SL1 (1), SL2 (2), SL3 (3), PDSM + ácido gálico 168h (4) revelado com iodo ressublimado

Fonte: Elaborado pelo autor

4.5 Avaliação da atividade biológica

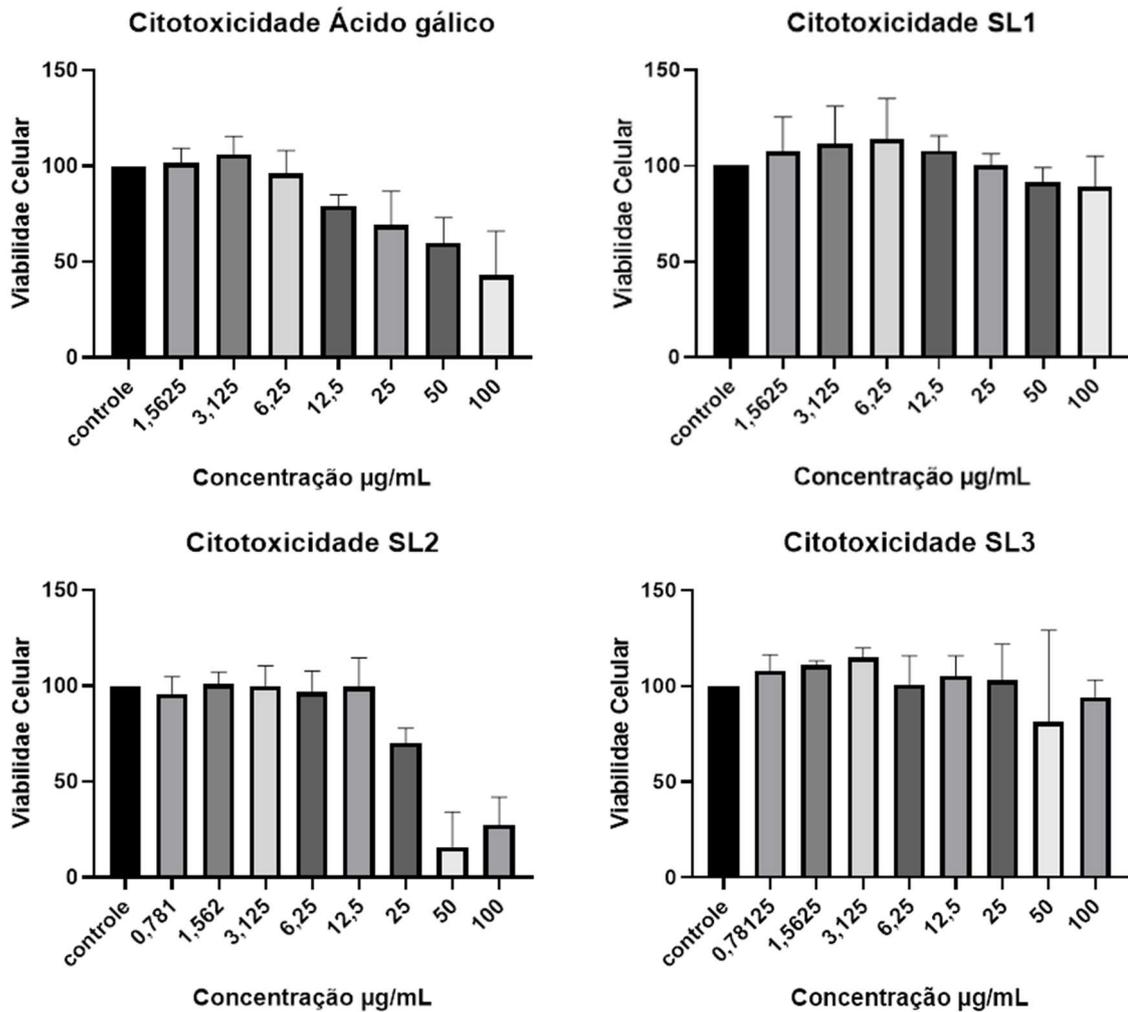
4.5.1 Avaliação de citotoxicidade

A citotoxicidade do ácido gálico e das amostras SL1, SL2 e SL3 foi avaliada através do método da sulforrodamina B. De acordo com Shakil *et al.*, (2022), o ensaio de sulforrodamina B (SRB) tem sido uma escolha popular devido à sua simplicidade, precisão, confiabilidade e reprodutibilidade. Este método é baseado na capacidade que a sulforrodamina B tem de se ligar às proteínas celulares em condições levemente ácidas. Ao remover o excesso, a quantidade de sulforrodamina B presente na amostra é diretamente proporcional às células integras. Deste modo, o corante é solubilizado em condições básicas, permitindo a medição de densidade ótica. Entre as vantagens de se utilizar este método, está a sua estabilidade por longo período de tempo e menor variação quando aplicado a diferentes linhagens celulares em comparação a ensaios colorimétricos, como por exemplo, com ensaio colorimétrico com o sal de tetrazólio (MTT) (Nedel *et al.*, 2011; Pawar; Dwivedi, 2023).

Os resultados das porcentagens de viabilidade celular obtidas através do ensaio de avaliação da citotoxicidade através do método da Sulforrodamina B estão descritos na Figura 32. É possível observar que as amostras SL1 e SL3 possuem menor citotoxicidade quando comparado ao ácido gálico e à amostra SL2, não demonstrando toxicidade na concentração máxima testada de 100 µg/mL. A amostra SL2 apresentou maior toxicidade que o ácido gálico nas concentrações de 50 µg/mL e 100 µg/mL.

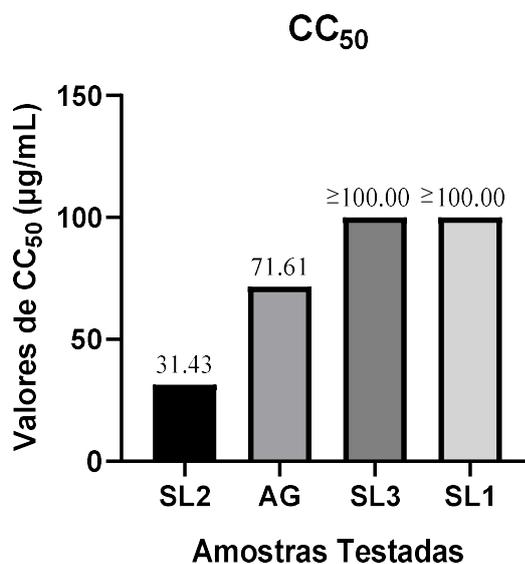
Antes da determinação da citotoxicidade através do ensaio da SRB, foi determinado visualmente para cada amostra a concentração máxima não tóxica (CMNT). Esta análise foi realizada através da visualização microscópica da morfologia e alterações celulares presentes na monocamada celular, utilizando o microscópio invertido. As concentrações máximas não tóxicas (CMNT) foram iguais a 12,5 µg/mL e 25 µg/mL para o ácido gálico e amostra SL2, respectivamente. As amostras SL1 e SL3 exibiram valores de CMNT superior a 100 µg/mL.

Figura 32 - Citotoxicidade do ácido gálico e derivados SL1, SL2, SL3



Fonte: Elaborado pelo autor

Através de análise de regressão linear, foram calculadas as concentrações citotóxicas a 50 % (CC₅₀) de cada amostra (Figura 33). As amostras SL1 e SL3 apresentaram os valores de CC₅₀ maior do que 100 µg/mL. O ácido gálico demonstrou uma CC₅₀ de 71,61 ± 7,02 µg/mL e o derivado SL2 apresentou um valor de CC₅₀ igual a 31,43 ± 2,40 µg/mL.

Figura 33- CC₅₀ do ácido gálico e derivados SL1, SL2, SL3

Fonte: Elaborado pelo autor

4.5.2 Atividade antiviral

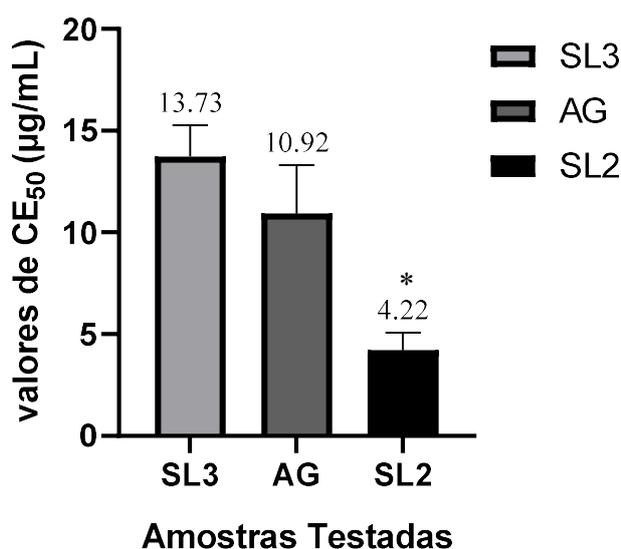
Para os ensaios antivirais foram utilizadas as suspensões virais de HSV-1 Cepa KOS e HSV-2 Cepa 333 com os títulos iguais a $8,75 \times 10^6$ UFP/mL e $4,18 \times 10^6$ UFP/mL, respectivamente.

Durante ensaio de pós tratamento, a amostra teste é aplicada após a adsorção viral na célula permitindo investigar a ação direta dos compostos na inibição do ciclo de replicação viral (Ripim *et al.*, 2018), deste modo o método de redução de placas de lise, em relação ao ensaio do pós-tratamento revelou que a amostras SL1, SL2 e SL3 apresentaram somente 14,7 %, 38,7 % e 11,45 % de inibição da replicação do vírus HSV-1 cepa KOS, respectivamente, nas CMNT, enquanto o ácido gálico apresentou maior inibição da replicação do vírus HSV-1 cepa com valores de concentração efetiva (CE₅₀) igual a $6,68 \pm 1,15$ µg/mL e um IS igual a 10,44. Os resultados obtidos com o ácido gálico frente ao HSV-1 cepa KOS estão de acordo com a literatura. Estudo anterior descreveu que o ácido gálico apresentou atividade contra entre vírus apresentado um valor de IS igual a 11,72 (Kratz *et al.*, 2008). O ácido gálico apresentou 100 % de inibição da replicação do vírus HSV-2 cepa 333 em 12,5 µg/mL, maior concentração testada no pós-tratamento e a amostra SL1 apresentou somente 37,50 % de inibição da replicação do vírus HSV-2 cepa 333 em 100 µg/mL, maior concentração testada no mesmo ensaio, os derivados SL2 e SL3 não apresentaram atividade inibição frente ao HSV-2 cepa 333. O aciclovir foi utilizado como controle positivo e apresentou 100 % de inibição da replicação viral

na concentração testada de 15 µg/mL.

O estudo da atividade virucida frente ao HSV-1 cepa KOS, avaliada através do método de redução de placa de lise demonstrou que o derivado SL1 que apresentou somente 33,21 ± 3,54 % de inibição da infecciosidade residual, não sendo possível calcular sua CE₅₀. O ácido gálico apresentou CE₅₀ igual a 10,92 ± 2,39 µg/mL e os derivados SL1 e SL2 apresentaram CE₅₀ igual a 4,21 ± 0,74 µg/mL e 13,73 ± 1,52 µg/mL respectivamente. As diferenças significativas foram avaliadas por One-way ANOVA com teste de comparação múltipla de Tukey, que revelou maior atividade virucida da amostra SL2 em comparação ao ácido gálico e ao derivado SL3 (P < 0,05), o derivado SL3 não apresentou diferença estatisticamente significativa em comparação ao ácido gálico (P > 0,05). A concentração efetiva a 50 % (CE₅₀) dos derivados frente ao HSV-1 cepa KOS é demonstrada na Figura 34:

Figura 34- CE₅₀ do ácido gálico e derivados SL1, SL2, SL3



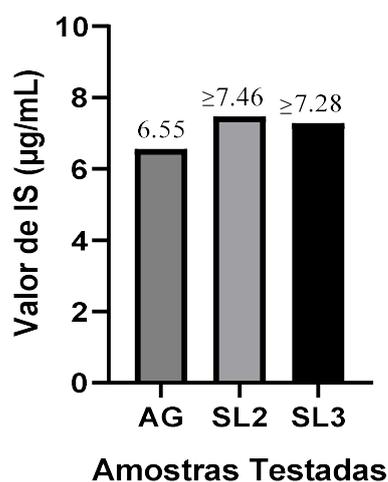
Legenda: CE₅₀ do ácido gálico e dos derivados SL2 e SL3. * P < 0,05

Fonte: Elaborado pelo autor

O índice de seletividade das amostras é um importante indicador da potencial atividade de uma determinada molécula, pois leva em consideração uma relação entre a atividade de interesse e a toxicidade do material testado (Robles-Loaiza *et al.*, 2022). Quando se avalia a efetiva atividade antiviral é necessário considerar os valores de CC₅₀ e de CE₅₀, através do índice de seletividade. Assim, mesmo que o derivado SL2 apresentou uma maior ação virucida do que o ácido gálico e o derivado SL3, quando se avalia os índices de seletividade (Figura 35) pode-se verificar que não há diferença entre os IS obtidos e que estes derivados apresentaram atividade virucida equivalente ao ácido gálico. De acordo com diversos autores, compostos que

apresentam um índice de seletividade superior a 4 podem ser considerados agentes antivirais promissores (Bag *et al.*, 2013; Hochheim *et al.*, 2019; Savi *et al.*, 2010; Theerawatanasirikul *et al.*, 2021), portanto, o ácido gálico, assim como seus derivados obtidos por biotransformação apresentaram potencial atividade virucida frente ao HSV-1 cepa KOS.

