



UNICAMP

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE QUÍMICA**

CARLA PORTO DA SILVA

***“Potencial enzimático da microbiota da pele humana e sua
ação sobre insumos de fragrâncias”***

**TESE DE DOUTORADO APRESENTADA AO
INSTITUTO DE QUÍMICA DA UNICAMP PARA
OBTENÇÃO DO TÍTULO DE DOUTOR EM CIÊNCIAS.**

ORIENTADOR: PROFA. DRA. ANITA JOCELYNE MARSAIOLI

**ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA TESE DEFENDIDA
POR CARLA PORTO DA SILVA, E ORIENTADA PELO PROFA. DRA. ANITA JOCELYNE MARSAIOLI.**

Assinatura do Orientador

CAMPINAS, 2012

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR SIMONE LUCAS - CRB8/8144 -
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE QUÍMICA DA UNICAMP

Si38p Silva, Carla Porto da (1976-).
Potencial enzimático da microbiota da pele humana e sua ação sobre insumos de fragrâncias / Carla Porto da Silva. – Campinas, SP: [s.n.], 2012.

Orientador: Anita Jocelyne Marsaioli.
Tese (doutorado) - Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Química.

1. Microbiota da pele humana. 2. Triagem enzimática. 3. Fragrâncias. I. Marsaioli, Anita Jocelyne. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Química. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em inglês: Enzymatic potential of the human skin microbiota and its effect on fragrance ingredients

Palavras-chave em inglês:

Human skin microbiota
High-throughput screening
Fragrance ingredients

Área de concentração: Química Orgânica

Titulação: Doutor em Ciências

Banca examinadora:

Anita Jocelyne Marsaioli [Orientador]
Iguatemi Melo Costa
Luiz Alberto Beraldo de Moraes
Luciana Gonzaga de Oliveira
José Augusto Rosário Rodrigues

Data de defesa: 27/02/2012

Programa de pós-graduação: Química

*Nada na vida deve ser temido,
somente compreendido.
Agora é hora de compreender mais
para temer menos.*

Marie Curie

Dedico este trabalho a meus pais e meus irmãos,
exemplos de amor, humildade e
perseverança.

E ao meu amor, pelo companheirismo e por tornar
meus dias mais felizes.

A vocês, meu eterno amor e agradecimento!!!

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais Maria Julia e José Luiz e ao meu irmão Tiago pelo apoio incondicional e por acreditarem que eu podia buscar meus sonhos... Ao meu irmão Adriano (*in memoriam*), pois eu sei que você está sempre ao meu lado.

À minha orientadora Profa. Dra. Anita Marsaioli, pela orientação, pela paciência e pela confiança que depositou em mim.

Aos professores Luciana Oliveira e José Augusto Rodrigues (IQ-Unicamp) e a Profa. Valéria Maia de Oliveira (CPQBA-Unicamp) pelas sugestões no Exame de Qualificação de Área.

À Natura por acreditar no meu projeto e pelo suporte financeiro, agradeço a toda a Diretoria de C&T e a Educação Corporativa pelo apoio e incentivo para realização desta tese.

Aos meus gestores de área Sergio Gallucci e Rosa Friedlander que desde o início desta tese entenderam minhas ausências e me apoiaram nos momentos em que mais necessitei.

As duas grandes pesquisadoras que me incentivaram e inspiraram a construção do projeto aqui desenvolvido: Dra. Debora Pedroso e Dra. Maria Inês Harris. Agradeço pelo grande apoio e pelas valiosas contribuições durante a construção do projeto.

Ao Dr. Gilson Manfio sempre disposto a ajudar, aconselhar e mostrar que nada é tão difícil que não possa ser feito, basta quer!

À Dona Maria, pela enorme dedicação e carinho com que sempre me tratou.

Ao meu querido orientador de iniciação e mestrado Prof. Dr. Ademir Morel, pelo exemplo de pesquisador e pela enorme contribuição na minha formação.

Aos meus queridos amigos e companheiros de trabalho Caroline, Simone, Célio, Georgiana e Lucas, pela inestimável amizade, por todo o apoio, pelos conselhos e momentos de descontração durante todo o período de doutorado.

Aos funcionários da CPG pela enorme presteza e carinho com que sempre me trataram.

Aos amigos e colegas de pesquisa (antigos e novos): Simone (Si), Georgiana (Gê), Célio, Lucas, Bruna, Francine (Fran), Adriana Pianaro (Dri), Caroline (Carol), Felipe, Daniela (Dani), Rafael, Dávila, Fernando Cabeça (Kabeca), Cíntia, Pedro, Diana, Fabiana, Eduardo, Luciana (Lu), Suzan, Ísis, Lu Chen, Marcela, Sergio (Serginho),

Adriana Flach (Adri) e Luiz Antônio, pela amizade e principalmente pela agradável convivência durante estes anos.

A meus queridos companheiros neste projeto: Pedro Aquino e Aline Crucello. Agradeço por toda ajuda durante grande parte deste trabalho.

Aos grandes amigos que conquistei durante o período de doutorado: Viviane & Ernesto e o fofo do João Domingos, Amadeu & Dani, André Francisco & Marla, Alex & Marina, Georgiana & Alex; Bruna & Arnaldo; Francine & Silvio; Júlio & Renata, Aloízio & Elem e Pablo pela amizade e carinho que sempre me trataram.

Aos meus amigos conterrâneos de UFSM que sempre estiveram por perto Sabrina, Márcio e Fabiana, pela amizade e momentos de descontração.

A Caroline Stüker e Adriana Flach pela amizade, carinho e cumplicidade desde os tempos de UFSM.

Aos grandes amigos que conquistei na Natura: Paula (Paulinha), Cristiane (Cris), Simone (Si Esteves), Débora Castellani (Dé), Danielle (Dani), Iguatemi, Maria Inês, Diana, Fabiana, Débora Pedroso, Débora Rodriguez, Amanda, pelos momentos de apoio, desabafo e descontração durante todos os momentos desta nossa louca vida.

À perfumista da Natura, Veronica Kato e ao responsável pelo laboratório do Núcleo Olfativo, Clayton Santos, meu sincero agradecimento por toda a ajuda durante o projeto, pelos insumos de fragrâncias disponibilizados e principalmente por toda a paciência, carinho e compreensão. Não seria possível realizar este projeto sem este precioso apoio. Obrigada!

Aos demais colegas de trabalho que estão sempre por perto e que de alguma forma ajudaram, apoiaram e torceram por mim.

A todos os voluntários participaram deste projeto e que tornaram a pesquisa tão especial!

Finalmente, a todos que, direta ou indiretamente, colaboraram para a realização deste trabalho.

Muito obrigada!

Meu agradecimento eterno a meu companheiro inseparável, Eduardo. Esta tese é nossa! Ela reúne muitos momentos, bons e ruins que compartilhamos durante todo o período de desenvolvimento do trabalho. Você sempre esteve presente, me apoiando de forma incondicional. Obrigada pela paciência, carinho, compreensão, pelos conselhos e pelo valiosíssimo apoio ao final desta tese.

Amo Você pra Sempre!

Curriculum Vitae

Nome: Carla Porto da Silva

Nascimento: 22/10/1976

Formação Acadêmica/Titulação

2006 - 2012 **Doutorado em Química**

Instituto de Química - Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP),
Campinas, Brasil.

2003 - 2005 **Mestrado em Química (Produtos Naturais)**

Universidade Federal de Santa Maria, UFSM, Santa Maria, Brasil.

1999 - 2002 **Graduação em Química Industrial**

Universidade Federal de Santa Maria, UFSM, Santa Maria, Brasil.

1990 - 1994 **Ensino Profissional de Nível Técnico em Química Industrial**

Fundação Escola Técnica Liberato Salzano Vieira da Cunha, Novo Hamburgo,
RS, Brasil.

Formação Complementar

1999 - 2000 **Iniciação Científica**

Universidade Federal de Santa Maria, UFSM, Santa Maria, Brasil.
Bolsista PIBIQ - Centro de Ciências Rurais, Departamento de Tecnologia e
Ciência dos Alimentos.

2001 - 2002 **Iniciação Científica**

Universidade Federal de Santa Maria, UFSM, Santa Maria, Brasil.
Bolsista PIBIQ e FAPERGS - Centro de Ciências Naturais e Exatas, Núcleo de
Pesquisa de Produtos Naturais.

Atuação Profissional

Natura Inovação E Tecnologia de Produtos – NATURA (Cajamar, SP)

Ago/09 – Atual Pesquisador Sênior – Tecnologia de Insumos - Biotecnologia

Fev - Ago/09 Pesquisador Pleno – Tecnologia de Insumos – Biotecnologia

Nov/07 – Jan/09 Pesquisador Pleno – Tecnologia de Óleos Essenciais

Out/05 – Nov/07 Pesquisador Júnior – Tecnologia de Óleos Essenciais

Duas Rodas Industrial S.A (Jaraguá do Sul, SC)

Out/95 – Jul/96 Laboratorista de Aplicações,
Centro de Pesquisa, Laboratório de Desenvolvimento de Aromas

Produção Bibliográfica

1. Porto, C.; Gonçalves, C.C.S.; Sette, L.; Bonugli-Santos, R.C.; Zampieri, D.S., Marsaioli, A. J. Baeyer-Villiger Monooxygenases (BVMO) from Human Skin Fungi. Submetido em dez/12 para: *Journal Catalysis B: Enzymatic*, Edição Especial - Biotrans 2011.
2. Porto, C., Benevides, P.J.C., Costa, I. M., Barbizan, D.S. Placeres Neto, A., Figueiredo, R. O., Gallucci, S. Essential oil from fruits of *Bursera graveolens* as a sustainable alternative for the perfume industry. Submetido em dez/11 para: *Flavour and Fragrance Journal*, 2011.
3. Gallucci, S., Costa, I M, Porto, C., Figueiredo, R, Barbizan D, Placeres, A N, Benevides P. Essential Oil of *Eugenia uniflora* L.: an Industrial Perfumery Approach. *The Journal of Essential Oil Research*, 2010, 22, 176-179.
4. Porto, C., Stüker, C. Z., Flach, A., Simionatto, E., Silva, U. F., Malmann, A., Dalcol, I. I. Morel, A.F. (*R*)-(-)-Carvone and (1*R*, 4*R*)-*trans*(+)-Dihydrocarvone from *Poiretia latifolia* Vogel. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 2010, 01, 1 - 5.
5. Simionatto, E., Malmann, A. S., Porto, C., Ilha, V. Morel, A. Chemical composition and antimicrobial activity of the volatile oil from *Baccharis articulata* (Lam.) Pers.. *The Journal of Essential Oil Research*, 2008, 20, 366-368.
6. Dias, G., Porto, C., Stüker, C.Z., Graessler, V., Burrow, R., Dalcol, I., Silva, U., Morel, A. Alkaloids from *Melochia chamaedrys*. *Planta Medica*, 2007, 73, 289-292.
7. Simionatto, E., Porto, C., Stüker, C. Z., Dalcol, I. I., Silva, U. F. da, Morel, A.F. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil from *Aeolanthus suaveolens* Mart. ex Spreng. *Química Nova*, 2007, 30, 1923-1925.
8. Simionatto, E., Porto, C., Silva, U. F., Morel, A. F., Dalcol, I.I. Essential oil of *Pluchea quitoc* dc. (Asteraceae). *The Journal of Essential Oil Research*, 2007, 19, 494-497.
9. Morel, A., Dias, G., Porto, C. Simionatto, E., Stüker, C., Dalcol, I. Antimicrobial activity of extractives of *Solidago microglossa*. *Fitoterapia*, 2006, 77, 453-455.
10. Graebner, I., Porto, C., Dalcol, I., Morel, A.F. Study on the antimicrobial activity of *Hymatanthus sucuba*. *Fitoterapia*, 2006, 77, 50-53.
11. Simionatto, E., Porto, C., Silva, U. F. da, Squizani, A. M. C., Dalcol, I. I., Morel, A.F. Composition and antimicrobial activity of the essential oil from *Aloysia sellowii*. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 2005, 16, 1458-1462.
12. Simionatto, E., Porto, C., Dalcol, I. I., da Silva, U. F, Morel, A. F. Essential Oil from *Zanthoxylum hyemale*. *Planta Medica*, 2005, 71, 759-763.
13. Moura, N.F., Simionatto, E., Porto, C., Hoelzel, S.M., Zanatta, N. Morel, A.F. Quinoline Alkaloids, Coumarins and Volatile Constituents of *Helietta longifoliata*. *Planta Medica*, 2002, 68, 631-634.

Prêmios:

2010 Poster Premiado - Divisão de Química Biológica, 33^a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química. Atividade enzimática da microbiota da pele humana.

2008 Prêmio HighTec - Divisão de Produtos Naturais, 31^a Reunião Anual Sociedade Brasileira de Química. Frutos de Palo Santo: Fonte Sustentável de Óleo Essencial para Uso na Perfumaria.

Resumo

Estima-se que o corpo humano que contém cerca de 10 trilhões de células seja portador de aproximadamente 100 trilhões de micro-organismos. Fatores ambientais como temperatura, umidade e exposição à luz, além de fatores do hospedeiro, como gênero, genótipo, status imune e uso de cosméticos, podem afetar a composição e a distribuição microbiana da pele. Inúmeras pesquisas indicam que a microbiota desempenha um papel importante no sistema imune da pele. Contudo, pouco é conhecido sobre os conjuntos de espécies presentes em amostras cutâneas bem como suas atividades enzimáticas. Esta tese visou realizar o estudo do potencial enzimático da microbiota da pele humana, vinculando este potencial às principais reações de degradação de formulações de cosméticos, mais especificamente, insumos de fragrâncias. O recrutamento dos voluntários levou em conta parâmetros como idade, sexo e fototipo de pele. As principais atividades enzimáticas das microbiotas coletadas foram avaliadas através de técnicas de triagem de alto desempenho, a fim de detectar proteases, lipases, amilases, esterases, epóxido hidrolases e mono-oxigenases, num total de 2.160 experimentos. Através dos resultados obtidos das triagens enzimáticas, algumas amostras foram selecionadas para a realização de ensaios de degradação de insumos de fragrâncias através de ensaios de multibiorreação. Todos os resultados obtidos foram avaliados com intuito de relacionar o tipo da microbiota coletada com reações de degradação de componentes de fragrância, levando em conta as diferenças intrínsecas de cada voluntário. Além disso, observou-se uma grande diversidade fúngica, ainda pouco descrita na literatura, onde diversos representantes foram isolados e identificados. Os dados obtidos demonstraram que os tipos de pele devem ser levados em consideração nas formulações de uso tópico a fim de atingir alvos específicos, tendo em vista que a pele humana não é um ambiente estéril, mas sim um microbioma complexo. Desta forma, o potencial de biotransformação de insumos cosméticos pela microbiota da pele é um fator relevante e poderá auxiliar na busca de produtos mais eficazes, seguros e versáteis.

Abstract

The human body contains about 10 trillion cells and carries approximately 100 trillion microorganisms' cells. Environmental factors, such as temperature, humidity and light exposure and host factors such as gender, genotype, immune status and use of cosmetics, can affect the composition and distribution of skin microbes. Numerous studies indicate that skin microbiota plays an important role in the human skin immune system. However, little is known about the species present in skin samples and their enzymatic activities. Therefore, the aim of this thesis was to evaluate the enzymatic potential of the human skin microbiota, establishing a link between this potential and the main fragrance degradation of cosmetic formulations, more specifically, fragrance ingredients. The recruitment of volunteers (55) took into account some parameters such as age, gender and skin phototype. The main enzymatic activities of the collected microbiota were assessed by high throughput screening techniques in order to detect protease, lipase, amylase, esterase, epoxide hydrolase and monooxygenase, in a total of 2160 experiments. These enzymatic profiles were applied in the selection of microorganisms to probe the biodegradability of fragrance ingredients using the multibioreaction protocol. The results linking microbiota type and degradation reactions of fragrance ingredients took into consideration the intrinsic differences between volunteers. In addition, a great fungal diversity, still poorly described in the literature, was observed and several representative entities of this diversity were isolated and identified. The obtained data showed that skin types must be considered in topical formulations to achieve specific biological targets and , taking into consideration that the human skin is not a sterile environment, but rather consists of a complex microbiome. Consequently the biotransformation susceptibility of cosmetic ingredients to human skin microbiota is a relevant factor to consider in formulations.

Índice

Abreviaturas, Siglas e Símbolos	xix
Índice de figuras	xxi
Índice de Tabelas	xxiii
Índice de Esquemas.....	xxv
1 Introdução.....	3
1.1 A pele humana.....	4
1.1.1 Estrutura da Pele Humana	4
1.1.2 Mecanismos de defesa cutânea	5
1.1.3 Fatores relacionados ao hospedeiro e ao meio externo	9
1.2 Microbiota da Pele Humana.....	14
1.2.1 Microbiota bacteriana da Pele Humana.....	14
1.2.2 Microbiota fúngica da pele humana.....	18
1.3 Diferenças na pele humana: sexo e etnia	20
1.4 Exposição a cosméticos e incidência de alergia	23
1.4.1 Degradação de insumos de fragrâncias	24
1.5 Enzimas e suas aplicações	26
1.6 Ensaios de Triagem Enzimática.....	30
1.6.1 Triagem enzimática em cultura de células em crescimento	32
1.6.2 Triagem de alto desempenho em microplacas	33
1.6.3 Uso de substratos modificados.....	33
1.6.4 Uso de substratos não modificados.....	36
1.6.5 Triagem utilizando instrumentação analítica.....	37
1.6.6 Triagem mediante multibiorreações	38
2 Objetivos gerais	41
3 Resultados e Discussões.....	45
3.1 Coleta da microbiotas da pele humana	45
3.2 Detecção de atividade enzimática da microbiota da pele	52
3.2.1 Avaliação da atividade enzimática por triagem em placas de Petri	52
3.2.2 Avaliação da atividade enzimática por triagem em microplacas.....	61
3.2.3 Conclusão Parcial.....	71
3.3 Diversidade fúngica da pele humana: prospecção e identificação taxonômica	72

3.3.1	Identificação taxonômica e inferência filogenética de fungos da pele ..	74
3.3.2	Conclusão Parcial.....	80
3.4	Degradação de insumos de fragrâncias pela a microbiota da pele mediante multibiorreação	81
3.4.1	Seleção de substratos para ensaios de multibiorreação	81
3.4.2	Biotransformação de ésteres utilizados em fragrâncias	82
3.4.3	Biotransformação de cetonas utilizadas em fragrâncias	93
3.4.4	Biotransformação de derivados de enxofre de fragrâncias.....	103
4	Conclusão.....	117
5	Parte Experimental	121
5.1	Solventes, reagentes e meios de cultura	121
5.2	Equipamentos e técnica utilizadas	121
5.2.1	Cromatografia em camada delgada (CCD)	121
5.2.2	Cromatografia em coluna (CC).....	122
5.2.3	Leitor de microplacas	122
5.2.4	Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM)..	122
5.2.5	Cromatografia gasosa quiral.....	123
5.2.6	Ressonância Magnética Nuclear (RMN).....	123
5.3	Procedimentos gerais adotados no laboratório de biocatálise	123
5.3.1	Meios de cultura para manutenção dos micro-organismos	124
5.4	Coleta e cultivo dos micro-organismos	125
5.4.1	Preservação dos micro-organismos	126
5.5	Sondas Fluorogênicas	129
5.6	Preparo soluções	131
5.6.1	Soluções estoque das sondas fluorogênicas.....	131
5.7	Ensaio de triagem de alto desempenho	132
5.8	Ensaio de Multibiorreação	133
5.9	Caracterização Ensaio de Multibiorreação	134
5.9.1	Cálculo de Conversão e Excesso Enantiomérico	135
5.10	Procedimentos Sintéticos.....	136
5.10.1	Síntese do 2-pentilciclopentanol (25.1).....	136
5.10.2	Síntese do Sulfóxido 29.1	137
6	Anexos	141

Abreviaturas, Siglas e Símbolos

BVMO	Baeyer-Villiger Mono-oxigenase
CG-EM	Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
<i>DNA</i>	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
DC	Dermatite de contato
<i>EC</i>	<i>Enzyme nomenclature</i>
<i>ee</i>	Excesso Enantiomérico
EM	Espectrometria de Massas
EPH	epóxido hidrolases
EST	esterases
HTS	<i>High-Throughput Screening</i>
BSA	Bovine Serum Albumin
<i>m/z</i>	razão massa/carga
MEA	<i>Malt Extract Agar</i>
MOx	Mono-oxigenases
NA	<i>Nutrient Agar</i>
UV	Ultravioleta
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
RODAC	<i>Replicate Organism Detection and Counting</i>
SA	<i>Sabouraud Agar</i>
TSA	<i>Tryptona Soy Agar</i>
YMA	<i>Yeast Malt Extract</i>
UFC	Unidades Formadoras de Colônias
PCA	<i>Principal Component Analysis</i>
HCA	<i>Hierarchical Clusters Analysis</i>

Índice de figuras

Figura 1. Estrutura e características da pele saudável.	5
Figura 2. Fatores que contribuem para a variação no microbiota da pele.	6
Figura 3. Diagrama dos principais mecanismos de defesa antimicrobianos que operam na superfície da pele.....	7
Figura 4. Diagrama mostrando o pH de várias regiões da pele humana.	8
Figura 5. A temperatura de várias regiões da pele em valores típicos de temperatura de várias regiões da pele em adultos.	12
Figura 6. Concentração de lipídeos ($\mu\text{g cm}^{-2}$) na superfície da pele de adultos.....	13
Figura 7. Distribuição topográfica de bactérias em diversos locais da pele.....	16
Figura 8. Enumeração das espécies de fungos em seis regiões cutâneas.....	18
Figura 9. Oxidação do limoneno e linalol na presença de luz e oxigênio.....	25
Figura 10. Fenóis conjugados utilizados em substratos cromogênicos e fluorogênicos, comprimento de onda de máxima absorção ($\lambda_{\text{máx}}$), comprimento de onda de excitação λ_{exc} , comprimento de onda de emissão λ_{em}	34
Figura 11. Ferramentas utilizadas nos métodos não invasivos de coleta.	45
Figura 12. Exemplo de placas RODAC após o tempo de incubação dos consórcios microbianos..	48
Figura 13. Contagem de UFC por placa RODAC para cada tipo de micro-organismo e meio de cultura utilizado na coleta.....	49
Figura 15. Ensaios de detecção de lipases (leitura em 359 nm; C+, controle positivo).	53
Figura 16. Ensaios de detecção de amilases reveladas com iodo (C+, controle positivo). ..	54
Figura 17. Representação gráfica do perfil das atividades enzimáticas observadas para os consórcios de bactérias, de leveduras e os fungos filamentosos nos ensaios de triagem em placa de Petri.....	59
Figura 18. Sondas fluorogênicas e controles positivos utilizados nos ensaios de triagem em microplacas.....	61
Figura 19. Perfil geral da atividade enzimática dos consórcios de bactérias, leveduras e dos fungos filamentosos nos ensaios fluorogênicos.	70
Figura 20. Exemplo de placas Rodac após a coleta e crescimento de colônias de fungos filamentosos.....	72
Figura 21. Exemplo da diversidade de espécies fúngicas encontradas na pele humana.. ..	73
Figura 22. Perfil cromatográfico da mistura de ésteres (18-23) utilizada nos ensaios de multibiorreações.....	84

Figura 23. Cromatograma de íons totais (CG-EM) da multibiorreação de ésteres com o consórcio de bactérias 2NA (24hs de reação).....	85
Figura 24. Cromatograma de íons totais (CG-EM) da multibiorreação de ésteres com o consórcio de leveduras 38YMA (24h de reação).....	88
Figura 25. Cromatograma de íons totais (CG-EM) da multibiorreação de ésteres com fungo filamento 30M1 (24h de reação).....	90
Figura 26. Perfil cromatográfico da mistura de cetonas (24-28) utilizada nos ensaios de multibiorreações.....	94
Figura 27. Cromatograma de íons totais (CG-EM) da multibiorreação de cetonas pelo fungo filamentoso 42M (48h de reação).....	95
Figura 28. Cromatograma de íons totais (CG-EM) da biotransformação de cetonas pelo fungo filamentoso 30M2 (48h de reação).....	96
Figura 29. Deslocamentos químicos de ciclopentanol cis/trans-disubstituídos.....	98
Figura 30. A, Cromatograma CG-DIC quiral da mistura cis/trans do 2-pentilciclopentanol 25.1 obtido por redução química. B, Cromatogramas CG-DIC quiral do cis-25.1 e do trans-25.1 separados por coluna cromatográfica..	99
Figura 31. Cromatograma CG-DIC da redução da cetona 25 pelo consórcio de leveduras 38YMA.....	100
Figura 32. Perfil cromatográfico da mistura de derivados de enxofre (29-31) utilizada nos ensaios de multibiorreações.....	104
Figura 33. Cromatograma de íons totais (CG-EM) da multibiorreação dos derivados de enxofre (29, 30 e 31) com o fungo filamentoso 30M1 (72h de reação)	105
Figura 34. Cromatograma de íons totais (CG-EM) da biocatálise de 29 com o consórcio de bactérias 20NA (72h de reação).....	106
Figura 35. Diastereoisômeros do sulfóxido 29.1 formados a partir do cis-29.....	108
Figura 36. A, Cromatograma CG-DIC da fração isolada contendo um par de enantiômeros do sulfóxido 29.1. B, Cromatograma CG-DIC do produto bruto da oxidação de 29.....	110
Figura 37. Cromatograma CG-DIC do biotransformação do 1,3-oxatiano (29) pelo fungo filamentoso 30M1IS1 (72 h).....	112
Figura 38. Substratos fluorogênicos e controles positivos utilizados para triagem de epóxido-hidrolases, esterases e mono-oxigenases.	130

Índice de Tabelas

Tabela 1. Principais fatores que afetam a sobrevivência e o crescimento microbiano na pele.	10
Tabela 2. Diferenças da pele humana associadas ao sexo (adaptado de Giacomoni).....	20
Tabela 3. Fototipos de pele de acordo com a reatividade e sensibilidade.....	22
Tabela 4. Contagem de viáveis em UFC mL ⁻¹ de material de coleta, para cada região da pele e meio de cultura testados.....	46
Tabela 5. Contagem de UFC por placa Rodac, para cada meio de cultura testado.....	47
Tabela 6. Contagem dos micro-organismos na forma de UFC obtidos nos meios de cultura utilizados para a coleta.....	50
Tabela 7. Atividades enzimáticas observadas para os consórcios de bactérias, conforme sexo e fototipo de pele.....	56
Tabela 8. Atividades enzimáticas observadas para os consórcios de leveduras, conforme sexo e fototipo de pele.....	57
Tabela 9. Atividades enzimáticas observadas para os fungos isolados.....	58
Tabela 10. Perfil geral das atividades enzimáticas observadas nos ensaios de triagem em placa de Petri.....	59
Tabela 11. Atividades enzimáticas (% conversão) ^a detectadas nos consórcios de bactérias, indicando sexo e fototipo de pele.....	64
Tabela 12. Atividades enzimáticas (% conversão) ^a detectadas nos consórcios de leveduras, indicando sexo e fototipo de pele.....	66
Tabela 13. Atividades enzimáticas (% conversão) ^a detectadas nos fungos filamentosos, indicando sexo e fototipo de pele.....	68
Tabela 14. Perfil geral da atividade enzimática dos consórcios microbianos e dos fungos filamentosos nos ensaios fluorogênicos.....	69
Tabela 15. Culturas de fungos filamentosos selecionadas para identificação taxonômica e a codificação das culturas puras.....	74
Tabela 16. Ribotipos gerados pela digestão com as enzimas de restrição HaeIII, MspI e RsaI.	76

Tabela 17. Caracterização taxonômica dos isolados selecionados pelo ARDRA.	78
Tabela 18. Ésteres selecionados para os ensaios de multibiorreações.	83
Tabela 19. Biotransformação de ésteres de fragrâncias (Tab. 18) por consórcios de bactérias da pele.	86
Tabela 20. Biotransformação de ésteres de fragrâncias (Tab. 18) por consórcios de leveduras da pele (tempo de 24 horas).	89
Tabela 21. Biotransformação de ésteres de fragrâncias (Tab. 18) pelos fungos filamentosos da pele.	91
Tabela 22. Cetonas selecionadas para os ensaios de multibiorreação.	93
Tabela 23. Biotransformações observadas nas multibiorreações de cetonas com consórcios de bactérias, leveduras e fungos filamentosos.	97
Tabela 24. Dados espectroscópicos de RMN de ^1H e ^{13}C para os diastereoisômeros cis- e trans-25.1.	98
Tabela 25. Excesso enantiomérico (% <i>ee</i>) e razão diastereoisomérica (% <i>rd</i>) observada para redução da cetona 25.	100
Tabela 26. Derivados de enxofre selecionados para os ensaios de multibiorreação.	103
Tabela 27. Biotransformação dos derivados de enxofre por consórcios de bactérias e fungos filamentosos.	107
Tabela 29. Dados espectroscópicos de RMN de ^1H e ^{13}C para o isômero de 29.1 isolado, em comparação com dados da literatura.	109
Tabela 30. Excesso enantiomérico (% <i>ee</i>) e razão diastereoisomérica (% <i>rd</i>) observada para a oxidação de 29.	111
Tabela 31. Solução Tampão de Sorensen.	132
Tabela 32. Parâmetros cromatográficos utilizadas para os grupos de substâncias estudadas.	135

Índice de Esquemas

Esquema 1. Tipos de triagens funcionais comumente usadas para encontrar enzimas ativas. Adaptado de Reymond and Babiak.....	31
Esquema 2. Representação esquemática do ensaio enzimático em placas de Petri. Adaptado de Marsaioli e Porto.....	33
Esquema 3. Ensaio de triagem de atividade enzimática utilizando sondas fluorogênicas para detecção enzimática.	35
Esquema 4. Representação esquemática proposta para detecção de enzimas citocromo P450 utilizando a sonda (13).....	36
Esquema 5. Ésteres utilizados nas multibiorreações e os produtos monitorados.....	84
Esquema 6. Oxidação do álcool 20.1 com a formação do ácido 20.2.	86
Esquema 7. β -Oxidação do ácido 21.1 com a formação do ácido 21.2. ACDH, enzima acil-CoA desidrogenase; EDH, enzima enoil-CoA hidratase; HADH, β -hidroxiacil-CoA desidrogenase; ACT, enzima acetil-CoA tiolase ^a	87
Esquema 8. Oxidação do álcool 18.1 com a formação do ácido 18.2.	88
Esquema 9. Redução da cetona 24 com a formação do álcool 24.1.....	95
Esquema 10. Redução da cetona 25 com a formação do álcool 25.1.....	95
Esquema 11. Oxidação da cetona 25 com a formação da δ -decalactona 25.2.....	96
Esquema 12. Reação de oxidação do <i>cis</i> -29 com a formação dos sulfóxidos 2,3- <i>trans</i> -3,4- <i>trans</i> -29.1 (oxigênio <i>trans</i> em relação aos grupos alquila) e 2,3- <i>cis</i> -3,4- <i>cis</i> -29.1 (oxigênio <i>cis</i> em relação aos grupos alquila). Somente o isômero majoritário do oxano foi monitorado nas reações (<i>cis</i> -29).	105

INTRODUÇÃO

1 Introdução

Estima-se que o corpo humano, que contém cerca de 10 trilhões de células, seja rotineiramente portador de aproximadamente 100 trilhões de células microbianas. A composição da microbiota humana é relativamente estável com gêneros específicos ocupando as diversas partes do corpo durante o ciclo de vida de um indivíduo¹. Os micro-organismos que colonizam uma região específica constituem o que é conhecido como microbiota normal desse local. No entanto, a maioria dos estudos investiga apenas a composição de bactérias da microbiota e pouco se sabe sobre a identidade dos outros tipos de micro-organismos presentes em qualquer local do corpo².

A pele humana é um ambiente dinâmico, hospedando uma variedade de organismos, incluindo bactérias, vírus, fungos e outros parasitas. Normalmente, a barreira da pele garante proteção contra muitos desses micro-organismos que se hospedam no corpo, embora a frequência destas interações possa aumentar a incidência de doenças cutâneas³. A patogenicidade de muitos habitantes da pele é determinada tanto pela virulência individual do patógeno como pelo estado da superfície cutânea na qual ele reside. Bactérias e fungos geralmente residem benignamente sobre a superfície da pele humana normal, mas eles também podem estar ocasionalmente associados a infecções graves, especialmente em indivíduos imunocomprometidos⁴.

¹ Sekirov I., Finlay B. *Nature Medicine*, **2006**, 12, 7, 736-737.

² Cogen A.J., Nizet V., Gallo R.L. *Brit. J. Dermatol.* **2007**, 158, 442–455.

³ Wilson, M. *Microbial Inhabitants of Humans: Their Ecology and Role in Health and Disease*, 1^a ed. Cambridge University Press, Cambridge, **2005**.

⁴ Rosenthal M., Goldberg D., Aiello A., Larson E., Foxman B. *Infec., Genet. Evol.*, **2011**, 11, 839–848.

1.1 A pele humana

A pele é o maior órgão do corpo humano, em termos de área superficial, que varia de 0,25 m² (recém-nascidos) a 1,8 - 2,5 m² em um homem adulto. É composta por diferentes células e estruturas que trabalham de forma harmônica, garantindo assim suas funções. Está dividida em dois tecidos principais: a epiderme (tecido epitelial mais externo) e um tecido conectivo composto da derme (a partir do qual a epiderme se origina)⁵.

1.1.1 Estrutura da Pele Humana

A pele é um ecossistema composto de habitats diversos com uma abundância de dobras, invaginações e nichos especializados que suportam uma variedade de micro-organismos. O primeiro papel da pele é servir como uma barreira física, protegendo nosso corpo contra agressões de organismos externos ou substâncias tóxicas. A pele é também a interface com o meio externo e, como tal é colonizada por uma diversidade de micro-organismos, incluindo bactérias, fungos e vírus, bem como ácaros.

A epiderme consiste de uma camada exterior da pele e é composta principalmente de queratinócitos, juntamente com os melanócitos (responsáveis pela produção de melanina) e as células de Langerhans (responsáveis pela apresentação de antígenos⁶ ao sistema imunológico). A epiderme pode ser dividida em estrato basal, estrato espinhoso, estrato granuloso e estrato córneo (camada de células anucleadas), de acordo com o grau de amadurecimento dos queratinócitos (queratinização). Abaixo da epiderme encontra-se a derme, composta em grande parte por tecido conjuntivo. Na derme são também encontrados folículos pilosos, terminações nervosas, glândulas sudoríparas, glândulas sebáceas, e os vasos sanguíneos (Figura 1).

⁵Harris, M.I.N.C. *Pele: estrutura, propriedades e envelhecimento*. 3ª Ed., Editora Senac, São Paulo-SP, 2009.

⁶ Antígenos são partículas ou moléculas capazes de iniciar uma resposta imune.

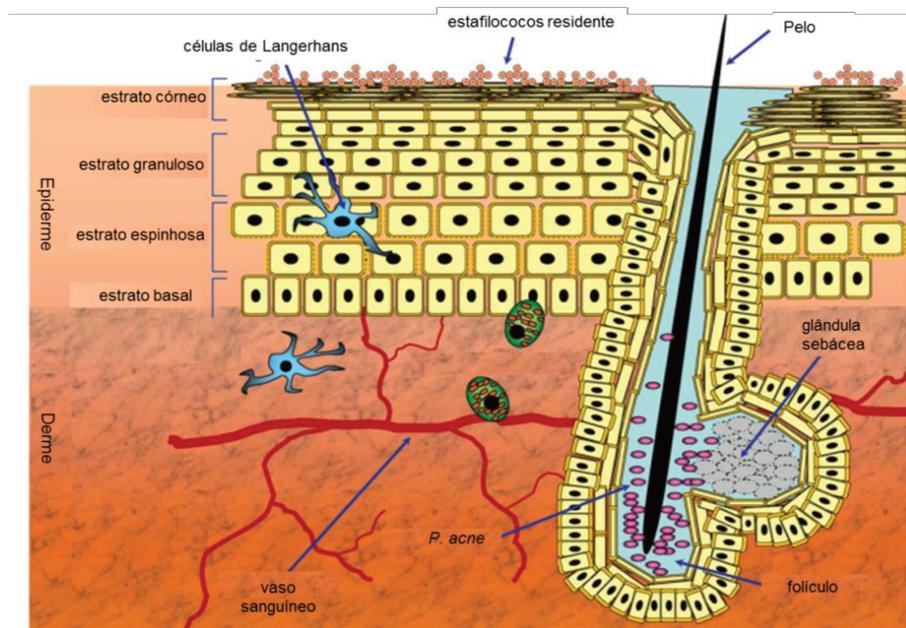


Figura 1. Estrutura e características da pele saudável. Adaptada de MacLeod e colaboradores⁷.

A estrutura da pele é um fator determinante em suas características. Desta forma, a presença de pelos afeta a temperatura e umidade da superfície da pele, enquanto a presença de glândulas, por causa de suas secreções, altera o teor de nutrientes, umidade, pH e salinidade do local. Todos esses fatores afetam a composição da comunidade microbiana em um determinado local e, conseqüentemente, a distribuição das glândulas na superfície da pele tem um efeito profundo sobre os tipos de micro-organismos presentes e sua densidade populacional.

1.1.2 Mecanismos de defesa cutânea

A percepção da pele como um ecossistema - composto de entidades biológicas e componentes físicos ocupando habitats diversos - pode contribuir para uma melhor compreensão do delicado equilíbrio entre hospedeiro e micro-organismo. Alterações nesse equilíbrio podem resultar em doenças de pele ou infecções. Perturbações que afetam a relação hospedeiro/micro-organismo podem ser endógenas (por exemplo,

⁷ MacLeod D.T, Cogen A.L., Gallo R.L. *Skin Microbiology in: Encyclopedia of Microbiology*, Moselio Schaechter Editor, 2009. pg. 734-747.

variação genética que seleciona uma comunidade microbiana específica) ou exógenas (por exemplo, hábito de lavar as mãos). A comunidade científica vem unindo esforços para caracterizar de forma mais completa da microbiota da pele e como ela interage com seu hospedeiro (Figura 2)⁸.

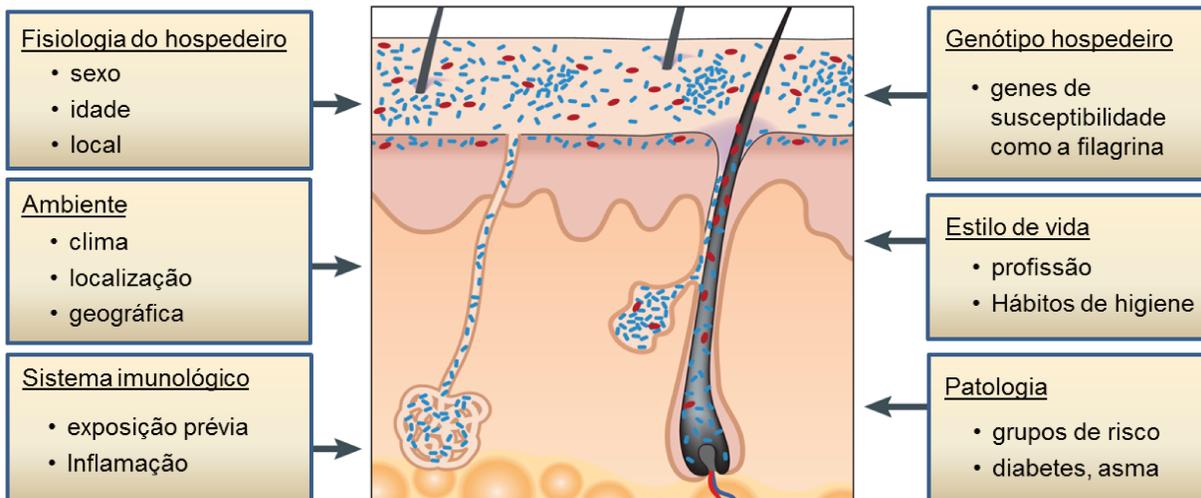


Figura 2. Fatores que contribuem para a variação no microbiota da pele. Adaptado de Grice e colaboradores, 2011⁸.

Muitos destes micro-organismos são simbióticos⁹ e ocupam uma grande variedade de locais de pele, protegendo contra a invasão de organismos mais patogênicos ou prejudiciais. Eles desempenham um papel crucial no desenvolvimento de milhões de células de Langerhans que são encontradas na pele, preparando-as para responder a presença de outros micro-organismos que possam atuar como patógenos.

Os principais mecanismos antimicrobianos de defesa que atuam na superfície da pele podem impedir a colonização por micro-organismos e, portanto, exercem uma pressão de seleção, influenciando assim os tipos de micro-organismos que podem estabelecer-se na pele.

O fluxo contínuo de ar através das superfícies do corpo constitui a primeira linha de defesa contra a colonização microbiana. Esse processo impede que os micro-

⁸ Grice E.A., Segre J.A. *Nature Reviews Microbiology*, 2011, 9, 244-253.

⁹ Simbiose é a relação interespecífica (de espécies diferentes) que ocorre entre dois ou mais organismos de espécies diferentes, de forma mutuamente vantajosa.

organismos do ar e partículas que contêm bactérias sedimentem sobre a pele (Figura 3). O estrato córneo também fornece uma barreira eficaz contra a penetração de quaisquer outros micro-organismos que chegam à superfície da pele. Essa camada de queratinócitos mortos e lipídios tornam a superfície da pele muito seca e sua constante escamação limita a colonização microbiana da pele.

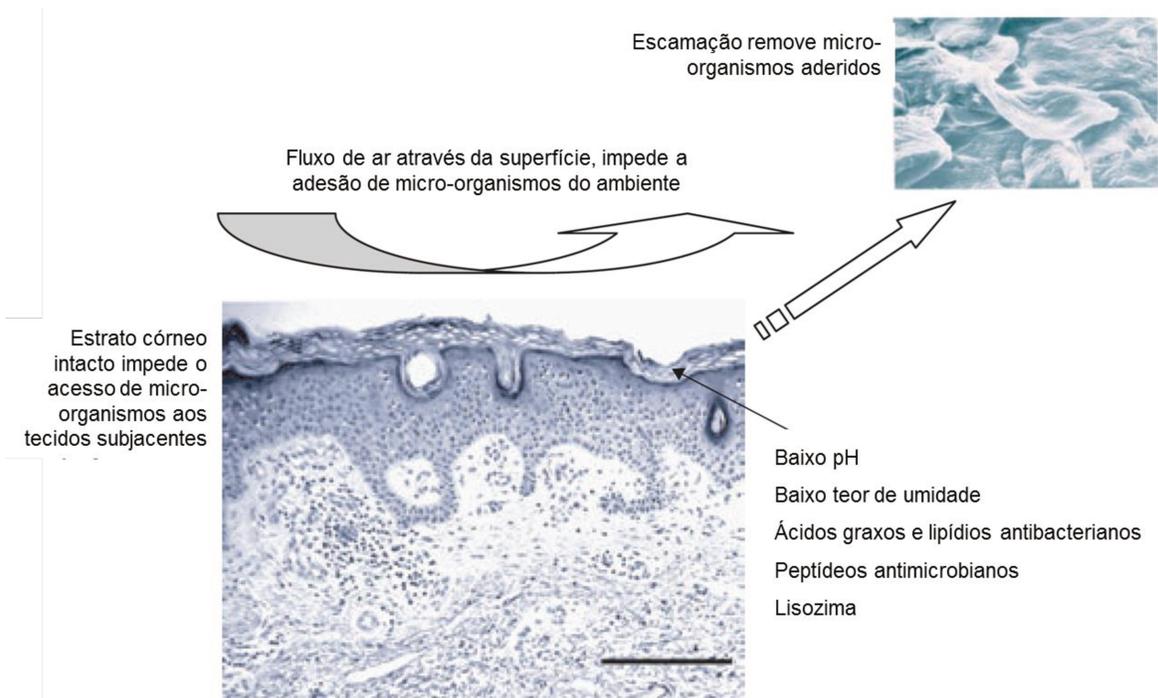


Figura 3. Diagrama dos principais mecanismos de defesa antimicrobianos que operam na superfície da pele. Adaptada de Wilson, M.; 2008¹⁰.

Além disso, a pele possui um pH baixo (Figura 4) na maioria das regiões do corpo como resultado do acúmulo de secreções ácidas, de ácidos produzidos durante o processo de queratinização, e de ácidos excretados por células epiteliais e micro-organismos. Muitos micro-organismos não conseguem sobreviver em pHs tão baixos. Além do efeito de diminuição de pH, muitas das substâncias presentes na superfície da pele são diretamente tóxicas para os micro-organismos.

¹⁰ Wilson M. Bacteriology of Humans: An Ecological Perspective, 1^a ed. Blackwell Publishing, Oxford, 2008.

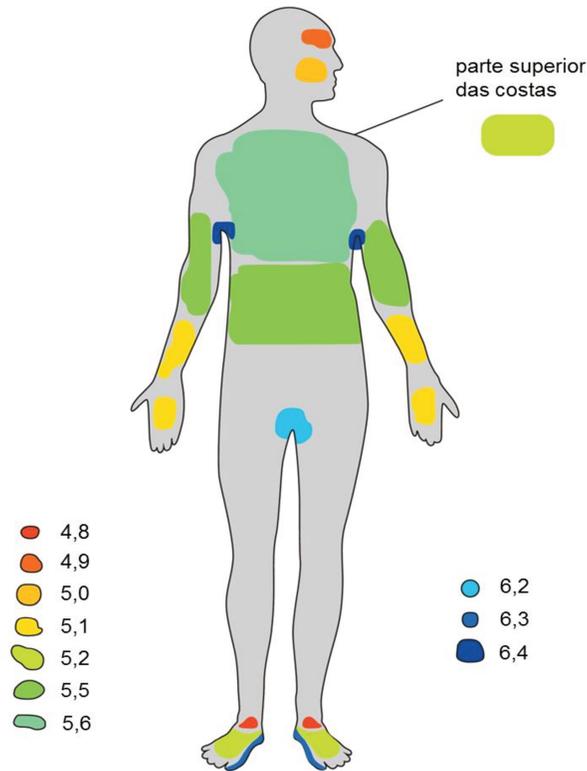


Figura 4. Diagrama mostrando o pH de várias regiões da pele humana. Adaptado de Wilson, M.; 2008¹⁰.

Os ácidos graxos livres, particularmente os ácidos láurico (C12) e mirístico (C14), são os mais eficazes e têm um amplo espectro antimicrobiano. Os ácidos linoleico (C18:2) e linolênico (C18:3) também têm atividade antimicrobiana, principalmente contra micro-organismos transitentes, tais como *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*). Os ácidos láurico (C12), capróico (C6), butírico (C4) e mirístico (C14) são inibidores espécies como *Propionibacterium acnes* (*P. acnes*), *Streptococcus pneumoniae* (*S. pneumoniae*), *Streptococcus pyogenes* (*S. pyogenes*), corinebacterias, micrococos, *Candida* spp e estafilococos³.

A evaporação do suor na superfície da pele deixa para trás grandes quantidades de cloreto de sódio e outros solutos, sendo que qualquer umidade presente na pele apresentará uma alta salinidade. Muitos micro-organismos, especialmente bactérias Gram-negativas, são incapazes de crescer em ambientes muito salinos.

1.1.3 Fatores relacionados ao hospedeiro e ao meio externo

Fatores específicos do hospedeiro tais como, idade, sexo, status imune e ambiente externo (por exemplo, clima e geografia) contribuem para as variações observadas na microbiota da pele humana.

A idade tem um efeito considerável sobre o microambiente da pele e, assim, sobre sua microbiota¹¹. No útero, a pele do feto é estéril, mas a colonização microbiana ocorre imediatamente após o parto^{12,13}. Atualmente, pesquisadores buscam entender como as comunidades microbianas da pele e outros locais são estabelecidas e estabilizadas durante os primeiros anos de vida, como um bebê recém-nascido explora seu ambiente e como seu sistema imunológico amadurece¹⁴. Durante a puberdade, as mudanças hormonais provocam um aumento na produção de sebo, paralelo ao aumento de micro-organismos lipofílicos na pele¹⁵. Diferenças fisiológicas e anatômicas da pele entre homens e mulheres, tais como produção de sebo, suor e hormônios, em parte, podem explicar as diferenças na microbiota observadas entre os dois sexos^{16,17,18}.

Alterações significativas e potencialmente prejudiciais da estrutura da comunidade microbiana da pele podem ocorrer como resultado de vários fatores ambientais específicos para cada indivíduo, tais como profissão, estilo de vida e uso de antibióticos. O efeito do tratamento com antibióticos sobre a microbiota intestinal tem sido analisado^{19,20,21}, mas, até o momento, não foram encontrados relatos de uma avaliação similar para a microbiota da pele, em indivíduos saudáveis. Produtos de higiene pessoal (cosméticos), sabonetes, perfumes e hidratantes, também contribuem

¹¹ Somerville D. A. Br. *J. Dermatol.* **1969**, *81*, 248–258. .

¹² Dominguez-Bello M. G. *Proc. Natl Acad. Sci.* **2010**, *107*, 11971–11975.

¹³ Sarkany, I., Gaylarde C. C. *J. Pathol. Bacteriol.* **1968**, *95*, 115–122.

¹⁴ Palmer C., Bik E. M., DiGiulio D. B., Relman D. A., Brown P. O. *PLoS Biol.* **2007**, *5*, e177

¹⁵ Somerville D. A. Br. *J. Dermatol.* **1969**, *81*, 248–258.

¹⁶ Marples R. R. *Arch. Dermatol. Res.* **1982**, *272*, 317–320

¹⁷ Fierer N., Hamady M., Lauber C. L., Knight R. *Proc. Natl Acad. Sci.* **2008**, *105*, 17994–17999.

¹⁸ Giacomoni P. U., Mammone T., *J. Dermatol. Sci.* **2009**, *55*, 144–149.

¹⁹ Dethlefsen, L., Relman D. A. *Proc. Natl Acad. Sci.* **2010**, *16*, 1-8.

²⁰ Antonopoulos D. A. *Infect. Immun.* **2009**, *77*, 2367–2375

²¹ Dethlefsen L., Huse S., Sogin M. L., Relman D. A. *PLoS Biol.*, **2008**, *6*, 2383-2400.

para a variação da microbiota da pele. Estes produtos alteram as condições da barreira da pele, mas seus efeitos sobre a microbiota da pele permanecem desconhecidos²².

A luz ultravioleta (UV) é bem documentada como tratamento bactericida, o que pode indicar que uma possível variabilidade geográfica da microbiota da pele possa estar relacionada também com a variação da exposição humana aos raios UV²³.

Os principais fatores que afetam o crescimento e a sobrevivência de micro-organismos na pele são resumidos na Tabela 1. A pele, em geral, é um ambiente relativamente seco, e espécies Gram-positivas (estafilococos e particularmente micrococos) são mais adaptadas a tais condições do que as espécies Gram-negativas e, portanto, as comunidades microbianas na pele tendem a ser dominadas pelas primeiras³.

Tabela 1. Principais fatores que afetam a sobrevivência e o crescimento microbiano na pele.

Fator	Efeito
Temperatura	Permite o crescimento de mesófilos, porém impede o crescimento de termófilos e psicrófilos.
Baixa umidade	Impede a sobrevivência ou crescimento de muitas espécies, especialmente bactérias Gram-negativas
Alta salinidade	Impede a sobrevivência ou crescimento de muitas espécies, especialmente bactérias Gram-negativas
Baixo pH	Impede a sobrevivência ou o crescimento de muitas espécies
Concentração de oxigênio	Geralmente elevados, impedindo a sobrevivência e crescimento de anaeróbios. É baixa nos folículos pilosos, permitindo assim o crescimento de anaeróbios e microaerófilos.
Disponibilidade de nutrientes	Abundante, porém consiste essencialmente em polímeros do hospedeiro.
Interação com outros micro-organismos	Pode ser favoráveis e antagonistas
Sistema de defesa do hospedeiro	Impede a adesão e a sobrevivência de muitos tipos de micro-organismos

²² Holland K.T., Bojar R.A. *Am. J. Clin. Dermatol.* **2002**, 3, 445-449.

²³ Faergemann J., Larko O. *Acta Derm. Venereol.* **1987**, 67, 69-72.

Um dos principais fatores que regulam a distribuição de micro-organismos na pele é a disponibilidade de umidade. Como o teor de água do estrato córneo é baixo (15% em peso), a superfície da pele é um ambiente relativamente seco, limitando assim a sobrevivência e crescimento microbiano. No entanto, a produção suor (aprox. 200 mL por dia) pode aumentar o teor de umidade na superfície, particularmente em locais em que o suor não evapora facilmente (regiões "ocluídas"), como nas axilas e regiões entre os dedos do pé. Essas regiões ocluídas têm densidades populacionais relativamente maiores do que as áreas secas (como as palmas das mãos) e suportam diferentes comunidades microbianas. Assim, corinebactérias, bactérias Gram-negativas e fungos são encontrados em locais ocluídos e ausentes em regiões secas. Estafilococos e micrococos, em contraponto, são resistentes à dessecação, não ficando restritos a estes locais. Outra consequência da produção do suor é que os solutos presentes ficam na superfície da pele quando o suor evapora¹⁰.

A temperatura da pele varia muito com a localização anatômica (Figura 5). As axilas e virilha tendem a ter temperaturas mais elevadas, enquanto os dedos dos pés e das mãos têm temperaturas mais baixas. Tais temperaturas (entre 25°C e 35°C) são ideais para o crescimento de mesófilos, enquanto psicrófilos e termófilos são em grande parte excluídos. A temperatura em um determinado local pode afetar a taxa de crescimento dos organismos presentes e também pode influenciar a microbiota indiretamente devido aos seus efeitos sobre a produção de suor. Um aumento na produção de suor como um resultado de alta temperatura, em ambiente com alto teor de umidade, modifica a concentração de nutrientes, de compostos antimicrobianos, salinidade e pH³.

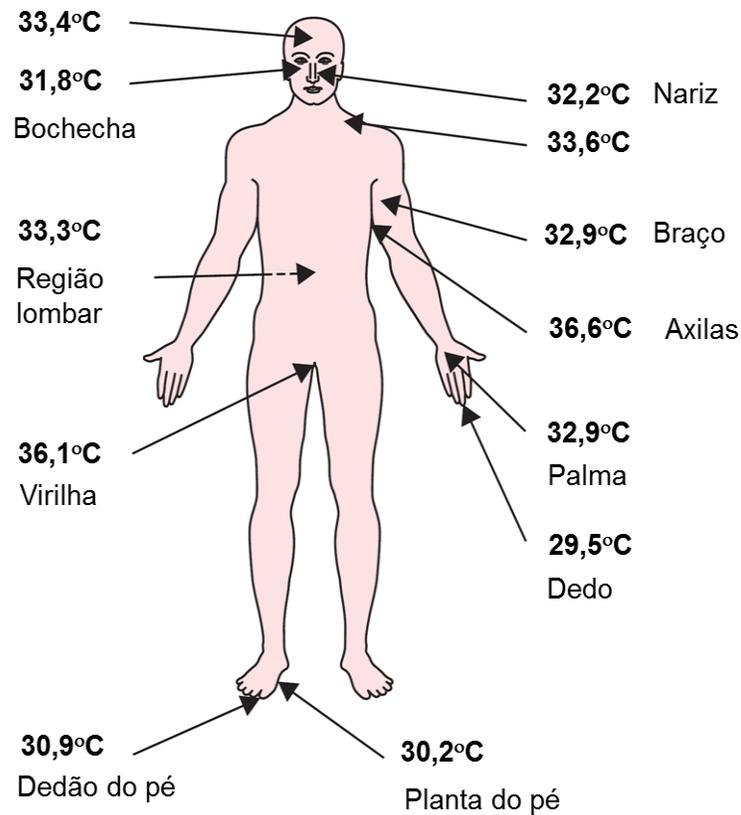


Figura 5. A temperatura de várias regiões da pele em valores típicos de temperatura de várias regiões da pele em adultos. Adaptado de Wilson, M.; 2008¹⁰.

O estrato córneo é provido de oxigênio diretamente da atmosfera e também pela difusão dos capilares cutâneos. A superfície da pele, portanto, é um ambiente predominantemente aeróbico e não contribui para o crescimento ou a sobrevivência de anaeróbios restritos. No entanto, devido ao seu consumo por células do hospedeiro e micro-organismos residentes, os níveis de oxigênio são reduzidos nos folículos pilosos e nas camadas internas do estrato córneo. Isso resulta na criação de ambientes de microaerofilia e/ou anaerobiose nessas regiões, permitindo assim o crescimento da microaerófilos e anaeróbios restritos. Espécies de propionibactéria são grandes colonizadores dos folículos pilosos.

O pH da pele é geralmente ácido, mas o valor exato do pH varia muito entre os diferentes locais e está relacionado principalmente com a densidade de glândulas sudoríparas. O pH ácido resulta da presença de ácido láctico (produzido por células do hospedeiro e micro-organismos), aminoácidos (do suor), ácidos graxos (do sebo) e

ácidos produzidos durante o processo de queratinização. Apesar de ser um ambiente ácido, os pHs encontrados na superfície da pele são geralmente muito altos para o crescimento da acidófilos, muito baixo para alcalinófilos, mas são adequados para neutrófilos. O estrato córneo é composto principalmente de proteínas (75-80%) e lipídeos (5-15%). Sendo os lipídeos uma importante fonte de carbono de energia para muitos micro-organismos cutâneos, e sua concentração na superfície da pele varia muito conforme mostrado na Figura 6.

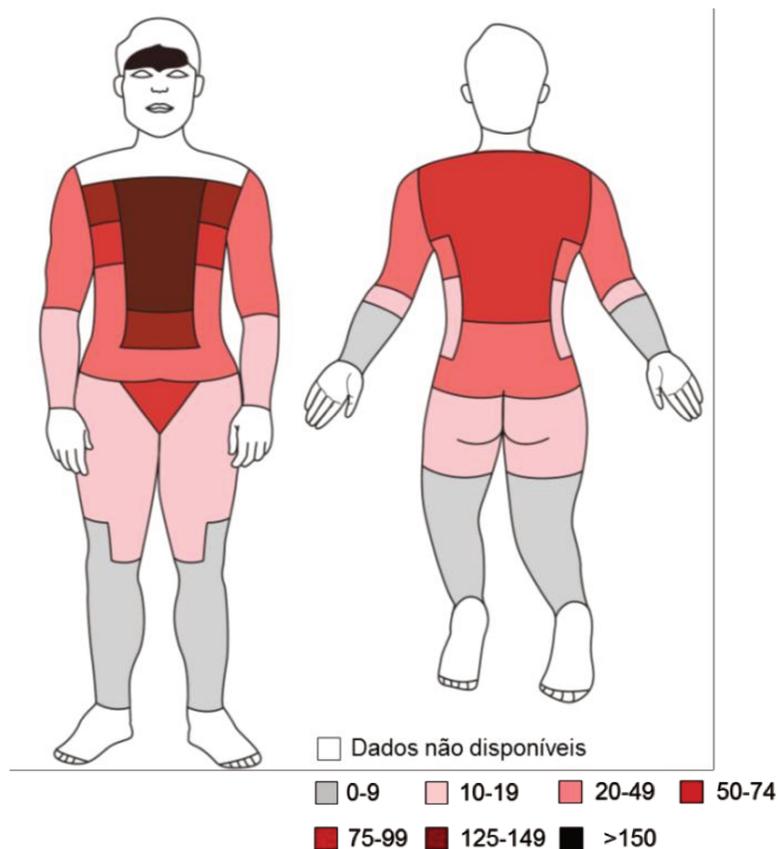


Figura 6. Concentração de lipídeos ($\mu\text{g cm}^{-2}$) na superfície da pele de adultos. Adaptado de Wilson, M.; 2008¹⁰.

1.2 Microbiota da Pele Humana

1.2.1 Microbiota bacteriana da Pele Humana

A pele humana normal é colonizada por micro-organismos residentes e transientes, principalmente bactérias Gram-positivas e negativas. A microbiota residente é uma população relativamente estável de micro-organismos tipicamente não patogênicos, que está presente de forma consistente sobre a pele, e se for removido, recompõe-se em poucas horas. Embora a microbiota residente seja relativamente constante, uma série de fatores ambientais, incluindo o clima e a exposição à radiação UV, bem como uma série de fatores do hospedeiro, como idade, sexo e etnia, podem influenciar a quantidade e tipos de micro-organismos que compõem sua microbiota²⁴.

Por muitas décadas, os pesquisadores mantiveram-se interessados em definir a composição da microbiota da pele humana, com foco em características descritivas tais como sua associação com infecções²⁵, sua estabilidade ao longo do tempo²⁶, e suas interações com outros micro-organismos²⁷. Além disso, os estudos, em grande parte, foram baseados em técnicas de cultivo e isolamento⁸, o que levou a uma avaliação consideravelmente limitada da composição de comunidades microbianas complexas^{28,29}.

Devido à complexidade de seu ecossistema, a pele é particularmente interessante para estudos de diversidade microbiana. Adequadamente caracterizada, essa microbiota tem importantes implicações clínicas, devido a sua interação com outros micro-organismos que podem desempenhar um papel crucial em várias doenças humanas. Os estudos pioneiros do microbioma da pele têm se concentrado na caracterização da estrutura da comunidade de bactérias que habitam a pele humana saudável ou na avaliação de "como estas se tornaram patogênicas"^{2, 17, 30}. Tais

²⁴Holland K.T., Bojar R.A. *Am. J. Clin. Dermatol.* **2002**, *3*, 445-449.

²⁵McBride M.E., Duncan W.C., Knowx J.M. *J. Cutaneous Pathol.* **1977**, *4*, 14-22.

²⁶Evans C.A. *J. Invest. Dermatol.* **1975**, *64*, 42-46.

²⁷Wright P., Terry C.S. *J. Med. Microbiol.* **1981**, *14*, 271-278.

²⁸Gao Z., Tseng C., Pei Z., Blaser M.J. *PNAS*, **2007**, *104*, 2927-2932.

²⁹McCaig A.E., Glover L.A., Prosser J.I. *Appl Environ Microbiol* **1999**, *65*, 1721-1730.

³⁰Chiller, K., Selkin, B.A., Murakawa, G.J. *J. Invest. Dermatol. Symp. Proc.* **2001**, *6*, 170-174.

estudos ainda não permitem prever se certos padrões de diversidade microbiana são bons ou ruins, muito menos se eles podem causar doenças. O que está claro é que esses padrões são altamente complexos e dinâmicos^{28, 31}.

Tradicionalmente, os micro-organismos eram identificados por métodos dependentes de isolamento e cultivo, portanto, muitas espécies fastidiosas ficaram sub-representadas nas culturas de comunidades microbianas mistas³², enquanto muitas outras ainda não puderam ser cultivadas em condições descritas³³. A utilização de técnicas que independem do isolamento e cultivo de micro-organismos levou a uma drástica mudança na perspectiva da diversidade microbiana existente no ambiente³⁴.

A evolução das técnicas moleculares vem contribuindo para uma grande reavaliação da compreensão científica sobre a microbiota humana. Estudos recentes têm contribuído significativamente para um grande avanço do conhecimento da diversidade microbiana humana (conhecida como "microbioma humano")³⁵, através de estudos independentes de cultivo³⁶, permitindo assim a caracterização de comunidades microbianas ainda desconhecidas, além de micro-organismos individuais⁸.

As abordagens moleculares usando sequências de DNA ribossomal (rDNA) como ferramenta na classificação microbiana, ou ainda a avaliação do genoma total de uma comunidade (metagenoma), vêm sendo aplicadas para caracterizar a microbiota da pele humana e têm revelado uma diversidade muito maior de micro-organismos do que se conhecia através dos métodos dependentes de cultivo^{28,37,38,34}. Grice e colaboradores³⁷, avaliaram a diversidade bacteriana da região do antebraço de seis indivíduos saudáveis identificando 8 filos e 91 gêneros diferentes³⁸. Os mesmos autores realizaram novo estudo agora com dez voluntários saudáveis em vinte locais distintos da pele, identificando 19 filos e 205 gêneros.

³¹ Dekio I., Hayashi H., Sakamoto M., Kitahara M., Nishikawa T., Suematsu M., Benno Y. *J. Med. Microbiol.* **2005**, *54*, 1231–1238.

³² Frank D. N., Spiegelman G. B., Davis W., Wagner E., Lyons E., Pace N. R. *J. Clin. Microbiol.* **2003**, *41*, 295–303.

³³ Amann R. I., Ludwig W., Schleifer K. H. *Microbiol. Rev.* **1995**, *59*, 143–169.

³⁴ Costello E. K., Lauber C.L., Hamady M., Fierer N., Gordon J.I., Knight R. *Science* **2009**, *326*, 1694–1697.

³⁵ Peterson J., Garges S., Giovanni M. *Genome Res.* **2009**, *19*, 2317–2323.

³⁶ Schloss P. D., Handelsman. *J. Microbiol Mol Biol Rev* **2004**, *68*, 686–691.

³⁷ Grice E.A., Kong H.H., Renaud G., Young A.C., Bouffard G.G., Blakesley R.W., Wolfsberg T.G., Turner M.L., Segre J.A. *Genome Res.* **2008**, *18*, 1043–1050.

³⁸ Grice E.A., Kong H.H., Conlan S., Deming C.B., Davis J., Young A.C., Bouffard G.G., Blakesley R.W., Murray P.R., Green E.D., Turner M.L., Segre J.A. *Science*, **2009**, *324*, 1190-1192.

Estes dois estudos demonstraram que a colonização de bactérias é dependente da fisiologia da região da pele, com bactérias específicas associadas a microambientes úmidos, secos e sebáceos (Figura 7). Segundo os autores, em geral a diversidade bacteriana é menor em regiões sebáceas, sugerindo que existe uma seleção de subconjuntos específicos de organismos que podem tolerar as condições dessas regiões. Regiões sebáceas que contêm baixa diversidade de filotipos incluem a testa (6 filotipos)³⁷, o vinco retroauricular (atrás da orelha) (15 filotipos)³⁸, as costas (17 filotipos)³⁸ e da dobra alar (lado da narina) (18 filotipos)³⁸.

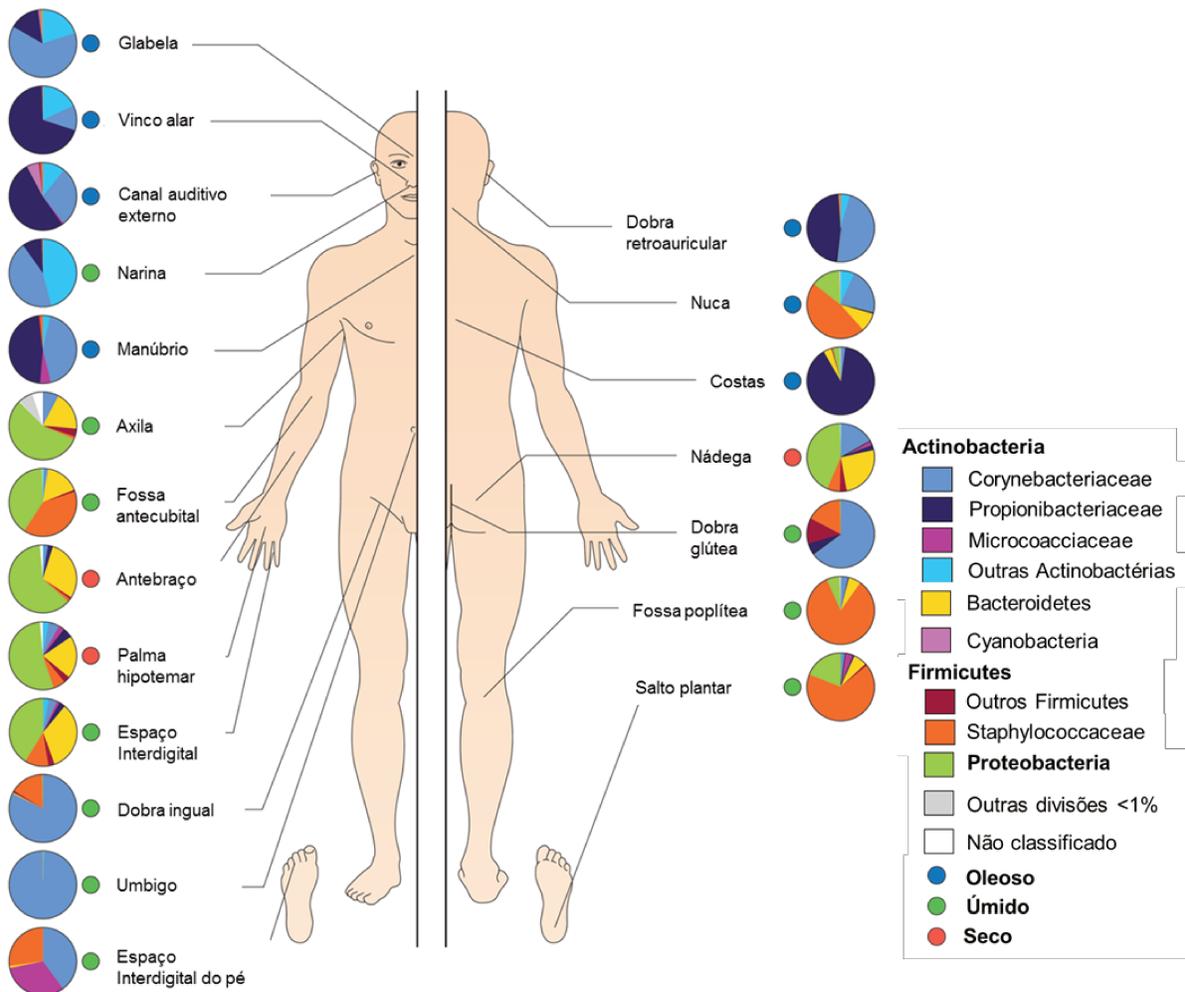


Figura 7. Distribuição topográfica de bactérias em diversos locais da pele. Adaptado de Grice e colaboradores, 2011⁸. Bactérias que colonizam a pele estão classificadas em nível de família, os filos estão destacados em negrito. As regiões foram selecionadas por apresentarem maior incidência de infecções bacterianas e estão agrupadas como regiões sebáceas (círculos azuis), úmidas (círculos verdes) e secas (círculos vermelhos).

Conforme definido em estudos metagenômicos, a maioria das bactérias da pele é classificada em quatro diferentes filos: *Actinobacteria*, *Firmicutes*, *Bacteroidetes* e *Proteobacteria*. Estes quatro filos dominantes também constituem a microbiota que encontrada nas superfícies internas das mucosas (trato gastrointestinal e cavidade oral)^{39, 40, 41, 42}. Entretanto, as proporções são muito diferentes: enquanto membros do filo *Actinobacteria* são mais abundantes na pele, os membros *Firmicutes* e *Bacteroidetes* são mais abundantes no trato gastrointestinal⁸.

As bactérias dominantes nas áreas sebáceas são espécies de *Propionibacterium* spp., o que confirma estudos microbiológicos clássicos que descrevem estas como residentes da unidade pilossebácea². Além disso, a análise metagenômica revelou que espécies de *Staphylococcus* e *Corynebacterium* spp. são mais abundantes nas áreas úmidas, o que corrobora com os dados de estudos baseados em cultura que sugerem que estes organismos preferem áreas com alta umidade^{10,37}. O metabolismo da secreção apócrina por estafilococos e corinebactérias resulta no mau cheiro característico, associado com o suor em humanos^{43,44}.

Enquanto muitos destes micro-organismos são benéficos, comensais ou neutros, alguns podem se tornar patogênicos. Os estudos ainda demonstram que os membros potencialmente patogênicos da microbiota são mantidos sob controle por outros micro-organismos residentes. Perturbações ou intervenções com antibióticos e antissépticos, o hábito de lavar as mãos ou utilizar loções, podem alterar a comunidade microbiana permitindo supercrescimento de membros patogênicos que, assim podem causar doenças⁸. De acordo com uma recente revisão da microbiota cutânea, podemos considerar as bactérias dos gêneros *Staphylococcus*, *Corynebacterium*, *Propionibacterium*, como parte da microbiota residente da pele humana². Muitos deles estão agora emergindo como patógenos multirresistentes, tais como *S. aureus* e *S. epidermidis*^{45,46}.

³⁹ Eckburg P. B. *Science* **2005**, *308*, 1635–1638.

⁴⁰ Dewhirst F. E. *J. Bacteriol.* **2010**, *192*, 5002–5017.

⁴¹ Zaura E., Keijsers B. J., Huse S. M., Crielaard W. *BMC Microbiol.* **2009**, *9*, 259–271.

⁴² Bik E. M. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **2006**, *103*, 732–737.

⁴³ Leyden J. J., McGinley K. J., Holze E., Labows J. N., Kligman A. M. *J. Invest. Dermatol.* **1981**, *77*, 413–416.

⁴⁴ Emter R., Natsch A. *J. Biol. Chem.* **2008**, *283*, 20645–20652.

⁴⁵ Marshall B. M., Ochieng D. J., Levy S. B. *Microbe* **2008**, *4*, 231–238.

⁴⁶ Sommer M.O.A., Dantas G., Church G.M. *Science* **2009**, *325*, 1128–1131.

1.2.2 Microbiota fúngica da pele humana

A microbiota fúngica (ou “micobiota”) da pele humana saudável é muito pouco caracterizada, em comparação com a bacteriana, provavelmente como resultado de sua raridade e natureza assintomática². A maioria dos fungos considerados como membros da microbiota da pele são leveduras principalmente do gênero *Malassezia*, anteriormente conhecido como *Pityrosporum*. Elas são encontradas na superfície da pele de todos os adultos e se aglomeram próximo às glândulas sebáceas⁸.

A maioria dos fungos identificados na pele saudável, por análises moleculares, são leveduras do gênero *Malassezia* spp.⁴⁷, o que concorda com os dados anteriores de estudos baseados em cultivo^{47,48,49}. Em um estudo realizado por Gao e colaboradores⁴⁹, espécies de *Malassezia* foram detectadas em grande proporção, constituindo 53-80% da população total de fungos da pele, dependendo da região de coleta, sendo a região atrás da orelha a que abriga a maior proporção (Fig. 8). Ainda não é claro quais as espécies de fungos constituem o restante da população, e investigações mais aprofundadas deverão ser realizadas.

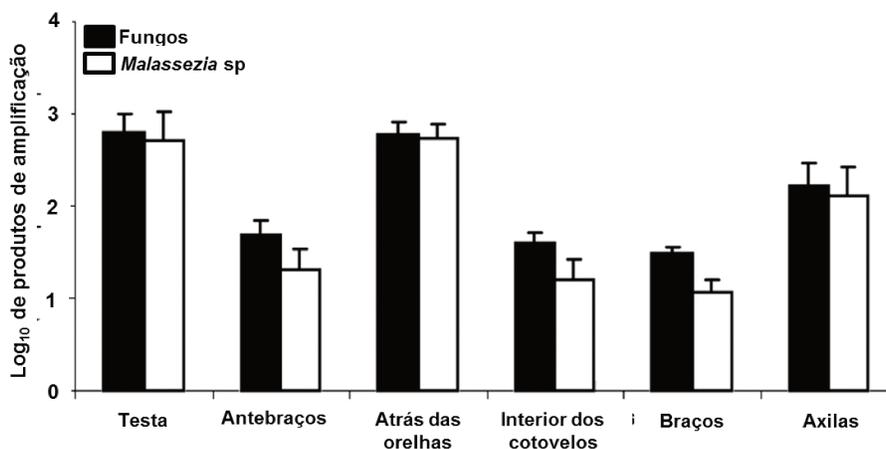


Figura 8. Enumeração das espécies de fungos em seis regiões cutâneas. Adaptado de Gao e colaboradores, 2010⁴⁹. Neste estudo foram avaliados 8 voluntários. Análise de PCR (*Polymerase Chain Reaction*) quantitativo foi realizada com iniciadores universais para espécies de fungos ou *Malassezia*. As barras indicam a média do desvio padrão dos valores entre as amostras.

⁴⁷ Paulino L.C., Tseng C.H., Strober B.E., Blaser M.J. *J. Clin. Microbiol.* **2006**, *44*, 2933-2941.

⁴⁸ Paulino L. C., Tseng C. H., Blaser M. J. *FEMS Yeast Res.* **2008**, *8*, 460-471.

⁴⁹ Gao Z., Perez-Perez G. I., Chen Y., Blaser M. J. *J. Clin. Microbiol.* **2010**, *48*, 3575-3581.

Análises baseadas em cultivo sugerem que *Candida* spp. raramente colonizam a pele humana, mas podem causar infecções clínicas, especialmente em condições de imunodeficiência, diabetes ou infecção pós o uso de agente antibacterianos⁵⁰. Outros tipos de fungos que, de acordo com análises baseadas em cultivo, são ocasionalmente descritos como colonizadores transientes incluem *Trichosporon* spp. na área do períneo e dermatófitos embaixo das unhas e no couro cabeludo⁵¹, mas a maioria dos estudos se restringem a casos envolvendo doenças de pele, principalmente micoses⁵². Além disso, existe pouca evidência sobre quais fungos filamentosos têm algum envolvimento na microbiota normal da pele³, embora alguns deles possam ser transportados, mesmo que temporariamente⁵³. Percebe-se assim a necessidade da realização de estudos maiores e mais extensos sobre fungos filamentosos na pele humana, bem como o uso de diversas abordagens para a identificação e sequenciamento destas espécies.

Abordagens moleculares para a caracterização da diversidade microbiana levantaram muitas questões importantes sobre a relação hospedeiro/micro-organismo, e sua relevância em doenças de pele. Embora agora esteja claro que micro-organismos dominantes (isto é, *Staphylococcus* e *Propionibacterium* spp.) constituem uma grande proporção da microbiota da pele, pouco se sabe sobre os organismos transitórios (como fungos filamentosos) que compõem o equilíbrio. Ainda não se conhece quais os fatores capazes de conduzir variações nestes ecossistemas, e como flutuações são associadas a doenças de pele.

⁵⁰ Peleg A. Y., Hogan D. A., Mylonakis E. *Nature Rev. Microbiol.* **2010**, *8*, 340–349.

⁵¹ Noble W.C., *The skin microflora and microbial skin disease*. Cambridge University Press, United Kingdom, 1993.

⁵² Ákaza N., Akamatsu H., Sasaki Y., Takeoka S., Kishi M., Mizutani H., Sano A., Hirokawa K., Nakata S., Matsunaga K. *J. Dermatol.*, **2010**, *37*, 786–792.

⁵³ Paquet P., Piérard-Franchimont C., Piérard G. E., Quatresooz P. *Arch. Dermatol. Res.* **2008**, *300*, 167-171.

1.3 Diferenças na pele humana: sexo e etnia

As diferenças genéticas e hormonais afetam consideravelmente a estrutura e a função da pele, refletindo em particularidades associadas ao sexo. Algumas diferenças básicas podem ser percebidas na arquitetura da pele de homens em relação a de mulheres. A pele de homens e mulheres difere principalmente no metabolismo hormonal, na espessura da pele (nos homens é mais espessa), crescimento de pêlos (homens tem maior quantidade e maior espessura), taxa de sudorese, a produção de sebo, pH de superfície, acúmulo de gordura, entre outros¹⁸. Existem algumas diferenças também na propensão a doenças cutâneas e câncer de pele como exemplificado na Tabela 2.

Tabela 2. Diferenças da pele humana associadas ao sexo (adaptado de Giacomoni)¹⁸.

Características	Homens	Mulheres
Taxa de sudorese durante o exercício (mL h ⁻¹)	800	450
Produção de sebo (µg cm ⁻²)	3,0	0,7
pH (superfície)	5,8	5,5
pH (intraepidérmico)	4,6	5,6
Espessura da pele (razão homem/mulher)	1,2	
Câncer de pele (incidência - razão homens/mulheres)	2,0	
Lúpus sistêmico (incidência - razão homens/mulheres)	0,11	
Melanoma (mortalidade - razão homens/mulheres)	2,0	

Além disso, diversos estudos comparativos relatam as variações entre as propriedades fisiológicas da pele de diferentes grupos étnicos (brancos, negros, asiáticos), tais como resistência mecânica, hidratação, perda de água transepidérmica, teor de lipídios do estrato córneo e excreção de sebo, além da propensão a irritação e alergia^{54,55}. Diferenças significativas também são observadas na ocorrência de irritação

⁵⁴Modjtahedi S.P., Maibach H.I. *Contact Dermatitis*, **2002**, 47, 272–278.

⁵⁵Taylor S.C, *J. Am. Acad. Dermatol.* **2002**, 46, S41-62.

e alergia, mostrando uma maior ocorrência em asiáticos, seguidos dos brancos, sendo que os negros são menos suscetíveis, provavelmente por ter em uma camada córnea mais compacta e resistente^{56,57}.

Apesar de todas as variáveis citadas acima, ainda são muito raros os trabalhos que levam em conta as possíveis alterações da microbiota da pele humana conforme sexo e etnia dos indivíduos^{17,18,16}. Já em relação a diferenças étnicas, Rebora e Guarrera⁵⁸ compararam o número total de bactérias em indivíduos asiáticos, brancos e negros, mostrando que o último tem maior quantidade de micro-organismos, com destaque para a alta incidência de *Propionibacterium*, o que poderia ser explicado pelo alto teor de lipídeos do seu estrato córneo⁵⁹.

Embora a densidade de melanócitos na camada basal da epiderme varie entre diferentes regiões do corpo, este valor para um determinado local da pele permanece relativamente constante nos diferentes grupos étnicos. E as diferenças de pigmentação observadas são devidas às diferenças na melanogênese, e não à alteração do número de melanócitos.

Para tentar uma maior uniformização da informações relatadas, a dermatologia utiliza sistemas de classificação através da cor da pele, sendo que o mais usado é o de Fitzpatrick, definido por fototipos de pele⁶⁰. Este sistema é baseado na capacidade da pele em responder à radiação UV com a formação de queimadura ou bronzeamento. Este classifica os indivíduos em 6 grandes grupos de fototipos (I a VI), conforme a Tabela 3.

⁵⁶ Yosipovitch G., Theng T.S. *Cosmetics & Toiletries Magazine*, **2002**, 117, 57-62.

⁵⁷ Rawlings A.V. *J. Cosmet. Sci.* **2006**, 28, 79-93.

⁵⁸ Rebora R., Guarrera, M. *Acta Derm. Venereol.* **1988**, 68, 165-168.

⁵⁹ Komparore F., Mary J.P., DuPont C. *SkinPharmacol.* **1993**, 6, 200-207.

⁶⁰ Fitzpatrick T.B. *Arch. Dermatol.* **1988**;124, 869-71.

Tabela 3. Fototipos de pele de acordo com a reatividade e sensibilidade⁶⁰.

Foto	Descrição	Pele	Cabelo	Olhos
I	Queima com facilidade, nunca bronzeia	branca	vermelho ou loiro	azuis/verdes
II	Queima com facilidade, bronzeia muito pouco	branca	loiro	azuis/ verdes/ castanhos claros
III	Queima moderadamente, bronzeia moderadamente	morena clara	loiro escuro/ castanho claro	castanhos claros/escuros
IV	Queima pouco, bronzeia com facilidade	morena moderada	castanho	castanhos escuros
V	Queima raramente, bronzeia muito	morena escura	castanho escuro/preto	castanhos escuros
VI	Nunca queima, totalmente pigmentada	negra	preto	castanhos/ escuros

A classificação dos indivíduos como negros tem grandes variações, inicialmente somente os fototipos V e VI eram considerados negros, porém, hoje a ideia mais aceita é de que muitos indivíduos de fototipo IV também possuem características que são semelhantes aos dois outros grupos. Estes grupos de pessoas raramente queimam-se quando expostos ao sol e bronzeiam-se com extrema facilidade⁶¹.

É importante frisar que este sistema de classificação tem algumas limitações. Primeiro porque em indivíduos orientais (origem asiática), por exemplo, a sensibilidade à radiação UV não é diretamente proporcional ao tom de pele⁶¹.

⁶¹ Taylor S.C. *J. Am. Acad. Dermatol*, 2000, 46, 541-562.

1.4 Exposição a cosméticos e incidência de alergia

Um grande número de produtos de consumo, como os cosméticos, são usados diariamente em diversas partes do corpo humano, com tempo de contato de 12 horas ou mais, e muitas vezes com aplicações repetidas. Dentre os mais populares, destacam-se os perfumes, e outros produtos que contém fragrâncias, que são misturas de inúmeros constituintes podendo conter mais de seis mil insumos naturais e sintéticos. Muitos destes constituintes apresentam atividades biológicas e com a frequente exposição às fragrâncias, esta atividade pode tornar-se toxicologicamente significativa⁶².

Pesquisas recentes mostram um grande aumento no grau de incidência de alergia de contato em indivíduos de diferentes fenótipos, tipos de pele, localidades e hábitos de consumo^{63,64}, sendo que as fragrâncias são a segunda causa mais comum de alergia de contato após níquel, sendo que ocorre com mais frequência na região das axilas, rosto e pescoço, embora possam ocorrer manchas ocasionais em áreas de aplicação de perfumes (pulsos, atrás das orelhas)⁶⁵.

Dentre estas alergias, a mais comum é a Dermatite de Contato (DC, conhecida como eczema ou dermatite atópica), normalmente causada por um alergênico de contato (hapteno⁶⁶) que pode penetrar na barreira da pele e reagir com algumas proteínas formando um antígeno, o qual é reconhecido pelas células de Langerhans, que sinalizam ao sistema imunológico, desencadeando um processo alérgico⁶².

A DC é uma doença crônica recorrente que afeta cerca de 15% das crianças e 2% dos adultos dos EUA, e também está, muitas vezes, associada com a colonização e infecção microbiana. A prevalência de DC triplicou nos países industrializados nas últimas três décadas sem uma causa clara. Isto levanta a intrigante possibilidade de que as flutuações microbianas da pele modulam a interação gene/ambiente na

⁶² Hostýnek J.J., Roberts M.S., Walters K.A. *Drugs and the Pharmaceuticals Sciences, Vol. 9: Dermal Absorption and Toxicity Assessment*. **2003**.

⁶³ Cogen V. N., Gallo R.L. *Br. J. Dermatol.* **2008**, *158*, 422-455.

⁶⁴ Friedmann P.S; Pickard C. *Contact Dermatitis*, **2010**, *63*, 237-247.

⁶⁵ Davies R.F.; Johnston G. A. *Clin. Dermatol.* **2011**, *29*, 311-315.

⁶⁶ Hapteno: toda espécie molecular não imunogênica, que se combina com uma macromolécula imunogênica carregadora é capaz de licitar uma resposta imune específica no hospedeiro.

superfície da pele, resultando na agravação dos quadros de DC. Mais de 90% dos pacientes com DC são colonizados com *S. aureus*, incidência muita alta se comparada com indivíduos saudáveis nos quais essa taxa é menor que 5%⁶⁷.

A desregulação da resposta imune da pele é aparente em várias doenças de pele (por exemplo, na psoríase e DC), mas ainda não se conhece como esta desregulação atinge ou é resultante de alterações na microbiota. Estudos confirmam apenas que as lesões DC são caracterizadas por baixos níveis de produção peptídeos antimicrobianos em comparação com os níveis encontrados na pele saudável⁶⁸.

1.4.1 Degradação de insumos de fragrâncias

A aceitação de um produto cosmético pelo consumidor é fortemente influenciada pelo odor do produto (fragrância). Por isso, existe uma grande preocupação, por parte da indústria, em oferecer produtos estáveis com características organolépticas inalteradas ao longo do tempo de armazenamento e de utilização.

Insumos são considerados seguros para uso cosmético quando apresentam propriedades toxicológicas conhecidas, como por exemplo: citotoxicidade, fototoxicidade, mutagenicidade, carcinogenicidade, permeação cutânea e alergenicidade. Entretanto, muitos insumos considerados seguros podem sofrer reações de degradação, como a auto-oxidação em contato com ar, luz e calor ou ainda através do metabolismo cutâneo, formando produtos que podem alterar o odor e/ou causar alergia de contato⁶⁹. Como exemplos clássicos podemos citar os terpenos limoneno e linalol que são facilmente oxidados na presença de luz e oxigênio, levando a formação de hidroperóxidos alergênicos⁷⁰ (Figura 9).

⁶⁷ Hanifin J.M., Rogge J.L. *Arch. Dermatol.* **1977**, *113*, 1383–1386.

⁶⁸ Nomura I. *J. Allergy Clin. Immunol.* **2003**, *112*, 1195–1202. Gudjonsson J. E. *J. Invest. Dermatol.* **2009**, *129*, 2795–2804.

⁶⁹ Kalberg A-T, Bergström M.A., Börje A., Luthman K., Nilsson J.L.G. *Chem. Res. Toxicol.* **2008**, *21*, 53-60.

⁷⁰ Sköld M., Börje A., Matura M., Karlberg, A. *Contact Dermatitis*, **2002**, *46*, 267-272.

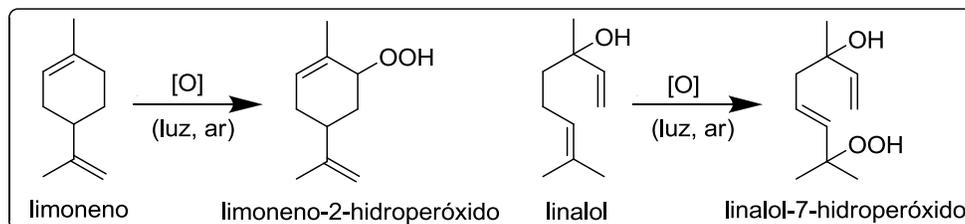


Figura 9. Oxidação do limoneno e linalol na presença de luz e oxigênio⁷⁰.

Vários componentes de cosméticos podem ser alergênicos, mas as fragrâncias são as principais causadoras de alergias relacionadas a estes. Contudo, poucos são os relatos divulgados sobre a degradação química de insumos de fragrâncias em contato com a pele e nenhum deles leva em conta a microbiota presente na mesma. Neste contexto, pesquisas que considerem possíveis reações de degradação (por exemplo, oxidação, redução e hidrólise) destes insumos pela microbiota da pele humana podem trazer informações valiosas para a avaliação da toxicidade, estabilidade e aceitabilidade de produtos cosméticos em geral.

Por conseguinte, o entendimento do potencial enzimático dos micro-organismos presentes na microbiota da pele humana tem grande importância, já que são poucos os estudos que avaliam a biotransformação de xenobióticos na pele, sendo estes relacionados ao metabolismo das células que constituem a pele humana^{71,72,73}. Embora nossa pele seja exposta diariamente a inúmeros compostos de fragrâncias nos mais diversos produtos, nada se sabe sobre as possíveis degradações causadas pela microbiota da pele humana. Para acessar, de forma efetiva, esta nova perspectiva sobre a degradação de insumos de fragrâncias, torna-se necessário a realização de uma ampla avaliação do potencial enzimático de um conjunto de amostras representativas de uma população. Para isto, devem-se levar em conta as diferentes faixas etárias da população, sexo (homem/mulher) e a miscigenação da população que pode ser representada pela seleção de diversos fototipos de pele.

⁷¹ Hikima T.; Tojob K.; Maibach H.I. *Skin Pharmacol. Physiol.* **2005**, *18*, 153-159.

⁷² Bergström M.A., Ott H., Carlsson A., Neis M., Zwadlo-Klarwasser G., Jonsson, C.A.M., Merk H.F, Karlberg A-T., Baron J.M. *J. Invest. Dermatol.* **2007** *127*, 1145–1153.

⁷³ Svensson C.K. *Drug. Metab. Dispos.* **2009**, *37*, 247-253.

1.5 Enzimas e suas aplicações

Os seres vivos utilizam reações bioquímicas para controlar suas funções vitais e processos metabólicos, que envolvem catalisadores biológicos conhecidos como enzimas. As enzimas têm um papel essencial em todo o metabolismo humano e, particularmente, na pele onde são imprescindíveis nos processos de absorção e eliminação de componentes xenobióticos e endógenos⁷⁴.

Atualmente, as enzimas desempenham um papel importante na alimentação humana, em processos de fabricação de alimentos e como matéria prima de diversos produtos de consumo diário, tais como detergentes para a roupa (que dissolvem as manchas, com a ajuda de proteases e lipases). Na química fina, a busca por processos ambientalmente corretos e as propriedades das enzimas como catalisadores (régio-, estereo- e quimiosseletividade) têm estimulado a aplicação industrial da biocatálise para a obtenção de moléculas de alto valor agregado⁷⁵.

As enzimas também são fundamentais em estudos na área de saúde, uma vez que muitas doenças podem estar ligadas ao mau funcionamento de uma ou mais enzimas. Assim, muitas das pesquisas farmacêuticas são baseadas na busca de inibidores potentes e específicos para estas enzimas⁷⁶.

Dentre as grandes classes de enzimas, as mais utilizadas tanto na pesquisa acadêmica quanto na indústria são as hidrolases e as oxidorreduções, correspondendo, respectivamente, a 60 e a 25% das aplicações descritas⁷⁷.

As hidrolases são enzimas capazes de hidrolisar ou formar ésteres, amidas, lactonas, lactamas, epóxidos, nitrilas, anidridos, glicosídeos e organolídeos⁷⁵. Essas enzimas são relevantes para o catabolismo, fornecendo nutrientes assimiláveis pelas células. Existem 12 subgrupos de hidrolases de acordo com o tipo de ligação em que atuam, onde das enzimas de relevância tecnológica que pertencem a esta família são lipases, esterases, epóxido hidrolases, proteases e amilases. A maioria das hidrolases

⁷⁴ Baron J. M., Wiederholt T., Heise R., Merk H. F., Bickers, D. R. *Curr. Med. Chem.*, **2008**, *15*, 2258-2264

⁷⁵ Faber K. *Biotransformation in Organic Chemistry*, 2nd ed.; Springer: Berlin, **1995**.

⁷⁶ Illanes A. *Enzyme Biocatalysis: Principles and Applications*. Springer Science, **2008**.

⁷⁷ Oliveira L.G., Mantovani S.M. *Quim. Nova*, **2009**, *32*, 742-756.

não requer coenzimas, muitas são extracelulares e suficientemente robustas para resistir a condições severas⁷⁶.

As lipases e esterases são as mais amplamente utilizadas em resoluções e dessimetrizações de álcoois primários, ácidos carboxílicos, e substratos complexos contendo um ou mais centros estereogênicos⁷⁵. Representam um grupo diversificado de hidrolases que catalisam a clivagem e a formação de ésteres. Essas enzimas representam o grupo mais importante de biocatalisadores para aplicações biotecnológicas⁷⁸.

As lipases caracterizam-se por catalisar reações de hidrólise, esterificação e transesterificação de triglicerídeos compostos principalmente por ácidos graxos de cadeia longa (mais lipossolúveis), enquanto as esterases hidrolisam preferencialmente ésteres simples (cadeia curta), como acetatos e propionatos, e normalmente ésteres de ácidos graxos com até 6 carbonos⁷⁸. Inúmeros organismos vivos expressam essas enzimas, sendo que na pele humana, a microbiota residente utiliza lipases e esterases para hidrolisar diferentes lipídios que compõe o estrato córneo (triglicerídeos, ceramidas, ésteres graxos e esfingolipídios)⁵. Muitos ésteres graxos são utilizados em formulações cosméticas como agentes tensoativos, emolientes, emulsificantes, além dos inúmeros ésteres de cadeia curta que são utilizados em fragrâncias. Estas matérias primas estão presentes em inúmeros produtos de uso diário, sendo que a degradação dos mesmos pode levar a alteração de odor, cor e aspecto das formulações ou ainda, durante o uso, levar a formação de compostos toxicologicamente perigosos.

Outra classe de hidrolases bastante interessante são as epóxido hidrolases que catalisam a resolução de epóxidos racêmicos a seus respectivos dióis vicinais⁷⁵. Essas enzimas estão envolvidas no metabolismo de uma variedade de epóxidos, muitos dos quais podem ser mutagênicos e/ou carcinogênicos. Os epóxidos tem sua toxicidade relacionada com a alta reatividade do anel oxirano, que devido ao seu caráter eletrofílico, pode reagir com uma variedade de nucleófilos biológicos. Dessa maneira a sua degradação a dióis, os quais são mais solúveis em água e podem ser facilmente

⁷⁸ Bornscheuer U. T. *FEMS Microbiol. Rev.*, **2002**, 26, 73-81.

eliminados, é de vital importância para a regulação celular⁷⁹. No entanto, pode levar a formação de compostos potencialmente alergênicos⁸⁰.

As proteases também são enzimas hidrolíticas, responsáveis pela clivagem de ligações peptídicas em proteínas e peptídeos⁸¹. São encontradas em células humanas e também podem ser encontradas em micro-organismos que compõe a microbiota da pele. Essas enzimas são responsáveis pela degradação de cadeias polipeptídicas da pele (queratina, colágeno) e liberação de aminoácidos usados na manutenção da epiderme e também como fonte de energia para a microbiota. Diversos produtos cosméticos contêm proteínas em sua formulação, com a função de hidratação e formação de filme⁸². A degradação indesejada ou prematura destas proteínas pode desestabilizar a formulação, inativar o produto, ou ainda causar a liberação de compostos indesejados.

As amilases são enzimas capazes de hidrolisar moléculas de polissacarídeos, sendo usadas na conversão de amido para a produção de maltodextrina, amidos modificados e xarope de frutose e glicose, para diversas aplicações industriais. A α -amilase é uma enzima que possui atividade hidrolítica, atuando sobre ligações glicosídicas α -1,4 de polissacarídeos. É responsável pela degradação inicial de amidos pela clivagem de ligações da amilose e amilopectina (polímeros de glicose)⁸³. Amidos são amplamente utilizados em formulações cosméticas como agente espessante, estabilizante e umectante⁸⁴. Diversos micro-organismos, inclusive representantes da microbiota humana, utilizam amilases para auxiliar na degradação de macromoléculas para a liberação de nutrientes¹⁰. Assim, uma possível hidrólise de amido em um produto cosmético (ou durante a sua aplicação) pode causar a degradação da fórmula ou a não obtenção do efeito desejado.

As oxidoredutases, elas são enzimas que catalisam reações de oxidação e redução envolvendo a transferência de elétrons, átomos de hidrogênio ou de oxigênio.

⁷⁹ Archelas A., Furtoss R. *Tibtech*, **1998**, *16*, 108-116.

⁸⁰ Scholes E.W., Pendlington R.U., Sharma R.K., Basketter D.A. *Toxic. in Vitro*, **1994**, *8*, 551-553.

⁸¹ Ji-Wei Wu J-W., Chen X-L. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2011**, 253-262.

⁸² Kumar, M.; Roopa Ghirnikar, R. Proteins and Peptides in Personal Care. In: Lad, R. (Ed.) *Biotechnology in personal care. Cosmetic science and technology*, Taylor & Francis Group, NY, EUA, **2006**. *29*, 57-76.

⁸³ Prakash, O.; Jaiswal, N. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **2010**, *160*, 2401-2414.

⁸⁴ Barel, A.O.; Paye, M.; Maibach, H.I. *Handbook of cosmetic science and technology*, Informa Healthcare, NY, USA, 3 ed., **2009**.

Estão envolvidas em vias metabólicas centrais da célula, pois exigem coenzimas e são estritamente intracelulares⁷⁶. As oxidorreduções mais empregadas estão em três categorias: desidrogenases, oxigenases e oxidases.

As desidrogenases são amplamente utilizadas na redução de grupos carbonílicos de aldeídos e cetonas, com a possibilidade de geração de centros assimétricos a partir de cetonas pró-quirais. As oxigenases são úteis na transferência de um (mono-oxigenases) ou dois (dioxigenases) átomos de oxigênio aos substratos, proporcionando a funcionalização de ligações C=C e C-H. As oxidases geralmente atuam em reações de transferência de elétrons, estando entre elas peroxidases, haloperoxidases e Baeyer-Villigerases⁷⁵.

Muitos ingredientes de cosméticos e fragrâncias podem sofrer reações de oxidação e redução, tanto pelo metabolismo da pele como pela ação da microbiota residente⁸⁵. Existe uma grande preocupação em relação a reações de oxidação, principalmente em fragrâncias, onde pode ocorrer a formação de hidroperóxidos de terpenos que são alergênicos⁶⁹ ou ainda a oxidação de cetonas cíclicas com a formação de lactonas que, em alguns casos, são relatadas como fototóxicas ou ainda neurotóxicas⁸⁶.

Assim, considerando a diversidade enzimática da pele e da sua microbiota, novos estudos direcionados para um maior entendimento da relação enzimas/degradação de componentes de fragrância e a ligação com processos alérgicos, alterações olfativas e organolépticas, podem contribuir significativamente para o desenvolvimento de produtos mais seguros e estáveis e a diminuição de processos alérgicos.

⁸⁵ Jäckh C., Blatz V., Eric Fabian E., Guth K., Ravenzwaay B-V., Reisinger K., Landsiedel R. *Toxicol. in Vitro*, **2011**, 25, 1209–1214.