Figura 35- Índice de seletividade do ácido gálico e derivados SL1, SL2, SL3



Fonte: Elaborado pelo autor

A atividade virucida permite avaliar a ação direta das amostras sobre as partículas virais, e a consequente diminuição da sua capacidade infecciosa (Galabov, 2007). Devido à natureza crônica do HSV, a ausência de tratamentos capazes eliminar completamente o vírus do hospedeiro e a inexistência de vacinas eficazes, a obtenção de derivados com atividade virucida é particularmente vantajosa, pois representa uma alternativa promissora para o controle da transmissão viral, permitindo a produção formulações tópicas que podem prevenir entrada do vírus em pessoas soronegativa (Sauerbrei *et al.*, 2016; Suazo *et al.*, 2015). Além de seu caráter preventivo, o uso tópico de substâncias virucidas, pode agir de maneira sinérgica às terapias antivirais convencionais, minimizando a seleção de cepas resistentes (Sicurella *et al.*, 2021).

5 CONCLUSÃO

As condições empregadas na biotransformação do ácido gálico por *Beauveria bassiana* ATCC 7159, bem como as condições de isolamento dos derivados, foram consideradas adequadas.

Através da biotransformação do ácido gálico, foi possível obter três derivados (SL1, SL2 e SL3) em quantidades satisfatórias para determinação da citotoxicidade, atividade antiviral e determinação estrutural.

O ensaio de sulforrodamina B revelou que o SL1 e SL3, tiveram citotoxicidade reduzida em comparação com o ácido gálico. O SL2 se mostrou mais citotóxico que seu precursor.

O ácido gálico apresentou atividade antiviral e virucida frente ao HSV-1 cepa KOS.

Os derivados SL2 e SL3, apresentaram atividade virucida equivalente ao do ácido gálico, no ensaio virucida frente ao HSV-1 Cepa KOS, porém com menor atividade antiviral.

O derivado SL3 não demonstrou promissoras atividades antivirais e virucida frente aos vírus HSV-1 cepa KOS e HSV-2 cepa 333 quando comparada com as atividades do ácido gálico, frente aos mesmos vírus.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUIRRE-PRANZONI, C. *et al.* Coumarin metabolic routes in *Aspergillus* spp. **Fungal Biology**, v. 115, n. 3, p. 245–252, 2011.

AL ZAHRANI, N. A.; EL-SHISHTAWY, R. M.; ASIRI, A. M. Recent developments of gallic acid derivatives and their hybrids in medicinal chemistry: a review. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 204, p. 112609, 2020.

ALANDIJANY, T. Host intrinsic and innate intracellular immunity during herpes simplex virus type 1 (HSV-1) infection. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, p. 490513, 2019.

ALVARADO, I. E. *et al.* Fungal biotransformation of p-coumaric acid into caffeic acid by *Pycnoporus cinnabarinus*: An alternative for producing a strong natural antioxidant. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 19, n. 2, p. 157–160, 2003.

ALY, A. H.; DEBBAB, A.; PROKSCH, P. Fifty years of drug discovery from fungi. **Fungal Diversity**, v. 50, n. 1, p. 3–19, 2011.

AMANULLAH, A. *et al.* Agitation induced mycelial fragmentation of *Aspergillus oryzae* and *Penicillium chrysogenum*. **Biochemical Engineering Journal**, v. 5, n. 2, p. 109–114, 2000.

ARUNRATTIYAKORN, P. *et al.* Biotransformation of β -mangostin by an endophytic fungus of *Garcinia mangostana* to furnish xanthenes with an unprecedented heterocyclic skeleton. **Journal of Natural Products**, v. 81, n. 10, p. 2244–2250, 2018.

AUTORE, G. *et al.* Update on viral infections involving the central nervous system in pediatric patients. **Children**, v. 8, n. 9, p. 782, 2021.

BADHANI, B.; SHARMA, N.; KAKKAR, R. Gallic acid: a versatile antioxidant with promising therapeutic and industrial applications. **RSC Advances**, v. 5, n. 35, p. 27540–27557, 2015.

BAG, P. *et al.* An indole alkaloid from a tribal folklore inhibits immediate early event in HSV-2 infected cells with therapeutic efficacy in vaginally infected mice. **PLOS ONE**, v. 8, n. 10, p. e77937, 2013.

- BAI, J. *et al.* Gallic acid: pharmacological activities and molecular mechanisms involved in inflammation-related diseases. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 133, p. 110985, 2021.
- BELL, E. L. *et al.* Biocatalysis. **Nature Reviews Methods Primers** 2021, v. 1, n. 1, p. 1–21, 2021.
- BERNARDINI, S. *et al.* Natural products for human health: an historical overview of the drug discovery approaches. **Natural Product Research**, v. 32, n. 16, p. 1926–1950, 2018.
- BHATLA, S. C.; LAL, M. A. **Plant physiology, development and metabolism**. 1. ed. Singapore: Springer, 2023. p. 765–808.
- BHATTA, A. K. *et al.* Vertical transmission of herpes simplex virus: an update. **JDDG: Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft**, v. 16, n. 6, p. 685–692, 2018.
- BORISADE, O. A.; MAGAN, N. Growth and sporulation of entomopathogenic *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae*, *Isaria farinosa* and *Isaria fumosorosea* strains in relation to water activity and temperature interactions. **Biocontrol Science and Technology**, v. 24, n. 9, p. 999–1011, 2014.
- BRUCE, S. O.; BRUCE, S. O. Secondary metabolites from natural products. **Secondary Metabolites - Trends and Reviews**, 2022.
- BRUNATI, M. *et al.* Biotransformations of cinnamic and ferulic acid with actinomycetes. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 34, p. 3–9, 2004.
- BURLESON, F. G.; CHAMBERS, T. M.; WIEDBRAUK, D. L. **Virology: a laboratory manual**. 1. ed. San Diego: Academic Press, 1992.
- CALDAS, L. Q. A. *et al.* *Uncaria tomentosa* in the treatment of the herpes labialis. **Brazilian Journal of Sexually Transmitted Diseases**, v. 22, n. 2, p. 57–59, 2010.
- CALIXTO, J. B. The role of natural products in modern drug discovery. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 91, p. e20190105, 2019.
- CARNEIRO, E. O. *et al.* Structure-based prediction and biosynthesis of the major mammalian metabolite of the cardioactive prototype LASSBio-294. **Bioorganic & medicinal chemistry letters**, v. 20, n. 12, p. 3734–3736, 2010.
- CHAYAVICHITSILP, P. *et al.* Herpes simplex. **Pediatrics In Review**, v. 30, n. 4, p. 119–

130, 2009.

CHEN, G. H. *et al.* Significant elevation of antiviral activity of strictinin from Pu'er tea after thermal degradation to ellagic acid and gallic acid. **Journal of Food and Drug Analysis**, v. 23, n. 1, p. 116–123, 2015.

CHINTOJU, N. *et al.* Importance of natural products in the modern history. **Research & Reviews: Journal of Hospital and Clinical Pharmacy**, v. 1, n. 1, p. 5–10, 2015.

CHOI, H. R. *et al.* Enhancing the antimicrobial effect of genistein by biotransformation in microbial system. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, v. 63, p. 255–261, 2018.

CHOJNACKA, K. *et al.* Antiviral properties of polyphenols from plants. **Foods**, v. 10, n. 10, p. 2277, 2021.

CHOUBEY, S. *et al.* Probing gallic acid for its broad spectrum applications. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 18, n. 15, p. 1283–1293, 2018.

COHEN, J. I. Herpesvirus latency. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 130, n. 7, p. 3361–3369, 2020.

COLE, S. Herpes simplex virus: epidemiology, diagnosis, and treatment. **Nursing Clinics**, v. 55, n. 3, p. 337–345, 2020.

CONNOLLY, S. A.; JARDETZKY, T. S.; LONGNECKER, R. The structural basis of herpesvirus entry. **Nature Reviews Microbiology**, v. 19, n. 2, p. 110–121, 2020.

CORDEIRO, K. C. F. **A Biotransformação fúngica da hesperetina e sua aplicação na produção de metabólitos ativos**. 2018. 135 f. Tese (Doutorado em Inovação Farmacêutica em Rede) - Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2019.

COSTA, E. M. D. M. B. *et al.* Selection of filamentous fungi of the *Beauveria* genus able to metabolize quercetin like mammalian cells. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 39, n. 2, p. 405–408, 2008.

DE CARVALHO, C. C. C. R. Fungi in fermentation and biotransformation systems. p. 525–541, 2016.

DEB, L.; RAJESH, T. W.; MONIKA, H. J. Growth of *Beauveria bassiana* in different solid media. **Trends in Biosciences**, v. 10, n. 23, p. 4815–4817, 2017.

DIAS, D. A.; URBAN, S.; ROESSNER, U. A historical overview of natural products in drug discovery. **Metabolites**, v. 2, n. 2, p. 303, 2012.

EKBLAD, M. *et al.* A highly lipophilic sulfated tetrasaccharide glycoside related to muparfostat (PI-88) exhibits virucidal activity against herpes simplex virus. **Antiviral Research**, v. 86, n. 2, p. 196–203, 2010.

EL ENSHASY, H. A. Fungal morphology: a challenge in bioprocess engineering industries for product development. **Current Opinion in Chemical Engineering**, v. 35, p. 100729, 2022.

EL-SALAM, M. A. *et al.* Antiurolithic activity and biotransformation of galloylquinic acids by *Aspergillus alliaceus* ATCC10060, *Aspergillus brasiliensis* ATCC 16404, and *Cunninghamella elegans* ATCC 10028b. **Biocatalysis and agricultural biotechnology**, v. 18, 2019.

ELSHAFIE, H. S.; CAMELE, I.; MOHAMED, A. A. A comprehensive review on the biological, agricultural and pharmaceutical properties of secondary metabolites based-plant origin. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 4, p. 3266, 2023.

FABER, K. Biotransformations in Organic Chemistry. **Biotransformations in Organic Chemistry**. 7. ed. Graz: Springer 2018.

FANG, X. *et al.* Changes in the biotransformation of green tea catechins induced by different carbon and nitrogen sources in *Aspergillus niger* RAF106. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, p. 486908, 2019.

FERNANDES, F. H. A.; SALGADO, H. R. N. Gallic acid: review of the methods of determination and quantification. **Critical Reviews in Analytical Chemistry**, v. 46, n. 3, p. 257–265, 2016.

GALABOV, A. S. Virucidal agents in the eve of manorapid synergy®. **GMS Krankenhaushygiene Interdisziplinär**, v. 2, n. 1, 2007.

GATHERER, D. *et al.* ICTV virus taxonomy profile: Herpesviridae 2021. **Journal of General Virology**, v. 102, n. 10, p. 001673, 2021.

GNAWALI, G. R.; ACHARYA, P. P.; RAJBHANDARI, M. Isolation of gallic acid and

estimation of total phenolic content in some medicinal plants and their antioxidant activity. **Nepal Journal of Science and Technology**, v. 14, n. 1, p. 95-102, 2013.

GOMES, T. F. *et al.* Biotransformation of LASSBio-579 and pharmacological evaluation of p-hydroxylated metabolite a N-phenylpiperazine antipsychotic lead compound. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 62, p. 214–221, 2013.

GONZÁLEZ-BURGOS, E.; GÓMEZ-SERRANILLOS, M. P. Effect of phenolic compounds on human health. **Nutrients**, v. 13, n. 11, p. 3922, 2021.

GROGAN, G. J.; HOLLAND, H. L. The biocatalytic reactions of *Beauveria* spp. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 9, n. 1–3, p. 1–32, 2000.

GRÜNEWALD, K. *et al.* Three-dimensional structure of herpes simplex virus from cryo-electron tomography. **Science**, v. 302, n. 5649, p. 1396–1398, 2003.

HA, S. K. *et al.* Generation of stilbene glycoside with promising cell rejuvenation activity through biotransformation by the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. **Biomedicines**, v. 9, n. 5, p. 555, 2021.

HASSAN, S. T. S.; MASARČÍKOVÁ, R.; BERCHOVÁ, K. Bioactive natural products with anti-herpes simplex virus properties. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 67, n. 10, p. 1325–1336, 2015.

HE, W. *et al.* New cryptotanshinone derivatives with anti-influenza A virus activities obtained via biotransformation by *Mucor rouxii*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 101, n. 16, p. 6365–6374, 2017.