⁸⁶ Adams T.B., Greer D.B., Doull J., Munro I.C., Newberne P., Portoghese P.S., Smith R. L., Wagner B. M., Weil C.S., Woods L.A., Ford A. *Food Chem. Toxicol.*, **1998**, 36, 249-278.

1.6 Ensaios de Triagem Enzimática

A triagem de atividades enzimáticas de uma grande quantidade de amostras, como os diferentes consórcios microbianos obtidos da pele humana, exige a utilização de ensaios rápidos e muito sensíveis, capazes de avaliar as transformações químicas desencadeadas pela ação destes micro-organismos.

Tais triagens enzimáticas consistem em ensaios rápidos capazes de testar um grande número de micro-organismos, individualmente, para uma reação alvo. Levando em conta a cinética enzimática e a especificidade (químio-, regio- e enantiosseletividade). A triagem também pode incluir a otimização de processos com uma única enzima com alterações nos parâmetros de reação, como solventes, tampões, aditivos, pH e temperatura⁸⁷.

Ensaios enzimáticos para triagem quando executados em placas de 96 ou 384 e os resultados avaliados em leitores de placas são denominados de sistema de alto desempenho (*HTS*, do inglês, *high-throughput screening*), e são valiosos para acessar grandes números de amostras.

O desenvolvimento de triagens enzimáticas tem sofrido uma enorme evolução nos últimos anos, particularmente na área de triagem de alto desempenho e métodos de microarranjos. Grande parte destes desenvolvimentos foi provocada por exigências da engenharia enzimática principalmente pela mutagênese aleatória, onde os ensaios de alto desempenho são ferramentas indispensáveis para a identificação de mutantes ativos, e pela exploração da biodiversidade e da metagenômica. Ensaios enzimáticos também desempenham um papel importante na descoberta de novos fármacos e em medicina diagnóstica⁸⁷.

Neste contexto, diversas metodologias vêm sendo desenvolvidas e aplicadas em formato de triagem de médio e alto desempenho para atender a exigências na busca de novos biocatalisadores. Conforme a classificação adotada por Raymond e Babiak⁸⁷, os sistemas de triagem enzimática podem ser divididos em três classes. Na primeira classe a atividade enzimática é avaliada nas células em crescimento por

⁸⁷ Raymond J. L.; Babiak P. *Adv. Biochem. Engin. Biotechnol.* **2007**, *105*, 31-58.

testes colorimétricos ou técnicas de seleção, já a segunda classe utiliza substratos cromogênicos ou fluorogênicos em sistemas miniaturizados no formato de microplacas ou micro-arranjos; enquanto a terceira classe é composta por ensaios que fazem uso de instrumentação analítica mais sofisticada como Cromatografia Gasosa (CG), Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), Espectrometria de Massas (EM), ou Ressonância Magnética Nuclear (RMN); adaptadas para ensaios em formato de médio e alto desempenho (Esquema 1).



Esquema 1. Tipos de triagens funcionais comumente usadas para encontrar enzimas ativas. Adaptado de Reymond and Babiak⁸⁷.

A utilização de ensaios preliminares e qualitativos na avaliação enzimática é uma ferramenta imprescindível no descobrimento de novas enzimas, melhoramento de enzimas existentes e descobrimento de moléculas bioativas de interesse⁸⁸.

⁸⁸ Gassner N.C., Tamble C.M., Bock J.E., Cotton N., White K.N., Tenney K., St Onge R.P., Proctor M.J., Giaever G., Nislow C., Davis R.W., Crews P., Holman T.R., Lokey R.S. *J. Nat. Prod.* **2007**, *70*, 383-390.

1.6.1 Triagem enzimática em cultura de células em crescimento

Os ensaios de triagem enzimática em cultura de células em crescimento são utilizados para testar diretamente colônias microbianas em crescimento para uma atividade enzimática, podendo incluir uma etapa de seleção genética, onde a presença de uma enzima ativa está ligada à sobrevivência da célula. Estes ensaios têm um alto potencial para aplicação em métodos de triagem de alto desempenho, mas permitem obter apenas informações preliminares (resultados positivos/negativos).

Muitos destes ensaios são idealizados através da seleção da classe de enzimas a ser avaliada e escolha de reações químicas relacionadas à atividade enzimática em questão e que transformam a reação enzimática num sinal detectável. A maioria destes ensaios baseia-se em alterações colorimétricas causadas por mudanças de pH, formação de complexos, alteração de substratos cromogênicos. Outros ensaios são baseados na toxicidade, nos quais a resposta ao ensaio consistirá na avaliação do crescimento microbiano, determinação de halos de inibição, dentre outros.

Métodos baseados em alterações colorimétricas de triagem em placas de Petri são bastante utilizados, pois são de fácil execução e podem ser aplicados para detecção de atividades de lipase⁸⁹, esterase⁹⁰, protease⁹¹, amilase⁹², celulase⁹³, entre outras. Esses ensaios baseiam-se na mudança de cor ou formação de halo que permitam analisar várias classes de enzimas de maneira rápida (Esquema 2), porém são ensaios qualitativos e não muito sensíveis a pequenas alterações na atividade enzimática, além de muitas vezes serem limitados pela baixa diversidade de substratos.

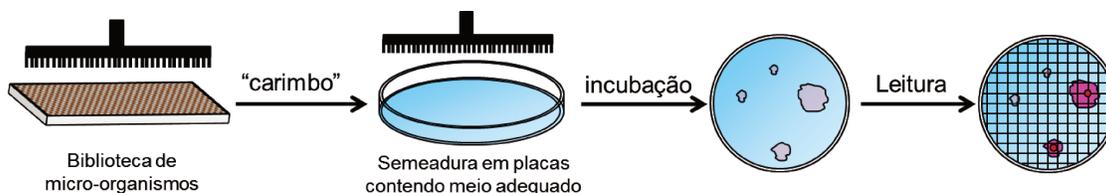
⁸⁹ a) Bornscheuer U. T., Altenbuchner J., Meyer H. H., *Biotechnol. Bioeng.* **1999**, *64*, 678-684. b) Jarvis G.N., Thiele J.H. *J. Microbiol. Methods*, **1997**, *29*, 41-47. c) Beisson F., Tiss A., Rivière C., Verger R. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **2000**, *2*, 133-153.

⁹⁰ a) Halonen P., Reinikainen T., Nyyssölä A., Buchert, J. *Enzyme Microb. Tech.*, **2009**, *44*,394-399. b) Donaghy J., Kelly P.F., McKay A. M. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **1998**, *50*, 257-260.

⁹¹ a) Ramesh S., Mathivanan N. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **2009**, *25*, 2103-2111. b) Saran S., Isar J., Saxena, R.K. *J. Biochem. Biophys. Methods*, **2007**, *70*, 697 - 699.

⁹² a) Fuwa H. *J. Biochem.* **1954**, *41*, 583-603; b) Farias D.F., Carvalho A.F.U., Oliveira C.C., D.C. *Braz. J. Biol.*, **2010**, *70*, 405-407.

⁹³ a) Hankin L., Anagnostakis S.L. *J. Gen. Microbiol.*, **1977**, *98*, 109-115. b) Kasana R. C., Salwan R., Dhar H., Dutt S., Gulati A. *Curr. Microbiol.* **2008**, *57*, 503-507.



Esquema 2. Representação esquemática do ensaio enzimático em placas de Petri. Adaptado de Marsaioli e Porto⁹⁴.

1.6.2 Triagem de alto desempenho em microplacas

Os métodos de triagens em microplacas mais utilizados são os ensaios com substratos fluorogênicos e cromogênicos, e consistem no uso de substratos capazes de liberar um cromóforo ou fluoróforo como consequência da ação enzimática⁹⁵. A literatura traz vários exemplos de ensaios acoplados a enzimas ou ensaios com substratos marcados e sistemas de detecção do ponto final, sendo que os ensaios envolvendo substratos fluorogênicos ou cromogênicos estão entre os mais utilizados⁹⁶.

As vantagens desses métodos são a alta sensibilidade (permitindo o uso de pequenas concentrações de substrato e de biocatalisadores), o aumento na velocidade de análise, a possibilidade do acompanhamento da cinética reacional em tempo real, além de permitir a quantificação da reação enzimática⁹⁷.

1.6.3 Uso de substratos modificados

Os métodos mais simples para obter um sinal UV/VIS ou fluorescência a partir de transformações enzimáticas utilizam substratos marcados sinteticamente, a fim de que após a ação enzimática um produto cromogênico ou fluorogênico possa ser detectado. Dentre esses substratos, encontram-se os derivados do ânion nitrofenolato **(1)**, que apresentam cor amarela após ação enzimática, e os derivados de ânions fluorescentes de umbeliferona **(2)**, resofurina **(3)** e a fluoresceína **(4)** que fluorescem no

⁹⁴ Marsaioli A.J., Porto A.L.M. *Biocatálise e Biotransformação – Fundamentos e Aplicações*, Editora Schoba, Salto, SP, Vol 1, **2010**, pg. 28.

⁹⁵ Goddard J. P., Reymond J. L. *Trends in Biotechnol.* **2004**, 7, 363-370.

⁹⁶ Bessler M.K., Jaeger K.E. *Trends in Biotechnol.* **2006**, 6, 248-250.

⁹⁷ Schmidt M., Bornscheuer U.T. *Biom. Eng.* **2005**, 22, 51-56.

azul, vermelho e verde respectivamente (Fig. 10). Muitos desses substratos modificados são comercialmente disponíveis e amplamente utilizados para detecção de enzimas hidrolíticas⁹⁸.

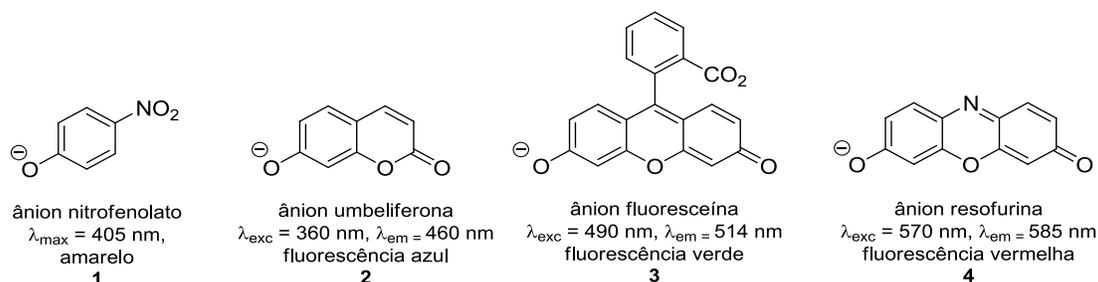


Figura 10. Fenóis conjugados utilizados em substratos cromogênicos e fluorogênicos, comprimento de onda de máxima absorção ($\lambda_{\text{máx}}$), comprimento de onda de excitação λ_{exc} , comprimento de onda de emissão λ_{em} .

Muitos substratos utilizados em ensaios para detecção de enzimas hidrolíticas podem ser problemáticos devido à alta reatividade e suscetibilidade a fatores não enzimáticos, como calor e pH ligeiramente básico, podendo dificultar a diferenciação entre as reações catalisadas pela enzima alvo e reações espontâneas. Além disso, esse tipo de substrato possui um grupo aromático ligado diretamente ao grupo funcional reativo, o que pode interferir no reconhecimento do substrato pela enzima⁹⁹.

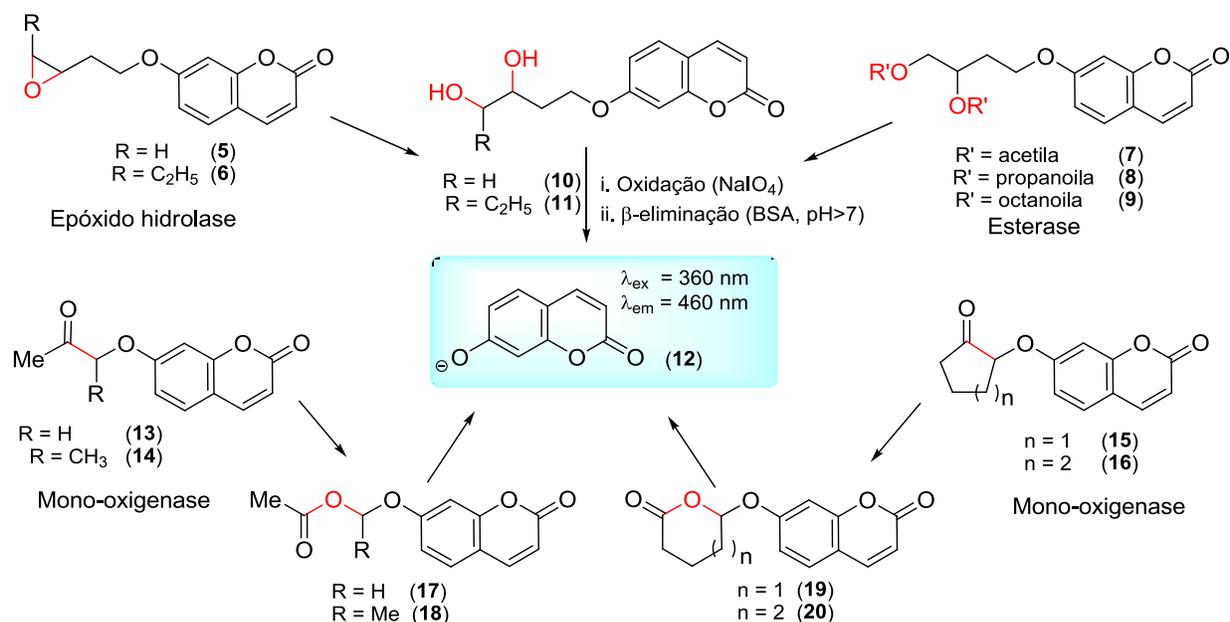
Este tipo de problema pode ser contornado usando substratos que liberam o grupo fenolato marcador indiretamente após reação da enzima alvo. Como exemplo, podemos destacar o modelo de ensaio enzimático utilizando sondas fluorogênicas derivadas de umbeliferona que foi proposto por Reymond e colaboradores¹⁰⁰ e amplamente utilizado em nosso grupo de pesquisa, pelo qual a detecção indireta de hidrolases consiste numa sequência de reações, onde os substratos fluorogênicos (**5-9**), derivados da 7-hidroxycoumarina, liberam o diol (**10** ou **11**) pela ação enzimática, o qual sofre clivagem oxidativa por NaIO_4 e posterior β -eliminação na presença de albumina de soro bovino (BSA). Essa última etapa leva à liberação do ânion umbeliferila (**12**) fluorescente, que pode ser detectado a 465 nm.

⁹⁸Reymond J. L. Enzyme Assays, Sicard, R.; Reymond, J. L., eds.; Wiley-VCH: Weinheim, **2004**, cap. 1.

⁹⁹Reymond J. L. Modern Biocatalysis: Stereoselective and Environmentally Friendly Reactions, Fessner W. D., Anthonsen T., Eds. Wiley-VCH Verlag: Weinheim, **2009**, cap. 1.

¹⁰⁰Wahler D., Reymond, J.L. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2001**, 12, 535-544.

O mesmo princípio pode ser aplicado para a detecção de mono-oxigenases¹⁰¹ (13-16) que após a oxidação enzimática das sondas geram os produtos de oxidação (17-20) que sofrem facilmente uma β -eliminação (Esquema 3).

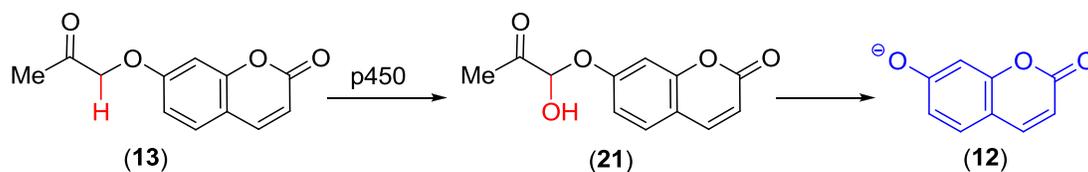


Esquema 3. Ensaio de triagem de atividade enzimática utilizando sondas fluorogênicas para detecção enzimática¹⁰².

Alternativamente, algumas sondas fluorogênicas usadas para detecção de mono-oxigenases podem sofrer oxidação por enzimas do tipo citocromo P450. Nesse caso, o sinal de fluorescência observado é referente à oxidação da sonda (13) ao composto (21) que libera o ânion da umbeliferona (12) no meio reacional (Esquema 4)¹⁰¹.

¹⁰¹Sicard R., Chen L. S., Marsaioli A. J., Reymond J-L. *Adv. Synth. Catal.* **2005**, *347*, 1041–1050.

¹⁰²Chen L.S. “Triagem de alto desempenho na detecção de atividade de epóxido hidrolases e mono-oxigenases utilizando células íntegras”, Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, **2006**. Tese de Doutorado.



Esquema 4. Representação esquemática proposta para detecção de enzimas citocromo P450 utilizando a sonda (13).

Essa técnica de triagem enzimática tem sido aplicada há algum tempo por nosso grupo de pesquisa¹⁰³ na triagem de micro-organismos isolados e será apresentada no capítulo 3 para avaliação do perfil enzimático da microbiota da pele humana (item 3.2.2).

1.6.4 Uso de substratos não modificados

As metodologias de triagem discutidas anteriormente são extremamente eficientes quando se trata da detecção do perfil enzimático de coleções e bibliotecas de enzimas/micro-organismos. Porém, quando o objetivo é o desenvolvimento de novos biocatalisadores, normalmente o estudo é direcionado para substratos muito específicos. Nestes casos, o uso de metodologias que permitam a avaliação da atividade enzimática frente aos substratos de interesse é de fundamental importância, já que em muitos casos, a utilização de substratos modificados não é representativa.

Esses ensaios enzimáticos utilizam substratos não modificados e quimiossensores que respondem à formação do produto e permitem a detecção da atividade. Fundamentam-se na detecção do ponto final da reação onde o consumo do substrato ou formação do produto após um intervalo de tempo revela as atividades enzimáticas pelo emprego de um reagente que interage especificamente o grupo funcional formado na reação. Como exemplos desses ensaios tem-se a detecção de lipases¹⁰⁴, nitrilases¹⁰⁵ pela visualização da mudança de pH por indicadores

¹⁰³a) Bicalho B., Chen L. S., Grognum J., Reymond J. L., Marsaioli A. J., *J. Braz. Chem. Soc.* **2004**, 6, 911-916. b) Mantovani S. M., de Oliveira L. G., Marsaioli A. J. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2008**, 173, 52-53. b) da Cruz G.F; Angolini C.F.F., de Oliveira L.G., Lopes P.F., de Vasconcelos S.P., Crespim E., de Oliveira V.M., Neto E.V.S.N., Marsaioli A.J. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **2010**, 87, 319-329.

¹⁰⁴Janes L. E., Löwendahl A. C., Kazlauskas R. J. *Chem. Eur. J.* **1998**, 4, 2324-231.

¹⁰⁵He Y-C., Ma C-L., Xu J-H., Zhou L. *Appl. Microbiol. Biotechnol* **2011**, 89, 817-823.

cromogênicos, ou ainda para detecção de hidrolases pela titulação reversa de periodato de sódio (NaIO₄) com adrenalina¹⁰⁶.

1.6.5 Triagem utilizando instrumentação analítica

Os ensaios que envolvem seleção genética ou triagem de alto desempenho para a produção de um sinal seletivo podem ser uma abordagem ótima em termos de rendimento, seletividade e sensibilidade. No entanto, o seu desenvolvimento é demorado e isso muitas vezes não é aplicável a estudos de biocatalisadores específicos. Neste contexto, pode ser mais prático desenvolver técnicas genéricas de ensaios de alto rendimento, adaptáveis para a detecção geral de qualquer produto de reação, independente de condições específicas, reações secundárias seletivas ou sensores⁹⁸.

Isto é possível através da adaptação de instrumentação analítica tais como Cromatografia Gasosa (CG), Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), Espectrometria de Massas (EM) ou Ressonância Magnética Nuclear (RMN) para o formato de triagem de médio e alto desempenho. Embora ensaios instrumentais possam ser limitados em desempenho e terem um custo inicial maior, eles são rapidamente adaptáveis a qualquer problema, uma vez que o instrumento esteja disponível. Ensaios instrumentais fornecem informações superiores em uma triagem, permitindo trabalhar diretamente com o substrato de interesse, sendo também possível testar seletividade¹⁰⁷.

¹⁰⁶a) Wahler D., Boujard O., Lefèvre F., Reymond J-L. *Tetrahedron*, **2004**, *60*, 703-710. b) Fluxa V. S., Wahler D., Reymond J-L. *Nat. Protoc.*, **2008**, *3*, 1270-1277.

¹⁰⁷Reetz M.T., Eipper A., Tielmann P., Mynott R. *Adv. Synth. Catal.* **2002**, *344*, 1008-1016. b) Reetz M.T., Kühling K.M., Wilensek S., Husmann H., Häusig U.W., Hermes M. *Catal. Today*, **2001**, *67*, 389-396.

1.6.6 Triagem mediante multibiorreações

Existem muitos métodos analíticos que permitem a detecção de biocatalisadores alvos para uma aplicação particular, porém esta avaliação pode ser trabalhosa já que cada substrato é normalmente avaliado independentemente. Como alternativa, pode-se utilizar uma triagem alternativa à biocatálise convencional, denominada "multibiorreação" que utiliza um biocatalisador e vários substratos diferentes e o monitoramento por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM), que reduz o tempo de análise em n vezes, onde " n " é o número de substratos adicionados. Essa técnica tem sido aplicada há algum tempo por nosso grupo de pesquisa¹⁰⁸ e será apresentada no capítulo 3 para a de gradação de insumos de fragrâncias pela microbiota da pele humana (item 3.4).

¹⁰⁸ Gonçalves R. A. C., Porto A. L. M., Pinheiro L., Cagnon J. R., Manfio G. P., Marsaioli A. J. *Food. Technol. Biotechnol.* **2004**, *42*, 355-361. Pinheiro L., Marsaioli A. J., *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2007**, *44*, 78-86.

OBJETIVOS

2 Objetivos gerais

O presente trabalho teve como objetivo mapear a microbiota residente na pele humana e enzimas por ela expressas através de ensaios triagem de alto desempenho. Avaliar a ação destas com as possíveis reações de degradação de substâncias presentes em fragrâncias, tendo como principais etapas a serem realizadas:

- Mapear o potencial enzimático de micro-organismos de pele humana através de ensaios com sondas fluorogênicas (HTS) e ensaios em placas de ágar;
- Correlacionar às atividades enzimáticas predominantes para os micro-organismos coletados dos voluntários (homens e mulheres) e os fototipos de pele estudados.
- Isolar os fungos filamentosos encontrados nas coletas e identificar aqueles que apresentarem atividades enzimáticas mais expressivas;
- Avaliar o impacto da microbiota da pele sobre os insumos de fragrâncias.

RESULTADOS E DISCUSSÕES

3 Resultados e Discussões

3.1 Coleta da microbiotas da pele humana

Para a realização da coleta de microbiotas da pele humana de maneira adequada, alguns aspectos importantes foram analisados. O primeiro passo foi selecionar a área para a coleta, onde foram levadas em conta as regiões da pele com maior incidência de alergias (DC), conforme a literatura⁶⁵. Com isso o rosto (região da testa), pescoço (região abaixo das orelhas) e o colo (região da caixa torácica) foram as regiões escolhidas para a realização de ensaios preliminares. O segundo passo foi buscar o melhor método de coleta da microbiota da pele, considerando duas premissas: a) utilização de um método não invasivo (procedimento que não envolve qualquer tipo de dano ao indivíduo); b) obtenção de uma amostra representativa e diversificada da microbiota presente na região da coleta.

Entre os métodos não invasivos de coleta de micro-organismos na superfície da pele, o uso do *swab* (haste com algodão estéril, Fig. 11) com solução salina estéril é um dos mais citados³⁷. O método se baseia na fricção do *swab* embebido em solução salina no local da coleta e o material biológico obtido é cultivado em ágar adequado. Outro método alternativo é a placa de contato (*RODAC*, do inglês *Replicate Organism Detection and Counting*,) muito usada para avaliação de contaminação de superfícies¹⁰⁹. Neste método, o menisco do ágar é feito de forma que possa estabelecer contato com a superfície a ser amostrada. A amostragem é realizada encostando a superfície do ágar no local a ser amostrado.

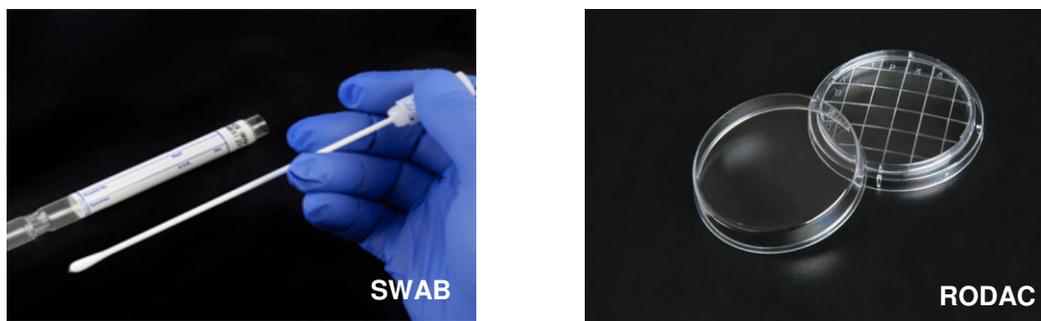


Figura 11. Ferramentas utilizadas nos métodos não invasivos de coleta.

¹⁰⁹ Bruch M. K., Smith F.W. *Appl. Microbiol.*, **1968**, *16*, 1427-1428.

Em um primeiro ensaio realizou-se a coleta de um voluntário nas regiões escolhidas (rosto, pescoço e colo), utilizando o procedimento de coleta com *swab* em solução salina e posterior cultivo em placas de Petri contendo meio de cultura adequado para o crescimento de bactérias: ágar nutriente (*NA*, do inglês *Nutrient Agar*) e ágar triptona de soja (*TSA*, do inglês *Tryptona Soy Agar*); de leveduras: ágar de extrato de malte e levedura (*YMA*, do inglês *Yeast Malt Extract*); de fungos filamentosos: ágar extrato de malte (*MEA*, do inglês *Malt Extract Agar*).

Os resultados dos ensaios estão apresentados na Tabela 4 onde se pode verificar um maior número de Unidades Formadoras de Colônias (UFC) por mililitro de material da coleta da região do pescoço. Neste ensaio foi possível observar que a coleta com *swab* resultou em uma alta contagem microbiana, o que dificultou a realização da contagem de viáveis. Por isso foi necessário utilizar o método de diluição em ágar para obtenção da contagem de viáveis. Apesar da alta concentração microbiana observada, a avaliação visual mostrou uma baixa diversidade microbiana, o que pode ter ocorrido por conta da facilidade de crescimento de algumas espécies menos fastidiosas que se sobressaem as demais que tem dificuldade de se adaptar aos meios de cultivo comercialmente disponíveis.

Tabela 4. Contagem de viáveis em UFC mL⁻¹ de material de coleta, para cada região da pele e meio de cultura testados.

Meio Região	NA	TSA	YMA	MEA
Colo*	3,3 x 10 ⁸	10,8 x 10 ⁸	400	1,4 x 10 ⁷
Rosto*	4,0 x 10 ⁸	7,3 x 10 ⁸	10,2 x 10 ⁸	3,7 x 10 ³
Pescoço*	4,8 x 10⁸	>100 x 10⁸	7,9 x 10⁸	2,0 x 10⁸

*coleta efetuada em 2 cm² da pele; NA, ágar nutriente; TSA, ágar triptona de soja; YMA, ágar extrato de levedura e malte; MEA, ágar extrato de malte.

A partir destes resultados, a região do pescoço foi escolhida para a coleta das microbiotas, pois além de apresentar uma alta contagem de micro-organismos em todos os meios testados, é um dos locais com grande ocorrência de alergias causadas por cosméticos e também é uma das regiões mais comuns para aplicação de perfume.

Um novo ensaio foi realizado para avaliar a coleta por placa de contato e alguns outros meios de cultura comumente utilizados para leveduras e fungos. Assim, o ensaio foi realizado utilizando os meios NA e TSA para bactérias e YMA, MEA e ágar Sabouraud (SA, do inglês *Sabouraud Agar*) para leveduras e fungos filamentosos. A coleta com placa Rodac se mostrou efetiva para a coleta da microbiota da pele, pois é um método simples, rápido e que não gerou qualquer desconforto aos voluntários do estudo. Além disso, a contagem de UFC foi realizada diretamente na placa de contato, sem a necessidade de realizar diluição em ágar para realizar a contagem de viáveis. Ainda foi possível observar uma diversidade microbiana muito maior do que pelo método utilizando *swab* (Tabela 5).

Tabela 5. Contagem de UFC por placa Rodac, para cada meio de cultura testado.

Coleta	NA	TSA	YMA		MEA		SA	
	Bactérias		Leveduras	Fungos	Leveduras	Fungos	Leveduras	Fungos
A	359	417*	327	2	24	5	3	31
B	298	104	123	0	4	4	1	61
C	327	312*	225	1	6	3	1	62

* Presença de colônias de fungos filamentosos; NA, ágar nutriente; TSA, ágar triptona de soja; YMA, ágar extrato de levedura e malte; MEA, ágar extrato de malte; AS, Sabouraud Agar.

A partir da definição do método adequado de coleta de microbiotas da pele humana, o protocolo do estudo foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa da Unicamp (Folha de Rosto 1085/2008, Anexo I). Os voluntários da pesquisa foram recrutados seguindo os critérios de inclusão/exclusão previamente estabelecidos (Anexo II e III), conforme descrito no procedimento experimental (item 4.4). Foram selecionados 55 voluntários, incluindo homens e mulheres agrupados através da classificação visual por fototipos de pele, sendo que foram selecionados os fototipos que mais representam a população brasileira com o acréscimo de um grupo de origem asiática (Fototipo II, III, V, VI e asiático), com idades entre 20 e 45 anos. As coletas foram efetuadas em placas RODAC contendo os meios de cultura: NA (para bactérias); YMA (para leveduras); MEA (para fungos filamentosos).

Visando manter uma maior diversidade microbiana de bactérias e leveduras, as amostras coletadas em meio NA e YMA foram mantidas integralmente, isto é, toda a

massa celular obtida foi utilizada para preparo dos repiques e da preservação das amostras, sem uma etapa de isolamento. Assim, as amostras obtidas nestes meios foram nomeadas de consórcios microbianos (micro-organismos que coexistem, uma espécie depende de produtos do metabolismo de outras espécies para sua sobrevivência e multiplicação¹¹⁰). Já no caso dos fungos filamentosos, as colônias obtidas foram selecionadas, uma a uma, diretamente da placa inicial e mantidas isoladamente. Vale ressaltar que, em muitos casos, uma mesma placa continha duas ou mais colônias filamentosas idênticas, nestes casos, o número total de colônias foi considerado na contagem de UFC, porém apenas uma colônia representante de cada tipo foi separada para as demais análises. A Figura 12 traz alguns exemplos de placas de coleta após o crescimento microbiano.

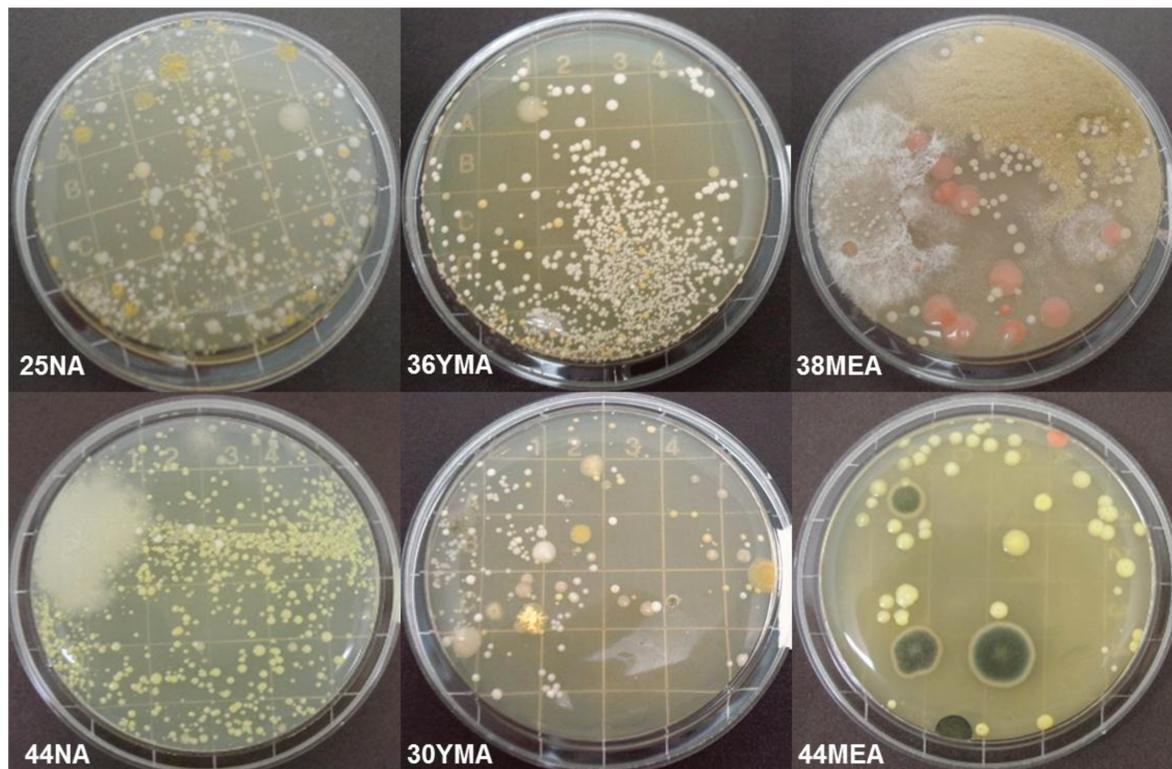


Figura 12. Exemplo de placas RODAC após o tempo de incubação dos consórcios microbianos. NA = microbiota obtida em meio ágar nutriente; YMA = microbiota obtida em meio ágar extrato de malte e levedura; MEA = microbiota obtida em meio ágar extrato de malte.

¹¹⁰ Wolfaardt G. M., Korber D. R., Lawrence J. R. *Cultivation of microbial consortia and communities*. In: Manual of environmental microbiology., Eds Hurst J. H., Knudsen G. R., McInerney M. J., Stetzenbach L. D., Walter M. V. (ASM Press, Washington, D.C.), 1997, pp 79–90.

A etapa de coleta resultou em uma coleção de 55 consórcios de bactérias, 55 consórcios de leveduras e 72 culturas de fungos filamentosos. A contagem de Unidades Formadoras de Colônias (UFC) destes consórcios mostrou crescimento de 16 a >300 UFC (placa de 6 cm²) em NA (consórcios de bactérias), sendo que os homens apresentaram maior número de amostras com >300 UFC por placa (52%) enquanto as mulheres tiveram maior número de amostras com 1 a 300 UFC por placa (57%). No caso do meio YMA (consórcios de leveduras), observou-se o crescimento de 2 a >300 UFC onde os homens apresentaram 41% das amostras com mais do que 300 UFC. Em contraponto 71% das amostras coletadas de mulheres tiveram entre 1 e 300 UFC por placa, em relação a 59% das amostras coletadas de homens.

Já no meio MEA pôde-se verificar o crescimento de 1 a 13 colônias de fungos filamentosos, em 79% das amostras coletadas de mulheres e 63% de homens. Além disso, 37% das amostras coletadas de homens e 21% de mulheres não apresentaram crescimento de colônias de fungos filamentosos após 10 dias de incubação, sendo assim consideradas como ausentes (Figura13 e Tabela 6).

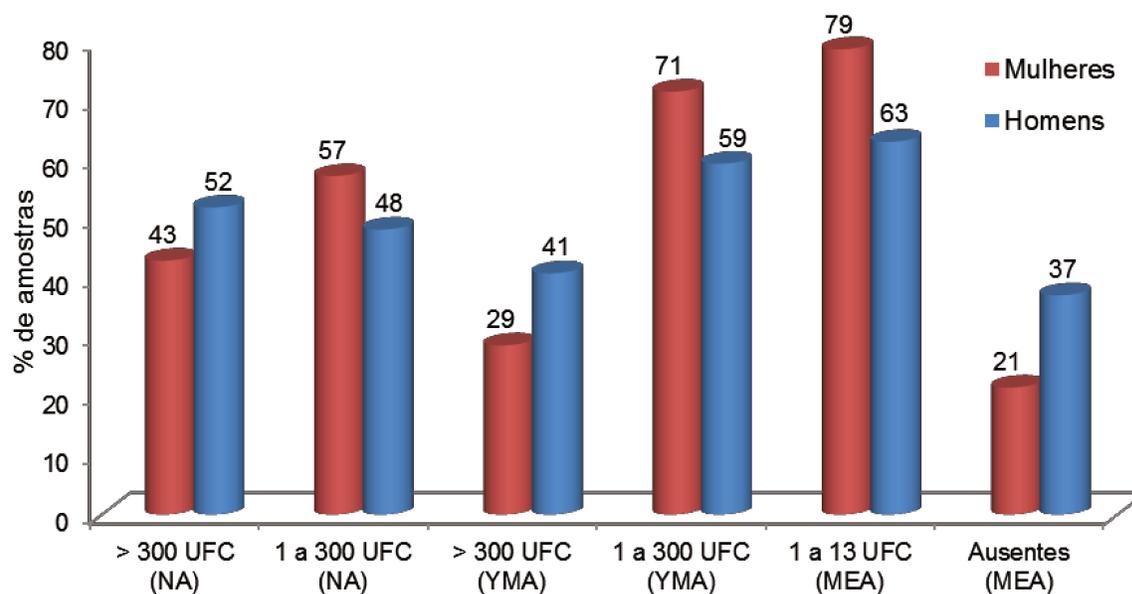


Figura 13. Contagem de UFC por placa RODAC para cada tipo de micro-organismo e meio de cultura utilizado na coleta. NA, consórcio obtido em meio ágar nutriente; YMA, consórcio obtido em meio ágar extrato de malte e levedura; MEA, consórcio obtido em meio ágar extrato de malte.

Tabela 6. Contagem dos micro-organismos na forma de UFC obtidos nos meios de cultura utilizados para a coleta.

Sexo	Idade	Fototipo ^a	Código da Amostra	NA ^b	YMA ^b	MEA ^b	Sexo	Idade	Fototipo ^a	Código da Amostra	NA ^b	YMA ^b	MEA ^b
Mulheres	28	II	4	41	24	1	Homens	21	II	1	>300	>300	aus
	23	II	8	>300	178	3		22	II	2	>300	226	4
	28	II	15	20	7	aus		24	II	3	>300	>300	2
	26	II	33	68	73	2		29	II	18	279	>300	1
	33	II	34	>300	163	aus		28	II	19	24	13	1
	44	II	38	79	104	2		25	II	20	>300	121	aus
	30	III	5	187	>300	5		29	III	9	>300	>300	13
	26	III	6	78	126	2		34	III	10	>300	152	1
	42	III	35	>300	>300	2		37	III	11	>300	>300	aus
	26	III	36	>300	>300	aus		30	III	17	122	113	aus
	25	III	37	245	46	1		37	III	32	115	47	aus
	35	III	39	>300	>300	3		22	V	12	>300	>300	1
	25	V	7	>300	196	2		29	V	21	>300	>300	aus
	42	V	13	57	123	aus		28	V	23	187	112	5
	41	V	14	>300	79	2		24	V	29	27	137	aus
	34	V	25	>300	>300	8		24	V	40	136	230	aus
	21	V	27	19	16	2		32	VI	22	>300	128	1
	19	V	28	168	59	9		26	VI	44	>300	>300	4
	29	VI	24	>300	112	aus		36	VI	45	>300	>300	1
	28	VI	48	21	87	3		21	VI	46	>300	>300	aus
21	VI	49	>300	46	5	44	VI	47	>300	15	aus		
39	VI	50	72	31	aus	26	A	16	57	>300	1		
28	VI	51	>300	>300	1	24	A	52	33	62	1		
25	A	30	178	225	5	22	A	54	58	43	1		
25	A	31	19	9	1	19	A	55	62	15	1		
22	A	41	>300	>300	1	22	A	56	16	2	1		
19	A	42	185	>300	7	22	A	57	171	71	5		
20	A	43	68	75	3								

^a Fototipo de pele conforme a classificação de Fitzpatrick (II, III, V e VI); A, voluntários de origem asiática. ^b Unidades Formadoras de Colônias (UFC) visualizadas na placa de 6 cm²; NA, meio ágar nutriente; YMA, meio ágar extrato de levedura; MEA, meio ágar extrato de malte; > 300, número de colônias superior a 300 UFC; *aus*, ausência de colônias de fungos filamentosos.

Através dos resultados obtidos poder-se-ia inferir que algumas diferenças fisiológicas e anatômicas da pele entre homens e mulheres, tais como produção de sebo, suor e hormônios poderiam afetar a composição da sua microbiota (item 1.3). Entretanto, o número de amostras e a metodologia de coleta utilizada neste estudo não permite tal inferência. Além do mais, os dados disponíveis na literatura não incluem cada uma das diferentes regiões da pele, a maioria descreve a composição da microbiota dividida em ambientes oleosos, úmidos e secos³⁸. Infelizmente, até o momento poucos estudos envolveram análises qualitativa e quantitativa de todos os micro-organismos presentes em um local particular da pele. A grande maioria tem determinado apenas a prevalência de um micro-organismo específico (ou grupo de organismos) em uma população¹⁰. Além disso, muitos estudos indicam que existe uma variação interpessoal muito grande, independente do sexo e da região de coleta³⁴.

Um estudo recente publicado por Staudinger e colaboradores¹¹¹ mostra que as diferenças entre homens e mulheres (sexo) não parecem ter muita influência na comunidade microbiana da pele da região da testa. Entretanto, eles observaram um grande aumento da diversidade bacteriana associada ao uso de maquiagem, inclusive com a presença de alguns gêneros de bactérias exclusivamente em mulheres que usam maquiagem diariamente (independente na natureza seca, normal ou oleosa da pele). Esta informação pode justificar algumas diferenças observadas neste trabalho.

Todas as amostras obtidas nas coletas foram preservadas utilizando dois métodos distintos, sendo os consórcios de bactérias e leveduras preservados através de liofilização e criopreservação, enquanto as culturas de fungos filamentosos foram preservadas em óleo mineral a 4°C e criopreservação (item 4.4.1.3).

¹¹¹ Staudinger, T.; Pipal, A.; Redl, B. *J. Appl. Microbiol.*, **2011**, *110*, 1381-1389.

3.2 Detecção de atividade enzimática da microbiota da pele

O interesse científico na composição e função da microbiota da pele humana vem crescendo rapidamente, porém os estudos mantem o foco na interação entre microbiota e células da pele e a estreita ligação entre as suas respectivas funções no organismo¹¹². Por isso, ainda são raros os relatos na literatura que contenham informações sobre a atividade enzimática dos micro-organismos que compõem a microbiota da pele.

Desta forma, obter dados sobre o perfil enzimático das comunidades microbianas encontradas na pele humana é imprescindível para um melhor entendimento sobre suas possíveis funções na pele, principalmente no metabolismo de xenobióticos. Neste estudo foram avaliadas as atividades enzimáticas de consórcios de bactérias e leveduras, bem como, de fungos filamentosos coletados de 55 voluntários do sexo masculino e feminino.

3.2.1 Avaliação da atividade enzimática por triagem em placas de Petri

Ensaio de triagem em placas de Petri baseados em alterações colorimétricas ou formação de halo de inibição foram realizados para detecção qualitativa de algumas atividades enzimáticas (protease, lipase e amilase)¹¹³. Os consórcios de bactérias e de leveduras, além dos fungos filamentosos foram avaliados para cada uma destas atividades totalizando 540 ensaios realizados em triplicata.

Para a detecção de enzimas do tipo protease foi utilizado o meio ágar leite, no qual se observa a hidrólise de caseína (proteína do leite), através do descoloramento do meio, originalmente leitoso, para incolor formando um halo ao redor da colônia microbiana⁹¹. A Figura 14 mostra ensaios de detecção de proteases para alguns consórcios de bactérias (A), consórcios de leveduras (B) e fungos filamentosos (C), os halos incolores ao redor das colônias indicam a presença de proteases (resultado positivo).

¹¹² Cogen A.L., Nizet V., Gallo R. L. *Brit. J. Dermatol.* **2008**;158, 442–55.

¹¹³ Fahy P.C., Hayward A.C. *Media and methods for isolation and diagnostic tests*. In.: Fahy, P.C.; PRESLEY, G.J. (Eds.) *Plant bacterial diseases: a diagnostic guide*. Sydney, Academic Press, 1983, 393p.

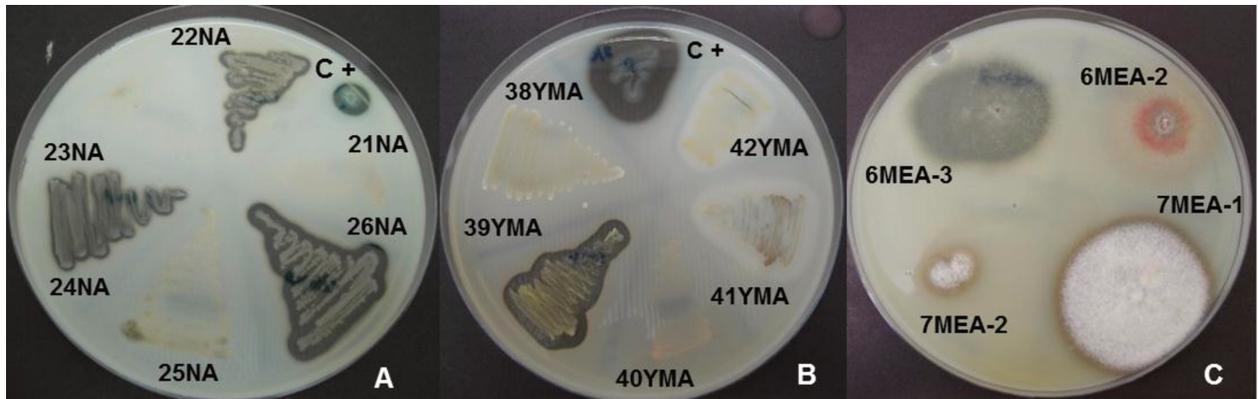


Figura 14. Ensaios de detecção de proteases (C+, controle positivo).

Para a detecção de lipases foi utilizado o método da rodamina B, onde a hidrólise de triacilglicerídeos (do azeite de oliva) incorporados em ágar, contendo a rodamina B, leva a formação de um complexo fluorescente permitindo o monitoramento da atividade lipase nas colônias¹¹⁴, onde a emissão de fluorescência laranja é o resultado positivo. Nos ensaios de detecção de lipases (Figura 15), a presença de atividade lipolítica é observada pela emissão de fluorescência laranja em todo o crescimento dos consórcios de bactérias (A) e de leveduras (B), no caso de fungos filamentosos (C), a fluorescência é mais evidente ao redor da colônia, pela liberação de lipases extracelulares pelo fungo.

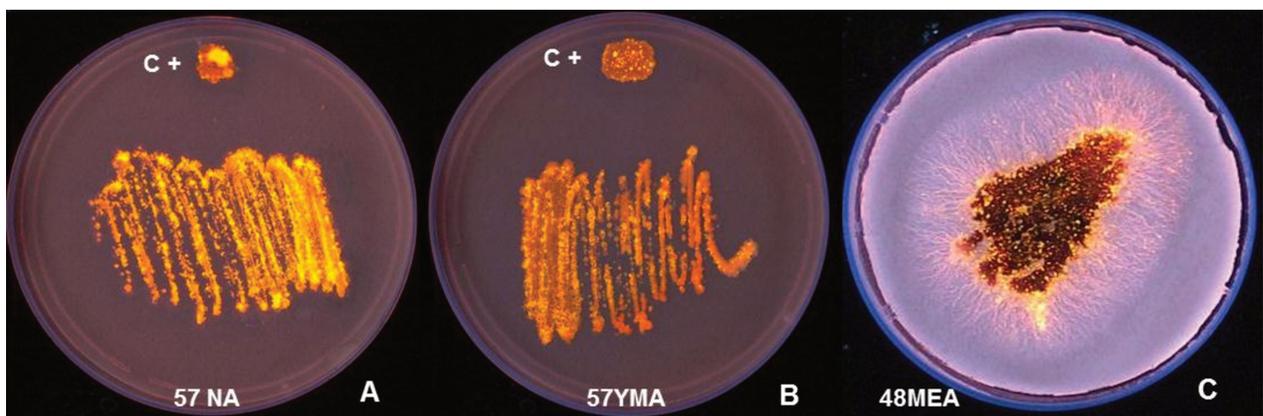


Figura 15. Ensaios de detecção de lipases (leitura em 359 nm; C+, controle positivo).

¹¹⁴ a) Shelley A.W., Deeth H.C., Macrae I.C. *J. Microbiol. Methods*, **1987**, 6, 123-137. b) Kouker G., Jaeger K. E. *Appl. Environ. Microbiol.*, **1987**, 53, 211-213.

Por último, a atividade amilolítica foi avaliada através de ágar contendo amido, onde a hidrólise deste por uma α -amilase pode ser evidenciada pela formação de halos incolores ao redor do crescimento microbiano, após a adição de solução de iodo (resultado positivo)⁹². A Figura 16 demonstra ensaios de detecção de α -amilase para consórcios de bactérias (A), consórcios de leveduras (B) e fungos filamentosos (C).

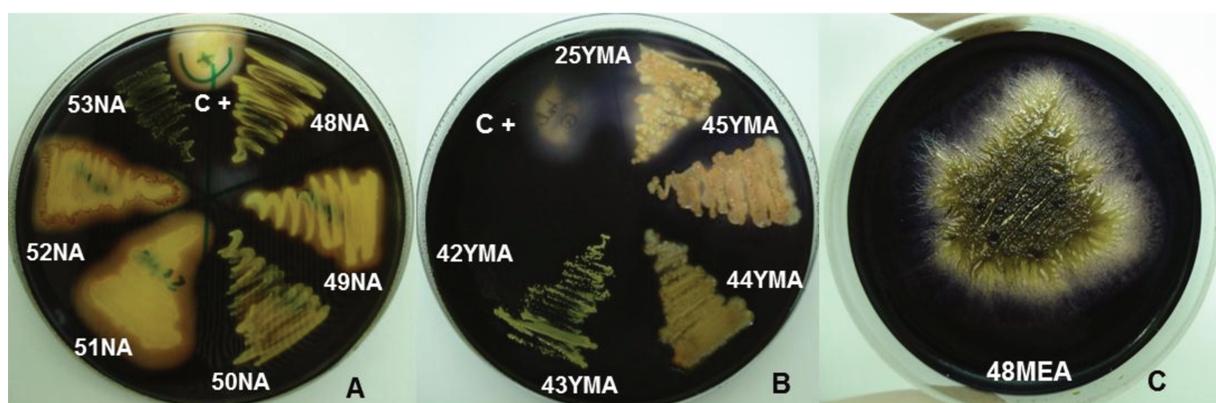


Figura 16. Ensaios de detecção de amilases reveladas com iodo (C+, controle positivo).