HEGAZY, M. E. F. *et al.* Microbial biotransformation as a tool for drug development based on natural products from mevalonic acid pathway: a review. **Journal of Advanced Research**, v. 6, n. 1, p. 17–33, 2015.

HERMANTO, M. W.; CHOW, P. S.; TAN, R. B. H. Operating strategy to produce consistent CSD in combined antisolvent-cooling crystallization using FBRM. **Industrial and Engineering Chemistry Research**, v. 51, n. 42, p. 13773–13783, 2012.

HOCHHEIM, S. *et al.* Determination of phenolic profile by HPLC–ESI-MS/MS, antioxidant activity, *in vitro* cytotoxicity and anti-herpetic activity of propolis from the brazilian native bee *Melipona quadrifasciata*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 29, n. 3, p. 339–350, 2019.

HOGESTYN, J. M.; MOCK, D. J.; MAYER-PROSCHEL, M. Contributions of neurotropic human herpesviruses herpes simplex virus 1 and human herpesvirus 6 to neurodegenerative

disease pathology. **Neural Regeneration Research**, v. 13, n. 2, p. 211, 2018.

HSU, F. L. *et al.* Biotransformation of gallic acid by *Beauveria sulfurescens* ATCC 7159. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 74, p. 659–666, 2007.

HSU, W. C. *et al.* Limonium sinense and gallic acid suppress hepatitis C virus infection by blocking early viral entry. **Antiviral Research**, v. 118, p. 139–147, 2015.

HULL, C. M. *et al.* Co-production of 11 α -hydroxyprogesterone and ethanol using recombinant yeast expressing fungal steroid hydroxylases. **Biotechnology for Biofuels**, v. 10, n. 1, p. 1–13, 2017.

IBRAHIM, H. A. *et al.* Antibacterial activity of vanillic acid and catechol produced by microbial biotransformation of caffeic acid. **Journal of Pharmaceutical Sciences and Research**, v. 12, n. 6, p. 740–743, 2020.

ITOO, Z. A.; RESHI, Z. A. Effect of different nitrogen and carbon sources and concentrations on the mycelial growth of ectomycorrhizal fungi under in-vitro conditions. **Scandinavian Journal of Forest Research**, v. 29, n. 7, p. 619–628, 2014.

JAMES, C. *et al.* Herpes simplex virus: global infection prevalence and incidence estimates, 2016. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 98, n. 5, p. 315, 2020.

JAMES, S. H.; SHEFFIELD, J. S.; KIMBERLIN, D. W. Mother-to-child transmission of herpes simplex virus. **Journal of the Pediatric Infectious Diseases Society**, v. 3, n. suppl_1, p. 19–23, 2014.

JIANG, Y. *et al.* Gallic acid: a potential anti-cancer agent. **Chinese Journal of Integrative Medicine**, v. 28, n. 7, p. 661–671, 2022.

JOHNSTON, C. *et al.* Herpes simplex virus viremia during primary genital infection. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 198, n. 1, p. 31–34, 2008.

JONES, C. A. Vertical transmission of genital herpes: prevention and treatment options. **Drugs**, v. 69, n. 4, p. 421–434, 2009.

KALITA, D.; KAR, R.; HANDIQUE, J. G. A theoretical study on the antioxidant property of gallic acid and its derivatives, **Journal of Theoretical and Computational Chemistry**, v. 11, n. 2, p. 391–402, 2012.

KAUFFMANN, A. C.; CASTRO, V. S. Phenolic compounds in bacterial inactivation: a perspective from brazil. **Antibiotics**, v. 12, n. 4, p. 645, 2023.

KHANI, M. *et al.* Optimization of carbon and nitrogen sources for extracellular polymeric substances production by *Chryseobacterium indologenes* MUT.2. **Iranian Journal of Biotechnology**, v. 14, n. 2, p. 13, 2016.

KIM, D. H.; JE, J. Y. Antimicrobial activity of gallic acid-grafted-chitosan against fish pathogens. **Journal of Carbohydrate Chemistry**, v. 34, n. 3, p. 163–171, 2015.

KOZŁOWSKA, E. *et al.* Cascade biotransformation of dehydroepiandrosterone (DHEA) by *Beauveria* species. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 1–11, 2018.

KRATZ, J. M. *et al.* Anti-HSV-1 and anti-HIV-1 activity of gallic acid and pentyl gallate. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 103, n. 5, p. 437–442, 2008.

KRAWCZYK-ŁEBEK, A. *et al.* New glycosylated dihydrochalcones obtained by biotransformation of 2'-hydroxy-2-methylchalcone in cultures of entomopathogenic filamentous fungi. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 17, p. 9619, 2021.

KRISHNAN, R.; STUART, P. M. Developments in vaccination for herpes simplex virus. **Frontiers in Microbiology**, v. 12, p. 798927, 2021.

KUO, J. Y. *et al.* Acyclovir-resistant HSV-1 isolates among immunocompromised patients in southern Taiwan: low prevalence and novel mutations. **Journal of Medical Virology**, v. 95, n. 8, p. e28985, 2023.

LEE, D. H.; ZUCKERMAN, R. A. Herpes simplex virus infections in solid organ transplantation: guidelines from the American Society of Transplantation Infectious Diseases Community of Practice. **Clinical Transplantation**, v. 33, n. 9, p. e13526, 2019.

LEE, J. H. *et al.* Antiviral effects of black raspberry (*Rubus coreanus*) seed and its gallic acid against influenza virus infection. **Viruses**, v. 8, n. 6, p. 157, 2016.

LERNER, A. M. *et al.* An update on the management of glandular fever (infectious mononucleosis) and its sequelae caused by Epstein–Barr virus (HHV-4): new and emerging treatment strategies. (HHV-4): new and emerging treatment strategies. **Virus Adaptation and Treatment**, v. 2, n. 1, p. 135–145, 2010.

LIESE, A.; SEELBACH, K.; WANDREY, C. Industrial biotransformations, second edition. **Industrial Biotransformations, Second Edition**, p. 1–556, 2006.

LIMA, A. S. B. *et al.* Utilization of *Uncaria tomentosa* (unha de gato) as phytotherapy. **Revista INGI - Indicação Geográfica e Inovação**, v. 3, n. 1, p. 279–289, 2019.

LONG, W. Y. *et al.* Gallic acid inhibits Kaposi's Sarcoma-associated herpesvirus lytic reactivation by suppressing RTA transcriptional activities. **Food Science & Nutrition**, v. 9, n. 2, p. 847–854, 2021.

LOUGHLIN, W. A. Biotransformations in organic synthesis. **Bioresource Technology**, v. 74, n. 1, p. 49–62, 2000.

MACESIC, N. *et al.* Herpes simplex virus-2 transmission following solid organ transplantation: Donor-derived infection and transplantation from prior organ recipients. **Transplant Infectious Disease**, v. 19, n. 5, p. e12739, 2017.

MAGAR, R. T.; SOHNG, J. K. A review on structure, modifications and structure-activity relation of quercetin and its derivatives. **Journal of Microbiol and Biotechnology**, v. 30, n. 1, p. 11–20, 2020.

MAGEL, G.; TYRING, S. **Herpesviridae: a look into this unique family of viruses**. 1. ed. Croácia: BoD - Books on Demand, 2012.

MAJEWSKA, A.; MLYNARCZYK-BONIKOWSKA, B. 40 years after the registration of acyclovir: do we need new anti-herpetic drugs? **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 7, p. 3431, 2022.

MALLIK, B.; CHAKRAVARTI, B.; CHAKRAVARTI, D. N. Principles of chromatography. **Current Protocols Essential Laboratory Techniques**, v. 13, n. 1, p. 6.1.1-6.1.23, 2016.

MARGULIES, B. J. The world of antiherpetic vaccines and drugs, 2022. **Viruses**, v. 14, n. 5, p. 850, 2022.

MO, M. H.; XU, C. K.; ZHANG, K. Q. Effects of carbon and nitrogen sources, carbon-to-nitrogen ratio, and initial pH on the growth of nematophagous fungus *Pochonia chlamydosporia* in liquid culture. **Mycopathologia**, v. 159, n. 3, p. 381–387 2005.

MOON, S. J. *et al.* Stability of acetylsalicylic acid in human blood collected using volumetric absorptive microsampling (VAMS) under various drying conditions. **Translational and Clinical Pharmacology**, v. 30, n. 1, p. 57, 2022.

MOREIRA, L. K. DA S. *et al.* Anxiolytic- and antidepressant-like effects of new phenylpiperazine derivative LQFM005 and its hydroxylated metabolite in mice. **Behavioural Brain Research**, v. 417, p. 113582, 2022.

MWAMBURI, L. A.; LAING, M. D.; MILLER, R. M. Effect of surfactants and temperature on germination and vegetative growth of *Beauveria bassiana*. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 46, n. 1, p. 67–74, 2015.

NEDEL, F. *et al.* Comparative analysis of two colorimetric assays in dental pulp cell density. **International Endodontic Journal**, v. 44, n. 1, p. 59–64, 2011.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs over the nearly four decades from 01/1981 to 09/2019. **Journal of Natural Products**, v. 83, n. 3, p. 770–803, 2020.

NÓBREGA G. C. **Biotransformação da curcumina por *Beauveria* do cerrado em derivado mais solúvel e potencialmente antioxidante**. 2016. 94 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2016.

OLIVEIRA, I. *et al.* Viability of *Beauveria bassiana* isolates after storage under several preservation methods. **Annals of Microbiology**, v. 61, n. 2, p. 339–344, 2011.

OTSUKA, H. Purification by solvent extraction using partition coefficient. **Natural Products Isolation**, p. 269–273, 2006.

PADDON, C. J.; KEASLING, J. D. Semi-synthetic artemisinin: a model for the use of synthetic biology in pharmaceutical development. **Nature Reviews Microbiology**, v. 12, n. 5, p. 355–367, 2014.

PAPAGIANNI, M. Fungal morphology and metabolite production in submerged mycelial processes. **Biotechnology Advances**, v. 22, n. 3, p. 189–259, 2004.

PARSHIKOV, I. A.; SUTHERLAND, J. B. Biotransformation of steroids and flavonoids by cultures of *Aspergillus niger*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 176, n. 3, p.

903–923, 2015.

PASSOS, M. R. L. Genital Herpes. **Atlas of Sexually Transmitted Diseases**, p. 105–133, 2018.

PAWAR, M.; DWIVEDI, J. Gi50 inhibition study on ethanolic extracts of *Convolvulus pluricaulis*, *Michelia champaca* and *Chromolaena odorata* against human breast (mcf-7) and colon cancer (ht-29) cell line by sulforhodamine b (srb) assay method. **World Journal of Pharmaceutical Science and Research**, v. 2, n. 6, p. 254–262, 2023.

PAZINI, F. **Preparação de derivados funcionalizados do novo protótipo de fármaco neuroativo lassbio 581 por bioconversão**. 2006. 190 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2006.

PENSO, J. *et al.* Vasorelaxant activity of 7- β -O-glycosides biosynthesized from flavonoids. **European Journal of Pharmacology**, v. 733, n. 1, p. 75–80, 15 jun. 2014.

PETRUCCI, R. H. *et al.* **General Chemistry: Principles and Modern Applications**. 11. ed. Toronto: Pearson, 2017. 1488p.

PINTO, A.; CONTENTE, M. L.; TAMBORINI, L. Advances on whole-cell biocatalysis in flow. **Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry**, v. 25, p. 100343, 2020.

PIRET, J.; BOIVIN, G. Antiviral resistance in herpes simplex virus and varicella-zoster virus infections: diagnosis and management. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v. 29, n. 6, p. 654–662, 2016.

PRASAD, G. S. *et al.* Biotransformation of albendazole by *Cunninghamella blakesleeana*: Effect of carbon and nitrogen source. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 24, n. 10, p. 2055–2059, 2008.

PRASAD, G. S. *et al.* Biotransformation of meloxicam by *Cunninghamella blakesleeana*: significance of carbon and nitrogen source. **Indian Journal of Microbiology**, v. 51, n. 1, p. 82–87, 2011.

PUNITHAVATHI, V. R. *et al.* Antihyperglycaemic, antilipid peroxidative and antioxidant effects of gallic acid on streptozotocin induced diabetic Wistar rats. **European Journal of Pharmacology**, v. 650, n. 1, p. 465–471, 2011.

QIAO, L. *et al.* Microbial transformation of lovastatin by *Beauveria bassiana*. **Acta**

Pharmaceutica Sinica B, v. 2, n. 3, p. 300–305, 2012.

QIN, D.; DONG, J. Multi-level optimization and strategies in microbial biotransformation of nature products. **Molecules**, v. 28, n. 6, p. 2619, 2023.

QUEIROZ, M. F. *et al.* Gallic acid-dextran conjugate: green synthesis of a novel antioxidant molecule. **Antioxidants**, v. 8, n. 10, p. 478, 2019.

QUEIROZ, S. C. N.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F. Métodos de extração e/ou concentração de compostos encontrados em fluidos biológicos para posterior determinação cromatográfica. **Química Nova**, v. 24, n. 1, p. 68–76, 2001.

RAJAK, R. C.; SINGH, A.; BANERJEE, R. Biotransformation of hydrolysable tannin to ellagic acid by tannase from *Aspergillus awamori*. **Biocatalysis and Biotransformation**, v. 35, n. 1, p. 27–34, 2017.

RECHENCHOSKI, D. Z. *et al.* Herpesvirus: an underestimated virus. **Folia Microbiologica**, v. 62, n. 2, p. 151–156, 2017.

RIFAI, N. *et al.*, **Principles and applications of clinical mass spectrometry: small molecules, peptides, and pathogens**. 1. ed. Amsterdam: Elsevier, 2018.

RIPIM, N. S. M. *et al.* Antiviral Properties of *Orthosiphon stamineus* Aqueous Extract in Herpes Simplex Virus Type 1 Infected Cells, **Sains Malaysiana**, v. 47, n. 8, p. 1725–1730, 2018.

ROBLES-LOAIZA, A. A. *et al.* Traditional and computational screening of non-toxic peptides and approaches to improving selectivity. **Pharmaceuticals**, v. 15, n. 3, p. 323, 2022.

ROCHELEAU, H.; AL-HARTHI, R.; OUELLET, T. Degradation of salicylic acid by *Fusarium graminearum*. **Fungal Biology**, v. 123, p. 77–86, 2019.

ROIZMAN, B.; WHITLEY, R. J. An inquiry into the molecular basis of HSV latency and reactivation. **Annual Review of Microbiology**, v. 67, p. 355–374, 2013.

ROMERO, M. *et al.* Genital herpes on the penis and topic use of *Uncaria Tomentosa*. **Brazilian Journal of Sexually Transmitted Diseases**, v. 26, n. 1–4, p. 29–31, 2014.

ROMERO, M. *et al.* *Uncaria tomentosa* and topical sse in genital herpes in vulva. **Brazilian**

Journal of Sexually Transmitted Diseases, v. 22, n. 2, p. 81–83, 2010.

SADOWSKI, L. A. *et al.* Current drugs to treat infections with herpes simplex viruses-1 and -2. **Viruses**, v. 13, n. 7, p. 1228, 2021.

SARJIT, A.; WANG, Y.; DYKES, G. A. Antimicrobial activity of gallic acid against thermophilic *Campylobacter* is strain specific and associated with a loss of calcium ions. **Food Microbiology**, v. 46, p. 227–233, 2015.

SARKER, S. D.; NAHAR, L. An introduction to natural products isolation. **Methods in Molecular Biology**, v. 864, p. 1–25, 2012.

SAUERBREI, A. *et al.* Database on natural polymorphisms and resistance-related non-synonymous mutations in thymidine kinase and DNA polymerase genes of herpes simplex virus types 1 and 2. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 71, n. 1, p. 6–16, 2016.

SAVI, L. A. *et al.* Evaluation of antirotavirus activity of flavonoids. **Fitoterapia**, v. 81, n. 8, p. 1142–1146, 2010.

SCHALKWIJK, H. H.; SNOECK, R.; ANDREI, G. Acyclovir resistance in herpes simplex viruses: prevalence and therapeutic alternatives. **Biochemical Pharmacology**, v. 206, p. 115322, 2022.

SEO, C. S. *et al.* Quantitative analysis and *in vitro* anti-inflammatory effects of gallic acid, ellagic acid, and quercetin from *Radix sanguisorbae*. **Pharmacognosy Magazine**, v. 12, n. 46, p. 104, 2016.

SHAKIL, M. S. *et al.* Key considerations when using the sulforhodamine B assay for screening novel anticancer agents. **Anti-Cancer Drugs**, v. 33, n. 1, p. 6–10, 2022.

SHANKER, K. S. *et al.* Biotransformation of ferulic acid to acetovanillone using *Rhizopus oryzae*. **Biocatalysis and Biotransformation**, v. 25, p. 109–112, 2007.

SHELDON, R. A.; WOODLEY, J. M. Role of biocatalysis in sustainable chemistry. **Chemical Reviews**, v. 118, n. 2, p. 801–838, 2018.

SHILEY, K.; BLUMBERG, E. Herpes viruses in transplant recipients: HSV, VZV, human herpes viruses, and EBV. **Hematology/Oncology Clinics**, v. 25, n. 1, p. 171–191, 2011.

SICURELLA, M. *et al.* Mangiferin-loaded smart gels for hsv-1 treatment. **Pharmaceutics**, v. 13, n. 9, 2021.

SILVA, L. DE S. **BIOTRANSFORMAÇÃO DOS ÁCIDOS GÁLICO E ELÁGICO POR MICROORGANISMOS DO CERRADO BRASILEIRO**. 2015. 157 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2015.

SIMÕES, C. M. O. *et al.* **Farmacognosia: do produto natural ao medicamento**. 1. ed. Santana: Artmed Editora, 2016.

SIMÕES, C. M. O.; AMOROS, M.; GIRRE, L. Mechanism of antiviral activity of triterpenoid saponins, **Phytotherapy Research**, v. 13, n. 4, p. 323-328, 1999.

SINGAB, R. A. *et al.* Biotransformation of caffeic acid into a promising biologically active metabolite by *Candida albicans* isolate CI-24. **Archives of Pharmaceutical Sciences Ain Shams University**, v. 2, n. 1, p. 37–46, 2018.

SINGH, M.; GOODYEAR, H. M.; BREUER, J. Herpes simplex virus infections. **Harper's Textbook of Pediatric Dermatology**, p. 598–611, 2019.

SINGH, S. P. *et al.* **Biomass, biofuels, biochemicals: advances in enzyme catalysis and technologies**, 1. ed. p. 11–30 Elsevier, 2020.

SMITHA MS; SINGH S; SINGH R. Microbial bio transformation: a process for chemical alterations. **Journal of Bacteriology & Mycology: Open Access**, v. 4, n. 2, 2017.

SORDON, S. *et al.* Regioselective O-glycosylation of flavonoids by fungi *Beauveria bassiana*, *Absidia coerulea* and *Absidia glauca*. **Bioorganic Chemistry**, v. 93, p. 102750, 2019.

SOROKINA, M.; STEINBECK, C. Review on natural products databases: where to find data in 2020. **Journal of Cheminformatics**, v. 12, n. 1, p. 1–51, 2020.

SORRENTINO, E. *et al.* Antimicrobial activity of gallic acid against food-related pseudomonas strains and its use as biocontrol tool to improve the shelf life of fresh black truffles. **International Journal of Food Microbiology**, v. 266, p. 183–189, 2018.

SOUZA, P. L. D. M. *et al.* One step N-glycosylation by filamentous fungi biofilm in bioreactor of a new phosphodiesterase-3 inhibitor tetrazole. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 26, n. 13, p. 3177–3181, 2016.

STEINER, I.; BENNINGER, F. Manifestations of herpes virus infections in the nervous

system. **Neurologic Clinics**, v. 36, n. 4, p. 725–738, 1 nov. 2018.

SUAZO, P. A. *et al.* Herpes simplex virus 2 infection: molecular association with HIV and novel microbicides to prevent disease. **Medical Microbiology and Immunology** v. 204, p. 161-176, 2015.

SUCHARITA, S.; KRISHNAGOPAL, A.; HURK, V. D. L-V. D. S. Comprehensive analysis of the tegument proteins involved in capsid transport and virion morphogenesis of alpha, beta and gamma *Herpesviruses*. **Viruses**, v. 15, n. 10, p. 2058, 2023.

ŠUDOMOVÁ, M. *et al.* Flavonoids target human herpesviruses that infect the nervous system: mechanisms of action and therapeutic insights. **Viruses**, v. 14, n. 3, p. 592, 2022.
TALAPATRA, S. K.; TALAPATRA, B. **Chemistry of Plant Natural Products**. 1. ed. Berlin: Springer, 2015.

THEERAWATANASIRIKUL, S. *et al.* Natural phytochemicals, luteolin and isoginkgetin, inhibit 3c protease and infection of FMDV, in silico and in vitro. **Viruses**, v. 13, n. 11, p. 2118, 1 nov. 2021.

TOGNARELLI, E. I. *et al.* Herpes simplex virus evasion of early host antiviral responses. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 9, p. 449387, 2019.

TORRES-MANCERA, M. T. *et al.* Biotransformation and improved enzymatic extraction of chlorogenic acid from coffee pulp by filamentous fungi. **Biotechnology Progress**, v. 29, p. 337–345, abr. 2013.

TREML, J. *et al.* Natural products-derived chemicals: breaking barriers to novel anti-hsv drug development. **Viruses**, v. 12, n. 2, p. 154, 2020.

TSANG, M. S. M. *et al.* Anti-inflammatory activities of pentaherbs formula, berberine, gallic acid and chlorogenic acid in atopic dermatitis-like skin inflammation. **Molecules**, v. 21, n. 4, p. 519, 2016.

UMARU, I. J. Introduction to natural product. **Extraction of Natural Products from Agro-industrial Wastes: A Green and Sustainable Approach**, p. 19–34, 2023.

VAN DE SAND, L. *et al.* Antiviral active compounds derived from natural sources against herpes simplex viruses. **Viruses**, v. 13, n. 7, p. 1386, 2021.

VARALAXMI, S.; VIDYAVATHI, M. Optimization studies for clozapine biotransformation

to its active metabolite-norclozapine using fungi. **World Journal of Pharmaceutical Research**, v. 4, n. 5, p. 1235–1245, 2015.

VEITER, L.; RAJAMANICKAM, V.; HERWIG, C. The filamentous fungal pellet—relationship between morphology and productivity. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 102, n. 7, p. 2997–3006, 2018.

VENISETTY, R. K.; KESHETTY, S.; CIDDI, V. Biotransformation of silibinin (silybin) using fungal organisms. **Indian Journal of Pharmaceutical Education and Research**, v. 45, n. 4, p. 384, 2011.

VICHAJ, V.; KIRTIKARA, K. Sulforhodamine B colorimetric assay for cytotoxicity screening. **Nature Protocols**, v. 1, n. 3, p. 1112–1116, 2006.

VISHT, S.; CHATURVEDI, S. Isolation of Natural Products. **CPR**, v. 2, n. 3, p. 584–599, 2012.

WARGANE, V. *et al.* Cultural and morphological characterizations of *Beauveria bassiana*. **Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry**, v. 8, n. 6, p. 591–594, 2019.

WU, Y.-H. *et al.* Structure properties and mechanisms of action of naturally originated phenolic acids and their derivatives against human viral infections. **Current Medicinal Chemistry**, v. 24, n. 38, 2017.

WUCHERPFENNIG, T. *et al.* Morphology and rheology in filamentous cultivations. **Advances in Applied Microbiology**, v. 72, p. 89–136, 2010.

XIE, L. *et al.* Methylglucosylation of aromatic amino and phenolic moieties of drug-like biosynthons by combinatorial biosynthesis. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 115, n. 22, p. E4980–E4989, 2018.

XIE, Y. *et al.* Alpha-herpesvirus thymidine kinase genes mediate viral virulence and are potential therapeutic targets. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, n. MAY, p. 448686, 8 maio 2019.

YADAV, S.; VAGHASIYA, P.; THAKAR, M. Growth pattern of *Beauveria bassiana* in different eco-friendly media. **International Journal of Pharmaceutical & Biological Archives**, v. 11, n. 1, p. 37–39, 2020.

YAN, L. *et al.* Biotransformation of ferulic acid to vanillin in the packed bed-stirred fermentors. **Scientific Reports**, v. 6, n. 1, p. 1–12, 2016.

YANG, H. *et al.* Biotransformations with crude enzymes and whole cells. *In*: SINGH, S. P. *et al.* **Biomass, biofuels, biochemicals: advances in enzyme catalysis and technologies**, 1. ed. p. 335–361, 2020.

YUAN, S. *et al.* Cryo-EM structure of a herpesvirus capsid at 3.1 Å. **Science**, v. 360, n. 6384, 2018.

ZANDAVAR, H. *et al.* Secondary metabolites: alkaloids and flavonoids in medicinal plants. **Herbs and Spices - New Advances**, 2023.

ZHANG, Q. W.; LIN, L. G.; YE, W. C. Techniques for extraction and isolation of natural products: a comprehensive review. **Chinese Medicine**, v. 13, n. 1, p. 1–26, 2018.

ZHENG, M. *et al.* Comparison of the host immune response to herpes simplex virus 1 (HSV-1) and HSV-2 at two different mucosal sites. **Journal of Virology**, v. 86, n. 13, p. 7454–7458, 2012.

ZHU, S.; VIEJO-BORBOLLA, A. Pathogenesis and virulence of herpes simplex virus. **Virulence**, v. 12, n. 1, p. 2670–2702, 2021.