Os resultados de todas as amostras testadas foram agrupados por tipo de micro-organismo, sexo (masculino e feminino) e classificação de fototipos (II, III, V, VI e asiáticos), onde os consórcios de bactérias podem ser visualizados na Tabela 7, os consórcios de leveduras na Tabela 8 e os fungos filamentosos na Tabela 9.

Para os consórcios de bactérias (Tabela 7), houve maior incidência de proteases em homens, principalmente de fototipo II, VI e de origem asiática, onde todas as amostras apresentaram atividade proteolítica. No caso de lipases, os consórcios de bactérias obtidos de mulheres dos fototipos III, VI e de origem asiática apresentaram maior ocorrência de lipase se comparados com os consórcios coletados de homens. A atividade amilolítica foi detectada em grande parte dos consórcios sendo em maior número nas amostras coletadas de homens com pele fototipo III, V e de origem asiática.

Os consórcios de leveduras ativos foram numericamente menores que os consórcios de bactérias (Tabela 8). Os consórcios coletados de homens mostraram maior atividade proteolítica, com destaque para aqueles obtidos de pele fototipo II e de origem asiática. As lipases também foram mais detectadas em amostras coletadas de homens, entretanto, todas as amostras de origem asiática coletadas de mulheres foram lipase positivas. A ausência de resultados para detecção de amilase foi um fato interessante, sendo que entre todos os consórcios de leveduras testados apenas um apresentou atividade amilolítica (homem de origem asiática).

No caso dos fungos filamentosos (Tabela 9), devido a grande diferença de número de amostras testadas, não foi possível realizar uma comparação entre os sexos. Isto se deve a baixa ocorrência de fungos filamentosos nas coletas de voluntários do sexo masculino. Porém pode-se notar a presença de proteases e lipases em grande parte das amostras. No caso dos fungos coletados de mulheres, proteases tiveram maior ocorrência em amostras de pele fototipo II, III e V; enquanto as lipases foram detectadas com mais frequência em fungos coletados de peles fototipo III, V e de origem asiática. A atividade amilolítica foi observada apenas em alguns fungos de pele fototipo III e VI.

Tabela 7. Atividades enzimáticas observadas para os consórcios de bactérias, conforme sexo e fototipo de pele.

Sexo	Idade	Fototipo ^a	Consórcio	Protease	Lipase	Amilase	Sexo	Idade	Fototipo ^a	Consórcio	Protease	Lipase	Amilase
Mulheres	28	II	4NA	-	-	+	Homens	21	II	1NA	+	+	+
	23	II	8NA	-	-	+		22	II	2NA	+	+	+
	28	II	15NA	+	-	+		24	II	3NA	+	-	+
	26	II	33NA	+	-	+		29	II	18NA	+	+	+
	33	II	34NA	+	+	+		28	II	19NA	+	+	+
	44	II	38NA	+	+	+		25	II	20NA	+	-	+
	30	III	5NA	-	+	-		29	III	9NA	+	-	+
	26	III	6NA	+	+	+		34	III	10NA	+	-	+
	42	III	35NA	+	+	-		37	III	11NA	-	+	+
	26	III	36NA	-	+	+		30	III	17NA	+	-	+
	25	III	37NA	+	+	-		37	III	32NA	+	+	+
	35	III	39NA	-	+	-		22	V	12NA	-	-	-
	25	V	7NA	+	+	+		29	V	21NA	+	+	+
	42	V	13NA	-	+	-		28	V	23NA	+	-	-
	41	V	14NA	-	+	+		29	V	26NA	+	-	+
	34	V	25NA	+	-	+		24	V	29NA	+	-	+
	21	V	27NA	-	+	-		24	V	40NA	+	+	+
	19	V	28NA	+	-	+		32	VI	22NA	+	+	+
	29	VI	24NA	+	+	-		26	VI	44NA	+	-	+
	28	VI	48NA	+	+	+		36	VI	45NA	+	+	-
	21	VI	49NA	-	+	+		21	VI	46NA	+	-	+
	39	VI	50NA	-	+	+		44	VI	47NA	-	+	+
	28	VI	51NA	-	+	+		26	A	16NA	+	+	-
	25	A	30NA	+	+	+		24	A	52NA	+	+	+
	25	A	31NA	+	-	-		22	A	54NA	+	+	+
	22	A	41NA	-	+	+		19	A	55NA	+	+	+
	19	A	42NA	+	+	+		22	A	56NA	+	+	+
	20	A	43NA	-	+	+		22	A	57NA	+	+	+

^a Fototipo de pele conforme a classificação de Fitzpatrick (II, III, V e VI); A, voluntários de origem asiática. NA, meio ágar nutriente; (+) amostra com resultado positivo [formação de halo incolor ou fluorescência laranja]; (-) amostras com resultado negativo.

Tabela 8. Atividades enzimáticas observadas para os consórcios de leveduras, conforme sexo e fototipo de pele.

Sexo	Idade	Fototipo ^a	Consórcio	Protease	Lipase	Amilase	Sexo	Idade	Fototipo ^a	Consórcio	Protease	Lipase	Amilase
Mulheres	28	II	4YMA	-	-	-	Homens	21	II	1YMA	+	+	-
	23	II	8YMA	-	-	-		22	II	2YMA	+	+	-
	28	II	15YMA	+	+	-		24	II	3YMA	+	+	-
	26	II	33YMA	-	-	-		29	II	18YMA	+	-	-
	33	II	34YMA	-	-	-		28	II	19YMA	+	-	-
	44	II	38YMA	-	-	-		25	II	20YMA	-	+	-
	30	III	5YMA	-	+	-		29	III	9YMA	+	-	-
	26	III	6YMA	-	+	-		34	III	10YMA	-	-	-
	42	III	35YMA	+	-	-		37	III	11YMA	-	-	-
	26	III	36YMA	-	-	-		30	III	17YMA	-	+	-
	25	III	37YMA	-	-	-		37	III	32YMA	-	+	-
	35	III	39YMA	+	-	-		22	V	12YMA	+	-	-
	25	V	7YMA	+	+	-		29	V	21YMA	-	+	-
	42	V	13YMA	+	-	-		28	V	23YMA	+	+	-
	41	V	14YMA	-	-	-		29	V	26YMA	-	-	-
	34	V	25YMA	+	+	-		24	V	29YMA	+	+	-
	21	V	27YMA	+	-	-		24	V	40YMA	-	-	-
	19	V	28YMA	+	-	-		32	VI	22YMA	-	-	-
	29	VI	24YMA	-	-	-		26	VI	44YMA	+	+	-
	28	VI	48YMA	+	-	-		36	VI	45YMA	+	+	-
21	VI	49YMA	-	+	-	21	VI	46YMA	-	-	-		
39	VI	50YMA	-	+	-	44	VI	47YMA	-	-	-		
28	VI	51YMA	-	-	-	26	A	16YMA	-	+	-		
25	A	30YMA	+	+	-	24	A	52YMA	-	-	-		
25	A	31YMA	+	+	-	22	A	54YMA	+	-	-		
22	A	41YMA	-	+	-	19	A	55YMA	+	+	-		
19	A	42YMA	-	+	-	22	A	56YMA	+	-	-		
20	A	43YMA	-	+	-	22	A	57YMA	+	+	+		

^a Fototipo de pele conforme a classificação de Fitzpatrick (II, III, V e VI); A, voluntários de origem asiática. NA, meio ágar nutriente; (+) amostra com resultado positivo formação de halo incolor ou fluorescência laranja; (-) amostras com resultado negativo.

Tabela 9. Atividades enzimáticas observadas para os fungos isolados.

Sexo	Idade	Fototipo ^a	Amostra	Fungo	Protease	Lipase	Amilase	Sexo	Idade	Fototipo ^a	Amostra	Código Fungo	Protease	Lipase	Amilase		
Mulheres	28	II	4M	4M	+	-	-	Mulheres	20	VI	44M	44M	+	-	-		
	23	II	8M	8M-1	-	-	-		21	VI	51M	51M	+	-	+		
				8M-2	+	-	-		36	VI	48M	48M	+	+	-		
	26	II	33M	33M-1	+	-	-		25	A	30M	30M-1	-	+	-		
				33M-2	-	-	-					30M-2	-	+	-		
				33M-3	-	-	-		25	A	31M	31M	-	+	-		
	44	II	38M	38M-1	+	-	-		35	A	41M	41M	+	-	-		
				38M-2	+	-	-		22	A	42M	42M	+	-	-		
	30	III	5M	5M	-	-	-		20	A	43M	43M-1	-	+	-		
	26	III	6M	6M-1	+	+	-					43M-2	+	-	-		
				6M-2	+	+	-										
				6M-3	+	+	-										
	Mulheres	42	III	35M	35M-1	-	-		+	Homens	22	II	2M	2M-1	+	+	-
					35M-2	-	-		+					2M-2	-	+	-
		42	III	37M	37M	+	-	+	24		II	3M	3M-1	+	+	-	
		39M-1	+	-	-	3M-2	+	-					-				
		35	III	39M	39M-2	-	-	-	29		II	18M	18M	+	-	-	
					39M-3	+	+	-	28		II	19M	19M	+	-	-	
					7M-1	-	+	-	29		III	9M	9M-1	+	+	+	
		7M-2	+	-	-	9M-2	-	+					+				
		14M-1	+	+	-	9M-3	-	-					-				
		41	V	14M	14M-2	-	-	-	34		III	10M	10M	-	-	-	
					27M-1	-	+	-	22		V	12M	12M	-	-	-	
		27M-2	-	+	-	28	V	23M					23M-1	-	-	-	
		19	V	28M	28M-1	-	-	-	23M-2		+	+	-				
					28M-2	-	-	-	32		VI	22M	22M	-	+	-	
					28M-3	+	-	-	26		VI	45M	45M	+	-	-	
					28M-4	-	+	-	26		A	16M	16M	+	+	-	
28M-5	+				-	-	28	A	52M	52M	+	+	-				
28M-6	+				-	-	24	A	54M	54M	-	-	-				
28M-7	+				+	-	22	A	55M	55M	+	-	-				
49M-1	+				-	-	19	A	56M	56M	-	-	-				
21	VI	49M	49M-2	-	+	-	22	A	57M	57M-1	-	-	-				
			49M-3	-	-	-				57M-2	-	-	-				
			49M-4	-	-	-				57M-3	-	+	-				
			49M-5	-	+	-				57M-4	+	-	-				
			49M-6	-	-	-				57M-5	-	-	-				

^aFototipo de pele conforme a classificação de Fitzpatrick (II, III, V e VI); A, voluntários de origem asiática. NA, meio ágar nutriente; (+) amostra com resultado positivo formação de halo incolor ou fluorescência laranja; (-) amostras com resultado negativo.

A Tabela 10 e a Figura 17 ilustram o perfil geral das atividades enzimáticas avaliadas para os consórcios de bactérias, de leveduras e fungos filamentosos. Os ensaios em placa de Petri revelaram uma alta atividade proteolítica e lipolítica em grande parte dos consórcios e fungos testados.

Tabela 10. Perfil geral das atividades enzimáticas observadas nos ensaios de triagem em placa de Petri.

Ensaio	% Amostras ativas- Mulheres ^a			% Amostras ativas – Homens ^a		
	Bactérias	Leveduras	Fungos	Bactérias	Leveduras	Fungos
Protease	54	39	63	89	53	62
Lipase	75	42	36	60	50	43
Amilase	71	0	13	85	3	6

^a Percentual de amostras ativas em relação ao número total de consórcios de bactérias (55), de leveduras (55) e fungos filamentosos (70) testados.

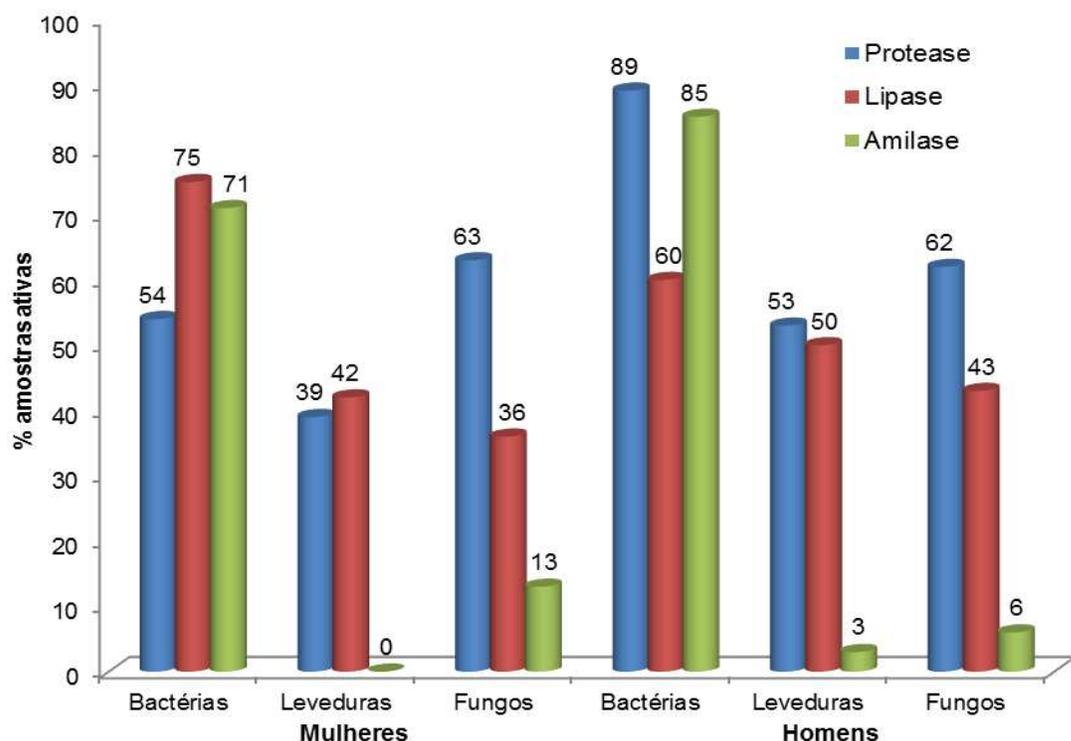


Figura 17. Representação gráfica do perfil das atividades enzimáticas observadas para os consórcios de bactérias, de leveduras e os fungos filamentosos nos ensaios de triagem em placa de Petri.

Nos ensaios de protease, os consórcios de bactérias mostraram maior atividade, principalmente quando coletados de homens (89%). Para os ensaios de lipase, os consórcios de bactérias também apresentaram maior atividade, com destaque para aqueles oriundos de mulheres (75%). Já nos ensaios de amilase, o número de amostras que apresentaram atividade foi bem menor, sendo que as amostras ativas foram quase exclusivamente consórcios bacterianos, tanto de mulheres (71%) como de homens (85%).

As altas atividades proteolíticas e lipolíticas observadas estão de acordo com o fato de a pele humana ser rica em proteínas (queratina, colágeno, elastina) e lipídeos (triglicerídeos, ceramidas, esfingosinas) todos susceptíveis a hidrólise. Sabe-se que os micro-organismos da microbiota da pele humana tem um papel importante na conversão de compostos lipídicos (ésteres graxos e de colesterol) para ácidos graxos de cadeia curta (C6, C8, C10 e C12), os quais são parcialmente responsáveis pela geração de odor desagradável, principalmente axilar¹¹⁵.

Em contraponto, a baixa ocorrência de amilases (no caso α -amilase) pode estar diretamente ligada novamente à composição da pele humana, onde amidos e outros polissacarídeos não estão disponíveis para a microbiota. Além disso, o fato de apenas os consórcios de bactérias terem demonstrado atividade significativa pode ser explicado por dados da literatura que mostram que grande parte destas enzimas são oriundas de bactérias do gênero *Bacillus*, enquanto poucas espécies de fungos como *Aspergillus oryzae* são descritos como produtores de α -amilase¹¹⁶.

¹¹⁵ James A.G., Casey J., Hyliands D., Mycock G. *J. Microbiol. Biotechnol.* **2004**, 20, 787–793.

¹¹⁶ de Souza P.M., Magalhães P. O., *Braz. J. Microbiol.* **2010**, 850-861.

3.2.2 Avaliação da atividade enzimática por triagem em microplacas

Ensaio de triagem de alto desempenho em microplacas permitem a avaliação rápida de um grande número de amostras. Dentre os vários métodos que permitem o monitoramento de atividade enzimática, os ensaios envolvendo substratos fluorogênicos estão entre os mais utilizados¹¹⁷.

As atividades enzimáticas das 110 microbiotas (bactérias e leveduras) e dos 70 fungos filamentosos obtidos neste trabalho foram avaliadas frente a 9 sondas fluorogênicas (item 4.5, materiais e métodos), totalizando 1620 ensaios realizados em triplicata. Para os ensaios de detecção de hidrolases, foram utilizadas duas sondas para epóxido hidrolases (EPH, **5** e **6**) e três para esterases (EST, **7**, **8** e **9**). Como controles positivos foram utilizados os dióis derivados da hidrólise dos respectivos substratos (**10** e **11**). Os ensaios para detecção de monooxigenases (MOx) foram realizados utilizando quatro sondas fluorogênicas (**13-16**), sendo que os controles positivos foram os respectivos ésteres derivados das cetonas (**17-20**), conforme Figura 18.

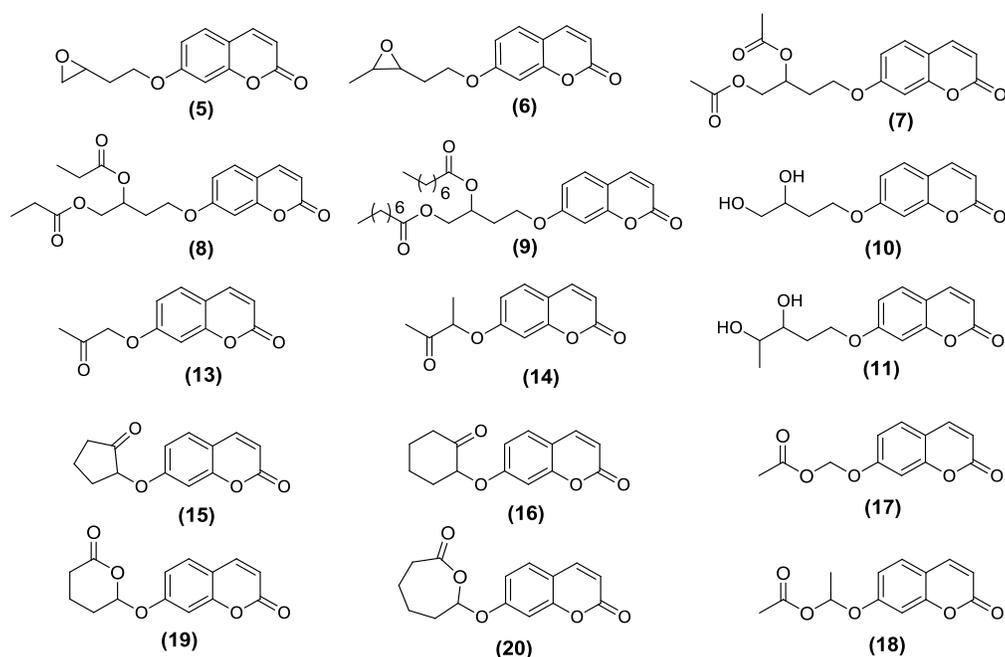


Figura 18. Sondas fluorogênicas e controles positivos utilizados nos ensaios de triagem em microplacas.

¹¹⁷ Bessler M.K., Jaeger K.E. *Trends in Biotechnol.* **2006**, 6, 248-250.

Essa avaliação revelou a presença de lipases, esterases, epóxido hidrolases e mono-oxigenases em grande parte dos micro-organismos analisados. Devido ao grande número de variáveis envolvidas nessa amostragem (sexo, idade, hábitos de higiene e alimentares, uso de medicamentos entre outros) buscou-se empregar uma abordagem quimiométrica para melhor visualização dos dados. Entretanto, mesmo após a utilização de várias ferramentas quimiométricas como Análise de Componentes Principais (PCA, do inglês, *Principal Component Analysis*) e Análise Hierárquica de Agrupamentos (HCA, do inglês, *Hierarchical Clusters Analysis*), não foi possível detectar uma correlação geral entre todos os dados obtidos. Desta forma, para auxiliar na visualização dos resultados, as amostras foram analisadas de acordo com o fototipo de pele (fototipo II, III, V, VI e de origem asiática), onde os voluntários foram agrupados por sexo (homens e mulheres).

3.2.2.1 *Triagem enzimática dos consórcios de bactérias*

A Tabela 11 apresenta todos os resultados das triagens enzimáticas utilizando sondas fluorogênicas para os consórcios de bactérias, agrupados por sexo e fototipos de pele. Foram considerados como resultados positivos apenas percentuais de conversão superiores a 5%, em relação ao controle positivo.

Na avaliação da atividade enzimática, os consórcios de bactérias coletados de mulheres demonstraram uma grande incidência de esterases frente a sondas de cadeia curta (**7** e **8**) em todos os fototipos analisados. Além disso, os consórcios exibiram uma alta atividade mono-oxigenase frente à sonda **13**, indicando uma maior preferência pela oxidação de cetonas acíclicas. Vale ainda ressaltar os consórcios de origem asiática foram altamente ativos tanto para esterase (**7**, **8**) como para mono-oxigenases (**13**), com valores de conversão superiores aos demais consórcios analisados.

Já nos consórcios de bactérias coletados de homens foi possível detectar esterases em grande parte das amostras, principalmente com as sondas de cadeia curta (**7** e **8**). Adicionalmente, a atividade mono-oxigenase frente à cetona acíclica (**13**) foi observada em consórcios de pele de homens fototipo II, III, V e VI. No caso dos consórcios de origem asiática foram observadas baixas atividades enzimáticas tanto para esterase como para mono-oxigenase, se comparadas às atividades dos consórcios coletados de mulheres. Nos ensaios de detecção de epóxido hidrolases (**5**, **6**) todos os consórcios de bactérias (mulheres e homens) apresentaram-se pouco ativos para a sonda de esterase de cadeia média (**9**).

Tabela 11. Atividades enzimáticas (% conversão)^a detectadas nos consórcios de bactérias, indicando sexo e fototipo de pele.

Sexo	Idade	Fototipo ^b	Consórcio	EPH (5)	EPH (6)	EST (7)	EST (8)	EST (9)	MOx (13)	MOx (14)	MOx (15)	MOx (16)	Sexo	Idade	Fototipo ^b	Consórcio	EPH (5)	EPH (6)	EST (7)	EST (8)	EST (9)	MOx (13)	MOx (14)	MOx (15)	MOx (16)
Mulheres	28	II	4NA	-	-	8,9	53,8	1,7	-	-	-	-	Homens	21	II	1NA	-	-	-	9,9	-	-	-	1,6	-
	23	II	8NA	7,2	-	83,8	29,3	1,2	1,3	1,3	6,8	-		22	II	2NA	-	-	-	13,0	4,5	-	-	-	-
	28	II	15NA	-	1,0	19,3	6,3	-	-	-	-	-		24	II	3NA	-	-	39,5	99,9	4,2	-	-	-	-
	26	II	33NA	3,1	-	-	1,0	2,9	21,2	-	-	-		29	II	18NA	-	-	-	2,4	6,9	-	3,8	-	-
	33	II	34NA	-	-	1,1	4,3	2,3	14,1	-	10,3	-		28	II	19NA	-	-	-	2,0	-	-	-	-	-
	44	II	38NA	-	-	2,8	2,1	-	-	-	-	-		25	II	20NA	1,4	2,7	23,0	27,2	2,5	78,0	7,4	17,9	7,5
	30	III	5NA	4,7	3,5	52,2	54,0	10,1	12,1	2,1	14,2	1,4		29	III	9NA	4,4	-	46,1	17,0	9,8	-	3,7	12,1	5,0
	26	III	6NA	-	-	29,5	99,9	7,1	1,5	-	-	0,3		34	III	10NA	-	-	28,1	17,0	6,4	-	2,2	2,9	1,2
	42	III	35NA	-	-	29,2	30,7	15,2	32,8	2,2	7,3	3,9		37	III	11NA	2,0	4,3	1,0	5,4	6,2	33,2	-	-	-
	26	III	36NA	-	-	1,1	16,5	15,9	0,4	-	-	-		30	III	17NA	5,3	3,0	1,6	1,6	-	3,0	-	4,5	2,6
	25	III	37NA	-	-	14,7	20,5	16,4	12,9	-	2,1	-		37	III	32NA	-	0,8	-	4,1	-	3,2	-	-	-
	35	III	39NA	-	-	23,5	26,4	14,7	99,9	14,6	40,5	14,2		22	V	12NA	-	-	24,9	5,9	1,6	-	-	-	1,1
	25	V	7NA	-	-	3,3	30,0	9,9	16,6	0,8	9,4	2,4		29	V	21NA	11,0	-	21,4	6,5	1,3	3,4	-	-	-
	42	V	13NA	-	-	12,1	24,1	13,9	-	-	-	-		28	V	23NA	5,9	-	23,1	10,8	-	29,0	0,3	1,2	2,2
	41	V	14NA	-	-	-	11,3	5,8	48,9	-	4,6	3,0		29	V	26NA	13,3	-	47,3	7,7	2,7	-	-	8,2	-
	34	V	25NA	-	-	11,0	16,5	1,5	5,3	-	4,9	-		24	V	29NA	0,9	-	27,9	20,3	1,5	-	-	-	-
	21	V	27NA	4,4	-	21,1	34,7	2,0	1,2	1,3	3,9	-		24	V	40NA	30,1	-	92,9	67,1	8,8	-	5,2	11,5	-
	19	V	28NA	1,1	-	-	4,7	-	-	-	-	-		32	VI	22NA	9,7	-	20,7	12,0	3,1	4,7	-	6,3	-
	29	VI	24NA	-	-	-	-	-	3,2	-	-	-		26	VI	44NA	-	-	49,7	79,3	2,7	23,2	-	-	-
	28	VI	48NA	-	-	-	3,0	-	1,1	-	3,5	0,4		36	VI	45NA	-	-	-	-	2,4	-	-	-	-
21	VI	49NA	-	-	16,8	54,7	2,5	59,6	4,1	36,2	3,5	21	VI	46NA	-	-	7,4	34,3	1,5	12,2	4,3	36,4	1,8		
39	VI	50NA	22,6	3,7	3,4	19,1	5,8	0,5	1,3	1,7	0,3	44	VI	47NA	-	-	5,8	60,5	-	-	-	-	-		
28	VI	51NA	-	-	7,3	35,2	18,1	4,5	3,0	5,0	1,8	26	A	16NA	-	-	6,9	33,7	12,9	13,2	-	-	1,4		
25	A	30NA	2,3	-	18,6	21,1	2,0	0,8	-	-	-	24	A	52NA	-	-	3,3	5,0	2,9	0,8	0,4	0,5	-		
25	A	31NA	10,0	1,5	2,8	4,6	2,1	10,1	1,3	12,2	-	22	A	54NA	-	-	1,1	4,6	2,4	9,5	3,7	-	2,0		
22	A	41NA	0,9	0,5	99,9	95,7	1,6	99,9	-	2,9	1,3	19	A	55NA	-	-	1,1	14,1	-	-	-	5,2	-		
19	A	42NA	-	-	89,7	81,3	-	99,9	-	-	-	22	A	56NA	18,9	3,1	3,7	9,4	1,6	0,5	1,1	4,2	-		
20	A	43NA	-	-	54,4	83,0	-	72,2	-	-	-	22	A	57NA	23,2	14,1	58,0	56,7	1,2	7,2	0,6	38,6	-		

^aPorcentagem de conversão calculada considerando as intensidades de fluorescência dos ensaios com as sondas fluorogênicas com relação à intensidade de fluorescência do controle positivo, amostras consideradas positivas com percentual de conversão maior que 5%. ^bFototipo de pele conforme a classificação de Fitzpatrick (II, III, V e VI); A, voluntários de origem asiática. NA, meio ágar nutriente

3.2.2.2 *Triagem enzimática dos consórcios de leveduras*

A Tabela 12 apresenta todos os resultados das triagens enzimáticas utilizando sondas fluorogênicas para os consórcios de leveduras, agrupados por sexo e os respectivos fototipos de pele. Foram considerados como resultados positivos apenas percentuais de conversão superiores a 5%, em relação ao valor do controle positivo.

Nos resultados de triagem enzimática para os consórcios de leveduras coletadas de mulheres pode-se verificar a predominância da atividade esterase para sondas de cadeia curta (**7**, **8**) presente em todos os fototipos de pele analisados, com destaque para as dos fototipos II, III e V com valores de atividade entre 54 e 99,9%, em relação ao controle positivo. Evidencia-se também uma alta atividade epóxido hidrolase para epóxido vicinal (**6**) em consórcios de fototipo III (36 YMA) e VI (24 YMA e 51 YMA), ainda uma baixa atividade epóxido hidrolase para epóxido terminal (**5**) em consórcios de diversos fototipos, com maior ocorrência em amostra do fototipo VI. Diferentemente dos consórcios de bactérias, a atividade mono-oxigenase nos consórcios de leveduras coletados de mulheres foi bem menos expressiva, com ressalva para o consórcio 25 YMA (fototipo V) que apresentou alta atividade (95%) frente à sonda acíclica (**13**).

Analisando os resultados dos consórcios de leveduras coletadas de homens, a atividade epóxido hidrolase foi observada para o epóxido terminal (**5**) em consórcios de fototipos II, III e V, enquanto para epóxido vicinal (**6**) apenas o consórcio 9 YMA (fototipo III) apresentou a atividade mais expressiva (51,2%). Esterases estão presentes em grande parte dos consórcios, que mostraram mais atividade frente às sondas de cadeia curta (**7**, **8**), porém com atividade moderada com a sonda de cadeia média (**9**). Diferente dos consórcios de bactérias coletados de homens, as leveduras demonstraram menor atividade mono-oxigenase, com exceção do consórcio 10 YMA (fototipo III) e 12 YMA (fototipo V) que apresentaram alta atividade frente às cetonas cíclicas (**15** e **16**). Além disso, os micro-organismos coletados de homens de origem asiática mostraram baixa atividade enzimática para as sondas testadas, enquanto que aqueles coletados de mulheres apresentam uma maior incidência de esterases.

Tabela 12. Atividades enzimáticas (% conversão)^a detectadas nos consórcios de leveduras, indicando sexo e fototipo de pele.

Sexo	Idade	Fototipo ^b	Consórcio	EPH (5)	EPH (6)	EST (7)	EST (8)	EST (9)	MOx (13)	MOx (14)	MOx (15)	MOx (16)	Sexo	Idade	Fototipo ^b	Consórcio	EPH (5)	EPH (6)	EST (7)	EST (8)	EST (9)	MOx (13)	MOx (14)	MOx (15)	MOx (16)		
Mulheres	28	II	4YMA	-	-	1,0	99,9	6,2	-	-	-	-	Homens	21	II	1YMA	3,7	-	11,9	10,7	2,6	-	-	-	-		
	23	II	8YMA	-	-	2,0	39,0	1,0	-	-	-	-		22	II	2YMA	6,5	1,1	7,7	29,9	18,1	-	4,0	1,4	-		
	28	II	15YMA	4,2	-	81,5	5,6	-	-	-	-	-		24	II	3YMA	4,9	-	4,6	99,9	6,6	-	-	-	-	-	
	26	II	33YMA	-	-	18,2	57,3	-	3,7	-	-	-		29	II	18YMA	3,5	-	73,2	15,7	-	9,9	-	1,0	1,1	-	
	33	II	34YMA	2,6	1,2	9,8	2,1	-	-	-	-	-		28	II	19YMA	-	-	99,9	22,8	1,0	1,0	-	-	-	-	
	44	II	38YMA	7,5	1,1	23,1	77,8	1,6	4,0	-	-	-		-	25	II	20YMA	6,7	-	91,1	10,9	-	2,5	3,2	9,4	1,4	-
	30	III	5YMA	-	-	19,0	5,8	24,8	2,4	1,5	-	-		-	29	III	9YMA	1,0	51,2	7,2	99,9	21,0	-	-	-	-	-
	26	III	6YMA	-	-	1,9	99,9	1,3	-	-	-	-		-	34	III	10YMA	20,4	-	-	1,0	-	-	3,9	2,8	82,6	-
	42	III	35YMA	5,0	2,0	95,0	11,3	-	-	-	-	1,1		-	37	III	11YMA	-	5,9	5,6	16,4	2,7	1,5	6,6	2,3	3,8	-
	26	III	36YMA	4,9	89,2	91,9	8,2	-	-	-	1,9	-		-	30	III	17YMA	-	-	99,9	12,5	-	-	-	-	-	-
	25	III	37YMA	-	-	99,9	13,5	-	-	-	-	-		-	37	III	32YMA	-	-	41,4	76,2	5,3	5,6	-	-	-	-
	35	III	39YMA	-	-	4,7	54,7	2,8	2,3	-	-	-		-	22	V	12YMA	12,2	1,0	18,6	83,8	77,2	-	2,3	91,2	-	-
	25	V	7YMA	8,5	-	8,5	23,8	6,3	-	3,7	1,7	0,6		-	29	V	21YMA	-	-	28,0	76,7	-	9,0	-	-	-	-
	42	V	13YMA	-	-	99,2	9,7	-	-	-	-	-		-	28	V	23YMA	14,8	-	5,5	6,2	2,7	-	-	-	-	-
	41	V	14YMA	5,3	-	8,0	29,5	-	-	1,4	-	-		-	29	V	26YMA	3,9	-	-	9,1	-	11,1	5,7	18,7	-	-
	34	V	25YMA	-	-	12,7	17,6	3,4	95,0	1,3	8,2	2,8		-	24	V	29YMA	2,3	-	6,7	50,3	-	5,6	-	-	-	-
	21	V	27YMA	3,6	-	87,6	17,4	-	9,4	-	-	-		-	24	V	40YMA	-	3,8	4,0	56,5	25,8	1,6	-	-	-	-
	19	V	28YMA	-	-	8,7	63,0	1,3	10,1	-	-	-		-	32	VI	22YMA	1,8	-	98,4	12,0	-	-	-	3,4	-	-
	29	VI	24YMA	5,9	81,9	99,9	8,6	-	6,7	1,6	2,6	-		-	26	VI	44YMA	2,2	-	2,8	5,2	7,0	10,6	-	-	1,4	-
	28	VI	48YMA	3,3	3,1	1,6	-	-	-	1,4	-	-		-	36	VI	45YMA	-	-	15,1	55,7	36,6	-	-	-	-	-
21	VI	49YMA	1,3	-	16,6	28,9	-	-	-	-	-	-	21	VI	46YMA	-	2,0	99,9	7,7	-	-	-	-	-	-		
39	VI	50YMA	5,2	2,0	92,0	11,5	-	-	3,3	16,2	-	-	44	VI	47YMA	2,1	-	99,9	10,1	-	-	-	-	-	-		
28	VI	51YMA	8,0	88,7	99,9	11,5	-	1,3	2,0	5,3	-	-	26	A	16YMA	-	-	9,9	-	-	-	-	-	-	-		
25	A	30YMA	7,2	-	6,1	28,7	-	4,2	-	-	-	-	24	A	52YMA	1,3	-	-	1,3	5,6	-	1,2	-	-	-		
25	A	31YMA	-	-	6,4	48,4	-	3,0	-	-	-	-	22	A	54YMA	-	3,0	5,6	6,9	4,6	5,1	-	-	-	-		
22	A	41YMA	-	1,0	19,1	61,6	1,1	0,3	-	-	-	-	19	A	55YMA	-	-	1,1	4,7	8,8	-	-	-	-	-		
19	A	42YMA	-	-	34,9	75,9	6,2	6,3	-	-	-	-	22	A	56YMA	2,5	-	2,2	17,5	2,0	-	1,5	1,2	-	-		
20	A	43YMA	-	-	3,4	37,5	2,2	-	1,5	1,5	-	-	22	A	57YMA	-	-	20,8	4,5	7,8	6,8	1,1	5,5	-	-		

^aPorcentagem de conversão calculada considerando as intensidades de fluorescência dos ensaios com as sondas fluorogênicas com relação à intensidade de fluorescência do controle positivo, amostras consideradas positivas com percentual de conversão maior que 5%. ^bFototipo de pele conforme a classificação de Fitzpatrick (II, III, V e VI); A, voluntários de origem asiática. YMA, meio ágar extrato de levedura.

3.2.2.3 *Triagem enzimática de Fungos Filamentosos*

Diferentemente das bactérias e leveduras que foram analisadas na forma de consórcios, os fungos filamentosos foram analisados um a um, o que levou a números diferentes de ensaios para cada sexo, onde alguns voluntários não estão incluídos nesta etapa da triagem por não apresentarem crescimento de colônias filamentosas durante o procedimento da coleta das microbiotas. Neste caso, as mulheres apresentaram maior número de colônias de fungos filamentosos e maior diversidade, em comparação aos homens. Ainda percebem-se valores menores de conversão em todas as amostras, se comparados com os valores obtidos para os consórcios de bactérias e leveduras, anteriormente analisados.

A Tabela 13 apresenta todos os resultados das triagens enzimáticas utilizando sondas fluorogênicas para os fungos filamentosos, agrupados por sexo e os respectivos fototipos de pele. Foram considerados como resultados positivos apenas percentuais de conversão superiores a 5%, em relação ao valor do controle positivo. Para os fungos filamentosos coletados de mulheres foi possível verificar alta atividade esterase frente às sondas de cadeia curta (**7**, **8**) onde podemos destacar os consórcios dos fototipos II, III, V e de origem asiática. A presença de epóxido hidrolases foi observada em fungos do fototipo II, V e de origem asiática. Atividade mono-oxigenase expressiva (39,4 a 99,9%) foi detectada principalmente em fungos do fototipo V e de origem asiática, tanto em ensaios com a sonda cetona acíclica (**13**) como com as cetonas cíclicas (**15** e **16**).

Analisando os fungos coletados de homens, a detecção de atividade enzimática foi bem inferior, se comparados àqueles coletados de mulheres, inclusive em alguns casos não foi possível detectar qualquer atividade. Atividade esterase (**7**, **8** e **9**) foi a mais observada entre os fungos de homens em todos os fototipos, sendo que mono-oxigenases frente à sonda contendo cetona cíclica (**13**) (3M-1 e 18M) e a sonda contendo ciclohexanona (**16**) (18M e 19M). Novamente percebe-se uma diferença de perfil de atividade entre os fungos filamentosos de voluntários homens e mulheres de origem asiática, onde os fungos coletados de homens demonstraram uma atividade enzimática muito baixa, exceto para as sondas de esterase (**7** e **8**).

Tabela 13. Atividades enzimáticas (% conversão)^a detectadas nos fungos filamentosos, indicando sexo e fototipo de pele.

Sex	Ida	Foto	A	Fung	5	6	7	8	9	13	14	15	16	Sexo	Idad	Foto ^b	Am	Fungo	5	6	7	8	9	13	14	15	16	
Mulheres	28	II	4M	4M	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Mulheres	21	VI	49M	49M-6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3,4
	23	II	8M	8M-1	-	-	36,5	17,7	2,2	5,1	-	-	2,4		20	VI	48M	48M	-	-	1,2	2,8	-	-	-	-	1,2	-
				8M-2	-	-	-	-	-	1,4	-	1,1	-		-	-	21	VI	51M	51M	-	-	-	-	3,5	-	-	-
	26	II	33 M	33M-1	-	-	2,8	1,9	-	1,1	-	1,5	-		25	A	30M	30M-1	23,2	1,3	55,6	87,6	4,8	99,9	9,6	63,9	14,5	
				33M-2	1,6	-	10,6	17,6	-	-	-	-	30M-2					-	-	44,1	77,4	1,7	85,7	2,4	-	3,7		
				33M-3	-	-	26,2	1,3	-	16,2	-	-	-					-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	44	II	38 M	38M-1	-	-	7,2	-	-	-	-	-	-		25	A	31M	31M	-	-	-	-	1,0	-	-	-	-	-
				38M-2	4,3	-	34,7	4,5	-	-	-	-	-					-	-	35	A	41M	41M	1,8	1,8	46,9	91,2	32,2
	30	III	5M	5M	-	-	4,6	3,0	-	1,9	-	-	1,5		22	A	42M	42M	16,5	-	66,0	57,8	9,1	4,0	2,5	14,3	1,5	
	26	III	6M	6M-1	-	-	11,8	7,6	-	-	-	-	-					20	A	43M	43M-1	2,4	-	68,6	99,9	12,2	1,0	-
				6M-2	-	1,2	2,5	4,2	1,6	4,1	5,3	24,2	2,4		43M-2	-	-				16,4	7,8	7,7	-	-	2,7	-	
				6M-3	-	-	0,9	3,5	-	1,8	1,3	-	-		-	-	-				-	-	-	-	-	-	-	-
	42	III	35 M	35M-1	12,6	2,2	17,9	90,5	2,2	-	1,7	4,7	-		22	II	2M	2M-1	-	-	1,1	1,7	-	2,5	-	1,6	-	
				35M-2	-	-	-	-	-	-	-	-	-					-	2M-2	-	-	3,5	-	-	3,3	2,4	3,8	2,9
	25	III	37	37M	-	-	6,7	-	-	-	-	-	-		24	II	3M	3M-1	-	-	-	-	-	15,5	-	6,1	6,9	
				37M	-	-	6,7	-	-	-	-	-	-					-	3M-2	1,2	-	1,0	1,1	-	1,3	-	2,8	-
	35	III	39 M	39M-1	15,9	6,1	8,6	46,4	16,9	-	1,2	-	-		29	II	18M	18M	-	-	17,9	29,0	1,6	32,3	-	-	33,4	
				39M-2	-	1,9	2,8	20,3	8,3	-	-	-	-					-	-	-	-	-	-	-	-	-		
				39M-3	10,8	3,8	15,3	52,2	15,4	-	-	-	-					-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	25	V	7M	7M-1	10,3	-	28,9	54,5	22,0	42,0	4,7	12,9	47,8		29	III	9M	9M-1	1,5	-	2,1	-	-	5,4	2,9	8,3	14,5	
7M-2				-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-				9M-2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
41	V	14 M	14M-1	-	2,6	5,4	45,2	33,7	-	-	-	-	34	III	10M	10M	7,9	4,8	6,4	25,1	9,4	-	-	-	-			
			14M-2	-	-	-	-	9,5	-	-	-	-				-	-	34	V	12M	12M	1,7	3,0	7,3	15,5	15,5	-	-
34	V	25	25M	-	-	-	-	-	-	-	-	-	28	V	23M	23M-1	6,2	5,6	7,3	11,5	53,8	5,8	3,8	6,0	8,0			
21	V	27 M	27M-1	-	-	1,8	1,0	-	39,7	-	16,0	11,8				32	VI	22M	22M	-	-	16,5	3,4	0,7	-	-	-	-
			27M-2	-	-	4,5	10,1	17,1	-	-	-	-	-	-	26				VI	44M	44M	1,9	-	66,4	24,6	1,0	1,1	-
19	V	28 M	28M-1	-	-	-	-	-	4,4	4,8	15,8	1,7	36	VI	45M	45M	-	-	7,4	4,9	6,8	-	-	-	-	-		
			28M-2	-	-	2,2	2,2	-	9,9	4,3	15,6	6,0				26	A	16M	16M	-	-	-	-	1,0	1,8	4,6	-	
			28M-3	-	-	8,3	19,0	3,5	17,9	-	-	-							24	A	52M	52M	-	-	2,0	18,3	2,7	-
			28M-4	-	-	29,0	46,5	1,5	39,4	4,2	12,7	31,1				22	A	54M				54M	6,0	2,6	21,2	58,9	22,1	2,7
			28M-5	-	-	29,9	26,8	3,2	8,6	1,2	5,8	7,1							19	A	55M	55M	1,2	-	5,4	31,2	-	-
			28M-6	-	-	6,0	28,0	-	-	-	-	-				22	A	56M				56M	-	-	1,3	2,6	-	-
			28M-7	6,4	-	18,3	17,0	8,2	3,9	2,7	7,5	3,2							22	A	57M	57M-1	-	-	-	-	-	-
49M-1	-	-	2,8	22,4	2,9	-	-	-	-	57M-2	-	-	-	-	-	-	-	-				-	-	-				
49M-2	-	-	1,2	4,1	-	-	-	-	-	57M-3	-	-	65,9	99,9	2,8	1,4	1,1	2,3				-	-					
49M-3	-	-	4,7	11,9	-	-	1,5	-	4,8	57M-4	-	-	-	-	-	-	-	-				-	-					
49M-4	-	-	14,3	16,0	2,0	2,0	-	4,8	-	57M-5	-	-	-	9,4	-	-	-	-				-						
49M-5	-	-	34,4	16,9	-	-	-	-	-	-	-																	

^aPercentagem de conversão calculada considerando as intensidades de fluorescência dos ensaios com as sondas fluorogênicas com relação à intensidade de fluorescência do controle positivo, amostras consideradas positivas com porcentual de conversão maior que 5%. ^bFoto, fototipo de pele conforme a classificação de Fitzpatrick; A, voluntários de origem asiática. M, meio ágar extrato de malte...

Para uma análise geral dos dados, um perfil dos micro-organismos testados foi elaborado através do cálculo do percentual de amostras (bactérias, leveduras e fungos filamentosos) que apresentaram resultados positivos (valores de atividade igual ou superiores a 5%) para cada uma das sondas testadas, agrupados por sexo (mulheres e homens) (Tabela 14 e Figura 19).

Tabela 14. Perfil geral da atividade enzimática dos consórcios microbianos e dos fungos filamentosos nos ensaios fluorogênicos.

Atividade*	Sonda	% amostras ativas de Mulheres			% amostras ativas de Homens		
		Bactérias	Leveduras	Fungos	Bactérias	Leveduras	Fungos
Epoxido	5	14	25	13	33	30	15
Hidrolase (EPH)	6	0	4	4	11	4	4
Esterase (EST)	7	61	89	43	81	59	50
	8	75	89	49	96	81	50
	9	39	43	23	15	22	19
Mono-oxigenase (MOx)	13	50	36	17	19	26	15
	14	4	7	4	0	7	0
Mono-oxigenase (MOx)	15	36	32	9	11	30	12
	16	4	21	2	0	7	15

*Percentual de amostras ativas em relação ao número de consórcios de bactérias (55), de leveduras (55) e fungos filamentosos (70) separados por sexo.

Pode-se observar que grande parte dos micro-organismos testados apresentaram hidrolases tanto em mulheres como em homens. Esterases foram às enzimas mais encontradas, sendo que em todos os casos, houve uma preferência pela hidrólise das sondas contendo os grupos propanoila e acetila (**7**, **8**). Além disso, foram encontradas atividades menores frente à sonda contendo o grupo octanoila (**9**), indicando a presença de esterases mais seletivas para a hidrólise de ésteres de cadeia curta.

Porém, comparando os resultados supracitados com os resultados do ensaio para lipase (Rodamina, contendo triacilglicerídeos do azeite de oliva), pode-se observar que, grande parte das amostras que apresentaram atividade esterase também apresentaram atividade lipase. Portanto, as enzimas da

microbiota da pele humana são capazes de hidrolisar ésteres de cadeia curta (C2 e C3) e também de cadeia longa (C16, C18 e C20), porém apresentam mais dificuldade de hidrolisar ésteres de cadeia média (C8).

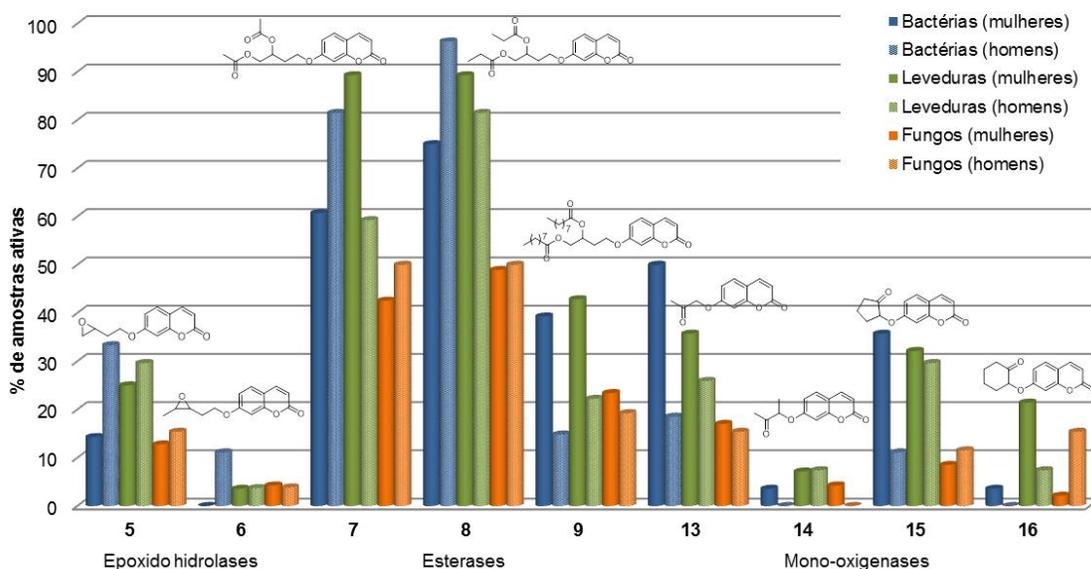


Figura 19. Perfil geral da atividade enzimática dos consórcios de bactérias, leveduras e dos fungos filamentosos nos ensaios fluorogênicos.

Na detecção de epóxido hidrolases, as bactérias e leveduras coletadas de homens e as leveduras coletadas de mulheres foram mais ativas nos ensaios com sonda contendo epóxido terminal (**5**), enquanto nos ensaios com a sonda de epóxido vicinal (**6**) o número de amostras ativas foi muito baixo, destacando apenas os consórcios de bactérias de homens com 11% de amostras ativas. Desta forma, apesar do importante papel das epóxido hidrolases na detoxificação de epóxidos pelas células da pele humana¹¹⁸, elas podem apresentar uma alta especificidade ou ainda podem não ser expressas pela microbiota residente da pele humana¹¹⁹.