7 ARTIGO

BIOTRANSFORMAÇÃO DO ÁCIDO GÁLICO E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIVIRAL FRENTE AO HERPES SIMPLEX VÍRUS

Sérgio Luis Fernandes do Nascimento¹, Francine Pazini², Carla Regina Andrichetti¹

¹Programa de Pós-graduação em Ciências em Saúde – PPGCS – Universidade Federal de Mato Grosso, Campus de Sinop – Av. Alexandre Ferronato, 1200, Sinop-MT, Brasil.

²Instituto de Ciências da Saúde – ICS - Universidade Federal de Mato Grosso, Campus Universitário de Sinop – Av. Alexandre Ferronato, 1200, Sinop-MT, Brasil.

Resumo: O herpes vírus simplex (HSV) é um vírus altamente transmissível capaz de estabelecer latência, gerando infecções vitalícias. O número limitado de antivirais disponíveis para o tratamento de infecções por HSV ressalta a importância da busca por novas moléculas com potencial atividade frente a este vírus. Na busca por novos candidatos a fármacos é importante investigar substâncias de origem natural, a exemplo o ácido gálico (AG), um composto fenólico cujos estudos demonstraram uma potencial atividade anti-HSV. A biotransformação é definida como uma reação química catalisada por enzimas, que tem se destacado como uma alternativa na busca de novas moléculas bioativas. O presente trabalho tem como objetivo produzir derivados funcionalizados do ácido gálico através da biotransformação utilizando o fungo filamentosso *Beauveria bassiana* ATCC 7159 e avaliar a potencial atividade antiviral destes derivados frente aos vírus HSV-1 KOS e HSV-2 Cepa 333. Para tanto, foram realizados ensaios semipreparativos com culturas de *Beauveria bassiana* ATCC 7159. O fungo foi inoculado em meio PDSM e após 65h de crescimento o substrato AG foi adicionado. A reação foi mantida por 168 h e após este tempo o meio reacional foi filtrado e extraído. Os extratos obtidos foram purificados através de cromatografia em coluna, cromatografia em camada delgada, dissolução fracionada e recristalização. A citotoxicidade foi avaliada através do ensaio colorimétrico com sulforrodamina B (SRB) utilizando células Vero E6 e a atividade anti-HSV foi determinada pelo método de redução de placas de lise através de pós-tratamento e ação virucida. A partir da biotransformação do AG, foi possível obter 3 derivados em quantidades suficientes para realização de testes biológicos. A avaliação da citotoxicidade revelou que o derivado SL2 possui $CC_{50} = 31,43 \pm 2,40 \mu\text{g/mL}$, o AG demonstrou uma $CC_{50} = 71,61 \pm 7,02 \mu\text{g/mL}$, e os derivados SL1 e SL3 apresentaram $CC_{50} > 100 \mu\text{g/mL}$. O pós tratamento revelou que os derivados SL1, SL2 e SL3 apresentaram menor inibição da replicação do vírus HSV-1 cepa KOS em relação ao AG que apresentou $CE_{50} = 6,68 \pm 1,15 \mu\text{g/mL}$ e um IS igual a 10,44. No ensaio de avaliação da ação virucida verificou-se que o AG apresentou um valor de $CE_{50} = 10,92 \pm 2,39 \mu\text{g/mL}$ com IS = 6,55 e os derivados SL2 e SL3 apresentaram valores de CE_{50} iguais a $4,21 \pm 0,74$ com IS = 7,46 para SL2 e $13,73 \pm 1,52$ com IS 7,28 para SL3. O derivado SL1 apresentou $33,21 \pm 3,54 \%$ de inibição da infecciosidade residual. Assim, conclui-se que através da biotransformação do AG através do fungo filamentosso *Beauveria bassiana* ATCC 7159 foram obtidos três derivados e os derivados SL2 e SL3 apresentaram atividade virucida equivalente ao ácido gálico.

Palavras-chave: Bioconversão; Produtos naturais; Virucida, HSV

INTRODUÇÃO

Os herpesvírus são vírus pertencente à família *Orthoherpesviridae*, que possuem como principal característica o seu ciclo de replicação em duas fases, lítica (replicativa) e latente. Entre esses vírus, o herpes vírus simplex (HSV) se destaca por apresentar maior incidência em humanos, infectando cerca de 60 % a 95 % da população adulta mundial (Magel; Tying, 2012; Rechenchoski *et al.*, 2017).

O vírus HSV-1 está relacionado principalmente a lesões vesiculares muco cutâneas na língua, lábios, gengiva, boca, faringe, face e também pode acometer olhos e sistema nervoso central (SNC), já o vírus HSV-2 é geralmente responsável por infecções da região anogenital, causando lesões em órgãos genitais, períneo, nádegas e áreas perianais (Chayavichitsilp *et al.*, 2009; Cole, 2020; Steiner; Benninger, 2018; Tognarelli *et al.*, 2019).

A infecção primária por HSV ocorre quando um indivíduo soronegativo com danos nas superfícies mucosas ou pele é exposto ao vírus pelo contato direto com lesões herpéticas, ou através de secreções genitais ou orais, e superfícies mucosas de pessoas assintomáticas, o que facilita a sua disseminação (Johnston *et al.*, 2008; Magel; Tying, 2012).

Apesar das terapias antivirais utilizadas no tratamento do HSV serem consideradas seguras e eficazes no tratamento da fase ativa do HSV, o crescente número de cepas resistentes aos fármacos utilizados atualmente ressalta a importância de se buscar por novas alternativas com diferentes mecanismos de ação (Schalkwijk; Snoeck; Andrei, 2022; Singh; Goodyear; Breuer, 2019; Xie *et al.*, 2019).

O ácido gálico é um ácido fenólico de baixo peso molecular constantemente encontrado na natureza como metabólito secundário em plantas (Badhani; Sharma; Kakkar, 2015)(Badhani; Sharma; Kakkar, 2015), que assim como seus derivados possui potente atividade antioxidante (Al Zahrani; El-Shishtawy; Asiri, 2020; Gnawali; Acharya; Rajbhandari, 2013; Kalita; Kar; Handique, 2012). Além disso, são relatadas outras atividades biológicas como a sua ação anti-inflamatória (Queiroz *et al.*, 2019; Seo *et al.*, 2016; Tsang *et al.*, 2016), atividade citotóxica em diferentes tipos de câncer (Jiang *et al.*, 2022), atividade antimicrobiana em diversas cepas de microrganismos (Kim; JE, 2015; Sarjit; Wang; Dykes, 2015; Sorrentino *et al.*, 2018), e a atividade antiviral frente a vírus de DNA e RNA incluindo diferentes tipos de herpesvírus humano (Chen *et al.*, 2015; Chojnacka *et al.*, 2021; Hsu *et al.*, 2015; Lee *et al.*, 2016; Long *et al.*, 2021; Šudomová *et al.*, 2022; Wu *et al.*, 2017).

A biotransformação é definida como modificações na estrutura de compostos orgânicos através de enzima ou sistema enzimático, que levam à formação de novas moléculas (Smitha, Singh e Singh, 2017). Neste contexto, a biotransformação pode ser útil na produção de análogos de compostos biologicamente ativos com potencial atividade já conhecida, uma vez que por meio da biotransformação é possível realizar reações que dificilmente seriam alcançadas por procedimentos sintéticos tradicionais, aumentando assim a possibilidade de encontrar novas moléculas (Choi *et al.*, 2018).

Beauveria bassiana é um fungo filamentosso entomopatogênico frequentemente utilizado como biocatalisador, sendo capaz de realizar uma grande diversidade de reações que incluem hidroxilação, sulfoxidação, desalquilação, glicosilação, acetilação, redução e hidrólise de uma ampla gama de substratos como aminas aromáticas, terpenos e terpenóides, polifenóis e esteróides (Grogan; Holland, 2000; Kozłowska *et al.*, 2018).

Portanto, o presente trabalho teve como objetivo produzir derivados do ácido gálico a partir da biotransformação com *Beauveria bassiana* ATCC 7159 e avaliar a atividade antiviral e virucida do ácido gálico e dos derivados formados.

METODOLOGIA

Biotransformação em escala semipreparativa

Para realização do ensaio em escala semipreparativa foram utilizadas subculturas de *Beauveria bassiana* ATCC 7159 com sete dias de crescimento. Os fungos foram ressuspensos com solução estéril de glicerol 25 % e uma gota da suspensão de esporos foi transferida para erlenmeyers contendo 100 mL de meio de cultura PDSM. As culturas foram incubadas por 65 h a 27 °C e agitação constante de 200 rpm, em incubadora shaker Tecnal TE-424

Após 65 h de crescimento, foi adicionado a cada erlenmeyers 1,0 mL de solução de ácido gálico solubilizado em álcool etílico P.A. em uma concentração de 30 mg/mL. Após a adição do substrato, os fungos foram novamente incubados a 27 °C com agitação mecânica de 200 rpm por 168 horas

Ao final do período de bioconversão, o meio reacional foi filtrado, gerando uma massa fúngica e um filtrado aquoso que foi supersaturado com cloreto de sódio. A fração aquosa supersaturada foi extraída com acetato de etila e o solvente foi removido por meio de secagem em evaporador rotativo a vácuo. Este processo foi repetido até total extração.

Para obtenção de possíveis derivados presentes na massa fúngica, a mesma foi extraída

com acetona P.A. e seca em evaporador rotativo.

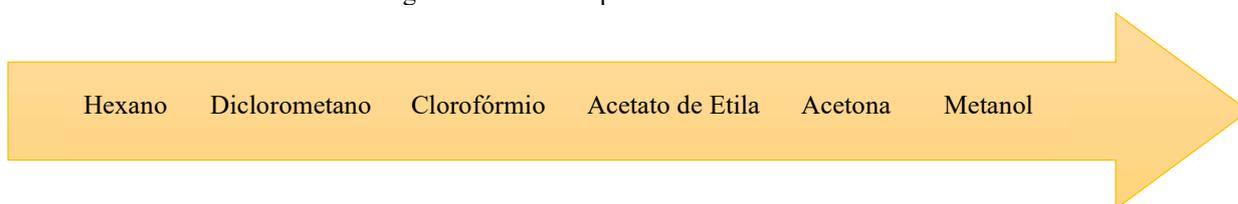
Purificação de derivados

Os derivados foram inicialmente purificados pelo método de cromatografia em coluna, utilizando sílica gel 40-63 μm (230-400 mesh; Sigma) como fase estacionária. Como fase móvel foram utilizadas misturas de solventes contendo acetato de etila, metanol, clorofórmio, ácido fórmico, diclorometano, hexano e acetona em diferentes proporções. O processo de separação foi acompanhado por cromatografia em camada delgada (CCD). As frações obtidas que possuíam substâncias com mesmo fator de retenção (R_f) foram agrupadas e secas em evaporador rotativo. Como método de purificação adicional foi realizada cromatografia em camada delgada preparativa, dissolução fracionada e recristalização das amostras.

A cromatografia em camada delgada (CCD) preparativa foi realizada utilizando cromatofolhas de alumínio DC-Fertigfolien ALUGRAM® Xtra SIL G/UV254, de 20x20 cm, sílica gel 60 F254 previamente saturada com fase móvel acetona/metanol/acetato de etila/diclorometano (2:0,5:0,5:2). Após a eluição, as placas foram observadas em câmara UV nos comprimentos de onda de 254 e 365 nm, as bandas foram demarcadas com grafite e foi realizado a raspagem da sílica, que foi extraída com álcool metílico em agitador magnético por 30 minutos à temperatura ambiente

A dissolução fracionada foi realizada adicionando solventes orgânicos até solubilização parcial da amostra e em seguida a porção solúvel foi retirada com auxílio de pipeta de pasteur de vidro. Este processo foi repetido com diferentes solventes em ordem de polaridade crescente (Figura 1). As frações obtidas foram analisadas por CCD e agrupadas conforme o R_f dos compostos presentes.

Figura 1- Ordem de polaridade de solventes



Fonte: Elaborado pelo autor

No processo de recristalização a amostra foi solubilizada e posteriormente precipitada através de refrigeração abaixo de 4 °C, ou pela adição de solvente no qual a amostra possui menor solubilidade, formando assim um precipitado. Em seguida o solvente foi removido com pipeta de pasteur de vidro e as amostras obtidas foram analisadas por CCD.

Células e vírus

Nos experimentos de avaliação da citotoxicidade e da atividade antiviral foram utilizadas células originárias de rim de macaco *Cercopithecus aethiops* (células Vero E6). Estas células foram cultivadas em frascos de cultura de 75 cm² contendo 10 mL de meio de cultura Leibovitz (L-15- Sigma-Aldrich) suplementado com 5 % de soro fetal bovino (SBF- Sigma-Aldrich) e 1 % de solução de antibiótico e antifúngicos (ATB/ solução de 10.000 U penicilina, 10.000 mg estreptomicina, 25 mg anfotericina B – Sigma-Aldrich) e mantidas a 37 °C em estufa, com renovação periódica das culturas celulares.

Nos experimentos foram utilizados os vírus: herpes simplex vírus tipo 1 (HSV-1) cepa KOS foi gentilmente cedido pela Prof^a. Dr^a. Cláudia Maria Oliveira Simões da Universidade Federal de Santa Catarina; herpes simplex vírus tipos 2 (HSV-2) cepa 333 foi gentilmente cedido pelo Prof. Dr. Tomas Bergstrom, da Universidade de Gotemburg (Suécia). Os estoques virais foram mantidos a - 80°C e titulados através do método de placa de lise.

Avaliação da citotoxicidade

A avaliação da citotoxicidade foi realizada através do ensaio colorimétrico com Sulforrodamina B (SRB), *in vitro*, descrito por Vichai e Kirtikara (2006)Vichai e Kirtikara (2006)Vichai e Kirtikara (2006)Vichai e Kirtikara (2006)Vichai e Kirtikara (2006). Assim, uma suspensão de células Vero E6, contendo aproximadamente 9×10^4 células/mL, foi obtida através da tripsinização de um frasco de cultura celular. Essa suspensão foi distribuída em uma placa de 96 cavidades (100 µL por cavidade). Após 24 h de incubação, a 37 °C, o meio de cultura foi retirado e foram adicionadas as amostras diluídas em L15 + 1 % de ATB em 8 concentrações diferentes, preparadas em diluição seriada (1:2). Em 4 poços foi adicionado controle com L-15 + ATB 1 % + dimetilsulfóxido (DMSO) 1 % (controle celular com DMSO), e em 8 cavidades foi adicionado apenas L-15 + ATB 1 % para controle celular. A placa foi incubada em uma estufa a 37 °C por 72 h.

Após este período, o meio foi removido das cavidades e as células foram fixadas adicionando 100 µL de solução de ácido tricloroacético (TCA) 10 % resfriado, e a placa foi incubada a 4 °C por uma hora. Após o período de incubação o TCA foi removido e as células foram lavadas 4 vezes com água destilada gelada. Após este procedimento, a placa foi reservada em temperatura ambiente por 24 h para secagem.

Posteriormente, foi adicionado 100 µL de sulforrodamina B em cada cavidade por 30 minutos em temperatura ambiente e em seguida a placa foi lavada 4 vezes com ácido acético 1 % para remoção do corante não ligado às proteínas celulares.

Para realizar a leitura, foi adicionado 100 µL de solução tris base 10mM em cada cavidade e a placa foi agitada por 5 minutos em agitador de mesa para solubilizar o corante ligado às proteínas celulares. Em seguida foi realizado a leitura em espectrofotômetro a 510 nm. Para a determinação do percentual de viabilidade celular de cada amostra, foi calculada a porcentagem em relação a absorbância do controle celular pela fórmula:

$$\% \text{ Inibição} = \frac{\text{ABS A}}{\text{ABS CC}} \times 100$$

Avaliação da atividade antiviral - método de redução de placas de lise

O ensaio de redução de placas de lise – Pós-tratamento foi realizado seguindo a metodologia proposta por Burleson, Chambers e Wiedbrauk (1992), em que as células Vero E6 (2×10^5 células/mL) foram cultivadas em placas de 24 poços em meio L-15 + 1 % de ATB + SBF 5 % e incubadas a 37 °C, por 24 horas. Após este período, o meio de cultura foi retirado e foi adicionado 400 µL de suspensão viral (50 a 100 UPF por cavidade) preparada em L-15 + ATB 1 % em cada cavidade. A placa foi incubada por uma hora com agitação intermitente a cada 15 minutos. Em seguida, a suspensão viral foi aspirada e foi adicionado 1 mL das diferentes concentrações de cada amostra, a partir da Concentração máxima não tóxica, diluídas seriadamente (razão 1:2) em uma solução (1:1) de meio L-15 (2x) + CMC (1,5 %), com 1 % ATB. Posteriormente, as placas foram incubadas a 37 °C, por 72 h para o HSV-1 Cepa KOS e 48 h para o HSV-2 Cepa 333. Para o controle viral somente foi adicionada a solução (1:1) de meio L-15 (2X) + CMC 1,5 % com 1 % de ATB. Foi utilizado como controle positivo o fármaco aciclovir (ACV – Sigma®) a uma concentração de 15 µg/mL. Após o período de incubação, as amostras foram retiradas e as células foram fixadas e coradas adicionando 200 µL preto de naftaleno e as placas foram mantidas sob agitação durante 40 minutos em temperatura ambiente, e em seguida o corante foi retirado.

A quantificação foi realizada através da contagem visual com o auxílio de uma lupa do número de focos virais. O percentual de inibição de replicação viral é calculado com base na média aritmética do controle viral que indica 100 % de replicação viral através da seguinte fórmula:

$$\% \text{ Inibição} = 100 - \frac{n^{\circ} \text{Focos na amostra}}{n^{\circ} \text{Focos no controle viral}} \times 100$$

Avaliação da atividade virucida

A infecciosidade residual foi determinada pelo método de placas de lise proposto por Ekblad *et al.* (2010). Assim, células Vero E6 (2×10^5 células/mL) foram cultivadas em placas de 24 cavidades em meio L-15 + ATB 1 % + SBF 5 % e incubadas a 37 °C, por 24 horas.

Foram utilizados 50 µL de diferentes concentrações decrescentes das amostras (razão 1:2) + 50 µL da suspensão viral contendo $4,0 \times 10^4$ UFP/mL. As soluções obtidas foram então incubadas por 30 minutos. Após este período, 10 µL de cada solução foi adicionada a 990 µL de L-15 + 1 % de ATB a fim de se obter concentrações não inibitórias das amostras. Como controle viral foram utilizadas as suspensões virais tratadas apenas com meio L-15 e submetidos às mesmas condições que as amostras.

O meio de cultura da placa preparada com 24 horas de antecedência foi aspirado e as células foram lavadas com 500 µL de PBS gelado. O PBS foi aspirado e as células foram infectadas com 400 µL da suspensão viral tratada com a amostra. A placa foi incubada por uma hora a 37 °C com agitação periódica a cada 15 minutos. Após o período de incubação, a suspensão viral foi removida, as células foram lavadas cuidadosamente com PBS gelado e foi adicionado 1mL da solução (1:1) de meio L-15 (2X) + CMC 1,5 %, com 1 % de ATB. Estas células foram então incubadas a 37 °C, por 72 h para o HSV-1 Cepa KOS e 48 h para o HSV-2 Cepa 333. Após o período de incubação o meio foi retirado e as células foram fixadas e coradas com adição de 200 µL de preto de naftaleno, com agitação constante, por 40 minutos.

A quantificação foi realizada através da contagem visual da placa de lise nos diferentes tratamentos e nos controles virais, e a infecciosidade residual foi calculada com base no controle viral pela fórmula:

$$\% \text{ IR} = \frac{\text{n}^{\circ} \text{Focos na amostra}}{\text{n}^{\circ} \text{Focos no controle viral}} \times 100$$

A concentração efetiva a 50 % das (CE_{50}) foi obtida por análise de regressão. Com base nos valores de CE_{50} e CC_{50} foi calculado o índice de seletividade:

$$\text{IS} = \frac{\text{CC}_{50}}{\text{CE}_{50}} \times 100$$

Análise estatística

Os valores de CC_{50} e CE_{50} foram estimados por meio de curvas concentração-resposta por análise de regressão utilizando o programa GrafPad Prism 8. Os experimentos foram realizados em duplicata ou triplicata e os resultados expressos por meio da média de dois ou três experimentos independentes testados e desvio padrão.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os aspectos macroscópicos do fungo *Beauveria bassiana* estão de acordo com a avaliação de crescimento realizada por Deb, Rajesh e Monika (2017) e Wargane *et al.* (2019), possuindo um aspecto suave, algodonosos e coloração branco amarelada.

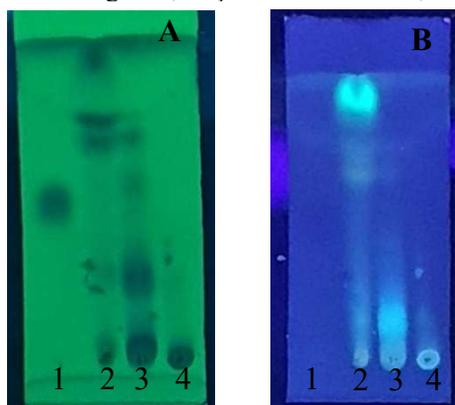
Foram realizados 4 ensaios semipreparativos (SP). Os fungos utilizados nos ensaios apresentaram um aspecto de massa amorfa com micélios dispersos, coloração levemente amarelada e presença de halos de crescimento. Tais características são descritas por outros autores em culturas de *Beauveria bassiana* em meio líquido PDSM (Cordeiro, 2019; Nóbrega, 2016).

Diversos fatores podem influenciar o processo de bioconversão, como a morfologia do fungo, agitação mecânica, meio de cultura, escolha das cepas, concentração e veículo para adição de substrato, fase de crescimento do fungo e a temperatura (El Enshasy, 2022; Prasad *et al.*, 2011; Qin; Dong, 2023; Varalaxmi; Vidyavathi, 2015).

Portanto, neste trabalho foram empregadas condições como temperatura de 27 °C que está de acordo com a faixa de temperatura considerada ideal para o crescimento de cepas *Beauveria bassiana* (Borisade; Magan, 2014; Mwamburi; Laing; Miller, 2015), agitação de 200 rpm que pode ser considerada apropriada para o fornecimento de oxigênio e crescimento adequado das cepas do fungo como demonstrado por outros autores (Carneiro *et al.*, 2010; Pazini, 2006), e o meio PDSM que é rico em nutrientes e fornece glicose como fonte de carbono e extrato de levedura e peptona como principais fontes de nitrogênio (Souza *et al.*, 2016; Fang *et al.*, 2019).

A partir da extração do meio reacional, foram geradas as frações acetato de etila e fração cetônica. Em ambas as frações, foi possível observar por CCD o consumo do substrato ácido gálico e a formação de derivados após 168 h de incubação (Figura 2).

Figura 2- Placa de CCD com ácido gálico, fração acetato de etila, fração cetônica, meio PDSM



Legenda: Ácido gálico (1); Fração acetato de etila (2); Fração cetônica (3); Meio PDSM (4). Fase móvel: Clorofórmio/Acetato de etila/Acetona/Ácido fórmico (8:3:2:1). Revelação em luz UV 254 nm (A) e 365 nm (B).
Fonte: Elaborado pelo autor

Purificação dos derivados

Um dos principais desafios nos estudos de produtos naturais, é o isolamento das moléculas de interesse, uma vez que estes compostos possuem diferentes padrões estruturais e propriedades físico-químicas, e normalmente são encontrados em matrizes complexas junto a diversos compostos (Talapatra; Talapatra, 2015)(Talapatra; Talapatra, 2015)(Talapatra; Talapatra, 2015)(Talapatra; Talapatra, 2015). De acordo com Sarker e Nahar (2012)Sarker e Nahar (2012), um protocolo apropriado para extração e isolamento só pode ser elaborado depois que os compostos alvo estiverem estabelecidos, portanto, para a purificação de produtos naturais desconhecidos é necessário desenvolver métodos piloto de extração e isolamento para descobrir o mecanismo mais adequado para a amostra.

Para purificação dos derivados obtidos foi utilizado inicialmente cromatografia em coluna, onde a fase móvel utilizada foi uma mistura de solventes orgânicos. A escolha da fase móvel foi determinada através de testes utilizando CCD em estudos prévios realizados pela equipe do laboratório.

As frações acetato de etila dos ensaios SP1 e SP2 foram separadas por cromatografia em coluna CC1 e CC2 respectivamente, utilizando uma mistura de solventes contendo clorofórmio/acetato de etila/acetona/ácido fórmico (8:3:2:1) como fase móvel. As subfrações coletadas a partir das colunas cromatográficas CC1 e CC2 foram comparadas e agrupadas conforme os derivados presentes.

Já as frações acetato de etila dos ensaios SP3 e SP4 foram associadas e separadas por cromatografia em coluna CC3. Na tentativa de melhorar o processo de purificação foram

utilizadas três fases móveis em sequência, sendo clorofórmio/acetato de etila/metanol (60:30:4), inicialmente utilizada para melhor separação dos derivados apolares, acetona/metanol/acetato de etila/diclorometano (2:0,5:0,5:2), para separar os produtos mais polares, e acetona/metanol/acetato de etila/diclorometano/água (2:0,6:0,5:0,8:0,2) para separação de compostos que estavam retidos na coluna cromatográfica.

Para purificação inicial da fração cetônica por cromatografia em coluna CC4, dentre as fases móveis testadas, a que demonstrou melhor separação dos derivados foi clorofórmio/acetato de etila/acetona/ácido fórmico (8:3:2:1).

Considerando que os processos iniciais de cromatografia em coluna das frações acetato de etila e cetônica não geraram derivados puros foi necessário realizar purificação adicional das subfrações obtidas. Inicialmente foi realizada a dissolução fracionada de todas as subfrações, que foram agrupadas conforme a polaridade dos derivados para posterior separação por cromatografia em camada delgada preparativa, cromatografia em coluna, e recristalização.