Nos ensaios realizados para a detecção de mono-oxigenases, verificou-se um maior número de amostras ativas frente às sondas **13** (cetona linear), e **15** (cetona cíclica de cinco membros). Entre os consórcios de bactérias, aqueles coletados de mulheres foram mais ativos tanto para as sondas **13** e **15**, enquanto nos consórcios de leveduras a quantidade de amostras ativas, frente a essas duas

¹¹⁸ Enayattallah, A.E.; French, R.A.; Thibodeau, M.S.; Grant, D.F. *J. Histochem. Cytochem.*, **2004**, 447-454.

¹¹⁹ Smith, C.K.; Hotchkiss, S.A.M. Enzymes and Pathways of Xenobiotic Metabolism in skin. In: *Allergic Contact Dermatitis: Chemical and Metabolic Mechanisms*. Taylor and Francis, London, 2001, cap. 4.

sondas, foi muito semelhante entre mulheres (36 e 32%) e homens (26 e 30%). No caso dos fungos, o número de amostras ativas foi bem inferior, onde se destacam aqueles coletados de mulheres com 17% das amostras ativas para sonda **13** e coletados de homens com 15% para sonda **13**, 12% para a sonda **15** e 15% para a sonda **16**.

Assim, os dados demonstraram que os consórcios apresentam atividade mono-oxigenase para cetonas lineares e cíclicas (preferencialmente frente à ciclopentanona). Os fungos isolados da pele apresentaram menor número de amostras com atividade mono-oxigenase, porém foi detectada mono-oxigenases capazes de oxidar a sonda **16** (cicloexanona), o que não foi observado nos consórcios. Tal sonda foi oxidada por poucos micro-organismos provavelmente por se tratar de uma cetona cíclica de seis membros, que leva a uma lactona de sete membros cuja formação é menos favorecida, diferentemente da sonda (**15**), uma ciclopentanona que frente à mono-oxigenases leva a formação de uma lactona de seis membros, mais favorecida¹²⁰.

3.2.3 Conclusão Parcial

As coletas dos consórcios de bactérias, dos consórcios de leveduras e dos fungos filamentosos da pele demonstraram a grande diversidade microbiana que pode ser encontrada na pele, com diferenças significativas entre cada coleta e entre homens e mulheres e entre diferentes fototipos analisados. Entretanto, devido à grande diversidade e complexidade das amostras avaliadas, as técnicas utilizadas possibilitaram apenas a construção de um perfil geral das amostras em questão.

Assim, a prospecção enzimática através de triagem de alto desempenho foi uma avaliação simples e direta do potencial enzimático da microbiota de pele humana, onde foi possível detectar hidrolases e mono-oxigenases nos diferentes tipos de consórcios e fungos analisados.

¹²⁰ Porto A.L.M. Isolamento e Seleção de Micro-organismos Brasileiros para Reações de Biocatálise e Produção de Metabólitos. *Tese de doutorado*, Instituto de Química, Unicamp, 2002.

3.3 Diversidade fúngica da pele humana: prospecção e identificação taxonômica

A microbiota da pele humana saudável é muito pouco caracterizada, em comparação com a bacteriana. A maioria dos fungos considerados como membros da microbiota da pele são leveduras principalmente do gênero *Malassezia* e *Candida*⁸.

Como já apresentado no item 3.1, dentre as amostras avaliadas, podemos verificar que aquelas amostras coletadas de voluntárias mulheres mostraram maior incidência de colônias de fungos filamentosos, correspondendo a 61% do total de colônias, enquanto as amostras oriundas de voluntários homens apresentaram um número menor de colônias de fungos filamentosos (45 UFC) 39% do total de colônias. A Figura 20 traz alguns exemplos de diferentes colônias de fungos obtidas nas coletas.

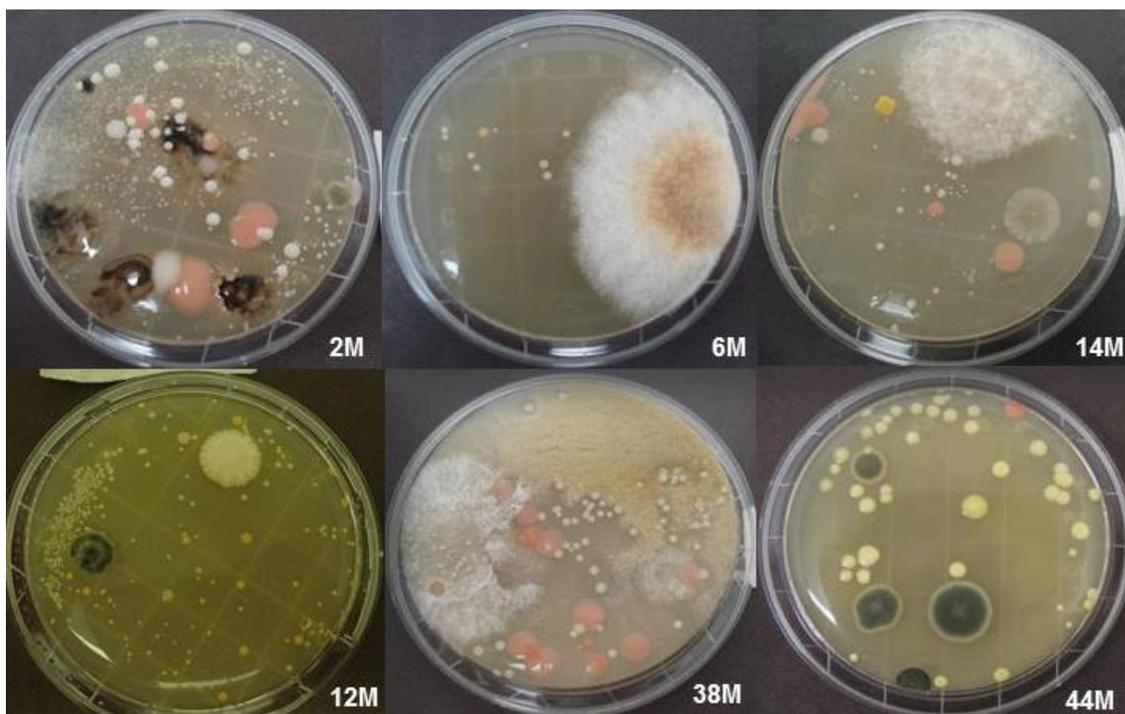


Figura 20. Exemplo de placas Rodac após a coleta e crescimento de colônias de fungos filamentosos. Placas de coletas de mulheres: 6M (fototipo III), 14M (fototipo V); 38M (fototipo II); placas de coletas de homens: 2M (fototipo II); 12M (fototipo V); 44M, (fototipo VI).

Após o compilamento e avaliação dos dados obtidos nos ensaios de triagens enzimáticas dos consórcios de bactérias e leveduras e dos fungos filamentosos ficou evidente a grande diversidade dos fungos com atividades enzimáticas significativas, os quais foram selecionados para identificação através de técnicas moleculares. Desta forma, foram selecionadas 33 colônias de fungos filamentosos de pele, os quais foram purificados através de estrias de esgotamento em placa, a fim de garantir culturas puras para o procedimento de identificação. Com este procedimento, identificou-se que 7 amostras iniciais eram culturas mistas que levaram ao isolamento de 15 culturas puras. Assim, as 33 culturas iniciais de fungos filamentosos selecionados para identificação geraram 41 culturas puras, nomeadas conforme descrito na Tabela 15 e exemplificadas na Figura 21.

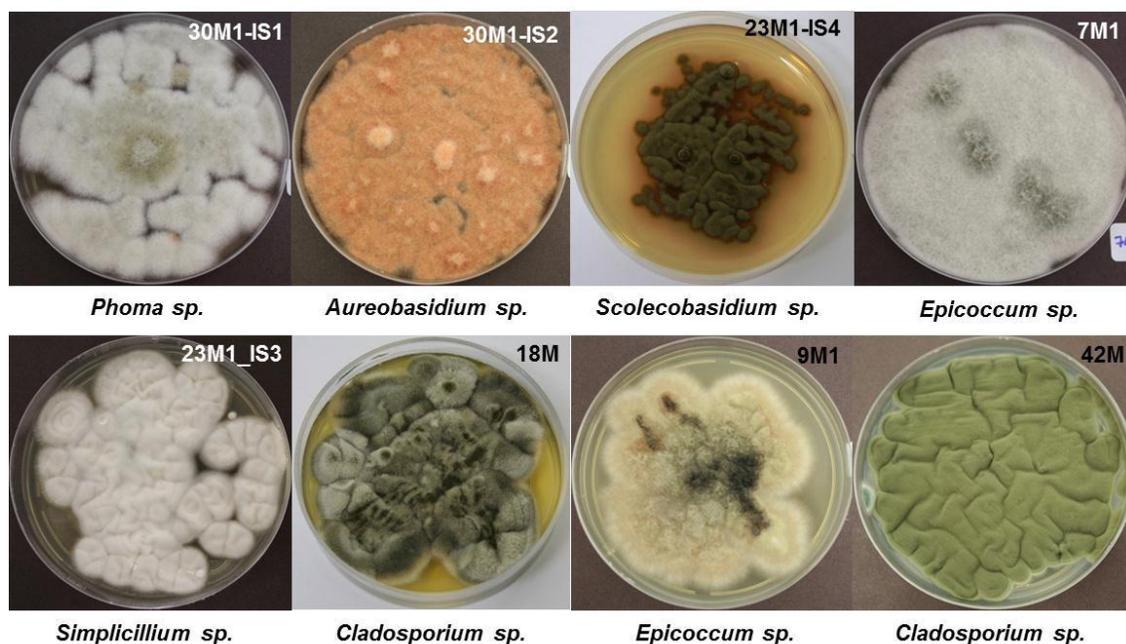


Figura 21. Exemplo da diversidade de espécies fúngicas encontradas na pele humana. **M**, meio ágar extrato de malte; **IS**, fungo isolado da amostra indicada.

Tabela 15. Culturas de fungos filamentosos selecionadas para identificação taxonômica e a codificação das culturas puras.

Nº	Código	Fungo Isolado	Nº	Código	Fungo Isolado
1	2M2	2M2 IS1	22	28M7	28M7-IS1
2	3M1	-	23		28M7-IS2
3	6M2	-	24	30M1	30M1-IS1
4	8M1	-	25		30M1-IS2
5	9M1	-	26	30M2	30M2-IS1
6	9M2	-	27		30M2-IS2
7	9M3	-	28	33M3	-
8	10M	-	29	35M1	-
9	18M	-	30	35M2	-
10	23M1	23M1-IS1	31	37M	37M-IS1
11		23M1-IS2	32		37M-IS2
12		23M1-IS3	33	39M1	-
13		23M1-IS4	34	39M3	-
14	27M1	-	35	42M	-
15	28M1	-	36	43M1	-
16	28M2	-	37	44M	-
17	28M3	28M3-IS2	38	45M	-
18		28M3-IS2	39	48M	-
19	28M4	-	40	49M5	-
20	28M5	-	41	51M	-
21	28M6	-			-

M, meio extrato de malte para crescimento fúngico; **IS**, fungo isolado.

3.3.1 Identificação taxonômica e inferência filogenética de fungos da pele

A taxonomia do Reino Fungi é extremamente complexa, tendo em vista a metodologia clássica atualmente utilizada para a classificação de espécies, que utiliza características morfológicas, fisiológicas e bioquímicas para a classificação de um indivíduo em diferentes espécies. Além disso, fases sexuadas (teleomórficas) e assexuadas (anamórficas) de um mesmo genótipo são classificadas como espécies distintas, e apresentam capacidades distintas de

compartilhar material genético, resultando em dificuldade na distinção dos indivíduos¹²¹.

Neste aspecto, técnicas moleculares de classificação e identificação estão contribuindo de forma significativa para o entendimento das relações filogenéticas entre as diferentes espécies de fungos, além de contribuir para uma melhor classificação das novas espécies que poderiam ser catalogadas em projetos de análise da biodiversidade¹²².

Desta forma, neste trabalho optamos por realizar a caracterização e identificação dos fungos filamentosos isolados de pele humana através de técnicas de taxonomia molecular (*fingerprints* e análise filogenética de sequências de DNA ribossomal). Esta etapa do projeto foi realizada em colaboração com a pesquisadora Dra Lara Durães Sette da Divisão de Recursos Microbianos (DRM) do Centro de Pesquisas Químicas Biológicas e Ambientais (CPQBA), Unicamp, atualmente Prof^a Dra da UNESP (Rio Claro) sendo que todo o desenvolvimento da identificação por técnicas moleculares foi realizado pela pós-doutoranda Dra Rafaella Costa Bonugli (DRM, CPQBA). A estratégia adotada para a identificação dos principais exemplares de fungos filamentosos isolados de pele humana foi dividida em duas fases:

a) Avaliação de polimorfismo genético pelo método de ARDRA (*Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis*), a fim de conhecermos a diversidade genética entre os fungos isolados e determinar uma possível origem comum entre eles.

b) Caracterização taxonômica e análise filogenética dos isolados selecionados pelo ARDRA e para a comparação da sequência do organismo-alvo com sequências de organismos representados em bases de dados e aplicação de métodos de análise para inferência filogenética.

Os resultados da identificação dos fungos encontram-se descritos a seguir, maiores detalhes sobre a metodologia aplicada e a avaliação filogenética completa

¹²¹ Thompson, F.L. et al. Taxonomia: Microbiana, de Procariontes, de Fungos, de Protozoários e de Vírus. Centro de Gestão e Estudos Estratégicos, Ciência, Tecnologia e Inovação (CGEE). Disponível em www.cgее.org.br/atividades/redirect.php?idProduto=1752. Acesso em 11 de nov. de 2010.

¹²² a) Kong H. H. Trends Mol. Med. **2001**, *17*, 320-328. b) Hirsch, P.R.; Mauchline, T.H.; Clark, I. M. Soil Biol. Biochem. **2010**, *42*, 878-887.

encontram-se no relatório emitido pelo CPQBA (Relatório Científico - Identificação de fungos filamentosos, Anexo IV).

3.3.1.1 Avaliação de polimorfismo genético pelo método de ARDRA

A avaliação de polimorfismo genético pelo método de ARDRA foi realizada utilizando as enzimas de restrição *HaeII*, *RsaI* e *MspI*. Os resultados obtidos pela técnica de ARDRA revelaram a presença de 31 ribotipos distintos dentre os 41 isolados analisados (Tabela 16). Desta forma, selecionamos para o sequenciamento um representante de cada ribotipo distinto (corte $\geq 96\%$ de similaridade) visando identificação taxonômica e inferência filogenética. Os isolados selecionados para a subsequente etapa de sequenciamento estão marcados na Tabela 7.

Tabela 16. Ribotipos gerados pela digestão com as enzimas de restrição *HaeIII*, *MspI* e *RsaI*.

Código	Enzimas			Ribotipo*	Sequen- ciados	Código	Enzimas			Ribotipo*	Sequen- ciados
	<i>HaeII</i>	<i>MspI</i>	<i>RsaI</i>				<i>HaeII</i>	<i>MspI</i>	<i>RsaI</i>		
2M2-IS1	1	1	1	1	X	28M7-IS1	14	15	13	16	X
3M1	2	2	2	2	X	28M7-IS2	12	16	14	17	X
6M2	1	1	3	3	X	30M1-IS1	13	15	3	18	X
9M1	1	1	3	3		30M1-IS2	12	14	15	19	X
28M1	1	1	3	3		30M2-IS1	12	15	3	20	X
28M2	1	1	3	3		30M2-IS2	12	15	3	20	
28M3-IS2	1	1	3	3		33M3	12	17	16	21	X
8M1	1	1	4	4	X	35M1	12	17	16	21	
9M2	1	3	5	5		35M2	12	17	16	21	
9M3	1	4	6	6	X	37M-IS1	12	17	16	21	
10M	3	5	7	7	X	37M-IS2	12	18	17	22	X
18M	4	6	8	8	X	39M1	12	19	18	23	X
23M1-IS1	4	6	8	8		39M3	14	15	19	24	X
23M1-IS2	4	6	8	8		42M	15	21	20	25	X
23M1-IS3	5	1	7	9	X	43M1	16	22	3	26	X
23M1-IS4	6	8	9	10	X	44M	4	22	21	27	X
27M1	6	9	7	11	X	45M	4	23	22	28	X
28M3-IS1	7	10	10	12	X	48M	17	24	23	29	X
28M4	8	12	11	13	X	49M5	18	1	24	30	X
28M5	9	13	12	14	X	51M	5	1	25	31	X
28M6	10	14	13	15	X						

*As cores representam os diferentes ribotipos localizados; **M**, meio extrato de malte para crescimento fúngico; **IS**, fungo isolado.

3.3.1.2 Caracterização taxonômica e análise filogenética dos isolados selecionados pelo ARDRA.

A caracterização molecular dos fungos filamentosos representantes de grupos taxonômicos distintos (ribotipos distintos) foi baseada na análise de sequências de DNA da região ITS1-5.8S-ITS2 e/ou região D1/D2 do DNAr 28S. Para alguns isolados a região D1/D2 do rDNA 28S foi também sequenciada visando a obtenção de uma identificação mais apurada. As sequências obtidas com cada primer foram montadas em um *Contig* (conjunto de fragmentos que compõe uma sequência única e representam uma região do genoma) e comparadas com as sequências de genes de organismos representados na base de dados do Genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) e do CBS (<http://www.cbs.knaw.nl/index.htm>).

3.3.1.3 Diversidade genética e caracterização taxonômica

Fungos representantes de ribotipos distintos (30) dentre os 41 fungos isolados inicialmente e mais um representante adicionado posteriormente (7M1, totalizando 31 isolados) foram submetidos ao sequenciamento de DNA e análise filogenética, visando à identificação taxonômica dos mesmos.

Os resultados das análises moleculares revelaram que os isolados estudados estão, em sua maioria, distribuídos no filo Ascomycota, incluindo 7 ordens e 9 gêneros distintos (Tab. 17): *Cladosporium* sp., (n=6), Capnodiales; *Exophiala* sp. (n=1), Chaetothyriales; *Cytospora* sp. n=1) Diaporthales; *Aureobasidium* sp. (n=3), Dothideales; *Penicillium* sp. (n=2), Eurotiales; *Simplicillium* sp. (n=1), *Fusarium* sp. (n=1) e *Hypocrea* sp. (n=1), Hypocreales; *Alternaria* sp. (n=2) e *Massarina* sp. (n=1), Pleosporales. Em adição, foram identificados representantes dos gêneros *Scolecobasidium* sp. (n=1) e *Phoma* sp. (n=4) pertencentes ao grupo dos Coelomycetes (fungos anamórficos) e *Epicoccum* sp (n=3), pertencente a classe dos Dothideomycetes. Somente um isolado (43M1) permaneceu como desconhecido. O filo Basidiomycota foi representado por isolados da ordem Agaricales pertencentes aos gêneros *Marasmius* (n=1), e *Coprinellus* (n=1) e pelo gênero *Rhodotorula* (n=1), grupo de fungos anamórficos. Cabe ressaltar que os isolados identificados como *Aureobasidium* sp. (28M6,

30M1-IS2 e 48M) e *Rhodotorula* sp. (28M7-IS2) são fungos em estágio leveduriforme.

Tabela 17. Caracterização taxonômica dos isolados selecionados pelo ARDRA.

Código	Ribotipo	Identificação Final	Ordem ou grupo taxonômico	Filo
2M2-IS1	1	<i>Alternaria</i> sp.	Pleosporales	Ascomycota
3M1	2	<i>Alternaria</i> sp.	Pleosporales	Ascomycota
6M2	3	<i>Epicoccum</i> sp.	Fungos anamóficis	Ascomycota
9M1		<i>Epicoccum</i> sp.		
28M1		<i>Epicoccum</i> sp.		
28M2		<i>Epicoccum</i> sp.		
28M3-IS2		<i>Epicoccum</i> sp.		
8M1	4	<i>Cladosporium</i> sp.	Capnodiales	Ascomycota
9M3	6	<i>Cladosporium</i> sp.	Capnodiales	Ascomycota
10M	7	<i>Exophiala</i> sp.	Chaetothyriales	Ascomycota
18M	8	<i>Cladosporium</i> sp.	Capnodiales	Ascomycota
23M1-IS1		<i>Cladosporium</i> sp.		
23M1-IS2		<i>Cladosporium</i> sp.		
23M1-IS3	9	<i>Simplicillium</i> sp.	Hypocreales	Ascomycota
23M1-IS4	10	<i>Scolecobasidium</i> sp.	Fungos anamóficis	Ascomycota
27M1	11	<i>Fusarium</i> sp.	Hypocreales	Ascomycota
28M3-IS1	12	<i>Phoma</i> sp.	Fungos anamóficis	Ascomycota
28M4	13	<i>Phoma</i> sp.	Fungos anamóficis	Ascomycota
28M5	14	<i>Massarina</i> sp.	Pleosporales	Ascomycota
28M6	15	<i>Aureobasidium</i> sp.	Dothideales	Ascomycota
28M7-IS1	16	<i>Cladosporium</i> sp.	Capnodiales	Ascomycota
28M7-IS2	17	<i>Rhodotorula</i> sp.	Fungos anamóficis	Basidiomycota
30M1-IS1	18	<i>Phoma</i> sp.	Fungos anamóficis	Ascomycota
30M1-IS2	19	<i>Aureobasidium</i> sp.	Dothideales	Ascomycota
30M2-IS1	20	<i>Phoma</i> sp.	Fungos anamóficis	Ascomycota
30M2-IS2		<i>Phoma</i> sp.		
33M3	21	<i>Penicillium</i> sp.	Eurotiales	Ascomycota
35M1		<i>Penicillium</i> sp.		
35M2		<i>Penicillium</i> sp.		
37M-IS1		<i>Penicillium</i> sp.		
37M-IS2	22	<i>Marasmius</i> sp.	Agaricales	Basidiomycota
39M1	23	<i>Hypocrea</i> sp.	Hypocreales	Ascomycota
39M3	24	<i>Coprinellus</i> sp.	Agaricales	Basidiomycota
42M	25	<i>Cladosporium</i> sp.	Capnodiales	Ascomycota
43M1	26	NI	NI	Ascomycota
44M	27	<i>Cladosporium</i> sp.	Capnodiales	Ascomycota
45M	28	<i>Penicillium</i> sp.	Eurotiales	Ascomycota
48M	29	<i>Aureobasidium</i> sp.	Dothideales	Ascomycota
49M5	30	<i>Epicoccum</i> sp.	mitosporic Dothideomycetes	Ascomycota
51M	31	<i>Cytospora</i> sp.	Diaporthales	Ascomycota
7M1	32	<i>Epicoccum</i> sp.	mitosporic Dothideomycetes	Ascomycota

NI, Não Identificado. M, meio extrato de malte para crescimento fúngico; IS, fungo isolado.

Os resultados obtidos (Tabela 17) demonstraram uma grande diversidade de fungos filamentosos na pele humana algo que foi surpreendente devido à avaliação anterior da literatura onde foram descritos somente a *Malassezia* e *Candida* como residentes em peles sadias^{47,48}. É possível verificar que dentre os fungos identificados nas coletas de microbiota da pele humana, a maioria provem de meio ambiental (solo, ar, *plantas*), enquanto que alguns já foram citados como possíveis micro-organismos transientes da pele humana (por exemplo, dos gêneros *Epicoccum* e *Rhodotorula*)¹²³. Grande parte destes fungos são citados como micro-organismos oportunistas, isto é, podem se tornar patógenos ao homem ou a animais em condições favoráveis (baixa imunidade, condições ótimas de crescimento, etc.).

Dentre os fungos identificados podemos citar os dematiáceos dos gêneros *Alternaria*, *Cladosporium*, *Exophiala*, *Aureobasidium* e *Phoma*, que ocorrem no solo e nas plantas, sendo também responsáveis por infecções humanas e em animais de estimação. Podem, também, provocar micoses subcutâneas e cutâneas, comumente chamadas de feohifomicoses¹²⁴ que são infecções oportunistas pouco frequentes¹²⁵.

Espécies do gênero *Fusarium*, em geral saprófitas do solo, são fitopatógenos embora algumas espécies, quando em contato com humanos, podem causar um amplo espectro de doenças (infecções cutâneas, alergias e doenças angioinvasivas). As formas graves ocorrem em pacientes imunocomprometidos, especialmente em transplantados¹²⁶.

Fungos dos gêneros *Penicillium* e *Scolecobasidium* também são saprófitas do solo, parasitas de plantas e degradadores de material orgânico, que em contato

¹²³ Noble W.C., *The skin microflora and microbial skin disease*. Cambridge University Press, United Kingdom, **1993**.

¹²⁴ Grupo de infecções causadas por fungos da família Dematiaceae, a forma clínica mais comum é subcutânea e manifesta-se como lesões nodulares, verrucosas ou císticas, adquirida por implantação traumática, ocorrendo em pacientes imunodeprimidos ou não.

¹²⁵ Brakhage A.A., Zipfel P.F Human and Animal Relationships In: *The Mycota - A Comprehensive Treatise on Fungi as Experimental Systems for Basic and Applied Research*. Cap. VI, 2nd Edition, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, **2008**.

¹²⁶ Dignani M.C., Anaissie E. *Clin. Microbiol. Infect.* **2004**, 10: 67–75.

com humanos, tornam-se oportunistas podendo geralmente causar micoses e alergia de contato¹²⁷.

3.3.2 Conclusão Parcial

A metodologia utilizada para as análises de avaliação de polimorfismo genético pelo método de ARDRA e identificação molecular dos 41 fungos estudados foi empregada com sucesso, pois permitiu o conhecimento da diversidade dos isolados, bem como a identificação em nível de gênero de 28 isolados dentre os 31 submetidos ao sequenciamento e análise filogenética.

A diversidade fúngica caracterizada neste trabalho sinaliza que o ser humano está cada vez mais exposto a novos micro-organismos, principalmente de origem ambiental, que podem alterar a composição de sua microbiota normal, comprometer o seu sistema imune e causar diversas doenças. Tais alterações podem ser provenientes do estilo de vida da população atual, incluindo uma alimentação baseada em grandes quantidades de produtos industrializados, mudanças nos hábitos de higiene (como o uso de cosméticos), maior sedentarismo proporcionado pelo acesso a tecnologias, o aumento da jornada de trabalho e alto nível de estresse do cotidiano. Outro ponto crucial é o uso indiscriminado de medicamentos, como antibióticos, que pode levar a uma seleção de micro-organismos resistentes muitas vezes, sendo estes oriundos da própria microbiota do indivíduo.

¹²⁷ Fleming R.V., Thomas M.D.J., Anaissie E.J. *Infect. Dis. Clin. N. Am.* **2002**, 915-933.

3.4 Degradação de insumos de fragrâncias pela a microbiota da pele mediante multibiorreação

Para investigar a degradação de insumos de fragrâncias e também o potencial biocatalítico da microbiota da pele humana, utilizamos ensaios de multibiorreação, que se baseia na reação de um micro-organismo (ou um consórcio microbiano) com vários substratos simultaneamente (item 1.6.7)¹⁰⁸. Neste trabalho, os ensaios de multibiorreação foram realizados com alguns representantes dos consórcios de bactérias, de leveduras e também fungos filamentosos isolados, os quais foram selecionados por apresentarem maior atividade enzimática nos ensaios de triagem de alto desempenho (item 3.2).

3.4.1 Seleção de substratos para ensaios de multibiorreação

Para os ensaios de multibiorreação foram utilizados como substrato uma série de insumos amplamente empregados em fragrâncias, os quais foram selecionados levando em conta a diversidade estrutural e grupos funcionais específicos. Isso permitiu associar as atividades enzimáticas expressas pelos micro-organismos testados com as possíveis reações de degradação dos insumos em questão.

A seleção de insumos foi realizada a partir de uma lista com mais de 100 compostos comumente utilizados em fragrâncias, gentilmente disponibilizada pelo Núcleo Olfativo da empresa Natura Inovação e Tecnologia de Produtos e também pela avaliação dos resultados dos ensaios enzimáticos realizados com os micro-organismos da microbiota de pele. Insumos estruturalmente diversos, contendo grupos funcionais suscetíveis a atividades enzimáticas foram selecionados compondo um grupo de 6 ésteres para a detecção de esterases, 6 cetonas para oxidoredutases e 3 derivados de enxofre para a detecção de sulfoxidasas.

A pureza de cada um dos insumos selecionados foi avaliada por CG-EM, já que muitos podem ser misturas de compostos. Além disso, a degradação de cada insumo frente a oxigênio e luz foi previamente avaliada utilizando as mesmas condições dos ensaios de multibiorreação (solução tampão fosfato pH 7,

temperatura de 28°C, agitação de 200 rpm e tempo de 72 horas). Desta forma foi possível selecionar o conjunto de insumos a serem usados.

3.4.2 Biotransformação de ésteres utilizados em fragrâncias

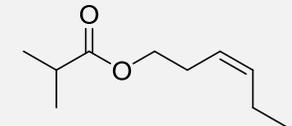
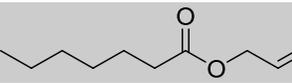
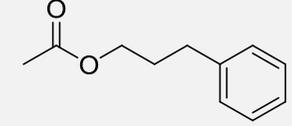
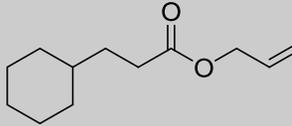
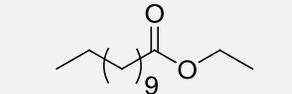
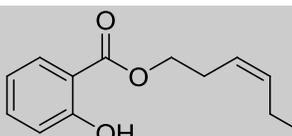
Ésteres são substâncias encontradas na natureza, ocorrendo em plantas e animais e amplamente utilizadas em aromas e fragrâncias, principalmente para imitar notas de frutas, possuindo características olfativas muito importantes. Entretanto, sua aplicação em fragrâncias de uso cosmético é limitada, já que os ésteres são pouco estáveis frente às condições da pele humana (pH e transpiração), podendo sofrer hidrólise, originando ácidos carboxílicos, os quais possuem muitas vezes odor desagradável¹²⁸.

Neste trabalho, a triagem enzimática para esterases permitiu selecionar consórcios de bactérias e leveduras, além de fungos filamentosos com atividade enzimática significativa. Esses micro-organismos foram selecionados para as multibiorreações a fim de verificar as atividades detectadas e também a habilidade dos mesmos em degradar especificamente os ésteres de fragrâncias selecionados (Tabela 18).

Para a realização das reações de biotransformação de ésteres foram selecionados os consórcios de bactérias 2NA, 9NA, 20NA e 39NA; os consórcios de leveduras 3YMA, 25YMA, 27YMA e 38YMA e os fungos filamentosos 7M1, 14M, 30M1, 30M2 e 42M.

¹²⁸ Rowe, D.J. Chemistry and Technology of Flavors and Fragrances. 2005, Blackwell Publishing Ltd. CRC Press, Boca Raton, USA.

Tabela 18. Ésteres selecionados para os ensaios de multibiorreações¹²⁹.

#	Estrutura	Nome Comercial/ Químico	Nº CAS	Nota Olfativa
18		Verdural B extra isobutirato de <i>cis</i> -3-hexenila	41519-23-7	Frutal (pera, maçã)
19		Heptilato de alila heptanoato de alila	142-19-8	Frutal (banana)
20		Acetato de hidrocinaamila acetato de 3-fenilpropila	122-72-5	Floral (mel)
21		"Ester de abacaxi" 3-cicloexilpropanoato de alila	2705-87-5	Frutal (abacaxi)
22		Laurato de etila dodecanoato de etila	106-33-2	Frutal (metálico)
23		Salicilato de 3-hexenila (<i>Z</i>)-2-hidroxibenzoato de 3-hexenila	65405-77-8	Floral/Verde (balsâmico)

A mistura de ésteres (**18-23**) foi testada com cada consórcio ou fungo selecionado em um único pote reacional (Erlenmeyer). As multibiorreações foram realizadas utilizando 5 mg de cada substrato (totalizando 30 mg) e 2 g de células (massa úmida) do micro-organismo em solução de tampão fosfato (pH 7,0). As reações foram monitoradas por CG-EM em intervalos de 24, 48 e 72 horas, sendo as alíquotas previamente derivatizadas aos correspondentes ésteres metílicos com diazometano (Parte Experimental, Cap. 5). O perfil cromatográfico da mistura de ésteres de fragrâncias utilizadas nos ensaios pode ser visualizado na Figura 22. As reações de hidrólise esperadas para cada um dos ésteres encontram-se representadas no Esquema 5. Os produtos das reações foram elucidados através de seus espectros de massas.

¹²⁹ Arctander S. *Perfum and flavor chemicals (aroma chemicals)*, V 1-2, Allured Publishing Corporation, USA, 1993.

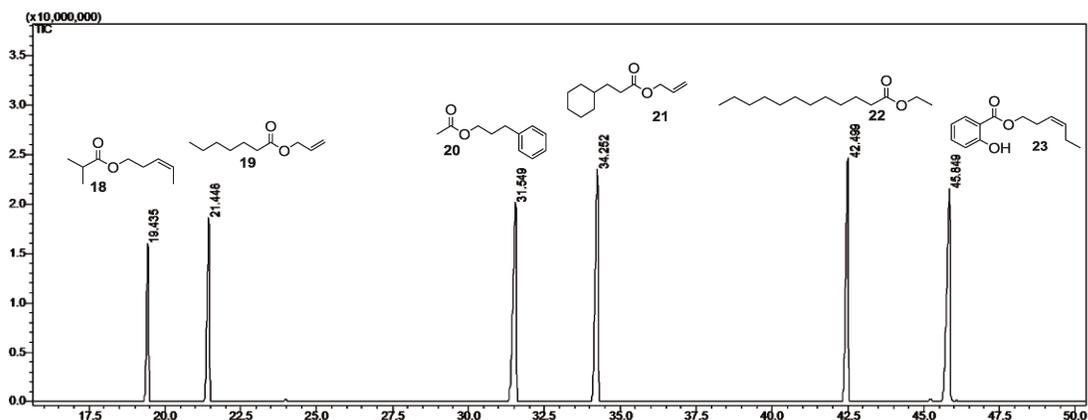
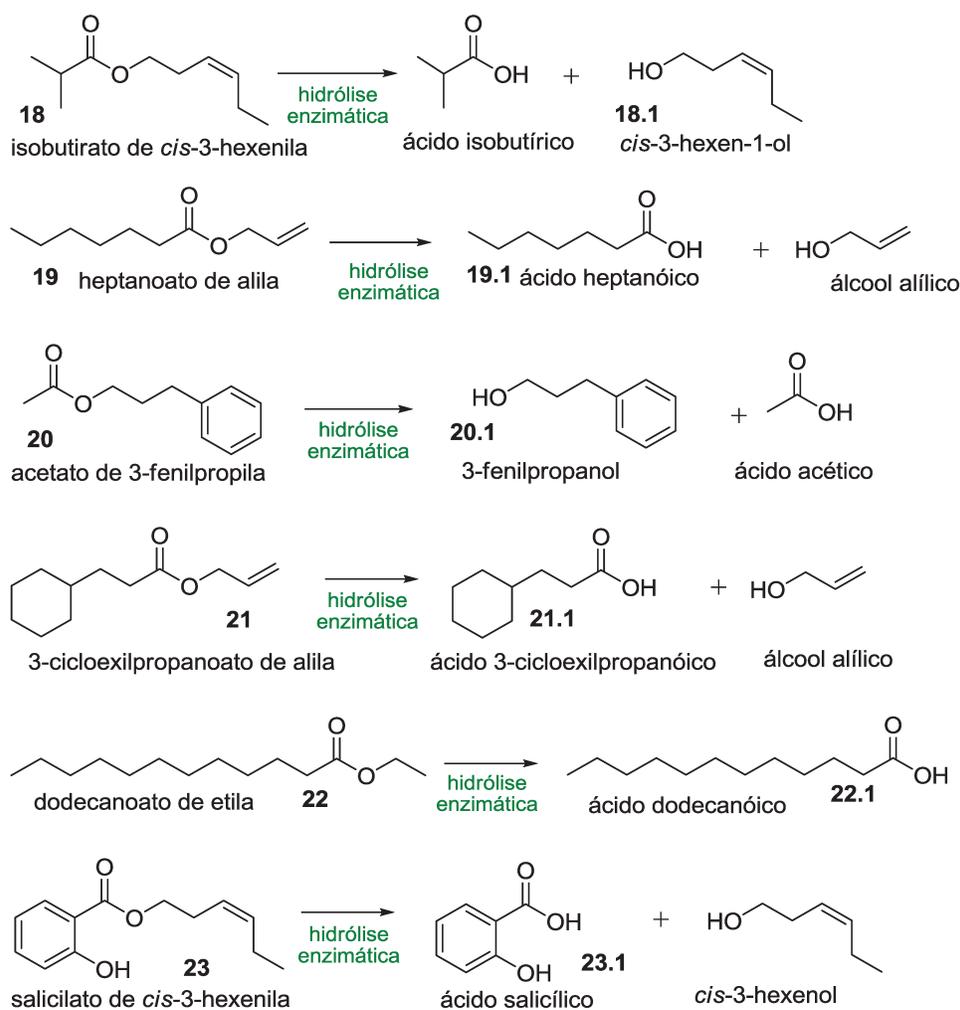


Figura 22. Perfil cromatográfico da mistura de ésteres (18-23) utilizada nos ensaios de multibiorreações. Espectros de massas de cada éster em anexo (E1-E6, anexo V).



Esquema 5. Ésteres utilizados nas multibiorreações e os produtos monitorados.

Dentre os consórcios de bactérias, podemos destacar o consórcio 2NA (coletado de homem com pele fototipo II) que hidrolisou a maioria dos ésteres testados, com exceção do salicilato de *cis*-3-hexenila (**23**). Conforme a Figura 23, podemos observar que o consórcio de bactérias 2NA hidrolisou parte do éster **18** liberando ácido isobutírico (não detectado na corrida cromatográfica) e *cis*-3-hexenol (**18.1**, m/z 100, E-7, anexo V), enquanto o éster **19** foi hidrolisado levando a formação do ácido heptanóico (**19.1**, m/z 144, éster metílico, E-8, anexo V) e álcool alílico.

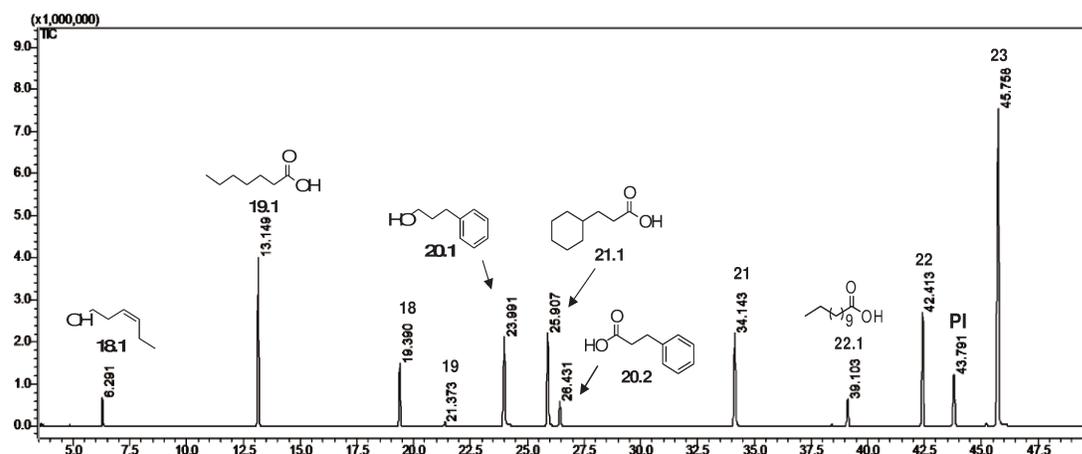
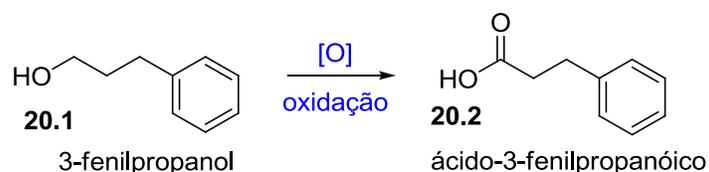


Figura 23. Cromatograma de íons totais (CG-EM) da multibiorreação de ésteres com o consórcio de bactérias 2NA (24hs de reação). PI: Padrão Interno (benzofenona). Produtos analisados na forma de seus ésteres metílicos (derivatização com diazometano).

Já o éster **20** foi totalmente consumido liberando ácido acético e 3-fenilpropanol (**20.1**, m/z 136, E-9, anexo V), sendo que este último sofreu uma reação de oxidação enzimática levando a formação do ácido fenilpropanóico (**20.2**, Esquema **6**). A formação do ácido **20.2** foi confirmada pelo espectro de massas (m/z 164, éster metílico, E-10, anexo V). Lembrando que todas as amostras foram tratadas com diazometano antes da realização da análise por CG-EM. O consórcio 2NA também hidrolisou o éster **21** levando a formação do ácido 3-cicloexilpropanóico (**21.1**, m/z 170, éster metílico, E-11, anexo V), enquanto o éster **22** foi hidrolisado liberando o ácido láurico (**22.1**, m/z 214, éster metílico, E-12, anexo V) e o éster **23** não sofreu qualquer alteração.



Esquema 6. Oxidação do álcool **20.1** com a formação do ácido **20.2**.

Os ensaios de multibiorreação demonstraram que uma alta expressão de esterases, as quais foram evidenciadas pela hidrólise dos substratos testados, confirmando assim os resultados obtidos nos ensaios de triagem. Além disso, permitiram uma melhor avaliação do potencial enzimático dos micro-organismos analisados frente aos compostos de fragrâncias (Tabela 19).

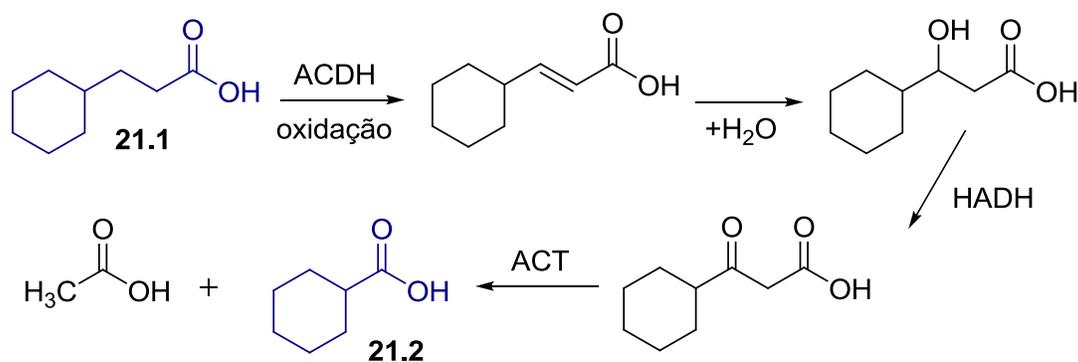
Tabela 19. Biotransformação de ésteres de fragrâncias (Tab. 18) por consórcios de bactérias da pele.

Substrato	Produtos ^b	% conversão de 18-23 pelos consórcios em 24 horas ^a			
		2NA	9NA	20NA	39NA
18	 18.1	22	na	na	nd
19	 19.1	92	nd	nd	5
20	 20.1	63	nd	nd	2
20	 20.2	16	72	70	6
21	 21.1	39	4	14	68
21	 21.2	nd	22	61	10
22	 22.1	17	nd	nd	nd
23	 23.1	nd	nd	1	na

a, conversão percentual calculada pela fórmula: $\%C_{(t)} = [(Área\ Produto_{(t)} \times Conc.\ PI) / (Área\ PI_{(t)} \times Conc.\ Substrato)] \times 100$; **na**, não avaliado neste ensaio; **nd**, não detectado; **b**, produtos analisados na forma de seus ésteres metílicos (derivatizados com diazometano). **NA**, consórcios obtidos em meio NA (bactérias).

A Tabela 19 traz todos os resultados obtidos nos ensaios de multibiorreação com os consórcios de bactérias. Em todos os consórcios confirmou-se a presença de esterases, responsáveis pela hidrólise de compostos com estruturas químicas diferenciadas. Os ésteres **22** e **23** foram menos susceptíveis à reação de hidrólise, provavelmente por necessitarem de enzimas mais específicas já que o primeiro é um éster de cadeia linear longa e o segundo é um ácido carboxílico ligado diretamente em anel aromático com hidroxila, o que pode torná-lo menos compatível com as enzimas em questão. Enquanto o 3-cicloexilpropanoato de alila (**21**) foi hidrolisado por todos os consórcios de bactérias testados.

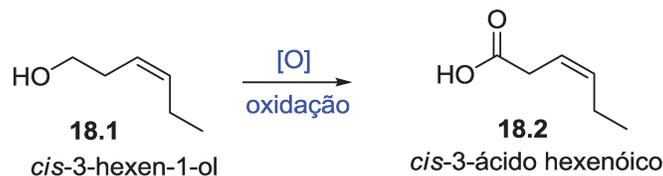
Reações de oxidação também foram observadas, como no caso do álcool primário (**20.1**) que foi oxidado formando o ácido carboxílico (**20.2**), indicando a presença de álcool desidrogenases. Além disso, nas multibiorreações com os consórcios 9NA, 20NA e 39NA, a hidrólise do éster **21** levou a formação do ácido carboxílico **21.1** que sofreu uma β -oxidação (**21.2**, Esquema 7), reação de oxidação de um ácido carboxílico em seu carbono β , muito comum no metabolismo de ácidos graxos¹³⁰. Através do espectro de massas foi possível confirmar a formação o ácido **21.2**, onde fragmentação mostra a perda do radical metoxila (M-31) (m/z 142, éster metílico, E-13, anexo V).



Esquema 7. β -Oxidação do ácido **21.1** com a formação do ácido **21.2**. ACDH, enzima acil-CoA desidrogenase; EDH, enzima enoil-CoA hidratase; HADH, β -hidroxiacil-CoA desidrogenase; ACT, enzima acetil-CoA tiolase^{130a}.

¹³⁰ a) Kunau, W-H.; Dommes, V.; Schulz, H. *Prog. Lipid Res.* **1995**, *4*, 267-342. b) Dutta, T. K.; Harayama, S. *Appl. Environ. Microbiol.* **2001**, *67*, 1970-1974.

Dentre os consórcios de leveduras testados, a Figura 24 mostra o perfil cromatográfico da multibiorreação de ésteres com o consórcio 38YMA (coletado de mulher com pele fototipo II) nos ensaios de multibiorreação. As biotransformações observadas foram semelhantes às observadas para os consórcios de bactérias. Observa-se a hidrólise de quase todos os ésteres testados (**18-22**), sendo que o éster **18** foi hidrolisado liberando o *cis*-3-hexenol (**18.1**), o qual sofreu subsequente oxidação gerando o ácido carboxílico **18.2** (Esquema 8, *m/z* 130, E-14, anexo V. O éster **19** também sofreu hidrólise liberando o ácido heptanóico (**19.1**), enquanto o éster **20** foi quase todo biotransformado gerando fenilpropanol (**20.1**), que foi parcialmente oxidado a ácido fenilpropanóico (**20.2**).



Esquema 8. Oxidação do álcool **18.1** com a formação do ácido **18.2**.

O éster **21** foi totalmente hidrolisado levando a formação de álcool alílico e ácido 3-cicloexilpropanóico (**21.1**), o ácido formado sofreu uma β -oxidação com a diminuição no número de carbonos e formação do ácido **21.2**. O éster **22** também hidrolisou formando o seu ácido carboxílico correspondente (**22.1**). Neste ensaio o éster **23** também não foi biotransformado.

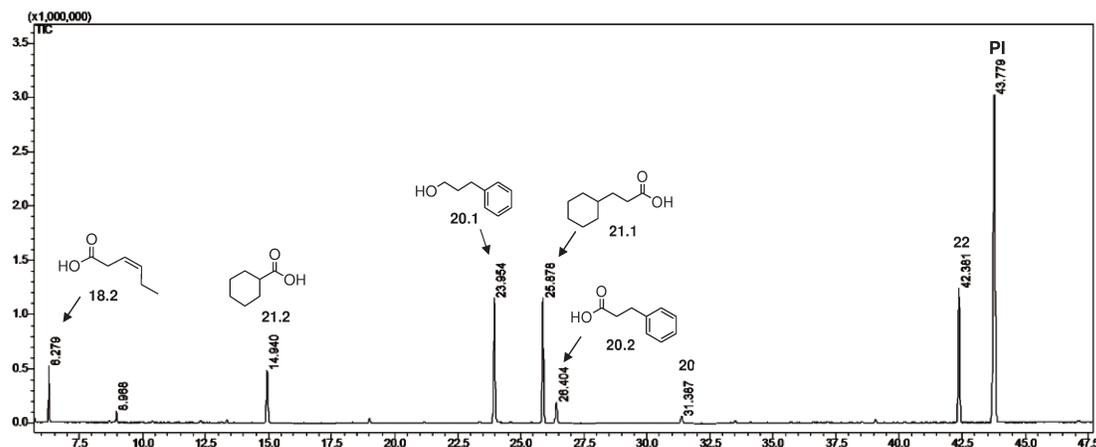
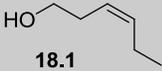
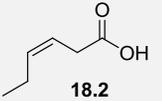
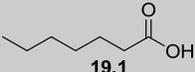
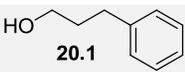
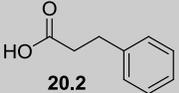
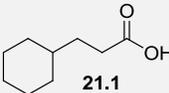
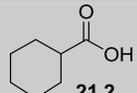
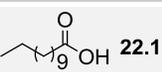
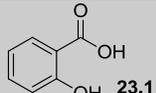


Figura 24. Cromatograma de íons totais (CG-EM) da multibiorreação de ésteres com o consórcio de leveduras 38YMA (24h de reação). PI, Padrão Interno (benzofenona). Produtos analisados na forma de seus ésteres metílicos (derivatização).

Na Tabela 20 pode-se verificar que as multibiorreações com os consórcios de leveduras mostraram alguns resultados diferentes dos de bactérias. Observou-se a hidrólise de quase todos os ésteres testados (**18-23**), sendo que os ésteres **20** e **21** foram totalmente hidrolisados (91,5% e 98%). Nestes ensaios, as reações de oxidação foram mais pronunciadas, já que além da formação de ácidos carboxílicos a partir do 3-fenil propanol (**20.1**), houve a formação do ácido carboxílico (**18.2**) a partir do álcool precursor (**18.1**). Além disso, também se evidencia a β -oxidação ao éster **21.2** em três dos quatro consórcios testados, enquanto o éster **23** foi hidrolisado liberando o ácido salicílico (**23.1**, m/z 152, éster metílico, E-15, anexo V) por dois consórcios de leveduras.