As subfrações contendo derivados mais apolares que o ácido gálico, foram inicialmente tratadas com hexano, para remoção de impurezas de menor polaridade. Em seguida foram recristalizadas com diclorometano, que permitiu a obtenção do derivado SL1.

O processo de recristalização foi repetido com todas as amostras, utilizando hexano, diclorometano, clorofórmio, acetato de etila, acetona e metanol em ordem de polaridade crescente. As amostras foram comparadas por CCD e agrupadas conforme os derivados presentes. As frações solúveis em diclorometano e clorofórmio foram posteriormente recristalizadas com metanol sob baixa temperatura, o sobrenadante foi aspirado e purificado por cromatografia em coluna CC5, utilizando como fase móvel acetato de etila/hexano/diclorometano/metanol/clorofórmio/ácido fórmico (1:1:1,5:0,5:1:0,15). Através dessa coluna cromatográfica foi possível obter o derivado SL2.

A partir da coluna cromatográfica CC5 foi obtida uma amostra contendo principalmente 2 derivados, que foram submetidos a recristalização. A fração foi solubilizada em acetona e posteriormente foi acrescentado diclorometano. A amostra foi resfriada abaixo de 4 °C e a porção solúvel foi evaporada e tratada com hexano para remoção de impurezas, dando origem ao derivado SL3.

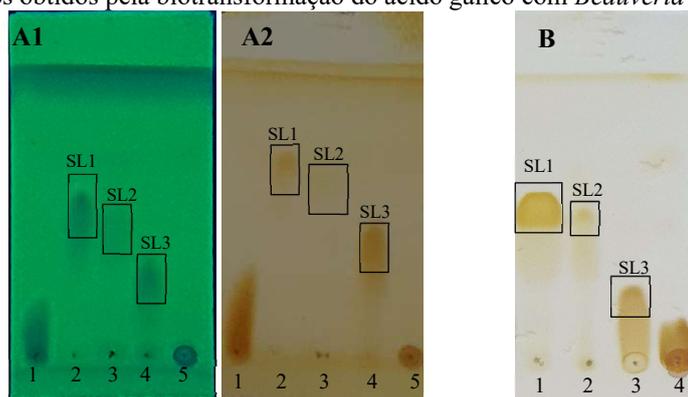
Derivados obtidos

Foram obtidos 3 derivados com quantidades suficientes para realização dos ensaios de atividade antiviral e virucida, e elucidação estrutural.

A Figura 3 mostra que os 3 derivados obtidos possuem Rf diferentes entre si, e que são

produtos distintos dos compostos presentes no meio de cultura. Ao realizar CCD com fase móvel diclorometano/acetato de etila/metanol (8:1:0,7) o derivado SL1 apresentou Rf 0,55, o derivado SL2 Rf 0,39 e o derivado SL3 Rf 0,27. Todos os derivados são visíveis no comprimento de onda de 254 nm e apresentam coloração amarelada quando revelados com iodo ressublimado. O iodo é um revelador universal, capaz de identificar compostos com duplas ligações (Simões *et al.*, 2016).

Figura 3- Derivados obtidos pela biotransformação do ácido gálico com *Beauveria bassiana* ATCC 7159



Legenda: **Figura A:** Ácido gálico (1), SL1 (2), SL2 (3), SL3 (4), PDSM (5). Fase móvel diclorometano/acetato de etila/metanol (8:1:0,7). Visualização em 254 nm (A1) e revelação com iodo ressublimado (A2). **Figura B:** SL1 (1), SL2 (2), SL3 (3), PDSM + ácido gálico 168h (4) revelado com iodo ressublimado

Fonte: Elaborado pelo autor

Citotoxicidade

A citotoxicidade do ácido gálico e das amostras SL1, SL2 e SL3 foi avaliada através do método da sulforrodamina B. De acordo com Shakil *et al.*, 2022, o ensaio de sulforrodamina B (SRB) tem sido uma escolha popular devido à sua simplicidade, precisão, confiabilidade e reprodutibilidade. Este método é baseado na capacidade que a sulforrodamina B tem de se ligar às proteínas celulares em condições levemente ácidas. Ao remover o excesso, a quantidade de sulforrodamina B presente na amostra é diretamente proporcional às células integras. Deste modo, o corante é solubilizado em condições básicas, permitindo a medição de densidade ótica. Entre as vantagens de se utilizar este método, está a sua estabilidade por longo período de tempo e menor variação quando aplicado a diferentes linhagens celulares em comparação a ensaios colorimétricos, como por exemplo, com ensaio colorimétrico com o sal de tetrazólio (MTT) (Nedel *et al.*, 2011; Pawar; Dwivedi, 2023).

Antes da determinação da citotoxicidade através do ensaio da SRB, foi determinado visualmente para cada amostra a concentração máxima não tóxica (CMNT). Esta análise foi realizada através da visualização microscópica da morfologia e alterações celulares presentes na monocamada celular, utilizando o microscópio invertido. As concentrações máximas não

tóxicas (CMNT) foram iguais a 12,5 µg/mL e 25 µg/mL para o ácido gálico e amostra SL2, respectivamente. As amostras SL1 e SL3 exibiram valores de CMNT superior a 100 µg/mL.

As concentrações citotóxicas a 50 % (CC₅₀) de cada amostra foram calculadas através de análise de regressão linear (Tabela 1). As amostras SL1 e SL3 apresentaram os valores de CC₅₀ maior do que 100 µg/mL. O ácido gálico demonstrou uma CC₅₀ de 71,61 ± 7,02 µg/mL e o derivado SL2 apresentou um valor de CC₅₀ igual a 31,43 ± 2,40 µg/mL.

Atividade antiviral

O método de redução de placas de lise, em relação ao ensaio do pós-tratamento revelou que as amostras SL1, SL2 e SL3 apresentaram somente 14,7 %, 38,7 % e 11,45 % de inibição da replicação do vírus HSV-1 cepa KOS, respectivamente, nas CMNT, enquanto o ácido gálico apresentou maior inibição da replicação do vírus HSV-1 cepa com valores de concentração efetiva (CE₅₀) igual a 6,68 ± 1,15 µg/mL e um IS igual a 10,44. Os resultados obtidos com o ácido gálico frente ao HSV-1 cepa KOS estão de acordo com a literatura. Estudo anterior descreveu que o ácido gálico apresentou atividade contra o vírus apresentado um valor de IS igual a 11,72 (Kratz *et al.*, 2008). O ácido gálico apresentou 100 % de inibição da replicação do vírus HSV-2 cepa 333 em 12,5 µg/mL, maior concentração testada no pós-tratamento e a amostra SL1 apresentou somente 37,50 % de inibição da replicação do vírus HSV-2 cepa 333 em 100 µg/mL, maior concentração testada no mesmo ensaio. Os derivados SL2 e SL3 não apresentaram atividade inibição frente ao HSV-2 cepa 333. O aciclovir foi utilizado como controle positivo e apresentou 100 % de inibição da replicação viral na concentração testada de 15 µg/mL.

O estudo da atividade virucida frente ao HSV-1 cepa KOS, avaliada através do método de redução de placa de lise demonstrou que o derivado SL1 que apresentou somente 33,21 ± 3,54 % de inibição da infecciosidade residual, não sendo possível calcular sua CE₅₀. O ácido gálico apresentou CE₅₀ igual a 10,92 ± 2,39 µg/mL e os derivados SL1 e SL2 apresentaram CE₅₀ igual a 4,215 ± 0,74 µg/mL e 13,73 ± 1,52 µg/mL respectivamente. As diferenças significativas foram avaliadas por One-way ANOVA com teste de comparação múltipla de Tukey, que revelou maior atividade virucida da amostra SL2 em comparação ao ácido gálico e ao derivado SL3 (P < 0,05), o derivado SL3 não apresentou diferença estatisticamente significativa em comparação ao ácido gálico (P > 0,05). A concentração efetiva a 50 % (CE₅₀) dos derivados frente ao HSV-1 cepa KOS é demonstrada no Quadro 1.

O índice de seletividade das amostras é um importante indicador da potencial atividade de uma molécula, pois leva em consideração uma relação entre a atividade de interesse e a

toxicidade do material testado (Robles-Loaiza *et al.*, 2022). Assim, mesmo que o derivado SL2 apresentou uma maior ação virucida do que o ácido gálico e o derivado SL3, quando se avalia os índices de seletividade pode-se verificar que não há diferença entre os IS obtidos e que estes derivados apresentaram atividade virucida equivalente ao ácido gálico. segundo diversos autores, compostos que apresentam índice de seletividade superior a 4, podem ser considerados agentes antivirais promissores (Bag *et al.*, 2013; Hochheim *et al.*, 2019; Savi *et al.*, 2010; Theerawatanasirikul *et al.*, 2021), portanto, o ácido gálico, assim como os derivados obtidos por biotransformação apresentaram potencial atividade virucida frente ao HSV-1 cepa KOS.

Quadro 1- Resultado da avaliação da citotoxicidade e da atividade antiviral do ácido gálico e dos derivados obtidos por biotransformação, através de ensaio de redução de placas de lise.

Tratamento	Citotoxicidade CC ₅₀ ± DP (µg/mL)	Pós-tratamento CE ₅₀ ± DP (µg/mL)	IS	Virucida CE ₅₀ ± DP (µg/mL)	IS
Ácido gálico	71,61 ± 7,02	6,68 ± 1,15	10,8	10,92 ± 2,39	6,55
SL1	≥ 100	*	-	*	-
SL2	31,43 ± 2,406	*	-	4,21 ± 0,74	7,46
SL3	≥ 100	*	-	13,73 ± 1,52	7,28

CC₅₀ = concentração citotóxica a 50 %; CE₅₀ = concentração efetiva a 50 % de inibição; *apresentou % de inibição menores que 50 % na maior concentração testada em um experimento; IS = CC₅₀/CE₅₀. Os valores obtidos representam a média de três experimentos independentes.

Fonte: Elaborado pelo autor

A atividade virucida permite avaliar a ação direta das amostras sobre as partículas virais, e a consequente diminuição da sua capacidade infecciosa (Galabov, 2007). Devido à natureza crônica do HSV, a ausência de tratamentos capazes eliminar completamente o vírus do hospedeiro e a inexistência de vacinas eficazes, a obtenção de derivados com atividade virucida é particularmente vantajosa, pois representa uma alternativa promissora para o controle da transmissão viral, permitindo a produção formulações tópicas que podem prevenir entrada do vírus em pessoas soronegativa (Sauerbrei *et al.*, 2016; Suazo *et al.*, 2015). Além de seu caráter preventivo, o uso tópico de substâncias virucidas, pode agir de maneira sinérgica às terapias antivirais convencionais, minimizando a seleção de cepas resistentes (Sicurella *et al.*, 2021).

CONCLUSÃO

Através da biotransformação do ácido gálico, foi possível obter três derivados (SL1, SL2 e SL3) em quantidades satisfatórias para determinação da citotoxicidade, atividade antiviral e elucidação estrutural. O ensaio de sulforrodamina B revelou que o SL1 e SL3, tiveram citotoxicidade reduzida em comparação com o ácido gálico e o derivado SL2 se mostrou mais citotóxico que seu precursor. A avaliação da atividade pelo método de redução de placa de lise demonstrou que o ácido gálico apresenta atividade antiviral e virucida frente ao HSV-1 cepa KOS. Os derivados SL2 e SL3, apresentaram índice de seletividade equivalente ao do ácido gálico, no ensaio virucida frente ao HSV-1 Cepa KOS, porém com menor atividade antiviral. O derivado SL1 não demonstrou promissoras atividades antivirais e virucida frente aos vírus HSV-1 cepa KOS e HSV-2 cepa 333 quando comparada com as atividades do ácido gálico, frente aos mesmos vírus.

REFERÊNCIAS

AL ZHRANI, N. A.; EL-SHISHTAWY, R. M.; ASIRI, A. M. Recent developments of gallic acid derivatives and their hybrids in medicinal chemistry: a review. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 204, p. 112609, 2020.

BADHANI, B.; SHARMA, N.; KAKKAR, R. Gallic acid: a versatile antioxidant with promising therapeutic and industrial applications. **RSC Advances**, v. 5, n. 35, p. 27540–27557, 2015.

BAG, P. *et al.* An indole alkaloid from a tribal folklore inhibits immediate early event in HSV-2 infected cells with therapeutic efficacy in vaginally infected mice. **PLOS ONE**, v. 8, n. 10, p. e77937, 2013.

BORISADE, O. A.; MAGAN, N. Growth and sporulation of entomopathogenic *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae*, *Isaria farinosa* and *Isaria fumosorosea* strains in relation to water activity and temperature interactions. **Biocontrol Science and Technology**, v. 24, n. 9, p. 999–1011, 2014.

BURLESON, F. G.; CHAMBERS, T. M.; WIEDBRAUK, D. L. **Virology: a laboratory manual**. 1. ed. San Diego: Academic Press, 1992.