Tabela 20. Biotransformação de ésteres de fragrâncias (Tab. 18) por consórcios de leveduras da pele (tempo de 24 horas).

Substrato	Produto ^b	% conversão de 18-23 pelos consórcios de leveduras ^a			
		3YMA	25YMA	27YMA	38YMA
18	 18.1	<i>na</i>	<i>na</i>	<i>na</i>	42
18	 18.2	<i>na</i>	<i>na</i>	<i>na</i>	9
19	 19.1	74	89	<i>nd</i>	3
20	 20.1	73	37	41	80
20	 20.2	19	32	<i>nd</i>	12
21	 21.1	87	71	<i>nd</i>	71
21	 21.2	<i>nd</i>	3	16	27
22	 22.1	97	78	<i>nd</i>	2
23	 23.1	8	5	<i>nd</i>	<i>na</i>

a, conversão percentual calculada pela fórmula: $\%C_{(t)} = [(Área \text{ Produto}_{(t)} \times Conc. \text{ PI}) / (Área \text{ PI}_{(t)} \times Conc. \text{ Substrato})] \times 100$; **na**, não avaliado neste ensaio; **nd**, não detectado; **b**, produtos analisados na forma de seus ésteres metílicos (derivatização com diazometano). **YMA**, consórcios obtidos em meio YMA (leveduras).

Já nos ensaios realizados com fungos filamentosos destacam-se os resultados obtidos com o fungo 30M1 (coletado de mulher de origem asiática). Neste ensaio pode-se observar a hidrólise dos ésteres **20** e **21** através da formação de fenilpropanol (**20.1**) e do ácido 3-cicloexilpropanóico (**21.1**) (Figura 25). Os produtos formados durante a reação de hidrólise sofreram nova reação de oxidação formando o ácido fenilpropanóico (**20.2**) e o ácido ciclohexanóico (**21.2**), respectivamente.

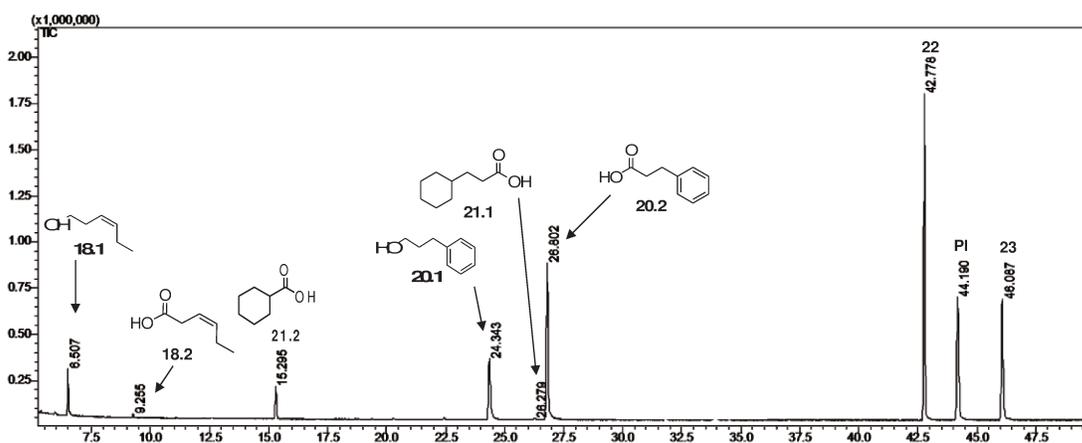
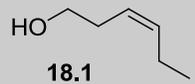
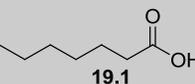
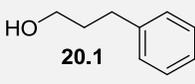
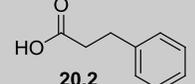
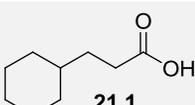
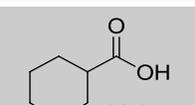
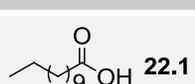
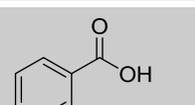


Figura 25. Cromatograma de íons totais (CG-EM) da multibiorreação de ésteres com fungo filamento 30M1 (48h de reação). PI, Padrão Interno (benzofenona). Produtos analisados na forma de seus ésteres metílicos (derivatização).

Os resultados das multibiorreações com os fungos filamentosos foram semelhantes aos demais (Tabela 21). Entretanto, nestes ensaios pode-se se detectar a hidrólise do éster **22** por três dos quatro fungos analisados, em conversões que variaram entre 2% e 77%, bem como a hidrólise do substrato **23** pelo fungo 42M. Podem-se destacar também as altas conversões na hidrólise do éster aromático **20** (75% a 97%), além de oxidação dos substratos **20** e **21**, com conversões de 69% e 95%, respectivamente.

Tabela 21. Biotransformação de ésteres de fragrâncias (Tab. 18) pelos fungos filamentosos da pele.

Substrato	Produtos ^b	% conversão de 18-23 pelos fungos em 48 horas ^a				
		7M-1	14M	30M-1	30M-2	42M
18	 18.1	33	9	<i>nd</i>	40	<i>na</i>
19	 19.1	90	6	<i>nd</i>	6	<i>nd</i>
20	 20.1	96	98	28,6	96	75
20	 20.2	1	1	69	3	10
21	 21.1	35	23	1	21	<i>nd</i>
21	 21.2	<i>nd</i>	<i>nd</i>	17	<i>nd</i>	95
22	 22.1	19	77	<i>nd</i>	2	20
23	 23.1	<i>na</i>	<i>nd</i>	<i>nd</i>	<i>nd</i>	28

a, conversão percentual calculada pela fórmula: $\%C_{(t)} = [(Área Produto_{(t)} \times Conc. PI) / (Área PI_{(t)} \times Conc. Substrato)] \times 100$; **na**, não avaliado neste ensaio; **nd**, não detectado; **b**, produtos analisados na forma de seus ésteres metílicos (derivatização com diazometano). **M**, fungos obtidos em meio MEA.

3.4.2.1 Conclusão Parcial

Os ensaios de multibiorreação de ésteres com os consórcios de microorganismos de pele bem como os fungos filamentosos isolados mostraram uma ampla atividade de esterases, responsáveis pela hidrólise de compostos com estruturas químicas diferenciadas, e ainda uma atividade álcool desidrogenase bem interessante, capaz de realizar a oxidação de álcoois primários, tanto com cadeia aromática como alifática. Este tipo de oxidação enzimática é de relevância industrial, por ser aplicável a uma variedade de álcoois e ainda não amplamente explorada¹³¹, a enzima *2-feniletanol desidrogenase* é um exemplo de álcool desidrogenase que vem sendo muito estudada e que já foi identificada em bactérias do gênero *Brevibacterium*, comumente encontrada na pele humana¹³².

Analisando os resultados das multibiorreações pela origem e tipo de microorganismos testados, grande parte dos consórcios de bactérias, de leveduras e fungos testados foi capaz de degradar os ésteres selecionados. Além disso, os consórcios de bactérias obtidos de homens com pele fototipo II e III, os consórcios de leveduras de mulheres com pele fototipo V e os fungos filamentosos de mulheres de origem asiática mostraram maior índice de degradação para todos os ésteres de fragrância testados.

Além disso, se avaliarmos os resultados obtidos do ponto de vista olfativo, durante a execução dos ensaios de biocatálise pode-se notar uma mudança significativa de odor de cada uma das reações, destacando-se a nota marcante do álcool alílico devido ao odor pungente que remete a alho, além dos ácidos carboxílicos liberados que também tem um odor graxo característico e muitas vezes desagradável, como exemplos o ácido isobutírico (odor rançoso), heptanóico (odor azedo) e láurico (odor de gordura côco).

¹³¹ Hirano, J.-I.; Miyamoto, K.; Ohta, H. *Tetrahedron Letters*, **2008**, 49, 1217–1219.

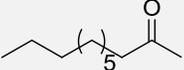
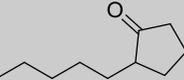
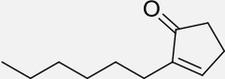
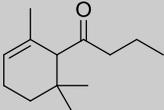
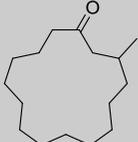
¹³² Buhler, B.; Witholt, B.; Hauer, B.; Schmid, A. *Appl. Environ. Microbiol.*, **2002**, 68, 560–568.

3.4.3 Biotransformação de cetonas utilizadas em fragrâncias

As cetonas são importantes na indústria de aromas e fragrâncias, sendo responsáveis pelas principais notas florais usadas atualmente, além de algumas notas doces e frutadas. Os substratos usados nos ensaios de multibiorreação foram selecionados entre inúmeras cetonas sintéticas mais comumente utilizadas em fragrâncias com notas florais, que formam um grupo de seis cetonas acíclicas e cíclicas com estruturas químicas variadas (Tabela 22).

A modificação enzimática da nota floral que essas cetonas representam pode ser ocasionada principalmente pela redução da carbonila a álcool por álcool desidrogenases e pela oxidação da cetona a éster ou lactona por Baeyer-Villiger mono-oxigenase. Assim as triagens enzimáticas anteriores serviram de suporte para a seleção dos micro-organismos para os ensaios de multibiorreação, os consórcios de bactérias 9NA, 20NA e 40NA; consórcios de leveduras 3YMA, 25YMA, 27YMA e 38YMA; os fungos filamentosos 7M1, 28M7-IS1, 30M1, 30M2 e 42M.

Tabela 22. Cetonas selecionadas para os ensaios de multibiorreação¹²⁹.

#	Estrutura	Nome Comercial/Químico	Nº CAS	Nota Olfativa
24		Metil nonil cetona undecan-2-ona	112-12-9	Floral (rosa, íris)
25		Quintona 2-pentilciclopentanona	4819-67-4	Floral (jasmin, doce)
26		Diidroisojasmona 2-hexilciclopent-2-en-1-ona	95-41-0	Floral/Verde (jasmin, verde)
27		Diidro- α -ionona 4-(2,6,6-trimetilcicloexil)-2-butanona	31499-72-6	Floral (íris, violeta)
28		Muscona 3-metilciclopentadecanona	541-91-3	“Musk” (almíscar)

As multibiorreações foram realizadas utilizando a mistura de cetonas (24-29) (5 mg de cada substrato, totalizando 20-30 mg) e 2 g de células (massa úmida) do micro-organismo em solução de tampão fosfato (pH 7,0). As reações foram monitoradas por CG-EM por alíquotas em intervalos de 24, 48 e 72 horas (Parte Experimental, Cap. 5). O perfil cromatográfico da mistura de cetonas de fragrâncias utilizadas nos ensaios pode ser visualizado na Figura 26.

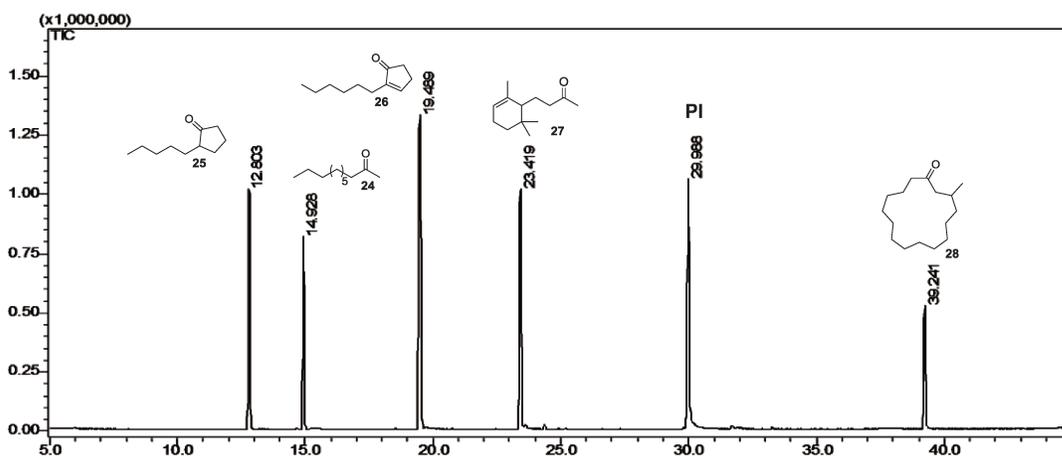


Figura 26. Perfil cromatográfico da mistura de cetonas (24-28) utilizada nos ensaios de multibiorreações. Espectros de massas de cada cetona em anexo (E-16-E-20, anexo V).

Dentre os ensaios de realizados, a Figura 27 traz o cromatograma da multibiorreação de cetonas com o fungo filamentososo 42M (coletado de uma mulher de origem asiática). Este fungo promoveu a redução da 2-undecanona (**24**) com a formação do 2-undecanol (**24.1**, Esquema 9, m/z 172, E-21, anexo V) e da 2-pentil-ciclopentanona (**25**) formando o respectivo álcool (**25.1**, Esquema 10, m/z 156, E-22, anexo V), onde os espectros de massas demonstraram a perda de água, característica de álcoois (M-18). Os demais substratos testados não sofreram qualquer tipo de biotransformação.

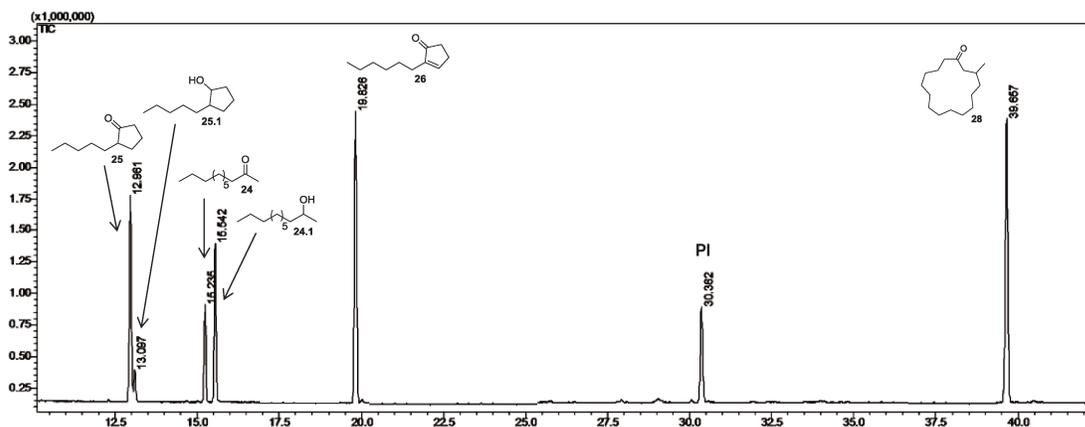
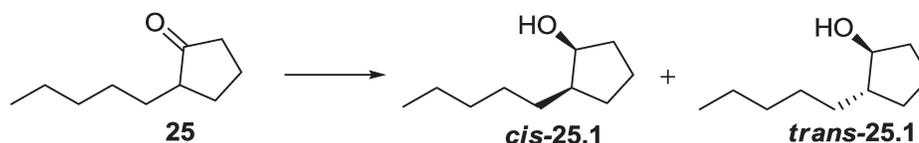


Figura 27. Cromatograma de íons totais (CG-EM) da multibiorreação de cetonas pelo fungo filamentoso 42M (48h de reação). PI, Padrão Interno (benzofenona).



Esquema 9. Redução da cetona **24** com a formação do álcool **24.1**.



Esquema 10. Redução da cetona **25** com a formação do álcool **25.1**.

O ensaio de multibiorreação de cetonas com o fungo 30M1 (coletado de uma mulher de origem asiática) também apresentou resultados interessantes. A Figura 28 mostra o perfil cromatográfico do ensaio de cetonas onde se observou a biotransformação da 2-pentilciclopentanona (**25**), tanto por reação de redução para formação do álcool **25.1** quanto por oxidação levando a formação da δ -decalactona **25.2** (Esquema 11, m/z 170, E-23, anexo V). A presença da lactona **25.2** foi confirmada através de comparação com padrão comercial e também pela avaliação do espectro de massas, onde o íon molecular tem um acréscimo de 16 *u.m.a.*, o que corresponde a um átomo de oxigênio.

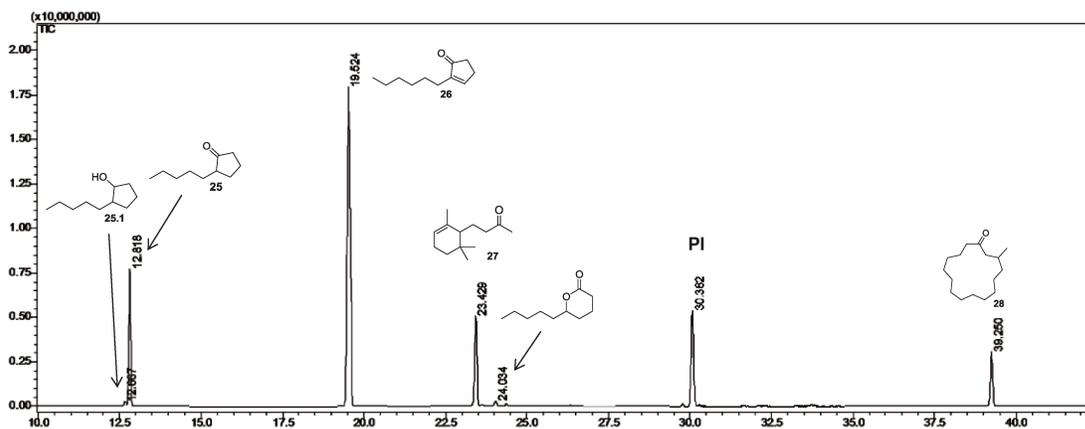
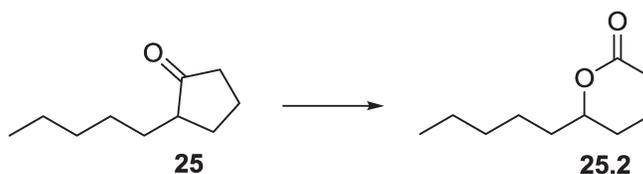


Figura 28. Cromatograma de íons totais (CG-EM) da biotransformação de cetonas pelo fungo filamentoso 30M2 (72h de reação). PI, Padrão Interno (benzofenona).

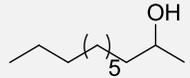
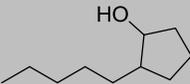
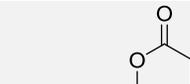


Esquema 11. Oxidação da cetona **25** com a formação da δ -decalactona **25.2**.

Os resultados gerais das multibiorreações com cetonas de fragrâncias podem ser visualizados na Tabela 23, sendo que os consórcios 9NA, 40NA, 3YMA, 25YMA e 27YMA e o fungo filamentoso 7M-1 não apresentaram atividade frente aos substratos testados e, por isso, não se encontram descritos. De modo geral, a undecanona (**24**), uma cetona de cadeia linear, foi reduzida levando a formação do álcool correspondente (**24.1**) com destaque para os fungos filamentosos 28M7-IS1 e 42M que mostraram altas conversões para a redução deste substrato (85 e 64%). A 2-pentilciclopentanona cíclica **25**, por sua vez, sofreu redução com formação do respectivo álcool (**25.1**), com conversão de 40,7% pelo consórcio de leveduras 38YMA.

Nos ensaios efetuados foram detectadas apenas uma reação de oxidação da pentilciclopentanona (**25**) levando a formação da correspondente lactona (**25.2**) com conversões de 6% com o fungo filamentoso 30M2.

Tabela 23. Biotransformações observadas nas multibiorreações de cetonas com consórcios de bactérias, leveduras e fungos filamentosos.

Produtos	% conversão de 24 e 25 pelos micro-organismos ^a					
	20NA (24h)	38YMA (24h)	28M7-IS1 (48h)	30M1 (48h)	30M2 (48h)	42M (48h)
 <p>24.1</p>	30	4	2	3	6	49
 <p>25.1</p>	2	41	nd	2	3	79
 <p>25.2</p>	nd	nd	nd	nd	6	5

a, conversão percentual calculada pela fórmula: $\%C_{(t)} = [(Área\ Produto_{(t)} \times Conc.\ PI) / (Área\ PI_{(t)} \times Conc.\ Substrato)] \times 100$; **nd**, não detectado; **NA**, consórcios obtidos em meio NA (bactérias); **YMA**, consórcios obtidos em meio YMA (leveduras); **M**, fungos filamentosos obtidos em meio MEA.

A fim de avaliar a seletividade da biorredução da cetona **25**, o álcool racêmico foi obtido pela redução da 2-pentilciclopentanona com boridreto de sódio, sendo que os isômeros *cis*-**25.1** e *trans*-**25.1** foram isolados por coluna cromatográfica e analisados por CG-EM (Esquema 9, *m/z* 156), RMN de ¹H, de ¹³C, DEPT 90° e 135° (espectros E-28 a 33 anexo VI).

A diferenciação entre os isômeros *cis*- e *trans*-**25.1** foi realizada pela comparação dos deslocamentos químicos do espectro de RMN de ¹³C com dados da literatura. Segundo o estudo realizado por Ritchie e colaboradores¹³³, em anéis de cinco membros (ciclopentanos) o efeito estereoeletrônico (orientações CH₃-CH, e CH₃-OH) é responsável pela proteção dos C-1 e C-2 do isômero *cis* em relação aos mesmos carbonos do isômero *trans*- (Fig. 29).

¹³³ Ritchie, R.G.S.; Cyr, N.; Korch, B.; Koch, H.J.; Perlin, A.S. *Can. J. Chem.*, **1975**, 53, 1424-1433.

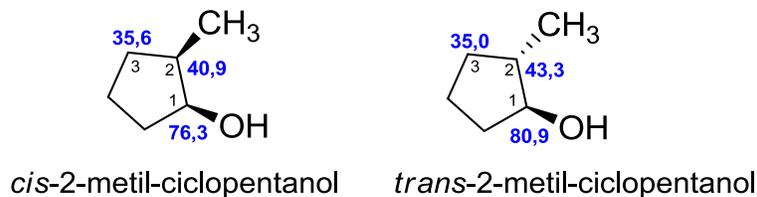


Figura 29. Deslocamentos químicos de ciclopentanol *cis*-/*trans*-disubstituídos¹³³.

Tabela 24. Dados espectroscópicos de RMN de ¹H e ¹³C para os diastereoisômeros *cis*- e *trans*-**25.1** (Anexo VI, E-28 a 33).

C#	 (+/-)- <i>cis</i> -25.1		 (+/-)- <i>trans</i> -25.1	
	δ_C	δ_H (mult., J)	δ_C	δ_H (mult., J)
C1	74,9	4,16 (<i>m</i> ; 1H; CH-OH)	79,3	3,80 (<i>q</i> , 5 e 6Hz; 1H; CH-OH)
C2	45,8	1,46 – 1,90 (<i>m</i> ; 7H)	48,4	1,41-2,00 (<i>m</i> , 8H)
C3-9*	34,7; 32,2; 29,1; 28,7; 28,3; 22,6; 21,8	1,2 – 1,45 (<i>s</i> ; 9H)	34,6; 33,8; 32,1; 30,0; 27,9; 22,6; 21,8	1,05-1,4 (<i>m</i> , 8H)
C10	14,0	0,92 (<i>t</i> ; 3H; 6,5Hz)	14,0	0,87 (<i>t</i> ; 3H; 6,5Hz)

*Devido à superposição dos sinais de RMN-¹H dos metilenos, as atribuições dos mesmos não foram realizadas, assim a tabela apresenta apenas a faixa de deslocamento químico em que ocorrem.

Durante a avaliação dos espectros de RMN de ¹³C (Tab. 24, espectros E-24 a 29, anexo IV) dos diastereoisômeros do 2-pentilciclopentanol, separados por coluna cromatográfica foi possível observar que o diastereoisômero *cis* apresentou sinais dos carbonos C1 (74,9 ppm) e C2 (45,8 ppm) mais protegidos, enquanto que no isômero *trans*, os mesmos carbonos eram mais desprotegidos (C-1; 79,3 ppm) e (C-2; 48,4 ppm). Este efeito foi consistente com os dados da literatura¹³³. Estes dados associados às análises de cromatografia CG-DIC quiral das frações contendo os diastereoisômeros permitiram identificar o isômeros *cis*-**25.1** com tempo de retenção de 20,510 e 20,082 min. e *trans*-**25.1** com tempos de retenção de 21,495 e 22,245 min., conforme mostra a Figura 30.

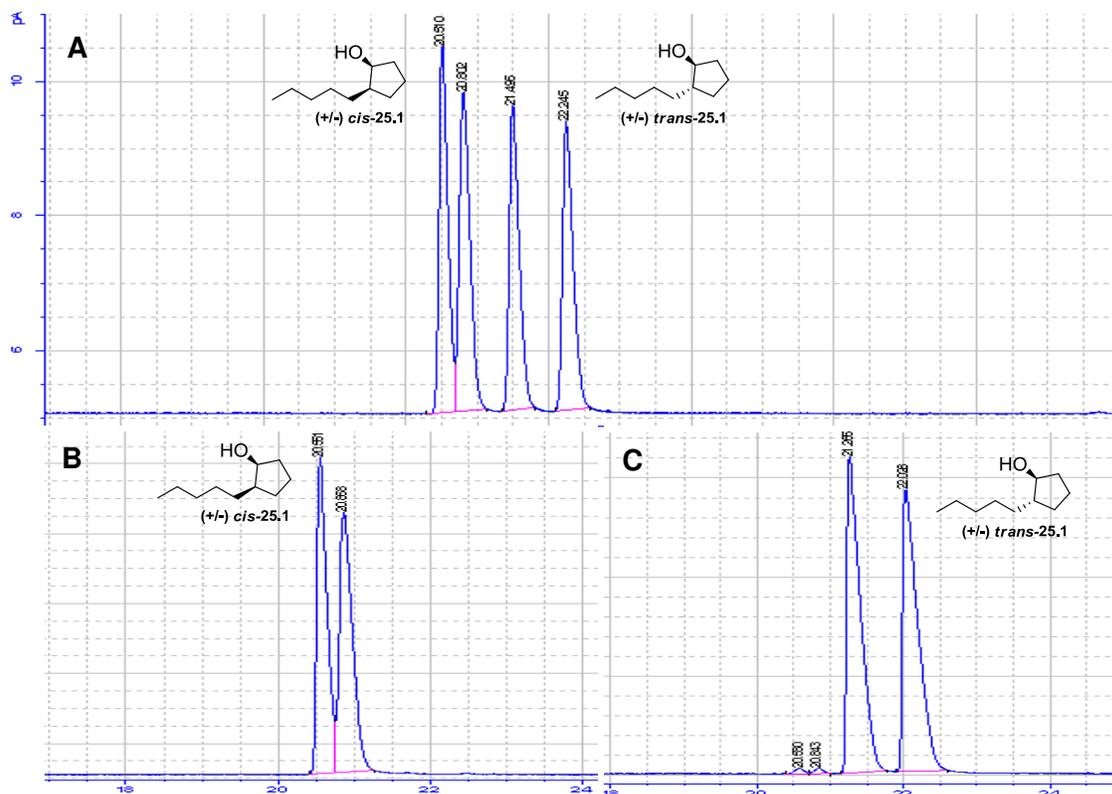
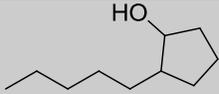


Figura 30. A, Cromatograma CG-DIC quiral da mistura cis/trans do 2-pentilciclopentanol 25.1 obtido por redução química. B, Cromatogramas CG-DIC quiral do cis-25.1 e do trans-25.1 separados por coluna cromatográfica. Condições de análise: 100 – 110 °C ($r = 0,3 \text{ } ^\circ\text{C min}^{-1}$), 180 °C ($r = 30 \text{ } ^\circ\text{C min}^{-1}$) espera de 5 min. T injetor = 200 °C, T detector = 240 °C, Fluxo constante = 1 mL min⁻¹. Coluna: Chrompack CD-Chirasil (25 m x 0,25 mm x 0,25 μm).

Visando avaliar a seletividade das reações observadas, foram selecionados consórcios de bactérias e leveduras e fungos isolados para serem reavaliados frente cetona **25** para monitorar a formação do álcool **25.1** levando em conta a diastereosseletividade e enantioseletividade da biotransformação. Neste caso, as reações biocatalíticas foram realizadas na presença de um único substrato, sendo os ensaios executados nas mesmas condições dos anteriores. A Tabela 25 apresenta os resultados obtidos para os ensaios de biotransformação da 2-pentilciclopentanona (**25**) pelo consórcio de leveduras (38YMA) e 4 fungos filamentosos.

Tabela 25. Excesso enantiomérico (% *ee*) e razão diastereoisomérica (% *rd*) observada para redução da cetona **25**.

Biocatalisador (48h)	 25.1		
	<i>ee</i> (<i>cis</i>) ^a	<i>ee</i> (<i>trans</i>) ^a	<i>rd</i> (<i>cis: trans</i>) ^b
38YMA	50	62	15 : 85
30M1	3	16	91 : 9
30M2	39	>99	77 : 33
42M	99	97	18 : 82

a, excesso enantiomérico calculado pela fórmula: $e.e. = [(A-B)/(A+B)] \times 100$, onde A e B são as áreas de cada enantiômero medidas no final da reação; **b**, razão diastereoisomérica calculada pela fórmula $\% r.d. = [(\sum \text{Área } A+A') / (\sum \text{Área } (A+A'+B+B'))] \times 100$. **YMA**, consórcios obtidos em meio YMA (leveduras); **M**, fungos filamentosos obtidos em meio MEA.

Os dados da Tabela 25 mostram resultados interessantes de seletividade, onde a biorredução da cetona **25** com o fungo filamentoso 30M2 (coletado de mulher asiática), apresentou uma alta enantiosseletividade para um dos enantiômeros do álcool *trans*-**25.1** (>99%), entretanto a razão diastereoisomérica foi maior para o álcool *cis*-**25.1** (77 : 33) e a conversão neste caso foi de apenas 2%. Já com o fungo 42M (coletado de mulher asiática), a conversão foi alta (78,5%), a enantiosseletividade para os dois álcoois também foi alta (*cis*, *ee*= 99% e *trans*, *ee*=97%) e a razão diastereoisomérica foi maior para o álcool *trans*-**25.1** (82:12).

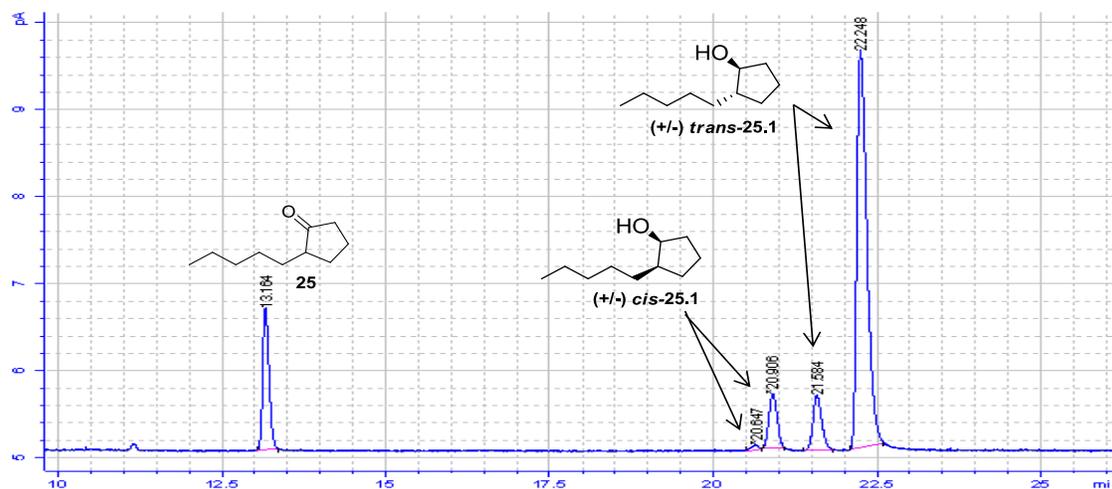


Figura 31. Cromatograma CG-DIC da redução da cetona **25** pelo consórcio de leveduras 38YMA. Condições de análise: 100 – 110 °C ($r=0,3 \text{ } ^\circ\text{C min}^{-1}$), 180 °C ($r=30 \text{ } ^\circ\text{C min}^{-1}$) espera de 5 min. T injetor = 200 °C, T detector = 240 °C, Fluxo constante = 1 mL min^{-1} . Coluna: Chrompack CD-Chirasil (25 m x 0,25 mm x 0,25 μm).

A Figura 31 apresenta ainda os resultados obtidos com o consórcio de leveduras 38YMA (coletado de mulher fototipo II) que promoveu a redução da cetona 25 com a formação do o álcool *trans*-25.1 com bons níveis de diastereosseletividade (85 : 15) e uma conversão de 40,7%. Entretanto, uma baixa enantiosseletividade foi observada ($ee=62\%$).

Os resultados dos ensaios de multibiorreação com cetonas de fragrâncias mostram maior ocorrência de reações de redução, principalmente frente a cetonas **25** e **26**. Diferente do esperado, os produtos de oxidação das cetonas quase não foram observados. Esta ausência de produtos de oxidação por BVMO na maioria das reações testadas pode ser justificada pela maior velocidade da reação de redução, formando álcoois das cetonas correspondentes frente às reações de oxidação. Outra possível causa é a condição reacional empregada nos ensaios podem que pode não ser adequadas para as reações de oxidação por BVMO.

Sabe-se que o processo de oxidação enzimática por BVMO com células íntegras, é limitado pelo suprimento de oxigênio, a estabilidade do biocatalisador e sua inibição pelo substrato e/ou produto formado¹³⁴. Além disso, muitos micro-organismos podem expressar hidrolases e álcool desidrogenases que podem, respectivamente, degradar a lactona formada e/ou promover a redução do substrato (cetona)¹³⁵.

Portanto, existe uma necessidade de avaliar condições experimentais que sejam mais adequadas para a promoção de reações de BVMO, utilizando células íntegras de fungos. Neste contexto, nosso grupo de pesquisa está desenvolvendo um estudo para avaliar fatores como concentração do biocatalisador, concentração do substrato e aeração em reações de oxidação enzimática¹³⁶.

¹³⁴ a) Woodley, J. M. *Org. Process Res. Dev.* **2008**, *12*, 660-665. b) Hilker, I.; Baldwin, C.; Alphand, V.; Furstoss, R.; Woodley, J.; Wohlgemuth, R. *Biotechnol. Bioeng.* **2006**, *93*, 1138-1144. c) Doig, S. D.; Avenell, P. J.; Bird, P. A.; Gallati, P.; Lander, K. S.; Lye, G. L.; Wohlgemuth, R.; Woodley, J. M. *Biotechnol. Prog.* **2002**, *18*, 1039-1046.

¹³⁵ Leisch, H.; Morley, K.; Lau, P.C.K. *Chem. Rev.* **2011**, *111*, 4165-4222.

¹³⁶ Porto, C.; Gonçalves, C.C.S.; Sette, L.; Bonugli-Santos, R.C.; Zampieri, D.S., Marsaioli, A. J. Baeyer-Villiger Monooxygenases (BVMO) from Human Skin Fungi. Sumetido para: *Journal Catalysis B: Enzymatic, Edição Especial Biotrans*, **2011**.

3.4.3.1 Conclusão parcial

Os ensaios de multibiorreação das microbiotas (bactérias e leveduras) e fungos filamentosos com cetonas evidenciaram uma presença mais significativa de oxidoredutases capazes de reduzir a 2-undecanona (**24**) e a 2-pentilciclopentanona (**25**). Apenas o fungo filamentoso 30M2 apresentou uma pequena atividade BVMO para **25**. A não obtenção do produto de oxidação por BVMO na maioria das reações testadas pode ser justificada pela maior velocidade da reação de redução, formando álcoois das cetonas correspondentes.

Avaliando os resultados obtidos do ponto de vista olfativo e de aplicação de fragrâncias, as reações de redução levaram a formação de produtos com características olfativas muito diferentes dos substratos originais. No caso da cetona **24** (floral), o álcool formado tem um odor que remete a rosa, mas com um fundo graxo, rançoso. Já no caso da cetona **25**, com nota floral (jasmim), ao sofrer a reação de redução forma um álcool correspondente com uma nota olfativa floral verde. Por sua vez, a reação de oxidação leva a formação da lactona derivada com uma nota frutada de pêssego cremoso.

Se avaliarmos os resultados obtidos levando em conta os dados de coleta dos micro-organismos, podemos verificar que as cetonas **24** e **25** foram reduzidas por micro-organismos coletados de mulheres representantes do fototipo II, V e de origem asiática. Ainda podemos destacar as representantes de origem asiática que foram as únicas a promoverem a oxidação, mesmo que com baixas conversões de **25**. Estes resultados podem indicar que pessoas com pele classificadas nestes fototipos podem ter maior propensão a degradar estes insumos.

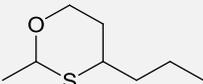
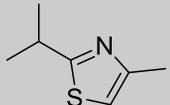
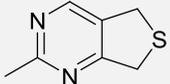
Uma vez que as cetonas avaliadas neste trabalho são comumente usadas em fragrâncias, as reações de biotransformação detectadas podem alterar significativamente o perfil olfativo do produto durante o uso, principalmente para as cetonas **24** e **25**. Por outro lado, os resultados enfatizam que a maioria dos produtos de perfumaria no caso das cetonas aqui testadas não foram biotransformadas por micro-organismos da pele, o que é um atributo desejável, se avaliar a estabilidade destes ingredientes ao metabolismo da pele humana e de sua microbiota.

3.4.4 Biotransformação de derivados de enxofre de fragrâncias

Ingredientes derivados de enxofre são insumos de aromas e fragrâncias extremamente potentes, usados em concentrações muito baixas, já que o sistema olfativo humano consegue captar quantidades muito pequenas destes (concentrações em *ppb*). São responsáveis pela caracterização de diversos odores naturais, como frutas, carne, alho e café. Para a realização dos ensaios de multibiorreação foram selecionados três derivados de enxofre (Tabela 26), comumente utilizados em composições de fragrâncias muito aplicadas em loções, xampus, condicionadores e sabonetes.

A alteração enzimática de compostos derivados de enxofre pode ocorrer principalmente pela oxidação do enxofre para sulfóxido ou sulfona por mono-oxigenases. Desta forma, os ensaios de triagem enzimática realizados anteriormente levaram a seleção dos micro-organismos para os ensaios de multibiorreação. Para a realização das reações de biotransformação de derivados de enxofre foram selecionados os consórcios de bactérias 9NA, 20NA e 40NA, os consórcios de leveduras 10YMA, 25YMA e 38YMA, além dos fungos filamentosos 7M1, 28M7-is1, 30M1, 30M2 e 42M.

Tabela 26. Derivados de enxofre selecionados para os ensaios de multibiorreação¹²⁹.

Cód	Estrutura	Nome Comercial/Químico	Nº CAS	Nota Olfativa
29		Oxano 2-metil-4-propil-1,3-oxatiano	59323-76-1	cítrico (pomelo, maracujá)
30		"Metiazol - pêssego" 2-isopropil-4-metiltiazol	15679-13-7	verde, frutal (cassis)
31		"Pirimidina - pipoca" 2-metil-5,7-diidrotieno[3,4-d]pirimidina	36267-71-7	"gourmand" (pipoca)

A mistura de derivados de enxofre (**29-31**) foi testada com cada consórcio ou fungo selecionado em um único pote reacional (Erlenmeyer). As multibiorreações foram realizadas utilizando 5 mg de cada substrato (totalizando 15 mg) e 2 g de células (massa úmida) do micro-organismo em solução de tampão fosfato (pH 7,0). As reações foram monitoradas por CG-EM com alíquotas obtidas em intervalos de 24, 48 e 72 horas. O perfil cromatográfico da mistura de derivados de enxofre utilizadas nos ensaios pode ser visualizado na Figura 32. Os produtos das reações foram elucidados através de seus espectros de massas.

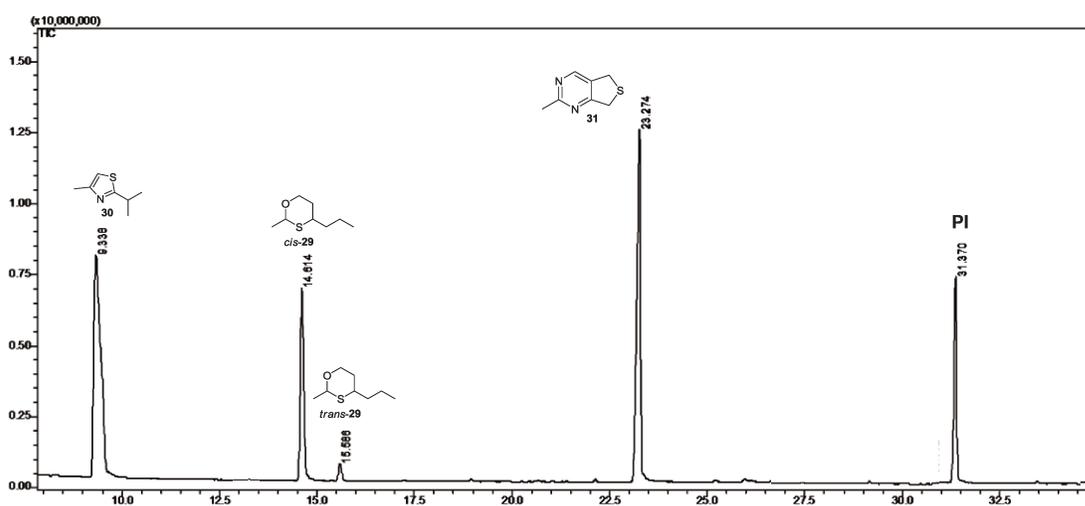


Figura 32. Perfil cromatográfico da mistura de derivados de enxofre (**29-31**) utilizada nos ensaios de multibiorreações. Espectros de massas de cada derivado de enxofre encontram-se em anexo (E-24 a E-26, anexo V). PI, Padrão Interno (benzofenona).

Dentre os micro-organismos testados, podemos destacar o fungo filamentoso 30M1 (coletado de mulher de origem asiática), que apresentou ótimos resultados para biotransformação de derivados de enxofre de fragrância. Na Figura 33 observa-se que ele foi capaz de oxidar os isômeros *cis*- e *trans*- do 1,3-oxatiano (**29**), formando os sulfóxidos correspondentes (Esquema 12, m/z 160, espectro E-27, anexo V) com uma conversão de 90%. Os substratos **30** e **31** não foram oxidados pelo fungo 30M1.

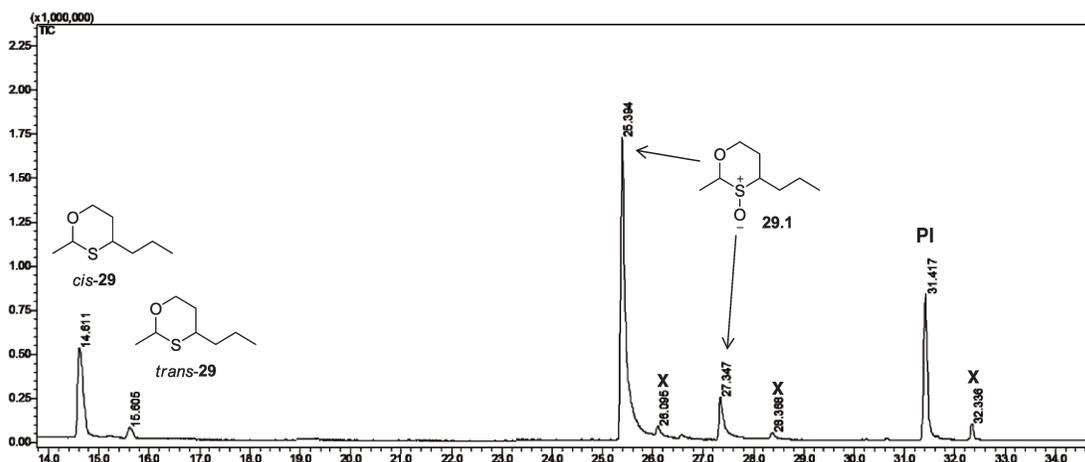
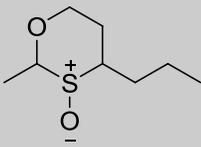
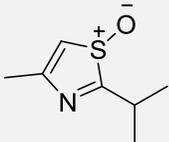
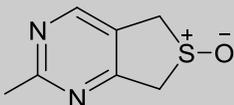


Figura 34. Cromatograma de íons totais (CG-EM) da biocatálise de **29** com o consórcio de bactérias 20NA (72h de reação). PI, Padrão Interno (benzofenona). (x) Picos relativos a degradação de um contaminante presente no insumo comercial de fragrância (oxano).

A Tabela 27 traz os resultados das multibiorreações com os micro-organismos selecionados, e apresenta o percentual de conversão de cada um dos substratos testados. Os consórcios de leveduras 10YMA, 25YMA e 38YMA não apresentaram atividade frente aos substratos testados e, por isso, não se encontram descritos. A maioria dos micro-organismos testados foi capaz de oxidar o substrato **29** com boas taxas de conversão, com destaque para o consórcio de bactérias 20NA (65% de conversão) e o fungo filamentoso 30M1 (90% de conversão). Nenhum dos micro-organismos testados foi capaz de oxidar os substratos **30** e **31**, algo justificável já que estes compostos heterocíclicos são bastante estáveis e apresentam atividade antimicrobiana¹³⁷, o que provavelmente limita a biotransformação dos mesmos pelos micro-organismos. Além disso, não encontramos relatos na literatura sobre os produtos de oxidação destes sulfetos **30** e **31**.

¹³⁷ a) Sadek, B.; Moawia Mohammad, M.; Fafehelbom, K. M. S. *Molecules*, **2011**, *16*, 9386-9396.

Tabela 27. Biotransformação dos derivados de enxofre por consórcios de bactérias e fungos filamentosos.

Cód.	Produtos	% Conversão dos substratos 29-31 ^a (72h)							
		9NA	20NA	40NA	7M1	28M7-is1	30M1	30M2	42M
29.1 ^b		57%	87%	2%	51%	67%	90%	50%	52%
30.1		nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
31.1		nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd

a, conversão percentual calculada pela fórmula: $\%C_{(t)} = [(Área\ Produto_{(t)} \times Conc.\ PI) / (Área\ PI_{(t)} \times Conc.\ Substrato)] \times 100$; **nd**, não detectado; **NA**, consórcios obtidos em meio NA (bactérias); **M**, fungos filamentosos obtidos em meio MEA.

O substrato **29** é amplamente utilizado na indústria de fragrâncias, a sua oxidação leva a alteração significativa de sua característica olfativa e o estudo de biotransformações utilizando este substrato pode ser de grande importância para o desenvolvimento de novos produtos. O sulfóxido **29.1** oriundo da oxidação de **29**, também já foi citados em estudos envolvendo novas fragrâncias e na avaliação de odores naturais de frutas como maracujá¹³⁸, sendo que cada um dos seus isômeros possui diferentes características olfativas¹³⁹.

Como os produtos de oxidação possuem três centros estereogênicos podem ser obtidos oito diastereoisômeros diferentes (Figura 35). As reações foram analisadas por cromatografia quiral, com o intuito de avaliar a seletividade da oxidação do substrato **29** para os correspondentes diastereoisômeros do sulfóxido **29.1**.

¹³⁸ Singer, G.; Heusinger, G.; Fröhlich, O.; Schreier, Mosandl, A. *J. Agric. Food. Chem.* **1986**, *34*, 1029-1033.

¹³⁹ Mosandl, A.; Heusinger, G., *Liebigs Ann. Chem.* **1985**, 1185-1191.

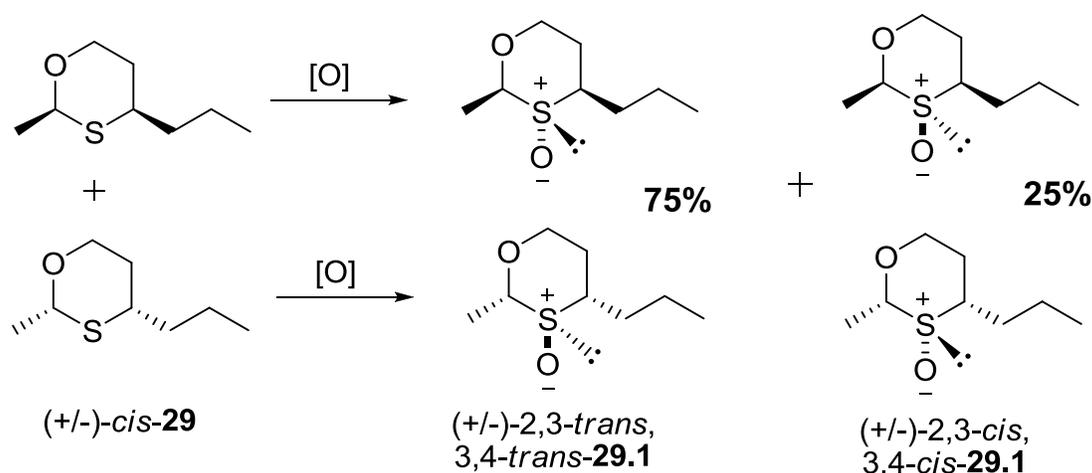


Figura 35. Diastereoisômeros do sulfóxido **29.1** formados a partir do *cis-29*.

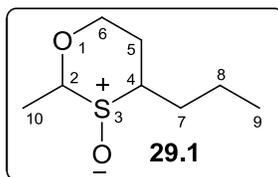
O estudo desenvolvido por Singer e colaboradores¹⁴⁰ mostra que a oxidação do isômero *cis-29* mediada por periodato de sódio é diastereosseletiva e leva a formação de uma proporção de 75:25 entre os possíveis isômeros do sulfóxido **29.1** (Fig. 35). A justificativa está baseada no fato de que o oxano em solução, adota uma conformação preferencial, com os grupos alquila (metila e propila) na equatorial e o grupo sulfeto permanentemente na axial (termodinamicamente favorável)¹⁴¹.

Com intuito de determinar a configuração relativa dos produtos formados nas reações de biocatálise, uma mistura de diastereoisômeros do sulfóxido **29.1** foi sintetizada através de oxidação com periodato de sódio, utilizando o insumo comercial como substrato (mistura *cis/trans-29*, 10:1). Assim, foi possível confirmar que a reação química é seletiva, com a formação majoritária de dois diastereoisômeros do sulfóxido. Um fracionamento em coluna cromatográfica levou ao isolamento de um deles, o qual foi analisado por CG-EM (Esquema 12, *m/z* 176), RMN de ¹H, de ¹³C, DEPT 90° e 135° (Tabela 29, espectros E-34 a 36, anexo VI).

¹⁴⁰ Singer, G.; Heusinger, G.; Mosandl, A.; Burschka, C. *Liebigs Ann. Chem.* **1987**, 451-453.