CARNEIRO, E. O. *et al.* Structure-based prediction and biosynthesis of the major mammalian metabolite of the cardioactive prototype LASSBio-294. **Bioorganic & medicinal chemistry letters**, v. 20, n. 12, p. 3734–3736, 2010.

CHAYAVICHITSILP, P. *et al.* Herpes simplex. **Pediatrics In Review**, v. 30, n. 4, p. 119–130, 2009.

CHEN, G. H. *et al.* Significant elevation of antiviral activity of strictinin from Pu'er tea after thermal degradation to ellagic acid and gallic acid. **Journal of Food and Drug Analysis**, v. 23, n. 1, p. 116–123, 2015.

CHOI, H. R. *et al.* Enhancing the antimicrobial effect of genistein by biotransformation in microbial system. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, v. 63, p. 255–261, 2018.

CHOJNACKA, K. *et al.* Antiviral properties of polyphenols from plants. **Foods**, v. 10, n. 10, p. 2277, 2021.

COLE, S. Herpes simplex virus: epidemiology, diagnosis, and treatment. **Nursing Clinics**, v. 55, n. 3, p. 337–345, 2020.

CORDEIRO, K. C. F. A **Biotransformação fúngica da hesperetina e sua aplicação na produção de metabólitos ativos**. 2018. 135 f. Tese (Doutorado em Inovação Farmacêutica em Rede) - Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2019.

DEB, L.; RAJESH, T. W.; MONIKA, H. J. Growth of *Beauveria bassiana* in different solid media. **Trends in Biosciences**, v. 10, n. 23, p. 4815–4817, 2017.

EKBLAD, M. *et al.* A highly lipophilic sulfated tetrasaccharide glycoside related to muparfostat (PI-88) exhibits virucidal activity against herpes simplex virus. **Antiviral Research**, v. 86, n. 2, p. 196–203, 2010.

EL ENSHASY, H. A. Fungal morphology: a challenge in bioprocess engineering industries for product development. **Current Opinion in Chemical Engineering**, v. 35, p. 100729, 2022.

FANG, X. *et al.* Changes in the biotransformation of green tea catechins induced by different carbon and nitrogen sources in *Aspergillus niger* RAF106. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, p. 486908, 2019.

GALABOV, A. S. Virucidal agents in the eve of manorapid synergy®. **GMS Krankenhaushygiene Interdisziplinär**, v. 2, n. 1, 2007.

GNAWALI, G. R.; ACHARYA, P. P; RAJBHANDARI, M. Isolation of gallic acid and estimation of total phenolic content in some medicinal plants and their antioxidant activity. **Nepal Journal of Science and Technology**, v. 14, n. 1, p. 95-102, 2013.

GROGAN, G. J.; HOLLAND, H. L. The biocatalytic reactions of *Beauveria* spp. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 9, n. 1–3, p. 1–32, 2000.

HOCHHEIM, S. *et al.* Determination of phenolic profile by HPLC–ESI-MS/MS, antioxidant activity, *in vitro* cytotoxicity and anti-herpetic activity of propolis from the brazilian native bee *Melipona quadrifasciata*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 29, n. 3, p. 339–350. 2019.

HSU, W. C. *et al.* Limonium sinense and gallic acid suppress hepatitis C virus infection by blocking early viral entry. **Antiviral Research**, v. 118, p. 139–147, 2015.

JIANG, Y. *et al.* Gallic acid: a potential anti-cancer agent. **Chinese Journal of Integrative Medicine**, v. 28, n. 7, p. 661–671, 2022.

JOHNSTON, C. *et al.* Herpes simplex virus viremia during primary genital infection. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 198, n. 1, p. 31–34, 2008.

KALITA, D.; KAR, R.; HANDIQUE, J. G. A theoretical study on the antioxidant property of gallic acid and its derivatives, **Journal of Theoretical and Computational Chemistry**, v. 11, n. 2, p. 391–402, 2012.

KIM, D. H.; JE, J. Y. Antimicrobial activity of gallic acid-grafted-chitosan against fish pathogens. **Journal of Carbohydrate Chemistry**, v. 34, n. 3, p. 163–171, 2015.

KOZŁOWSKA, E. *et al.* Cascade biotransformation of dehydroepiandrosterone (DHEA) by *Beauveria* species. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 1–11, 2018.

KRATZ, J. M. *et al.* Anti-HSV-1 and anti-HIV-1 activity of gallic acid and pentyl gallate. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 103, n. 5, p. 437–442, 2008.

LEE, D. H.; ZUCKERMAN, R. A. Herpes simplex virus infections in solid organ transplantation: guidelines from the American Society of Transplantation Infectious Diseases Community of Practice. **Clinical Transplantation**, v. 33, n. 9, p. e13526, 2019.

LEE, J. H. *et al.* Antiviral effects of black raspberry (*Rubus coreanus*) seed and its gallic acid against influenza virus infection. **Viruses**, v. 8, n. 6, p. 157, 2016.

LONG, W. Y. *et al.* Gallic acid inhibits Kaposi's Sarcoma-associated herpesvirus lytic reactivation by suppressing RTA transcriptional activities. **Food Science & Nutrition**, v. 9, n. 2, p. 847–854, 2021.

MAGEL, G.; TYRING, S. **Herpesviridae: a look into this unique family of viruses**. 1. ed. Croácia: BoD - Books on Demand, 2012.

MWAMBURI, L. A.; LAING, M. D.; MILLER, R. M. Effect of surfactants and temperature on germination and vegetative growth of *Beauveria bassiana*. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 46, n. 1, p. 67–74, 2015.

NEDEL, F. *et al.* Comparative analysis of two colorimetric assays in dental pulp cell density. **International Endodontic Journal**, v. 44, n. 1, p. 59–64, 2011.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs over the nearly four decades from 01/1981 to 09/2019. **Journal of Natural Products**, v. 83, n. 3, p. 770–803,

2020.

NÓBREGA G. C. **Biotransformação da curcumina por *Beauveria* do cerrado em derivado mais solúvel e potencialmente antioxidante.** 2016. 94 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2016.

PAWAR, M.; DWIVEDI, J. Gi50 inhibition study on ethanolic extracts of *Convolvulus pluricaulis*, *Michelia champaca* and *Chromolaena odorata* against human breast (mcf-7) and colon cancer (ht-29) cell line by sulforhodamine b (srb) assay method. **World Journal of Pharmaceutical Science and Research**, v. 2, n. 6, p. 254–262, 2023.

PAZINI, F. **Preparação de derivados funcionalizados do novo protótipo de fármaco neuroativo lassbio 581 por bioconversão.** 2006. 190 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2006.

PRASAD, G. S. *et al.* Biotransformation of meloxicam by *Cunninghamella blakesleeana*: significance of carbon and nitrogen source. **Indian Journal of Microbiology**, v. 51, n. 1, p. 82–87, 2011.

QIN, D.; DONG, J. Multi-level optimization and strategies in microbial biotransformation of nature products. **Molecules**, v. 28, n. 6, p. 2619, 2023.

QUEIROZ, M. F. *et al.* Gallic acid-dextran conjugate: green synthesis of a novel antioxidant molecule. **Antioxidants**, v. 8, n. 10, p. 478, 2019.

RECHENCHOSKI, D. Z. *et al.* Herpesvirus: an underestimated virus. **Folia Microbiologica**, v. 62, n. 2, p. 151–156, 2017.

ROBLES-LOAIZA, A. A. *et al.* Traditional and computational screening of non-toxic peptides and approaches to improving selectivity. **Pharmaceuticals**, v. 15, n. 3, p. 323, 2022.

SARJIT, A.; WANG, Y.; DYKES, G. A. Antimicrobial activity of gallic acid against thermophilic *Campylobacter* is strain specific and associated with a loss of calcium ions. **Food Microbiology**, v. 46, p. 227–233, 2015.

SARKER, S. D.; NAHAR, L. An introduction to natural products isolation. **Methods in Molecular Biology**, v. 864, p. 1–25, 2012.

SAUERBREI, A. *et al.* Database on natural polymorphisms and resistance-related non-synonymous mutations in thymidine kinase and DNA polymerase genes of herpes simplex virus types 1 and 2. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 71, n. 1, p. 6–16, 2016.

SAVI, L. A. *et al.* Evaluation of antirotavirus activity of flavonoids. **Fitoterapia**, v. 81, n. 8, p. 1142–1146, 2010.

SCHALKWIJK, H. H.; SNOECK, R.; ANDREI, G. Acyclovir resistance in herpes simplex viruses: prevalence and therapeutic alternatives. **Biochemical Pharmacology**, v. 206, p. 115322, 2022.

SEO, C. S. *et al.* Quantitative analysis and *in vitro* anti-inflammatory effects of gallic acid, ellagic acid, and quercetin from *Radix sanguisorbae*. **Pharmacognosy Magazine**, v. 12, n. 46, p. 104, 2016.

SHAKIL, M. S. *et al.* Key considerations when using the sulforhodamine B assay for screening novel anticancer agents. **Anti-Cancer Drugs**, v. 33, n. 1, p. 6–10, 2022.

SICURELLA, M. *et al.* Mangiferin-loaded smart gels for hsv-1 treatment. **Pharmaceutics**, v. 13, n. 9, 2021.

SIMÕES, C. M. O. *et al.* **Farmacognosia: do produto natural ao medicamento**. 1. ed. Santana: Artmed Editora, 2016.

SINGH, M.; GOODYEAR, H. M.; BREUER, J. Herpes simplex virus infections. **Harper's Textbook of Pediatric Dermatology**, p. 598–611, 2019.

SMITHA MS; SINGH S; SINGH R. Microbial bio transformation: a process for chemical alterations. **Journal of Bacteriology & Mycology: Open Access**, v. 4, n. 2, 2017.

SORRENTINO, E. *et al.* Antimicrobial activity of gallic acid against food-related pseudomonas strains and its use as biocontrol tool to improve the shelf life of fresh black truffles. **International Journal of Food Microbiology**, v. 266, p. 183–189, 2018.

SOUZA, P. L. D. M. *et al.* One step N-glycosylation by filamentous fungi biofilm in bioreactor of a new phosphodiesterase-3 inhibitor tetrazole. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 26, n. 13, p. 3177–3181, 2016.

STEINER, I.; BENNINGER, F. Manifestations of herpes virus infections in the nervous system. **Neurologic Clinics**, v. 36, n. 4, p. 725–738, 1 nov. 2018.

SUAZO, P. A. *et al.* Herpes simplex virus 2 infection: molecular association with HIV and novel microbicides to prevent disease. **Medical Microbiology and Immunology** v. 204, p.

161-176, 2015.

ŠUDOMOVÁ, M. *et al.* Flavonoids target human herpesviruses that infect the nervous system: mechanisms of action and therapeutic insights. **Viruses**, v. 14, n. 3, p. 592, 2022.

TALAPATRA, S. K.; TALAPATRA, B. **Chemistry of Plant Natural Products**. 1. ed. Berlin: Springer, 2015.

THEERAWATANASIRIKUL, S. *et al.* Natural phytochemicals, luteolin and isoginkgetin, inhibit 3c protease and infection of FMDV, in silico and in vitro. **Viruses**, v. 13, n. 11, p. 2118, 1 nov. 2021.

TOGNARELLI, E. I. *et al.* Herpes simplex virus evasion of early host antiviral responses. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 9, p. 449387, 2019.

TSANG, M. S. M. *et al.* Anti-inflammatory activities of pentaherbs formula, berberine, gallic acid and chlorogenic acid in atopic dermatitis-like skin inflammation. **Molecules**, v. 21, n. 4, p. 519, 2016.

VARALAXMI, S.; VIDYAVATHI, M. Optimization studies for clozapine biotransformation to its active metabolite-norclozapine using fungi. **World Journal of Pharmaceutical Research**, v. 4, n. 5, p. 1235–1245, 2015.

VICHAI, V.; KIRTIKARA, K. Sulforhodamine B colorimetric assay for cytotoxicity screening. **Nature Protocols**, v. 1, n. 3, p. 1112–1116, 2006.

WARGANE, V. *et al.* Cultural and morphological characterizations of *Beauveria bassiana*. **Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry**, v. 8, n. 6, p. 591–594, 2019.

WU, Y.-H. *et al.* Structure properties and mechanisms of action of naturally originated phenolic acids and their derivatives against human viral infections. **Current Medicinal Chemistry**, v. 24, n. 38, 2017.

WUCHERPFENNIG, T. *et al.* Morphology and rheology in filamentous cultivations. **Advances in Applied Microbiology**, v. 72, p. 89–136, 2010.

XIE, L. *et al.* Methylglucosylation of aromatic amino and phenolic moieties of drug-like biosynthons by combinatorial biosynthesis. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 115, n. 22, p. E4980–E4989, 2018.

XIE, Y. *et al.* Alpha-herpesvirus thymidine kinase genes mediate viral virulence and are

potential therapeutic targets. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, n. MAY, p. 448686, 8 maio 2019.