¹⁴¹ Pihlaja, K.; Sillanpää, R.; Dahlqvist, M.; Stájer, G.; Ahlgren, M. *Struct. Chem.*, **1993**, 4, 203-210.

Tabela 29. Dados espectroscópicos de RMN de ^1H e ^{13}C para o isômero de **29.1** isolado, em comparação com dados da literatura¹⁴⁰.



Cn	Experimental		Literatura ^b			
	2,3- <i>trans</i> , 3,4- <i>trans</i> - 29.1 ^a		2,3- <i>trans</i> , 3,4- <i>trans</i> - 29.1		2,3- <i>cis</i> , 3,4- <i>cis</i> - 29.1	
	δ_{C}	δ_{H} (mult., <i>J</i>)	δ_{C}	δ_{H} (mult., <i>J</i>)	δ_{C}	δ_{H} (mult., <i>J</i>)
C-2	93,4	4,12 (q; <i>J</i> =6,3Hz; 2a-H)	93,4	4,11 (q; <i>J</i> =6,5Hz; 1H; 2a-H)	87,1	4,19 (q, <i>J</i> =6,5Hz, 1H, 2a-H)
C-6	69,3	4,03 (ddd; 1H; 6e-H; <i>J</i> _{6eq,6ax} =12 Hz; <i>J</i> _{6eq,5ax} =4Hz; <i>J</i> _{6eq,5eq} =2Hz)	69,1	4,04 (ddd; 1H, 6e-H; <i>J</i> _{6eq,6ax} =12 Hz; <i>J</i> _{6eq,5ax} =4Hz; <i>J</i> _{6eq,5eq} =2Hz)	69,2	4,17 (ddd; 1H; 6e-H; <i>J</i> _{6eq,6ax} =12 Hz; <i>J</i> _{6eq,5ax} =4Hz; <i>J</i> _{6eq,5eq} =2Hz)
		3,64 (dt; 1H; 6a-H; <i>J</i> _{6ax,6eq} =12 Hz; <i>J</i> _{6ax,5ax} =12Hz; <i>J</i> _{6ax,5eq} =2Hz)		3,64 (dt; 1H; 6a-H; <i>J</i> _{6ax,6eq} =12 Hz; <i>J</i> _{6ax,5ax} =12Hz; <i>J</i> _{6ax,5eq} =2Hz)		3,67 (dt; 1H, 6a-H; <i>J</i> _{6ax,6eq} =12 Hz; <i>J</i> _{6ax,5ax} =12Hz; <i>J</i> _{6ax,5eq} =2Hz)
C-4	62,4	2,70 (m; 1H; 4a-H)	62,4	2,68 (m, 1H, 4a-H)	55,4	2,49 (m, 1H, 4a-H)
C-5	29,9	2,04 (m, 1H, 5e-H)	29,8	2,01 (m, 1H, 5e-H)	21,3	2,26 (m, 1H, 5a-H)
		1,79; (m, 1H, 5a-H)		1,77; (m, 1H, 5a-H)		1,44 (m, 1H, 5e-H)
C-7	32,1	2,16-2,07; 1,61-1,23 (m, 1H, 2H, 1H; 7-H, 8-H)	32,1	2,09; 1,73-1,50; 1,42 (m, 1H, 2H, 1H; 7-H, 8-H)	33,0	1,86; 1,70-1,44 (m, 1H, 3H; 7-H, 8-H)
C-8	19,2		19,0		18,8	
C-9	13,9	0,98 (t, <i>J</i> =7Hz, 3H, 9-H)	13,7	0,98 (t, <i>J</i> =7Hz, 3H, 9-H)	13,7	0,97 (t, <i>J</i> =7Hz, 3H, 9-H)
C10	16,8	1,67 (m, 3H; 10e-H)	16,6	1,67 (d, <i>J</i> =6,5Hz, 3H; 10e-H)	17,4	1,58 (d, <i>J</i> =6,5Hz, 3H, 10e-H)

a, Bruker WM-250, RMN ^1H (250 MHz), RMN ^{13}C (62,9 MHz), CDCl_3 , TMS (padrão interno);

b, Bruker WM-400, RMN ^1H (400 MHz), RMN ^{13}C (100,6 MHz), CDCl_3 , TMS (padrão interno).

Comparando os dados obtidos por RMN de ^1H e ^{13}C com os dados da literatura, podemos inferir que a fração pura do sulfóxido **29.1**, purificada em coluna cromatográfica, trata-se de um dos diastereoisômeros obtidos majoritariamente na oxidação de **29** e que identificados como 2,3-*trans*, 3,4-*trans*-**29.1**. Estas informações, aliadas à comparação das análises de cromatografia CG-

DIC quiral da fração pura obtida por coluna cromatográfica quiral, com o produto bruto obtido da reação de oxidação de **29**, permitiram identificar o tempo de retenção de cada um dos enantiômeros, com tempo de retenção de 20,422 e 21,987 min., conforme a Figura 36.

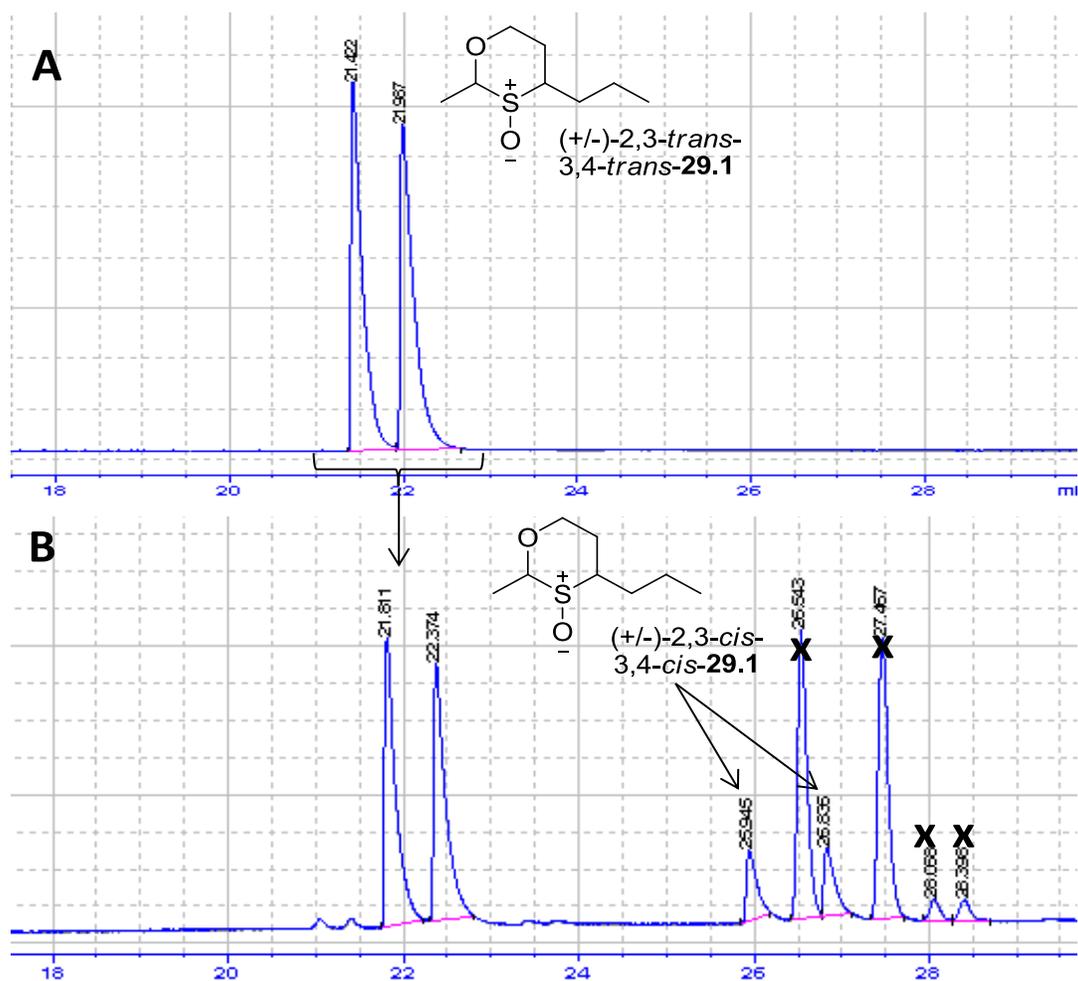


Figura 36. A, Cromatograma CG-DIC da fração isolada contendo um par de enantiômeros do sulfóxido 29.1. B, Cromatograma CG-DIC do produto bruto da oxidação química de 29. Condições de análise: 100 – 130 °C ($r=2$ °C min^{-1}), 150 C ($r=1$ °C min^{-1}), 180 °C ($r=40$ °C min^{-1}) espera de 5 min. T injetor = 200 °C, T detector = 240 °C, Fluxo constante = 0,8 mL min^{-1} . Coluna: Chrompack CD-Chirasil (25 m x 0,25 mm x 0,25 μm). (x) Picos relativos a um contaminante presente no insumo de fragrância (1,3-oxatiano).

Analisando a seletividade das reações biocatalíticas observadas, foram selecionados consórcios de bactérias e leveduras e fungos isolados para serem avaliados frente ao 2-metil-4-propil-1,3-oxatiano (**29**), a fim de monitorar a formação do sulfóxido **29.1** levando em conta a diastereosseletividade e enantioseletividade da biotransformação. Assim, as reações biocatalíticas foram realizadas na presença de um único substrato, nas mesmas condições dos ensaios de multibiorreação. A Tabela 30 apresenta os resultados obtidos para os ensaios de biotransformação de **29** por um consórcio de bactérias (20NA) e três fungos filamentosos isolados de pele humana.

Tabela 30. Excesso enantiomérico (% *ee*) e razão diastereoisomérica (% *rd*) observada para a oxidação de **29**.

Biocatalisador (72h)	2,3- <i>trans</i> -3,4- <i>trans</i> - 29.1	2,3- <i>cis</i> -3,4- <i>cis</i> - 29.1	<i>trans:cis</i>
	<i>ee</i> ^a	<i>ee</i> ^a	<i>rd</i> ^b
20NA	3,6	20	88 : 12
42M	35	6	92 : 18
28M7-IS1	48	24	66 : 33
30M1IS1	60	49	65 : 35

a, excesso enantiomérico calculado pela fórmula: $ee = [(A-B)/(A+B)] \times 100$, onde A e B são as áreas de cada enantiômero medidas no decorrer da reação; **b**, razão diastereoisomérica calculada pela fórmula $\% r.d. = [(\sum_{\text{Área}} A+A') / (\sum_{\text{Área}} (A+A'+B+B'))] \times 100$. **nd**, não detectado; **NA**, consórcios obtidos em meio NA (bactérias); **M**, fungos filamentosos obtidos em meio MEA.

Os excessos enantioméricos obtidos foram moderados, porém a razão diastereoisomérica foi alta, com destaque para o consórcio de bactérias 20NA (88:12) que também levou a boas conversões. O fungo filamentoso 42M, apesar da ótima razão diastereoisomérica, apresenta uma taxa de conversão muito baixa (2%).

A Figura 37 apresenta a análise por cromatografia quiral da bio-oxidação de **29** com o fungo filamentoso 30M1IS1, o qual levou a formação de dois pares de diastereoisômeros majoritários, porém com baixa enantiosseletividade, com um ee de 60% para um dos enantiômeros de 2,3-*trans*-3,4-*trans*-sulfóxido-**29.1** e de 49% para um dos enantiômeros de 2,3-*cis*-3,4-*cis*-sulfóxido-**29.1**. O excesso enantiomérico e a razão diastereoisomérica foram maiores para o primeiro.

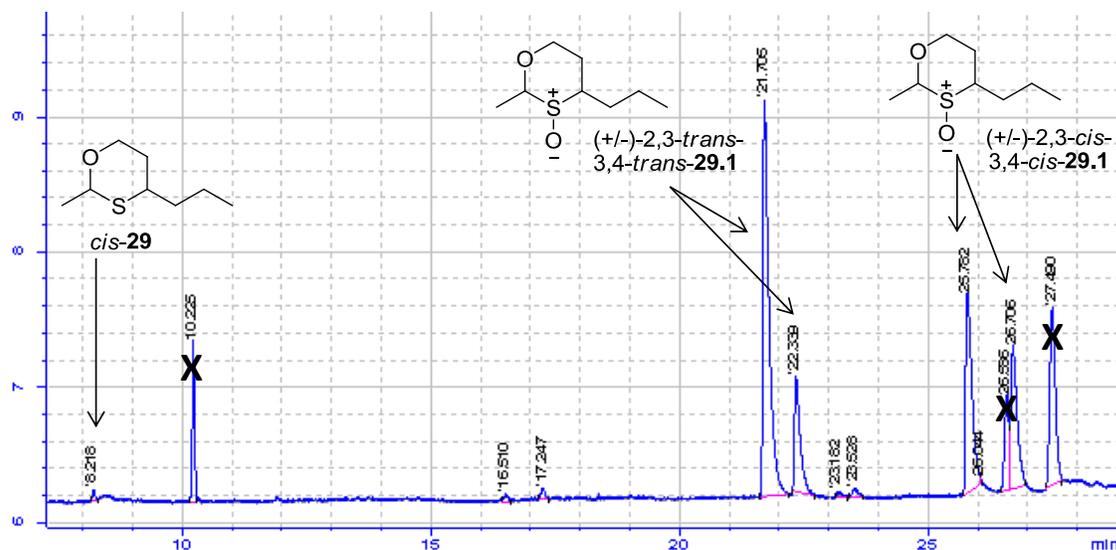


Figura 37. Cromatograma CG-DIC do biotransformação do 1,3-oxatiano (**29**) pelo fungo filamentoso 30M1IS1 (72 h). Condições de análise: 100 – 130 °C ($r=2$ °C min^{-1}), 150 C ($r=1$ °C min^{-1}), 180 °C ($r=40$ °C min^{-1}) espera de 5 min. T injetor = 200 °C, T detector = 240 °C, Fluxo constante = 0,8 mL min^{-1} . Coluna: Chrompack CD-Chirasil (25 m x 0,25 mm x 0,25 μm).

3.4.4.1 Conclusão parcial

Os ensaios de multibiorreação de derivados de enxofre com os micro-organismos da pele confirmaram a presença de mono-oxigenases, responsáveis pela oxidação de um dos três insumos testados. Este tipo de oxidação enzimática é de grande relevância industrial, pois a oxidação de um átomo de enxofre pró-quiral produz um sulfóxido quiral, intermediário sintético versátil para um grande número de reações¹⁴².

Além disso, as oxidações observadas alteram significativamente o odor dos produtos formados. No caso do 1,3-oxatiano (**29**) inicialmente responsável por uma nota olfativa frutal de maracujá, o produto formado mostrou um odor oxidado, que remete um maracujá passado. Se levarmos em conta as classificações de fototipo dos voluntários e o tipo de micro-organismo testado é possível perceber que os fungos filamentosos coletados de mulheres com pele fototipo V, e de origem asiática e consórcios de bactérias coletadas de homens com pele fototipo II e III demonstraram um alto potencial para oxidar derivados de enxofre, principalmente no caso do **29**.

Devido à importância, a alta frequência de uso em fragrâncias e o grande impacto olfativo destes insumos, qualquer grau de oxidação que possa ocorrer nestes insumos mesmos poderá levar a alterações na composição final de um produto, no seu perfil toxicológico e na percepção do consumidor durante o uso.

¹⁴² Fernandez I., Khiar N. *Chem. Rev.* **2003**, *103*, 3651-3705.

CONCLUSÃO

4 Conclusão

A realização deste trabalho permitiu constatar que há uma grande diversidade microbiana na pele humana, constituída de bactérias, leveduras e fungos filamentosos. A diversidade microbiana foi correlacionada à diversidade enzimática através de 1620 ensaios fluorogênicos e 540 ensaios em placa revelando a detecção de hidrolases e mono-oxigenases nos diferentes consórcios oriundos de diferentes voluntários. As microbiotas de homens e mulheres também mostraram perfis enzimáticos diferenciados.

Os consórcios microbianos e fungos testados através de ensaios de multibiorreação foram capazes de degradar um grande número de insumos de fragrâncias, portanto alterar o perfil olfativo e toxicológico dos mesmos. Isto indica que a microbiota da pele humana apresenta uma alta capacidade de metabolizar xenobióticos. Esse mecanismo pode estar diretamente ligado a diversas doenças de pele (principalmente alérgicas) e seu entendimento tem potencial para fornecer subsídios que justifiquem, por exemplo, o aumento exponencial da incidência de dermatite de contato nas mais diversas populações do mundo.

Finalmente, mas não menos importante foi o isolamento e identificação dos fungos filamentosos que possibilitou observar a grande diversidade fúngica da pele humana, pouco relatada na literatura. É possível sugerir que as mudanças de hábitos diários da vida moderna podem afetar nosso sistema de defesa, tornando nossa pele mais vulnerável a diversos patógenos de origem ambiental. Além disso, o uso indiscriminado de medicamentos, como antibióticos, também contribui para a seleção de micro-organismos resistentes muitas vezes, sendo estes oriundos da própria microbiota do indivíduo.

Até o presente momento, o desenvolvimento de ingredientes na área cosmética considerava a pele como um ambiente estéril, formado apenas por células humanas e seu metabolismo. Agora, podemos alertar sobre a importância e a necessidade de avaliar o potencial de biotransformação de insumos de uso tópico, de um modo geral, para desenvolver insumos mais eficazes, seguras e versáteis capazes de interagir positivamente com a microbiota da pele humana.

Além disso, o fato de muitos insumos utilizados neste projeto não terem sido degradados pelos micro-organismos da pele, como as cetonas, também demonstra um baixo potencial de biodegradabilidade dos mesmos, questão importante a ser considerada no descarte destes insumos.¹⁴³ Grande parte destes insumos está presente em produtos de uso diário (cosméticos, produtos de higiene e limpeza, aromatizantes) e os dados aqui obtidos, juntamente com informações já disponíveis na literatura indicam que alguns ingredientes de fragrâncias podem representar um risco ambiental¹⁴⁴.

Este trabalho proporcionou também uma série de informações inéditas, que poderão nortear e ampliar as perspectivas para estudos futuros, tanto pela identificação dos micro-organismos que compõem os consórcios estudados neste projeto, bem como pelo entendimento dos mecanismos das biotransformações observadas. Levando em conta dados da literatura, podemos inferir que diferentes tipos de pele podem ser levados em consideração em formulações de uso tópico para atingir alvos biológicos específicos.

¹⁴³ Bridges, B. *Flavour Fragr. J.* **2002**, *17*, 361–371.

¹⁴⁴ Salvito, D.T., Vey, M.G.H., Senna, R.J. *Flav. Fragr. J.* **2004**, *19*, 105-108.

PARTE
EXPERIMENTAL

5 Parte Experimental

5.1 Solventes, reagentes e meios de cultura

Os reagentes utilizados nesse trabalho foram obtidos da Sigma-Aldrich, os ingredientes de fragrâncias foram cedidos pela Natura e todos foram usados sem purificação. Os solventes utilizados em procedimentos de extração foram obtidos da Synth e posteriormente bidestilados. Os solventes deuterados utilizados para análise por RMN foram da obtidos da Cambridge Isotope Laboratories. Os meios de cultivo foram obtidos da Oxoid ou Difco.

Os meios de cultura foram submetidos à esterilização em autoclave a 121°C e pressão de 1 atm por 20 minutos. A vidraria foi adequadamente limpa e esterilizada em autoclave a 121°C, 1 atm por 20 minutos ou em estufa de esterilização a 180°C durante 1 hora. Todo material que não pôde ser esterilizado em autoclave foi submetido à radiação UV durante 30 minutos antes de seu uso. Utilizou-se água ultrapura (Milli-Q) no preparo de todas as soluções utilizadas neste trabalho. Todos os procedimentos foram realizados em condições estéreis, através da manipulação em capela de fluxo laminar.

5.2 Equipamentos e técnica utilizadas

5.2.1 Cromatografia em camada delgada (CCD)

As análises cromatográficas em camada delgada, para monitoramento das reações e acompanhamento das purificações dos produtos, foram realizadas empregando-se cromatofolhas de alumínio (folha padrão 20 x 20 cm), recobertas com sílica gel com indicador de fluorescência em UV 254 nm (Merck).

A revelação dos compostos se deu por irradiação de luz de lâmpada UV 254/365 nm e/ou pulverização com solução de KMnO_4 ou *p*-anisaldeído (*p*-anisaldeído, H_2SO_4 , ácido acético e etanol na razão de 1:2:1:100) e subsequente aquecimento a 300°C com pistola aquecedora.

5.2.2 Cromatografia em coluna (CC)

As cromatografias em colunas foram realizadas utilizando-se sílica gel 60 da Merck, granulometria de 70-230 mesh e gradientes de solventes destilados (hexano e acetato de etila) foram utilizados como eluentes.

5.2.3 Leitor de microplacas

As medidas de fluorescência das reações de triagem enzimática de alto desempenho foram realizadas em leitor de fluorescência Flashscan 530 Analytic Jena, utilizando filtro de excitação de $\lambda_{ex} = 365$ nm e leitura de emissão à $\lambda_{em} = 460$ nm. As leituras foram todas realizadas em placas de polipropileno de 96 poços (fundo plano) a temperatura ambiente (22 a 25°C) em triplicatas durante 3 minutos com intervalos de 60 segundos entre cada medida.

5.2.4 Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM)

As análises por CG-EM foram realizadas em cromatógrafo com fase gasosa acoplado a espectrômetro de massas, marca Shimadzu, modelo QP 2010 e cromatógrafo Hewlett Packard 6890, acoplado a um detector seletivo de massas HP5970 MSD, ambos operando com uma fonte de elétrons de ionização de 70 eV. Os cromatógrafos foram equipados com coluna capilar RTX-5MS (5% fenil, 95% dimetilpolisiloxano; marca Restek, para o equipamento QP-2010) e HP-5 (5% fenil, 95% dimetilpolisiloxano; marca Hewlett Packard, para o equipamento HP-6890), com 30 m x 0,25 mm x 0,25 μ m de espessura de filme. As amostras foram diluídas e o volume de 1 μ L foi utilizado nas injeções, utilizando-se hélio como gás de arraste. As temperaturas do injetor e do detector variaram conforme o método utilizado. O espectrômetro de massas operou na faixa de m/z 40-350.

5.2.5 Cromatografia gasosa quiral

A discriminação enantiomérica foi feita em cromatógrafo Agilent 6850 e detector de ionização de chama (DIC), equipado com injetor automático e coluna capilar de sílica fundida Chrompack®, de fase quiral Chirasil-β-ciclodextrina (25 m x 0,25 mm x 0,25 μm). As condições de análise foram com fluxo constante de H₂ de 1 mL min⁻¹, com injetor a 220 °C e detector a 240 °C, e as injeções feitas no modo “split”, com injeção de cerca de 1 μL na concentração de 1 mg mL⁻¹.

5.2.6 Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

Os espectros de RMN foram obtidos em espectrômetro Bruker 250 (250,1315 MHz para ¹H e 62,8952 para ¹³C), com os deslocamentos químicos registrados em ppm tomando-se como referência o sinal do clorofórmio (CDCl₃ δ_H 7,27 e δ_C 77,0) ou do tetrametilsilano (TMS δ_H 0,00). Os espectros de RMN de ¹³C, DEPT 135° e DEPT 90° foram utilizados para determinar o tipo de carbono pela comparação com o espectro de RMN de ¹³C desacoplado, onde carbonos metílicos (CH₃) e metínicos (CH) dão sinais positivos, metilênicos (CH₂) negativos e carbonos quaternários (C 0) são ausentes.

5.3 Procedimentos gerais adotados no laboratório de biocatálise

A vidraria foi lavada e seca, sendo então acondicionada com papel kraft, e esterilizada em autoclave a 121°C por 30 min. Todo o material contaminado, foi depositado num frasco de descarte contendo uma solução de hipoclorito de sódio 5% e/ou esterilizado em autoclave a 121°C durante 30 minutos.

Todos os meios de culturas, soluções, tubos de ensaio, pipetas e outros materiais utilizados em contato direto com os micro-organismos foram autoclavados (121°C, 15 min., 1 atm.) ou então esterilizados em bico de Bunsen, sob radiação UV, em soluções de etanol 70% ou em hipoclorito de sódio 0,2%.

As soluções de álcool 70% e solução de hipoclorito de sódio 5% foram utilizadas para desinfetar as bancadas de trabalho e câmara de fluxo laminar.

Todas as manipulações microbiológicas foram realizadas em capelas de fluxo laminar.

5.3.1 Meios de cultura para manutenção dos micro-organismos

Os micro-organismos e os consórcios microbianos foram cultivados em placas de petri (18 x 180 mm) contendo 15 mL do meio de cultura específico (20 g L⁻¹), a uma temperatura 30°C. Após 24 h, para bactérias e leveduras e 48h para fungos filamentosos, as culturas foram transferidas para frascos Erlenmeyer de 250 mL contendo 50 mL do meio de cultivo líquido, os quais foram incubados por 24, 48 ou 72h, a 28°C sob agitação de 200 rpm em agitador rotacional (modelo MA-420, Marconi).

5.3.1.1 Meio NA: ágar nutriente

O ágar nutriente foi utilizado para manutenção e crescimento dos consórcios de bactérias obtidos nas coletas. Composição: extrato de carne (0,3 g), extrato de levedura (0,3 g), peptona (0,5 g), D-glicose anidra (1,0 g) e água destilada (100 mL).

5.3.1.2 Meio YM: extrato de levedura e malte

O extrato de levedo e malte foi utilizado para manutenção e crescimento dos consórcios de leveduras obtidas das coletas. Composição: extrato de levedura (0,3 g), extrato de malte (0,3 g), peptona (0,5 g), D-glicose anidra (1,0 g) e água destilada (100 mL).

5.3.1.3 Meio MEA: extrato de malte e peptona

O extrato de malte e peptona foi utilizado manutenção e crescimento dos fungos filamentosos obtidas das coletas. Composição: extrato de malte (20 g), peptona (1 g), glicose (20 g), ágar (20 g) e água destilada (1000 mL).

5.3.1.4 Meios de cultura sólidos

Os meios de culturas sólidos que foram destinados aos crescimentos e repiques dos micro-organismos ou consórcios microbianos foram preparados de modo idêntico aos meios líquidos, com o acréscimo de 2% de ágar-ágar. Os meios foram vertidos em placas de petri ainda quentes, enquanto se encontravam liquefeitos.

5.4 Coleta e cultivo dos micro-organismos

Para a coleta das microbiotas de pele humana, o protocolo do estudo foi aprovado pelo a avaliação do Comitê de Ética em Pesquisa / Faculdade de Ciências Médicas (CEP/FCM) da Unicamp (Folha de Rosto 1085/2008, Anexo I). As coletas foram efetuadas em 55 voluntários, incluindo homens e mulheres de diversas etnias, com idade entre 20 e 45 anos. Os voluntários foram selecionados de acordo com os seguintes requisitos básicos: a) tomar o último banho no mínimo 12 horas antes do horário estipulado para a coleta; b) não utilizar cosméticos de qualquer natureza (creme, perfume, etc.) na região de do pescoço após o último banho e durante as 12 horas que antecedem a coleta; c) não alterar os hábitos de dieta alimentar na semana da participação da pesquisa.

Para solicitar a participação de voluntários na pesquisa, todos foram convidados a conhecer e participar do projeto. Todos os critérios de adesão foram explicitados e o Termo de Consentimento Livre e Esclarecimento (TCLE, Anexo - II) foi apresentado e detalhadamente explicado. Os voluntários que aceitaram participar foram convidados a comparecerem ao local de coleta (LabioSin) em data e horário marcado. Na data marcada, os voluntários responderam a algumas questões que auxiliaram na verificação dos requisitos de inclusão do voluntário no projeto e somente foram incluídos aqueles que concordaram com os requisitos e com a participação de caráter voluntário mediante assinatura do TCLE.

Para a realização do crescimento microbiano foram selecionados 3 meios de cultura: **NA** (ágar nutriente, para bactérias); **YMA** (ágar de malte e levedura, para leveduras); **MEA** (ágar extrato de malte, para fungos filamentosos).

Para a coleta foram utilizadas placas tipo Rodac contendo os meios de cultura selecionados para obtenção das microbiotas. Três (03) placas contendo meio estéril foram, colocadas em contato com a região do pescoço, sob leve pressão. Logo após, o material obtido foi incubado em estufa a 30°C e mantidos sob crescimento por 24 h para bactérias, 48 h para leveduras e 5 a 7 dias para fungos filamentosos. Após o crescimento microbiano, as placas foram submetidas a contagem do número de Unidades Formadoras de Colônias (UFC, por contagem direta) e aspecto visual (cor e aparência das colônias).

As microbiotas de bactérias (meio NA) e leveduras (meio YMA) obtidas foram então repicadas em placas de petri para a execução dos ensaios de triagem. Já as colônias de fungos (obtidas no meio MEA) foram selecionadas, uma a uma, diretamente da placa Rodac e repicadas isoladamente em placa de petri. Todas as microbiotas obtidas foram submetidas a técnicas de preservação de culturas em longo prazo (liofilização e criopreservação).

5.4.1 Preservação dos micro-organismos

A preservação dos consórcios de bactérias e leveduras foi realizada utilizando técnicas de liofilização e criopreservação, amplamente descrita na literatura¹⁴⁵. No caso dos fungos filamentosos foi utilizada a preservação em óleo mineral a 4°C e criopreservação a -80°C. Todos os consórcios e fungos foram preservados em quadruplicata.

5.4.1.1 Preservação por liofilização

Os consórcios de bactérias e leveduras foram repicados em placas com meio de cultura adequado. A quantidade de placas preparadas foi diretamente proporcional à quantidade de crescimento celular de cada consórcio (em geral, 2 placas para leveduras e 3 placas para bactérias). As placas foram incubadas a 30°C por 24 h (para bactérias) e 48 h (para leveduras).

¹⁴⁵ a) Hunter-Cevera, J. C.; Belt, A. **1996**, *Maintenance Cultures for Biotechnology and Industry*. London, Academic Press. 263pp. b) Kirsop, B. E.; Doyle, A. **1991**, *Maintenance of Microorganisms and Cell Cultures - A Manual of Laboratory Methods*. 2nd ed., London, Academic Press. 308pp.

Após o período de incubação, adicionou-se $1,0 \pm 0,5$ mL da solução crioprotetora (solução de leite desnatado a 10% em água ultrapura autoclavada por 10 min a 121°C) as placas de petri contendo as culturas crescidas, retirando toda a massa celular da superfície com auxílio de uma alça de Drigalsky (estéril). Transferiu-se toda a suspensão resultante para um tubo tipo falcon de 15 mL estéril, agitando o mesmo em agitador tipo vortex até se obter uma solução homogênea. Alíquotas de 0,2 mL da suspensão celular foram transferidas para tubos Eppendorfs estéreis, os quais foram lacrados apenas com parafilme.

Em seguida os tubos Eppendorfs contendo a suspensão celular foram submetidos a congelamento através da imersão em nitrogênio líquido. Após a total solidificação da suspensão celular, os Eppendorfs foram inseridos no liofilizador (Thermo Savant-MicroModulyo), procedendo-se com a liofilização dos mesmos sob vácuo por um tempo que variou de 18 a 24 horas, até que o material celular estivesse totalmente seco. Após o término da liofilização os Eppendorfs tiveram suas tampas fechadas, seladas externamente com parafilme, sendo armazenados em armário fechado, longe da luz e de umidade.

As culturas liofilizadas foram reativadas antes do uso, higienizando a parte externa do tubo Eppendorf com uma gaze ou algodão embebido em álcool 70%. Em capela de fluxo laminar, adicionou-se cerca de 0,2 mL de água destilada estéril ou do meio de cultura adequado ao tubo para reidratação da suspensão celular. A suspensão permaneceu em repouso durante 10 a 15 minutos e, em seguida, foi transferida para um erlenmeyer contendo meio em caldo específico para o consórcio e incubado a temperatura de 30°C por 24 horas (para bactérias) e 48 horas (para leveduras).

5.4.1.2 Preservação por Criopreservação (congelamento em ultrafreezer)

Os consórcios de bactérias e leveduras e os fungos esporulados foram repicados em placas com meio de cultura adequado. A quantidade de placas foi diretamente proporcional à quantidade de crescimento celular de cada consórcio (em geral, 2 placas para leveduras e 3 placas para bactérias). As placas foram incubadas a 30°C por 24 horas (para bactérias), 48 horas (para leveduras) e 72 ou

96 horas (para os fungos filamentosos esporulados).

Após o período de incubação, adicionou-se 2 mL da solução crioprotetora (solução de glicerol a 10% em água ultrapura autoclavada por 10 min a 121°C) as placas de petri contendo as culturas crescidas, retirando toda a massa celular da superfície com auxílio de uma alça de Drigalsky (estéril). Transferiu-se toda a suspensão resultante para um tubo tipo falcon de 15 mL estéril, adicionando mais 2 mL de glicerol 10%, agitando o mesmo em agitador tipo vortex até se obter uma solução homogênea. Distribuir cerca de 1mL da suspensão obtida criotubos, os quais foram identificados, fechados e lacrados com parafilme.

Os criotubos foram então submetidos a congelamento a -20°C por cerca de 20 minutos, este resfriamento tem a função de permitir que o crioprotetor envolva inteiramente as células, aumentando a sua ação de proteção. Após esse tempo de pré-resfriamento, os criotubos foram transferidos para o ultrafreezer (-80°C), acondicionados em caixas adequadas para ultracongelamento.

No caso dos fungos filamentosos não esporulados, os mesmos foram repicados em placa de petri contendo uma camada espessa de ágar (MEA) para auxiliar no processo de corte posterior. A quantidade de placas foi diretamente proporcional à quantidade de crescimento celular de cada fungo (em geral, 2 a 3 placas), sendo as mesmas incubadas a 30°C por 72 ou 96 horas.

Após o período de incubação, verificou-se o crescimento e a pureza da cultura. Logo após distribuiu-se 2 mL da solução de glicerol a 10% em cada criotubo e com auxílio de um bisturi, selecionou-se cerca de 10-15 cubinhos de ágar, onde 5-7 cubos foram retirados de uma região próxima ao centro da colônia e os demais de uma região mais distante. Com uma agulha de repique, 5 a 7 cubos foram transferidos diretamente para cada criotubo, diversificando cubos da região mais jovem e da região mais velha do micélio.

Após esse tempo de pré-resfriamento, transferir os criotubos para o ultra freezer, acondicionando-os adequadamente.

5.4.1.3 *Preservação em Óleo Mineral*

Os fungos filamentosos foram repicados em meio inclinado, por 48-72 horas, a 30°C. Utilizaram-se tubos com tampa rosqueável e a tampa foi mantida frouxamente adaptada durante o período de incubação. Após o crescimento fúngico, adicionou-se o óleo mineral, previamente esterilizado ao tubo de cultura, até uma altura de 1-2 cm acima do limite superior do meio.

A tampa rosqueável foi fechada de forma a proporcionar a melhor vedação possível e ainda o tubo foi vedado com parafilme. Os tubos foram armazenados em pé, evitando que o óleo toque a tampa, sob refrigeração (5°C).

Aplicou-se um intervalo de 6 meses entre as repicagens das culturas e a reativação foi realizada através da simples transferência de massa celular para um meio sólido adequado.

5.5 Sondas Fluorogênicas

Os ensaios foram realizados utilizando nove sondas fluorogênicas que já vem sendo utilizadas pelo grupo da Prof^a. Anita Marsaioli e foram sintetizadas pelo aluno Pedro A. C. Aquino durante seu projeto de Iniciação Científica (Fapesp Processo: 2008/08792-5). Para detecção de epóxido-hidrolases (EPH) foram utilizadas duas sondas uma contendo um epóxido terminal (**5**) e outra um epóxido vicinal (**6**). Para a detecção de esterases (EST) foram utilizadas três sondas, sendo a primeira para detecção de hidrólise de acetatos (**7**), a segunda para detecção de hidrólise de propionatos (**8**) e terceira a sonda para a detecção de hidrólise de cadeia mais longa (**9**). Para a triagem de mono-oxigenases (MOx) foram 2 sondas contendo cetonas acíclicas, a primeira linear (**13**) e a segunda contendo um grupo metila vizinho a cetona (**14**), além de 2 cetonas cíclicas, uma ciclopentanona (**15**) e a segunda com uma ciclohexanona (**16**), conforme a Figura 40.

Como controles positivos para os ensaios de epóxido-hidrolase e esterase foram utilizados os dióis derivados da hidrólise dos respectivos substratos (**10** e

11). Enquanto que para os ensaios de mono-oxigenases, os controles positivos utilizados foram os respectivos ésteres (17-20), derivados das cetonas (Figura 38).

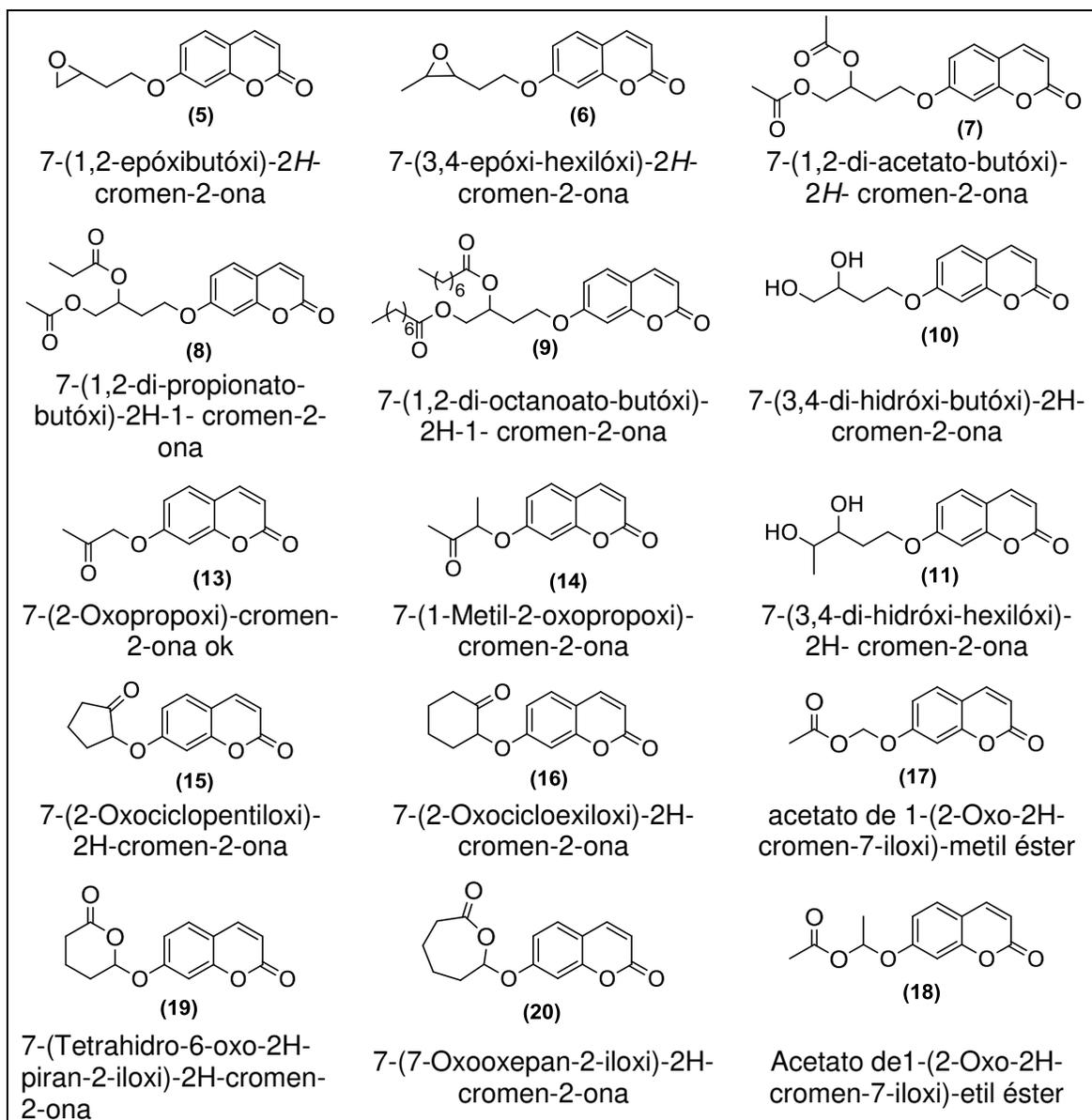


Figura 38. Substratos fluorogênicos e controles positivos utilizados para triagem de epóxido-hidrolases, esterases e mono-oxigenases.

5.6 Preparo soluções

5.6.1 Soluções estoque das sondas fluorogênicas

As sondas fluorogênicas e seus respectivos controles positivos foram inicialmente preparadas numa concentração de 20 mmol L⁻¹ em acetonitrila, numa segunda diluição de 10 vezes foi feita uma solução de 2 mmol L⁻¹ em H₂O:CH₃CN (1:1, v/v), que constitui a solução de trabalho. Estas soluções foram sempre conservadas em geladeira e preparadas em pequeno volume de trabalho.

5.6.1.1 Solução tampão borato 20 mmol L⁻¹ pH 8,8

A preparação da solução tampão borato 20 mmol L⁻¹ pH 8,8 foi realizada de acordo ao procedimento descrito em “*Preparation of buffers for use in enzyme studies*”¹⁴⁶

5.6.1.2 Solução Tampão de Sorensen (Na₂HPO₄ – KH₂PO₄)¹⁴⁷.

Inicialmente, foi preparada uma solução de Na₂HPO₄ dissolvendo 11,876 g do sal monoácido em água destilada o suficiente para completar 1 L de solução e uma solução de KH₂PO₄ foi também preparada através da dissolução de 9,078 g do sal previamente desidratado em água destilada o suficiente para completar 1 L de solução. A solução tampão com o pH desejado foi preparada de acordo com a Tabela 31:

¹⁴⁶ Gomori, G. *Preparations of buffers for use in enzyme studies*. In: *Handbook of Biochemistry and Molecular Biology - Physical and Chemical data Vol 1*, 3rd ed., Fasman, G.D. (Ed), Boca Raton, Florida, CRC-Press Inc., **2000**. p. 370-377.

¹⁴⁷ Morita, T. Assumpção, R.M.V. *Manual de Soluções, Reagentes e Solventes: Padronização, Preparação e Purificação*. 2^a. ed., São Paulo, Edgard Blücher, **1972**.

Tabela 31. Solução Tampão de Sorensen.

Solução usada			Solução usada		
Na ₂ HPO ₄ (mL)	KH ₂ PO ₄ (mL)	pH desejado	Na ₂ HPO ₄ (mL)	KH ₂ PO ₄ (mL)	pH desejado
0,25	9,75	5,288	5,0	5,0	6,813
0,5	9,5	5,589	6,0	4,0	6,979
1,0	9,0	5,906	7,0	3,0	7,168
2,0	8,0	6,239	8,0	2,0	7,318
3,0	7,0	6,468	9,0	1,0	7,731
4,0	6,0	6,643	9,5	0,5	8,043

5.6.1.3 Solução de periodato de sódio

A solução de periodato utilizada foi sempre recém-preparada. Para uma solução 20 mmol L⁻¹ de periodato de sódio foram dissolvidos 4,3 mg em 1 mL de água ultrapura.

5.6.1.4 Solução de BSA

A solução de BSA foi preparada com a própria solução tampão. Para uma concentração final de 2 mg mL⁻¹ na reação do ensaio (microplaca), foram dissolvidos 5 mg de BSA em 1 mL de solução tampão com agitação suave para evitar a formação de espuma.

5.7 Ensaios de triagem de alto desempenho

Os consórcios de bactérias e leveduras e os fungos filamentosos foram cultivados em placas de Petri contendo meios de cultura adequados, levando em conta tempo e temperatura para cada cultura. A massa celular obtida foi removida e transferida para frascos estéreis previamente pesados (peso úmido). Antes da realização dos ensaios, as células foram ressuspensas em tampão borato (20 mmol L⁻¹, pH 8,0) para a preparação das suspensões na concentração de 0,2 mg mL⁻¹ (bactérias e leveduras) e 1,0 mg mL⁻¹ (fungos filamentosos). Os experimentos

foram realizados em microplacas de polipropileno com 96 cavidades e todos os ensaios foram realizados em triplicata.

O acompanhamento foi realizado por fluorescência (FlashScan, leitor de fluorescência) utilizando filtros de λ_{ex} 360 ± 20 nm e λ_{em} 460 ± 20 nm. As leituras da emissão de fluorescência foram realizadas 24 e 48 h após o ensaio, para bactérias e leveduras, e 48 e 72 h após o ensaio, para fungos filamentosos. O aumento da intensidade de fluorescência nos sistemas testados foi relacionado com a liberação de umbeliferona no meio reacional, comparando com os valores obtidos dos controles positivos.

A taxa de emissão de fluorescência de cada microbiota foi calculada levando em conta a emissão observada no controle positivo, conforme a fórmula que segue:

$$\% \text{ Emissão} = \left[\frac{(\text{média ensaios com MO}) - (\text{média controles negativos})}{(\text{média controles positivos})} \right] \times 100$$

Considerou-se como resultado positivo de emissão de fluorescência, isto é, liberação da umbeliferona, os ensaios que obtiveram um valor de emissão maior ou igual a 5% do valor de fluorescência obtido no controle positivo.

5.8 Ensaios de Multibiorreação

Os consórcios de bactérias, leveduras e os fungos filamentosos a serem testados foram cultivados em placa de Petri contendo o meio adequado. Após o período de cultivo inoculou-se cada micro-organismo em um frasco do tipo falcon de 50 mL, contendo o meio líquido adequado (30 mL), sendo NB (caldo nutriente) para bactérias, YM para leveduras e ME para fungos. Após 24 h de cultivo os micro-organismos foram transferidos para Erlenmeyers de 500 mL, contendo cerca de 250 mL do mesmo meio líquido, sendo incubados por 48 h a 28°C sob agitação (200 rpm). Após esse período, as células foram centrifugadas a 5000 rpm, por 10 minutos no caso de bactérias e leveduras, no caso dos fungos

filamentosos, as células foram diretamente filtradas em uma unidade de filtração estéril (*Stericup*, Milipore).

Em Erlenmeyers de 125 mL contendo 40 mL de tampão Sørensen ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 - \text{KH}_2\text{PO}_4$), pH 7,0; adicionou-se cerca de 2 g de massa celular (peso úmido) do micro-organismo a ser testado e 5 mg de cada um dos substratos, totalizando de 15 a 30 mg da mistura de compostos testados por reação. Os frascos reacionais foram mantidos sob agitação de 200 rpm, à 28°C e monitorados por alíquotas de 2 mL a cada 24, 48 e 72. As alíquotas retiradas foram tratadas com a adição de uma pequena porção de NaCl, extraídas com 2 mL de acetato de etila (2 x 1 mL), e por último com 1 mL de acetato de etila contendo benzofenona 0,05 mg mL⁻¹ como padrão interno. A fase orgânica foi então coletada e seca com MgSO_4 anidro, concentrada sob N_2 , derivatizada com diazometano (no caso dos ésteres), e finalmente analisada por CG-EM.

5.9 Caracterização Ensaios de Multibiorreação

A caracterização química dos substratos e o monitoramento da formação de produtos nas multibiorreações foram realizados através de análises de CG-EM. Utilizou-se um sistema cromatográfico Shimadzu QP-2010, utilizando as bibliotecas Wiley 7.0, NIST 5 e Adams. Detecção por varredura de espectros (SCAN) na faixa de m/z 45-350 e ionização por impacto de elétrons (70 eV).

Para cada grupo de compostos utilizados neste trabalho foram definidos parâmetros cromatográficos específicos conforme a Tabela 30. As condições de operação do cromatógrafo foram padronizadas em 1 μL de amostra injetada e divisão de fluxo na razão de 1:50. Utilizou-se uma coluna capilar de sílica fundida RTX-5MS (5% de difenil, 95% dimetilpolisiloxano; 30,0 m x 0,25 mm x 0,25 μm de espessura de filme) para o equipamento QP-2010) e HP-5 (5% fenil, 95% dimetilpolisiloxano; 30,0 m x 0,25 mm x 0,25 μm de espessura de filme) para o equipamento HP-6890),

Tabela 32. Parâmetros cromatográficos utilizadas para os grupos de substâncias estudadas.

Parâmetro	Ésteres	Cetonas	Derivados de Enxofre
T injetor	230° C	230° C	230° C
T interface	250° C	250° C	250° C
T fonte de íons	230° C	230° C	230° C
T (0)	50° C	85° C	60° C
Taxa aquecimento	2,5° C min ⁻¹	2,5° C min ⁻¹	3,5° C min ⁻¹
T (1)	180 ° C	200° C	230° C
Taxa aquecimento	5° C min ⁻¹	60° C min ⁻¹	50° C min ⁻¹
T (2)	200° C	280° C	280° C
Taxa aquecimento	15° C min ⁻¹	-	-
T (3)	280° C	-	-
Tempo final	68 min	51 min	55 min
Fluxo Hélio	1 mL min ⁻¹	1 mL min ⁻¹	1 mL min ⁻¹
Velocidade Linear	30 cm s ⁻¹	30 cm s ⁻¹	30 cm s ⁻¹
Modo de injeção	Split 1:50	Split 1:50	Split 1:50

5.9.1 Cálculo de Conversão e Excesso Enantiomérico

Os valores de conversão dos substratos em produtos foram calculados levando em conta a razão entre o produto da área do pico cromatográfico do produto e do PI e o produto área do PI e a concentração de substrato no tempo reacional em estudo.

$$\%C = \frac{\text{Área do Produto} \times \text{Conc. PI}}{\text{Conc do Substrato} \times \text{Área do PI}} \times 100$$

Os valores de excesso enantiomérico foram calculados com base nas áreas de cada enantiômero segundo a equação:

$$\%ee = \frac{A - B}{A + B} \times 100$$

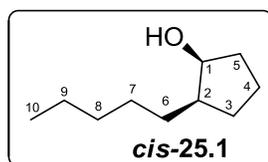
Onde, A e B corresponde à área de cada um dos enantiômeros.

5.10 Procedimentos Sintéticos

5.10.1 Síntese do 2-pentilciclopentanol (25.1)

A uma solução resfriada (0 °C) de 2-pentilciclopentanona (**25**) (10,0 mmol; 1,54 g) em metanol (30 mL), sob agitação magnética, foi adicionado boroidreto de sódio (NaBH₄) (2,5 mmol, 189 mg). A reação foi acompanhada por CCD (hexano/acetato de etila, 9:1) e revelada com solução de *p*-anisaldeído, onde se observou a formação do álcool pela coloração azul na placa, com polaridade maior que a correspondente cetona. Após 5 horas, adicionou-se 5 mL de água destilada, evaporou-se o metanol sob pressão reduzida. A fase aquosa residual foi extraída com acetato de etila (3 x 15mL). A fase orgânica foi seca sob MgSO₄ e concentrada sob pressão reduzida. Posterior purificação por cromatografia “flash” em coluna de sílica gel eluída com hexano:acetato de etila (gradiente, 10:0, 9,5:0,5 a 9:1) forneceu separadamente os dois isômeros do álcool **25.1** (cis e trans) como líquidos oleosos ligeiramente amarelados.

5.10.1.1 *cis*-2-Pentilciclopentanol (25.1)



C₁₀H₂₀O

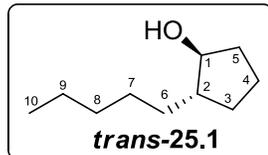
M.M. 154,53 g mol⁻¹

IE/EM *m/z* (int. rel.): 154 (M⁺, 10), 97 (10), 84 (100), 69 (8), 41 (20), 55 (20).

RMN de ¹H (250,00 MHz, CDCl₃, δ_{TMS} 0,0): δ 0,92 (*t*, *J* = 6,5Hz, 3H, CH₃); 1,20 – 1,45 (*s*, 9H); 1,46 – 1,90 (*m*, 7H); 4,16 (*m*, 1H, CH-OH).

RMN de ¹³C (62,90 MHz, CDCl₃, δ_{TMS} 0,0) 14,0; 21,8; 22,6; 28,3; 28,7; 29,1; 32,2; 34,7; 45,8; 74,9.

5.10.1.2 *trans*-2-Pentilciclopentanol (25.1)



C₁₀H₂₀O

M.M. 154,53 g mol⁻¹

IE/EM *m/z* (int. rel.): 154 (M⁺, 10), 97 (10), 84 (100), 69 (8), 41 (20), 55 (20).

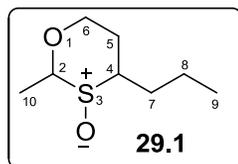
RMN de ¹H (62,90 MHz, CDCl₃, δ_{TMS} 0,0): δ 0,87 (*t*, *J*= 6,5, 3H, CH₃); 1,05-1,40 (*m*, 8H); 1,41-2,00 (*m*, 8H); 3,80 (*ddd*, *J*= 5 e 6Hz, 1H, CH-OH).

RMN de ¹³C (250,00 MHz, CDCl₃, δ_{TMS} 0,0) 14,0; 21,8; 22,6; 27,9; 30,0; 32,1; 33,8; 34,6; 48,4; 79,3.

5.10.2 Síntese do Sulfóxido 29.1

A uma solução do 2-metil-4-propil-1,3-oxatiano (**29**, 10,0 mmol; 1,61 g) em metanol:água (1:1, 30 mL) sob banho de gelo (0 °C) e agitação magnética, foi adicionado NaIO₄ (10,0 mmol, 2,14 g). A reação foi mantida sob agitação e a temperatura ambiente por 4 horas, sendo acompanhada por CCD hexano/acetato de etila 1:1) e revelação com *p*-anisaldeído). Após este período, a mistura reacional foi filtrada e extraída com acetato de etila (3 x 15mL). As frações orgânicas foram combinadas, secas sob MgSO₄ anidro e concentradas sob pressão reduzida. O produto bruto apresentou 6 produtos distintos (2 majoritários) que foram submetidos a purificados por cromatografia em coluna de sílica gel, eluída com gradiente de hexano:acetato de etila (8:2 a 1:9). Ao final do processo foi possível obter um único composto majoritário puro, os demais permaneceram em uma mistura.

5.10.2.1 3-óxido de 2-metil-4-propil-1,3-oxatiano (**29.1**)



$C_8H_{16}O_2S$

M.M.: 176,28 g mol⁻¹

IE/EM m/z (int. rel. %): 176 (M^+ , 1), 160 (6), 145 (8), 132 (75), 89 (66), 83 (45), 77 (26), 67 (9), 56 (11), 55 (100), 41 (31).

RMN de 1H (250,00 MHz, $CDCl_3$): δ 4,12 (*q*; $J = 6,3\text{Hz}$; 2_{ax-H}); 4,03 (*ddd*; 1H, 6_{eq-H} ; $J_{6eq, 6ax} = 12\text{ Hz}$; $J_{6eq, 5ax} = 4\text{Hz}$; $J_{6eq, 5eq} = 2\text{Hz}$); 3,64 (*dt*; 1H, 6_{ax-H} ; $J_{6ax, 6eq} = 12\text{ Hz}$; $J_{6ax, 5ax} = 12\text{Hz}$; $J_{6ax, 5eq} = 2\text{Hz}$); 2,70 (*m*, 4_{ax-H}); 2,04 (*m*, 1H, $5e-H$); 1,79 (*m*, 1H, 5_{ax-H}); 2,16-2,07; 1,61-1,23 (*m*, 1H, 2H, 1H; 7-H, 8-H); 1,67 (*m*, 3H; 10_{eq-H}); 0,98 (*t*, $J = 7\text{Hz}$, 3H, 9-H).

RMN de ^{13}C (62,90 MHz, $CDCl_3$): δ 93,4 (CH, C-2); 69,3 (CH_2 , C-6); 62,4 (CH, C-4); 32,1 (CH_2 , C-7); 29,9 (CH_2 , C-5); 19,2 (CH_2 , C-8); 16,8 (CH_3 , C-10); 13,9 (CH_3 , C-9).

ANEXOS

6 Anexos

Anexo I – Registro SISNEP (Sistema Nacional de Ética em Pesquisa) - Folha de Rosto 1085/2008 do Projeto de Pesquisa enviado ao Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da Unicamp.

Anexo II - Termo de Consentimento Livre e Esclarecimento (TCLE) aprovado pelo CEP/FCM-Unicamp

Anexo III - Check-list de critérios de inclusão e exclusão de voluntários (A) e questionário de avaliação individual (B), aprovado pelo CEP/FCM-Unicamp.

Anexo IV - Relatório Científico - Identificação de fungos filamentosos.

Anexo V – Espectros de Massas de substratos e produtos.

Anexo VI – Espectros de RMN de ^1H e ^{13}C .

Anexo I – Registro SISNEP (Sistema Nacional de Ética em Pesquisa) - Folha de Rosto 1085/2008 do Projeto de Pesquisa enviado ao Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da Unicamp.

11/01/12

SISNEP - Sistema Nacional de Ética em Pesquisa

Andamento do projeto - CAAE - 0855.0.146.000-08

Título do Projeto de Pesquisa
 Detecção da atividade enzimática da microbiota da pele e a modificação de componentes de fragrâncias.

Situação	Data Inicial no CEP	Data Final no CEP	Data Inicial na CONEP	Data Final na CONEP
Aprovado no CEP	10/12/2008 11:31:42	16/12/2008 16:36:12		

Descrição	Data	Documento	Nº do Doc	Origem
1 - Envio da Folha de Rosto pela Internet	09/12/2008 09:14:11	Folha de Rosto	FR236582	Pesquisador
2 - Recebimento de Protocolo pelo CEP (Check-List)	10/12/2008 11:31:42	Folha de Rosto	0855.0.146.000-08	CEP
3 - Protocolo Aprovado no CEP	16/12/2008 16:36:11	Folha de Rosto	1085/2008	CEP

[Voltar](#)

Anexo II - Termo de Consentimento Livre e Esclarecimento (TCLE) aprovado pelo CEP/FCM-Unicamp



Universidade Estadual de Campinas

Instituto de Química

Departamento de Química Orgânica

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)

Projeto de Pesquisa: “Detecção da atividade enzimática da microbiota da pele e a modificação de componentes de fragrâncias”

Você está sendo convidado a participar, como voluntário, de um projeto de pesquisa de doutorado do IQ da Unicamp. A pesquisadora responsável por este estudo é a doutoranda Carla Porto da Silva. Antes de decidir participar deste estudo, você deve conhecer os seus objetivos, os possíveis riscos e benefícios e o que é esperado de você durante a sua participação. Este Termo de consentimento lhe dará estas informações. A própria pesquisadora responsável do estudo apresentará este TCLE, discutirá todas as informações com você e responderá a todas as suas dúvidas. Somente depois dos procedimentos estarem plenamente explicados é que você deve tomar a sua decisão. Se você entendeu o que lhe foi explicado e concorda em participar, pediremos que assine este formulário. Uma cópia assinada ficará em seu poder.

Devido à grande incidência de alergias causadas pelo uso de fragrâncias (principalmente perfumes), este projeto de pesquisa pretende obter informações que relacionem os micro-organismos encontrados na pele com as degradações de fragrâncias e assim localizar as substâncias que tenham maior chance de causar alergias em nossa população.

O objetivo deste estudo é coletar micro-organismos da pele humana para realizar ensaios que identifiquem as principais enzimas que atuam nestes micro-organismos e verificar a possível relação destas enzimas com reações de degradação de substâncias presentes em fragrâncias usadas em cosméticos.

Sua participação no estudo envolverá uma única etapa como segue:

Coleta de Micro-organismos: será realizada apenas na região do seu pescoço, através de placas de contato. Três (03) placas serão, uma a uma, colocadas em contato com o seu pescoço por 30 segundos e após a coleta, as placas serão codificadas, colocadas em estufa de crescimento. Depois do crescimento, os resultados serão obtidos pela contagem do número de colônias de micro-organismos que cresceram por placa e a análise visual das colônias que serão submetidos aos ensaios enzimáticos.

Neste estudo, você e os demais voluntários não obterão nenhum benefício direto e não há previsão de riscos envolvidos no mesmo, pois a técnica que será utilizada é indolor e não é invasiva.

É importante você saber que:

1. Os materiais utilizados no estudo (placas) são seguros e adequados para a finalidade a que se destinam;
2. Participarão deste estudo 50-60 voluntários e sua participação terá duração de apenas 1 dia;

3. Todas as informações obtidas sobre sua pessoa serão tratadas de maneira confidencial;
4. Sua participação neste estudo é de caráter exclusivamente voluntário, ou seja, não há remuneração pela participação. E não haverá nenhuma forma de nenhum gasto.
5. Você não terá benefício direto com a participação neste estudo, porém estará contribuindo para o desenvolvimento da ciência.
6. Em caso de dúvidas, a pesquisadora responsável pela pesquisa **Carla Porto da Silva** estará disponível para esclarecimentos pelo telefone: (019) 3521-3098 ou pelo e-mail: cporto@iqm.unicamp.br.
7. Caso haja alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, o Comitê de Ética em Pesquisa que aprovou a pesquisa poderá ser contatado:
Comitê de Ética em Pesquisa / Faculdade de Ciências Médicas (CEP/FCM)
Rua Tessália Vieira de Camargo, 126 - Campinas – SP CP 6111 13083-887 Fone (019) 3521-8936 Fax (019) 3521-7187 e-mail: cep@fcm.unicamp.br
8. Durante o período de realização da coleta você deverá:
 - Ter tomado o último banho no mínimo 12 horas antes do horário estipulado para a coleta;
 - Não ter utilizado cosméticos de qualquer natureza (creme, perfume, etc.) na região de coleta (pescoço) após o último banho e durante as 12 horas que antecedem a mesma;
 - Não ter alterado seus hábitos de dieta na semana da participação da pesquisa.
 - Por fim, você tem toda a liberdade para se recusar a participar ou mesmo para se retirar do estudo a qualquer momento em que desejar, sem qualquer prejuízo.
 - Assinando este documento você declara que no momento está em perfeita condição de saúde, estando apto a participar deste teste. Além disso, assume total responsabilidade pela veracidade de todas as informações fornecidas.

Em virtude de considerar claras e satisfatórias as informações acima expostas, aceito participar deste estudo, de livre e espontânea vontade.

A minha assinatura abaixo é a declaração do meu livre consentimento em participar do estudo e de ter recebido explicação clara e completa sobre a pesquisa acima mencionada.

Nome do voluntário

Assinatura do voluntário

____/____/____

Data

Nome do apresentador do termo

____/____/____

Data

“MUITO OBRIGADO PELA SUA COLABORAÇÃO”

Anexo III - Check-list de critérios de inclusão e exclusão de voluntários (A) e questionário de avaliação individual (B), aprovado pelo CEP/FCM-Unicamp.



Universidade Estadual de Campinas
Instituto de Química
Departamento de Química Orgânica

A. Check-list de critérios de inclusão e exclusão.

Assinale com um X se o voluntário preenche os critérios de inclusão abaixo:

- Idade de 25 a 45 anos;
- O voluntário não alterou seus hábitos de dieta na semana da participação do estudo que consentirem à participação após explicação clara a respeito da finalidade e natureza da investigação (consentimento informado escrito);
- O voluntário não utilizou medicamentos antimicrobianos ou anti-inflamatórios nos 90 dias que antecedem o estudo;
- O voluntário é usuário de produtos cosméticos;
- O voluntário concorda em aderir aos procedimentos e exigências do estudo e comparecer ao local de coleta no dia e horário determinado.
- Voluntário sabe ler;
- O voluntário aceitou participar após explicação clara a respeito da finalidade e natureza da investigação (consentimento escrito).

Assinale com um X se o voluntário NÃO preenche os critérios de exclusão abaixo:

- O voluntário apresenta alguma patologia temporária no dia da coleta (gripe, inflamações na garganta, etc.);
- Qualquer condição que, na opinião do pesquisador responsável, possa comprometer a avaliação do estudo.

B. Questionário de avaliação individual

Data: ____/____/____

Nome: _____

Idade: _____

Sexo: _____

Cidade: _____

Telefone: _____

1. Você atualmente tem algum problema médico, como por exemplo:

(MARQUE COM UM "X" AS RESPOSTAS AFIRMATIVAS)

- () diabetes (açúcar no sangue)
 - () problemas de fígado, hepatite
 - () queixas urinárias (ardência ou queimação quando urina)
 - () problema de estômago (azia, queimação, indigestão)
 - () problemas de intestino (diarréia, prisão de ventre)
 - () úlcera
 - () tuberculose
 - () pressão alta
 - () sinusite
 - () asma
 - () meningite
 - () doença de tireóide (caroço no pescoço ou papeira)
 - () anemia
 - () dor de cabeça ou enxaqueca
 - () outro, especifique:
-

2. Você usou alguma dessas medicações no último mês?

(MARQUE COM UM "X" AS RESPOSTAS AFIRMATIVAS)

- () aspirina
- () outras drogas anti-inflamatórias, analgésicas ou derivados de cortisona (celestone, decadron, meticorten, etc...)
- () calmantes, ou drogas para diminuir a tensão ou nervosismo, ou para dormir (diazepam, valium, lexotan, lorax, etc...)
- () anticoncepcional ("pílula")

- medicação para asma ou bronquite
- diuréticos (lasix, higraton, etc...)
- hormônios (puran, cynomel, levoid, etc...)
- medicação para diabetes
- antibióticos
- pílulas para emagrecer ou diminuir o apetite
- outras.

Especifique quais medicamentos você tomou no último:

3. Você já teve/tem algum tipo de problema de pele?

- Alergia (dermatite)
- Herpes
- Acne (cravos e espinhas)
- Alopecia (calvície, queda de cabelos)
- Dermatite seborréica (caspa, seborréia)
- Rosácea
- Urticária
- Vitiligo
- Outro.

Especifique:

4. Você caracterizaria sua pele como:

- Seca
- Oleosa
- Mista
- Outro

Especifique:

5. Quando exposto ao sol, você se queima com facilidade?

- Queima com facilidade, nunca bronzeia
- Queima com facilidade, bronzeia muito pouco
- Queima moderadamente, bronzeia moderadamente
- Queima pouco, bronzeia com facilidade
- Queima raramente, bronzeia bastante
- Nunca queima, totalmente pigmentada

6. Você fuma atualmente? Sim Não

Caso afirmativo, quantos cigarros por dia?

- 1 - 10 cigarros 11 - 20 cigarros mais que 20 cigarros

Com que idade você começou a fumar? _____ anos de idade.

7. Nos últimos 3 meses, quantos dias por semana tem consumido bebidas alcoólicas?

- 1 a 3 vezes por semana
- 4 a 6 vezes por semana
- todos os dias
- menos que uma vez por semana
- nenhuma (pule para a questão 9)

8. Nos dias em que ingere bebida alcoólica, quantas doses você costuma beber em cada ocasião? _____ doses.

PINGA / WISKY	VINHO	CERVEJA
1 copinho = 1 dose	1 copo = 1 dose	1 garrafa = 2 doses
1/2 garrafa = 10 doses	1 garrafa = 6 doses	1/2 garrafa = 1 dose

9. Na última semana, você comeu algum alimento que esteja fora de sua rotina alimentar (p. ex. comida condimentada, *fast food*)? Há quantos dias?

Especifique: _____

10. Caso você deseje acrescentar algo importante que não tenha sido perguntado ou fazer algum comentário sobre seu problema, utilize as linhas abaixo.

“MUITO OBRIGADO PELA SUA COLABORAÇÃO”

Anexo IV - Relatório Científico - Identificação de fungos filamentosos.



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
CENTRO PLURIDISCIPLINAR DE PESQUISAS
QUÍMICAS, BIOLÓGICAS E AGRÍCOLAS
DIVISÃO DE RECURSOS MICROBIANOS



Relatório Científico

Identificação de fungos filamentosos

Colaboração em pesquisa com o a Profa. Dra. Anita Marsaioli (IQ/UNICAMP)

FASE 1. Avaliação de polimorfismo genético pelo método de ARDRA

1.1. Abordagem experimental

1.1.1. Extração de DNA

Os 41 isolados de fungos filamentosos foram cultivados em caldo Sabouraud Dextrose Ágar (Oxoid Brasil LTDA) a 28°C, e sob agitação de 140 rpm. Após 7 dias de cultivo, o DNA genômico de cada isolado foi extraído de acordo com o protocolo descrito por Raeder e Broda (1985). Para a remoção do RNA, 1 µL de RNase (10 mg ml⁻¹) foi adicionado à suspensão contendo o DNA extraído e a mesma foi, então, submetida à incubação a 37°C por 60 minutos. Os resultados da extração de DNA foram visualizados em géis de agarose 0,8%, corados com brometo de etídeo (1 µL/100 mL) e fotodocumentados, utilizando o sistema EpiChemi 3 Darkroom (UVP, Bioluminescence System). As estimativas das concentrações de DNA foram feitas através da comparação com padrões de concentração de DNA (fago λ). Os DNA foram estocados em freezer a -20 °C.

1.1.2. Amplificação do gene DNA ribossomal 28S (D1/D2)

A região D1/D2 do DNAr 28S foi amplificada pela técnica de PCR (*Polymerase Chain Reaction*) a partir do DNA genômico extraído das amostras, utilizando *primers* homólogos a regiões conservadas para o grupo dos fungos: NL-1m (5' GCA TAT CAA TAA GCG GAG GAA AAG 3') e NL-4m (5' GGT CCG TGT TTC AAG ACG 3') (O'Donnell, 1993). A reação de PCR foi composta de: 0,4 mM de cada primer, 0,2 mM dNTPs (GE Healthcare), 1,5 mM MgCl₂ (Invitrogen), 2,0 U Taq polimerase (Invitrogen) e 1,0 X tampão de reação (Invitrogen) e 5-25 ng de DNA genômico, para um volume final de 25 µL. As amplificações de PCR foram realizadas em termociclador (Eppendorf) com uma etapa inicial de desnaturação por 5 min a 95 °C, seguido por 30 ciclos de 1 min a 94 °C (desnaturação), 1 min a 55 °C (anelamento) e 3 min a 72 °C (extensão), seguido por um ciclo de extensão final de 3 min a 72 °C.

1.1.3. Restrição enzimática - ARDRA

A avaliação de polimorfismo genético dentre os fungos filamentosos foi realizado pelo método de ARDRA (*Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis*). Os produtos do PCR foram digeridos com as enzimas de restrição *HaeIII*, *RsaI* e *MspI* (GE Healthcare). Para tanto, 3 µL do produto de amplificação (item 1.1.2) foram utilizados em reações independentes de restrição enzimática a 37 °C por 2 horas. Os produtos da digestão enzimática foram submetidos à eletroforese em gel de agarose

2,5% corado com brometo de etídio (0,1 µg/mL). Os perfis de bandas (ribotipos) dos isolados foram fotodocumentados, utilizando o sistema EpiChemi 3 Darkroom (UVP, Bioluminescence System) e submetidos a análises de similaridade utilizando-se o programa Gel Compar 4.2 (Applied Maths) (Figura 1).

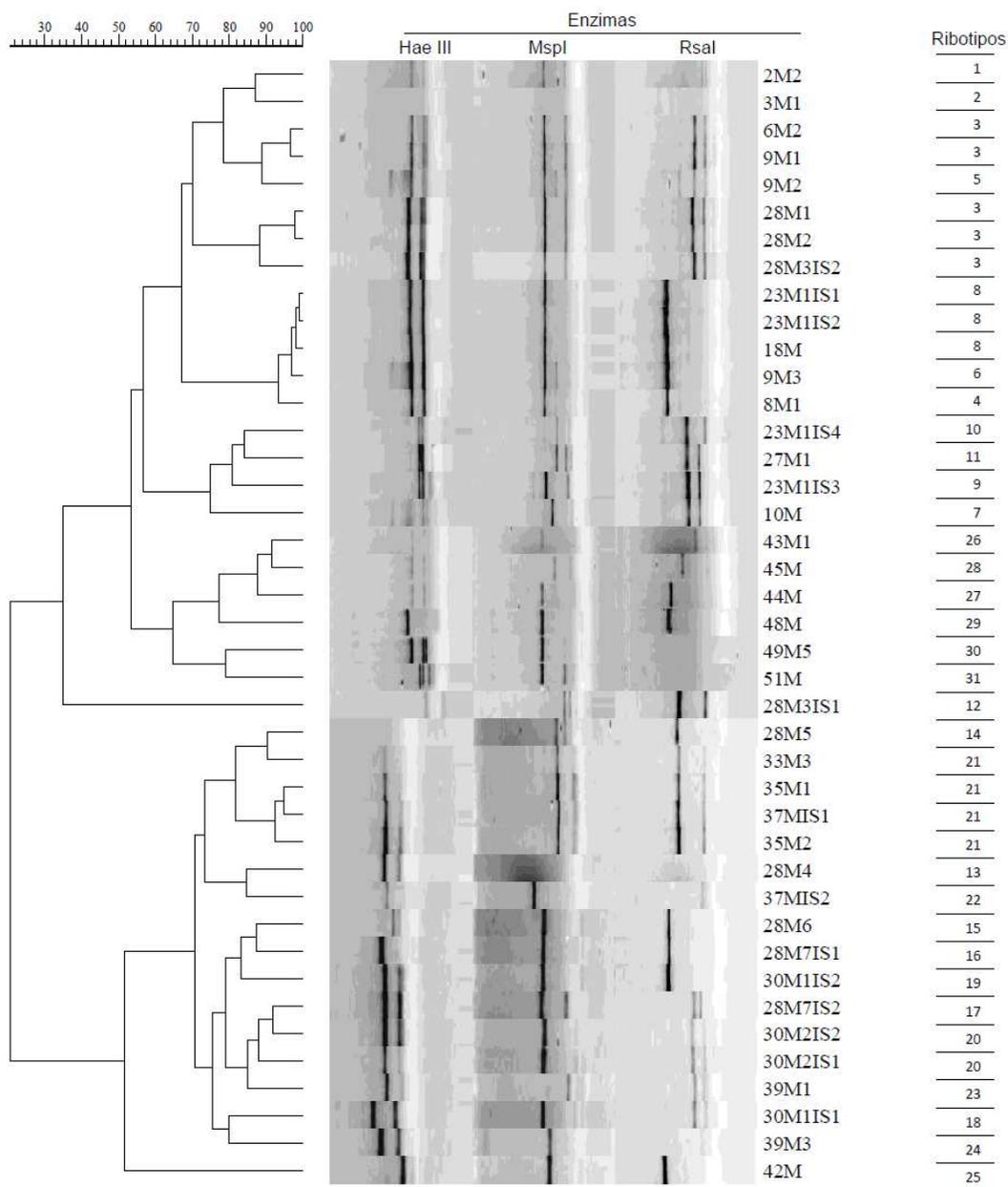


Figura 1. Dendrograma (UPGMA) derivado da análise de similaridade (Gel Compar 4.2).

Os resultados obtidos pela técnica de ARDRA revelaram a presença de 31 ribotipos distintos dentre os 41 isolados analisados (Tabela 1). Desta forma, foi sugerido o sequenciamento de um representante de cada ribotipo distinto (corte $\geq 96\%$ de similaridade) visando identificação taxonômica e inferência filogenética. Os isolados selecionados para a subsequente etapa de sequenciamento (FASE 2) estão marcados na Tabela 1.

Tabela 1. Ribotipos gerados pela digestão com as enzimas de restrição HaeIII, MspI e RsaI.

Código	Enzimas			Ribotipo	Sequenciar
	HaeIII	MspI	RsaI		
2MEA-2 IS1	1	1	1	1	X
3MEA-1	2	2	2	2	X
6MEA-2	1	1	3	3	X
9MEA-1	1	1	3	3	
28MEA-1	1	1	3	3	
28MEA-2	1	1	3	3	
28MEA-3 IS 2	1	1	3	3	
8MEA-1	1	1	4	4	X
9MEA-2	1	3	5	5	X
9MEA-3	1	4	6	6	X
10MEA	3	5	7	7	X
18MEA	4	6	8	8	X
23MEA -1 IS 1	4	6	8	8	
23MEA -1 IS 2	4	6	8	8	
23MEA -1 IS 3	5	1	7	9	X
23MEA -1 IS 4	6	8	9	10	X
27MEA-1	6	9	7	11	X
28MEA-3 IS 1	7	10	10	12	X
28MEA-4	8	12	11	13	X
28MEA-5	9	13	12	14	X
28MEA-6	10	14	13	15	X
28MEA-7 IS 1	14	15	13	16	X
28MEA-7 IS 2	12	16	14	17	X
30MEA-1 IS1	13	15	3	18	X
30MEA-1 IS2	12	14	15	19	X
30MEA-2 IS 1	12	15	3	20	X
30MEA-2 IS 2	12	15	3	20	
33MEA-3	12	17	16	21	X
35MEA-1	12	17	16	21	



Tabela 2. (Continuação)

35MEA-2	12	17	16	21	
37MEA IS 1	12	17	16	21	
37MEA IS 2	12	18	17	22	X
39MEA-1	12	19	18	23	X
39MEA-3	14	15	19	24	X
42MEA	15	21	20	25	X
43MEA-1	16	22	3	26	X
44MEA	4	22	21	27	X
45MEA	4	23	22	28	X
48MEA	17	24	23	29	X
49MEA-5	18	1	24	30	X
51MEA	5	1	25	31	X

FASE 2. Caracterização taxonômica e análise filogenética dos isolados selecionados pelo ARDRA

2.1. Abordagem experimental

2.1.1 Sequenciamento

A caracterização molecular dos fungos filamentosos representantes de grupos taxonômicos distintos (ribotipos distintos) foi baseada na análise de seqüências de DNA da região ITS1-5.8S-ITS2 e/ou região D1/D2 do DNAr 28S. O DNA genômico de cada linhagem de fungo filamentoso foi extraído, quantificado e a região ITS1-5.8S-ITS2 foi amplificada utilizando os *primers* ITS1 (5' TCCGTAGGTGAACCTGCGG 3') e ITS4 (5' TCCTCCGCTTATTGATATGC 3') (White et al, 1990). Para alguns isolados a região D1/D2 do rDNA 28S foi também seqüenciada visando obtenção de uma identificação mais acurada. Esta região foi amplificada de acordo com o protocolo descrito no item 1.1.1.

Os produtos de amplificação foram purificados utilizando mini-colunas (*GFX PCR DNA and gel band purification kit*, GE Healthcare) e submetidos ao sequenciamento em sequenciador automático (MegaBace, GE Healthcare). Os primers utilizados para região ITS foram os mesmos utilizados nas reações de amplificação (PCR). Os primers utilizados para a região D1/D2 foram: NL-1 e NL-4m (externos); NL-2m (CTTGTGCGCTATCGGTCTC) e NL-3m (GAGACCGATAGCGCACAAG) (internos). As reações de sequenciamento foram realizadas com o kit *DYEnamic ET Dye Terminator Cycle Sequencing Kit for MegaBace DNA Analysis Systems* (GE Healthcare), conforme instruções do fabricante. As seqüências obtidas com cada primer foram montadas em um contig (seqüência única combinando os diferentes fragmentos obtidos) com ajuda do programa phredPhrap e comparadas



com as sequências de genes de organismos representados na base de dados do Genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) e do CBS (<http://www.cbs.knaw.nl/index.htm>).

2.1.2 Análise filogenética

Sequências de organismos relacionados à sequência do organismo alvo foram recuperadas dos bancos de dados para realização das análises filogenéticas. O alinhamento das sequências foi realizado utilizando o programa Clustal X (Thompson et al., 1994); e as análises filogenéticas e moleculares, utilizando o software MEGA versão 4.0 (Tamura et al., 2007). O modelo de Kimura (Kimura, 1980) foi utilizado para estimar a distância evolutiva; e o algoritmo neighbor-joining (NJ) para as reconstruções filogenéticas com o valor de bootstrap calculado a partir de 1.000 pseudo-replicatas.

2.2. Diversidade genética e caracterização taxonômica

Um isolado de cada fungo representante de ribotipo distinto (31 isolados) dentre os 41 isolados estudados foram submetidos ao sequenciamento de DNA e análise filogenética, visando identificação taxonômica.

Os resultados das análises moleculares revelaram que os isolados estudados estão, em sua maioria, distribuídos no filo Ascomycota, incluindo sete ordens e nove gêneros distintos (Tabela 2, Figura 2): *Cladosporium* sp., (n=6), Capnodiales; *Exophiala* sp. (n=1), Chaetothyriales; *Cytospora* sp. n=1) Diaporthales; *Aureobasidium* sp. (n=3), Dothideales; *Penicillium* sp. (n=2), Eurotiales; *Simplicillium* sp. (n=1), *Fusarium* sp. (n=1) e *Hypocrea* sp. (n=1), Hypocreales; *Alternaria* sp. (n=2) e *Massarina* sp. (n=1), Pleosporales. Em adição, foram identificados representantes dos gêneros *Scolecobasidium* sp. (n=1) e *Phoma* sp. (n=2) pertencentes ao grupo dos Coelomycetes (fungos anamórficos) e *Epicoccum* sp (n=3), pertencente _a classe dos Dothideomycetes. Três isolados (NI-30MEA1-1, 30MEA2-1 e 43MEA1) foram classificados como não identificados, por apresentaram similaridade com sequências de fungos da base de dados pertencentes aos gêneros *Phoma* e *Ampelomyces*. O filo Basidiomycota foi representado por isolados da ordem Agaricales pertencentes aos gêneros *Marasmius* (n=1), e *Coprinellus* (n=1) e ao gênero *Rhodotorula* (n=1). do grupo dos fungos anamórficos. Cabe ressaltar que, os isolados identificados como *Aureobasidium* sp (28MEA6, 30MEA1-2 e 48MEA) e *Rhodotorula* sp. (28MEA7-2) são fungos unicelulares (estágio leveduriforme).

Tabela 2. Caracterização taxonômica dos isolados selecionados pelo ARDRA

Código	Ribotipo	Sequenciamento			Ordem ou grupo taxonômico	Filo
		Região ITS	Região 28S (D1/D2)	ID Final		
2MEA2-1	1	<i>Alternaria citri</i> ES03 - 100%	-	<i>Alternaria</i> sp.	Pleosporales	Ascomycota
		<i>Alternaria alternata</i> Y18-23 - 100%	-			
3MEA1	2	<i>Alternaria destruens</i> Alt2 (DQ323680) - 100%	-	<i>Alternaria</i> sp.	Pleosporales	Ascomycota
		<i>Alternaria lini</i> CBS 106.34 (Y17071)-100%	-			
6MEA2	3	<i>Epicoccum</i> sp. ASR-245 (GU973791) - 100%	-	<i>Epicoccum</i> sp.	Fungos anamóficos	Ascomycota
		<i>Epicoccum nigrum</i> CBS 125.82 (FJ426995) - 99%	-			
9MEA1	3	-	-	<i>Epicoccum</i> sp.		
28MEA1	3	-	-	<i>Epicoccum</i> sp.		
28MEA2	3	-	-	<i>Epicoccum</i> sp.		
28MEA3-2	3	-	-	<i>Epicoccum</i> sp.		
8MEA1	4	<i>Cladosporium cladosporioides</i> ATCC 64726 (AY361968) - 99%	-	<i>Cladosporium</i> sp.		
		<i>Cladosporium sphaerospermum</i> 1089 (AM182168) - 99%	-			
9MEA3	6	<i>Cladosporium</i> sp. CBS 280.4 (EU167574) - 100%	-	<i>Cladosporium</i> sp.	Capnodiales	Ascomycota
		<i>Cladosporium cladosporioides</i> ATCC 64726 (AY361968) - 99%	-			
10MEA	7	<i>Exophiala dermatitidis</i> ATCC 44504 (GU256756) - 100% *	-	<i>Exophiala</i> sp.	Chaetothyriales	Ascomycota
		<i>Exophiala dermatitidis</i> CBS 109154 (AY857525) - 100%	-			



Tabela 2. (Continuação)

18MEA	8	<i>Cladosporium cladosporioides</i> ATCC 58227 (AY361965) - 100%	-	<i>Cladosporium</i> sp.	Capnodiales	Ascomycota
		<i>Cladosporium tenuissimum</i> 21L-211-MEXICO (AY904056) - 99%	-			
23MEA1-1	8	-	-	<i>Cladosporium</i> sp.		
23MEA1-2	8	-	-	<i>Cladosporium</i> sp.		
23MEA1-3	9	<i>Simplicillium</i> sp. FTJZZJ01 (FJ196609) - 95%	<i>Simplicillium</i> sp. ID06-F0394 (AB378540) - 99%	<i>Simplicillium</i> sp.	Hypocreales	Ascomycota
		<i>Simplicillium</i> sp. KYK00024 (AB378539) - 95%	<i>Lecanicillium fusisporum</i> CBS 164.70 (AF339549) 97%			
23MEA1-4	10	<i>Simplicillium</i> sp. FTJZZJ01 (FJ196609) - 95%	<i>Scolecobasidium</i> sp. KH00283 (GU017545) - 98%	<i>Scolecobasidium</i> sp.	Fungos anamóficos	Ascomycota
		<i>Simplicillium</i> sp. KYK00024 (AB378539) - 95%	<i>Scolecobasidium humicola</i> P045 (EU107307) - 98%			
27MEA1	11	<i>Fusarium</i> sp. NRRL25204 (U61689) - 100%	-	<i>Fusarium</i> sp.	Hypocreales	Ascomycota
		<i>Fusarium succisae</i> NRRL 13613 (U34561) - 99%	-			
28MEA3-1	12	<i>Phoma anigozanthi</i> CBS 381.91 (GU237852) - 99%	-	<i>Phoma</i> sp.	Fungos anamóficos	Ascomycota
		<i>Phoma acetosellae</i> CBS 179.97 (GU237793) - 99%	-			
28MEA4	13	<i>Phoma sancta</i> CBS 644.97 (FJ427064) - 99%	-	<i>Phoma</i> sp.	Fungos anamóficos	Ascomycota
		<i>Peyronellaea eucalyptica</i> CBS 508.91 (GU237878) - 99% **	-			

Tabela 2. (Continuação)

28MEA5	14	Leaf litter ascomycete strain its262 (AF502787) - 94%	<i>Massarina igniaria</i> SGLA72 (EU715627) - 97%	<i>Massarina</i> sp.	Pleosporales	Ascomycota
		Ascomycete sp. HK-S247 (AM084451) - 94%	<i>Massarina</i> sp. BR386 (GQ141697) - 96%			
28MEA6	15	<i>Aureobasidium pullulans</i> NRM2 (AY225165) - 99% ***	-	<i>Aureobasidium</i> sp.	Dothideales	Ascomycota
		<i>Aureobasidium pullulans</i> CBS 101160 (AJ244236) - 98%	-			
28MEA7-1	16	<i>Cladosporium cladosporioides</i> ATCC 34668 (AY463365) - 100%	-	<i>Cladosporium</i> sp.	Capnodiales	Ascomycota
		<i>Cladosporium vignae</i> ATCC 90242 (AY361998) - 100%	-			
28MEA7-2	17	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i> CBS 8383 (AF444649) - 99%	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i> ATCC 32763 (AF335986) - 99%	<i>Rhodotorula</i> sp.	Fungos anamóficis	Basidiomycota
		<i>Rhodotorula mucilaginosa</i> ATCC 66034 (U853846) - 99%	<i>Rhodotorula dairenensis</i> IGC4897 (AY033552) - 98%			
30MEA1-1	18	<i>Phoma sorghina</i> CBS 986.95 (FJ427075) - 100%	-	NI	NI	Ascomycota
		<i>Ampelomyces</i> sp. KUC5006 (GQ241274)- 100%****	-			
30MEA1-2	19	<i>Aureobasidium pullulans</i> CBS 110375 (AY139392) - 100%	-	<i>Aureobasidium</i> sp.	Dothideales	Ascomycota
		<i>Aureobasidium pullulans</i> NRM2 (AY225165) - 99%	-			
30MEA2-1	20	<i>Phoma sorghina</i> CBS 986.95 (FJ427075) - 100%	-	NI	NI	Ascomycota
		<i>Ampelomyces</i> sp. KUC5006 (GQ241274)- 100%****	-			
30MEA2-2	20	-	-	NI		

Tabela 2. (Continuação)

33MEA3	21	<i>Penicillium glabrum</i> NRRL 766 (AF033407) - 100%	-	<i>Penicillium</i> sp.	Eurotiales	Ascomycota
		<i>Penicillium thomii</i> NRRL 2077 (AF034448) - 99%	-			
35MEA1	21	-	-	<i>Penicillium</i> sp.		
35MEA2	21	-	-	<i>Penicillium</i> sp.		
37MEA1	21	-	-	<i>Penicillium</i> sp.		
37MEA2	22	<i>Marasmius cladophyllus</i> CBB 378 (AY216475) - 99%	-	<i>Marasmius</i> sp.	Agaricales	Basidiomycota
		<i>Amanita rhoadsii</i> KCTC6689 (AF085493) - 98%	-			
39MEA1	23	<i>Hypocrea americana</i> isolate AFTOL-ID 52 (DQ491488) - 96%	-	<i>Hypocrea</i> sp.	Hypocreales	Ascomycota
		<i>Hypocrea pulvinata</i> (AY787707) - 96%	-			
39MEA3	24	<i>Coprinus radians</i> KACC49348 (AF345822) - 96%	-	<i>Coprinellus</i> sp.	Agaricales	Basidiomycota
		<i>Coprinellus</i> sp. DIS 129a (DQ327642) - 96%	-			
42MEA	25	<i>Cladosporium oxysporum</i> ATCC 66669 (DQ780395) - 100%	-	<i>Cladosporium</i> sp.	Capnodiales	Ascomycota
		<i>Cladosporium chlorocephalum</i> ATCC 38011 (AF393686) - 100%	-			
43MEA1	26	<i>Ampelomyces</i> sp. Po61 (Y207317) - 99%	-	NI	NI	Ascomycota
		<i>Ampelomyces quercinus</i> ATCC 36786 (AF035778) - 96%	-			
44MEA	27	<i>Cladosporium coralloides</i> ATCC 16160 (AF393695) - 100%	-	<i>Cladosporium</i> sp.	Capnodiales	Ascomycota
		<i>Cladosporium gossypicola</i> ATCC 38026 (AF393702) - 100%	-			

Tabela 2. (Continuação)

45MEA	28	<i>Penicillium glabrum</i> CBS:125543 (GU981567) - 100%	-	<i>Penicillium</i> sp.	Eurotiales	Ascomycota
		<i>Penicillium purpurescens</i> NRRL 720 (AF033408) - 99%	-			
48MEA	29	<i>Aureobasidium pullulans</i> SN22 (FJ515165) - 100%	<i>Aureobasidium pullulans</i> ATCC6292 (AF050239) - 100%	<i>Aureobasidium</i> sp.	Dothideales	Ascomycota
		<i>Aureobasidium pullulans</i> CBS 110376 (AY139393) - 99%	<i>Aureobasidium pullulans</i> var. <i>melanigenum</i> CBS 110374 (FJ150929) - 99%			
49MEA5	30	<i>Epicoccum nigrum</i> wb599 (AF455395) - 99%	-	<i>Epicoccum</i> sp.	mitosporic Dothideomycetes	Ascomycota
		<i>Epicoccum nigrum</i> CBS 318.83 (AJ279448) - 99%	-			
51MEA	31	<i>Valsa fabianae</i> ATCC 96150 (AY347358) - 100%	-	<i>Cytospora</i> sp.	Diaporthales	Ascomycota
		<i>Cytospora austromontana</i> CMW6736 (AY347362) - 99%	-			
7MEA1	32	<i>Ampelomyces</i> sp. Po61 (AY207317) - 99%	<i>Epicoccum sorghi</i> CBS 627.68 (GU237979) - 99%	<i>Epicoccum</i> sp.	mitosporic Dothideomycetes	Ascomycota
		<i>Leptosphaerulina trifolii</i> MU 5405 (AY131203) - 96%	<i>Epicoccum nigrum</i> (AY093414)			

Sinônimos: * *Exophiala* e *Sarcinomyces*; ** *Peyronellaea* e *Phoma*; *** *Aureobasidium* e *Hormonema*; ***** *Epicoccum* e *Phoma*; ***** *Valsa* e *Cytospora*

**** *Phoma* e *Ampelomyces* são gêneros próximos

NI – Não Identificado

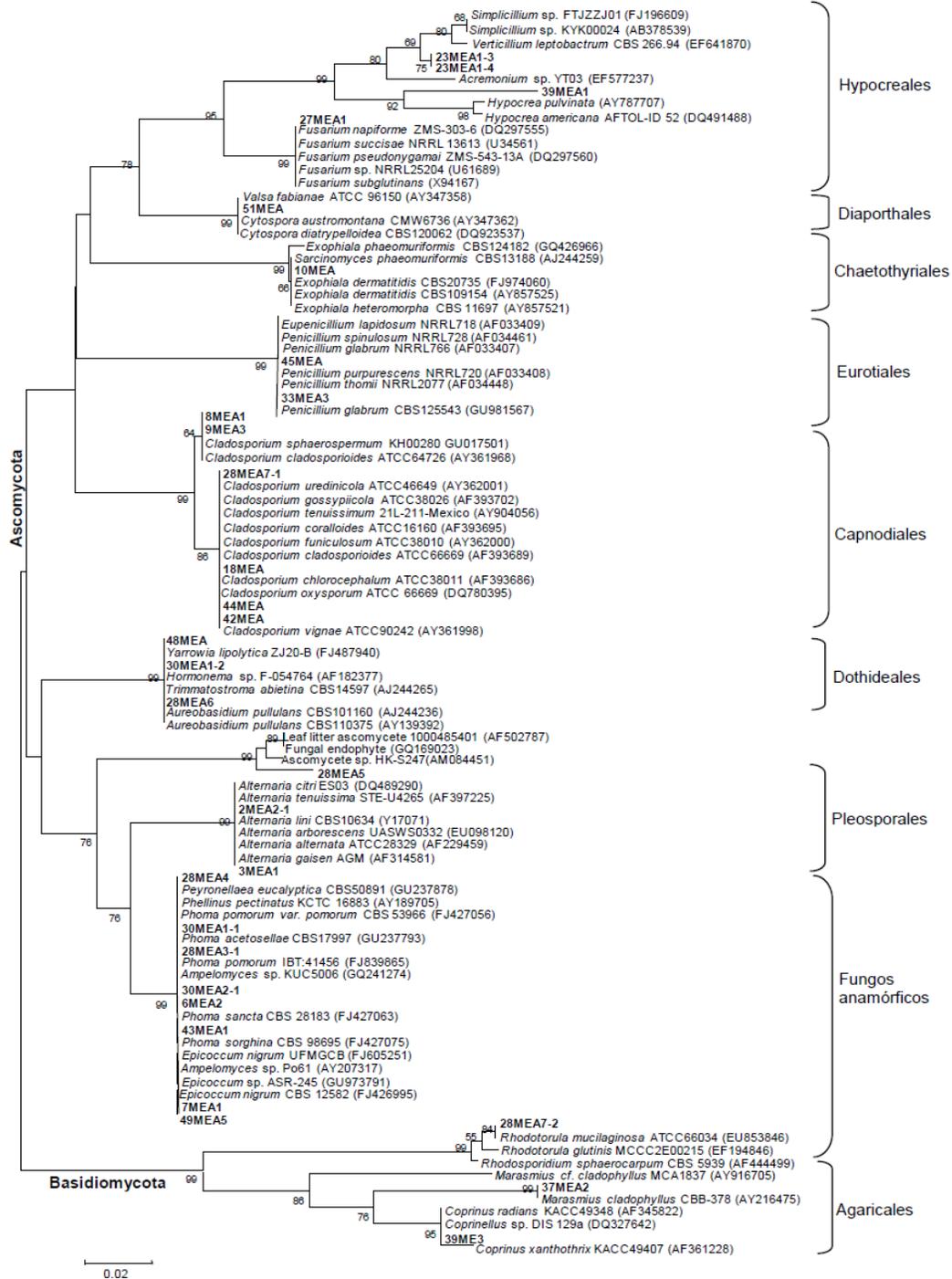


Figura 2. Árvore filogenética estruturada com base nas sequências de DNAr da região ITS (600pb) dos fungos pertencentes ao filo Ascomycota e Basidiomycota.

Alguns isolados representantes de ribotipos distintos foram agrupados em um mesmo cluster na análise filogenética (Figure 2), principalmente os isolados do gênero *Cladosporium* sp. Este resultado indica que a região ITS1-5.8S-ITS-2 deste grupo de fungos é altamente conservada e não permite a diferenciação em nível de espécie.

Visando diferenciação dos fungos filamentosos do grupo dos fungos anamórficos e da classe dos Dothideomycetes (gêneros não caracterizados em nível de ordem) foi realizada análise filogenética apenas com estes isolados, o que permitiu a caracterização dos isolados 28MEA4, 28MEA3-1 como pertencentes ao gênero *Phoma* sp. e 49MEA5 e 6MEA2 pertencentes ao gênero *Epicoccum* sp. (Figura 3). Contudo, não foi possível a caracterização dos isolados 30MEA1-1, 30MEA2-1 e 43MEA1, os quais agruparam com fungos do banco de dados dos gêneros *Phoma* e *Ampelomyces*, os quais são gêneros freqüentemente confundidos. Conforme Sullivan & White (2000) isolados anteriormente atribuídos ao gênero *Ampelomyces* mostraram-se como pertencentes ao gênero *Phoma* através de estudos morfológicos e análise da seqüência do DNA ribossomal de outros genes. Assim, estudos adicionais são necessários para a correta confirmação do gênero.

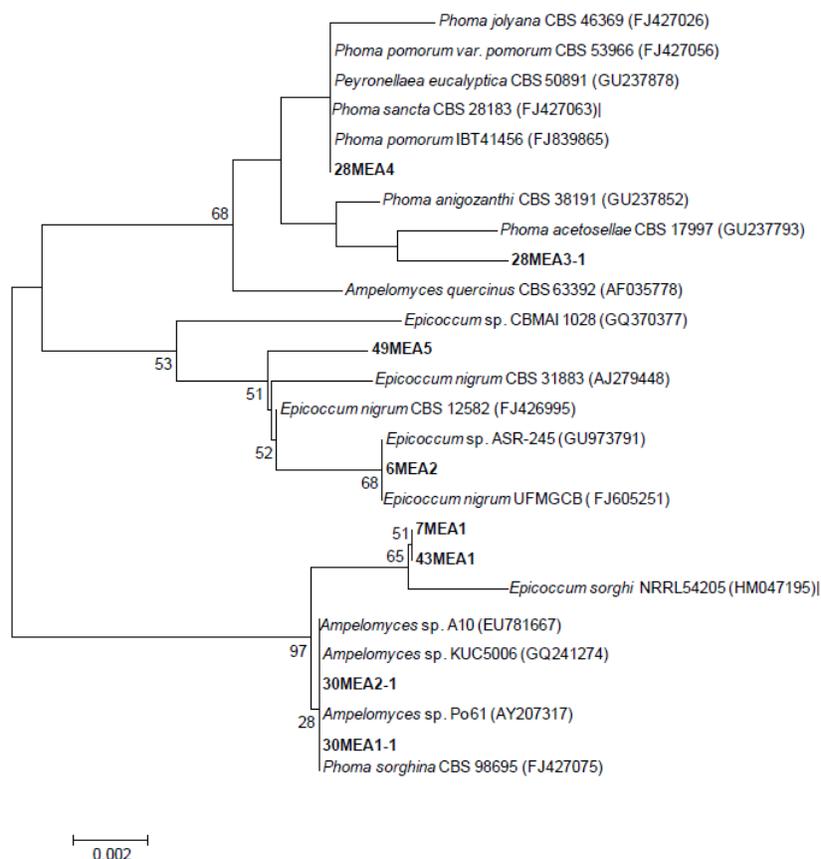


Figura 3. Árvore filogenética estruturada com base nas seqüências de DNAr da região ITS (600pb) dos fungos pertencentes grupo dos fungos anamórficos, gêneros *Phoma*, *Epicoccum* e *Ampelomyces*.

Todos os isolados estudados foram sequenciados utilizando *primers* específicos para o espaço interno transcrito (ITS) do rDNA. O ITS é dividido em ITS1, localizado entre os genes 18S e o 5.8S, e o ITS2, que separa os genes 5.8S e 28S (Schlotterer et al., 1994). Enquanto as regiões dos genes ribossomais são altamente conservadas dentro da espécie, as regiões dos espaçadores ITS podem variar intraespecificamente na sequência de bases e no comprimento, sendo frequentemente usadas para taxonomia de espécies e gêneros (Schlotterer et al., 1994; Gomes et al., 2002). Entretanto, a subunidade maior do DNA ribossomal dos eucariotos (LSU rDNA) que compreende os domínios D1/D2, também é relatada como útil para a identificação da maioria dos fungos filamentosos do grupo dos ascomicetos, em especial para caracterização de leveduras (Guarro et al., 1999; O'Donnell et al., 2001). Assim, os isolados que não mostraram resultados conclusivos quanto ao seqüenciamento e estudo filogenético da região ITS, foram adicionalmente seqüenciados utilizados os *primers* específicos para o domínio D1/D2 (Tabela 2e Figura 4).

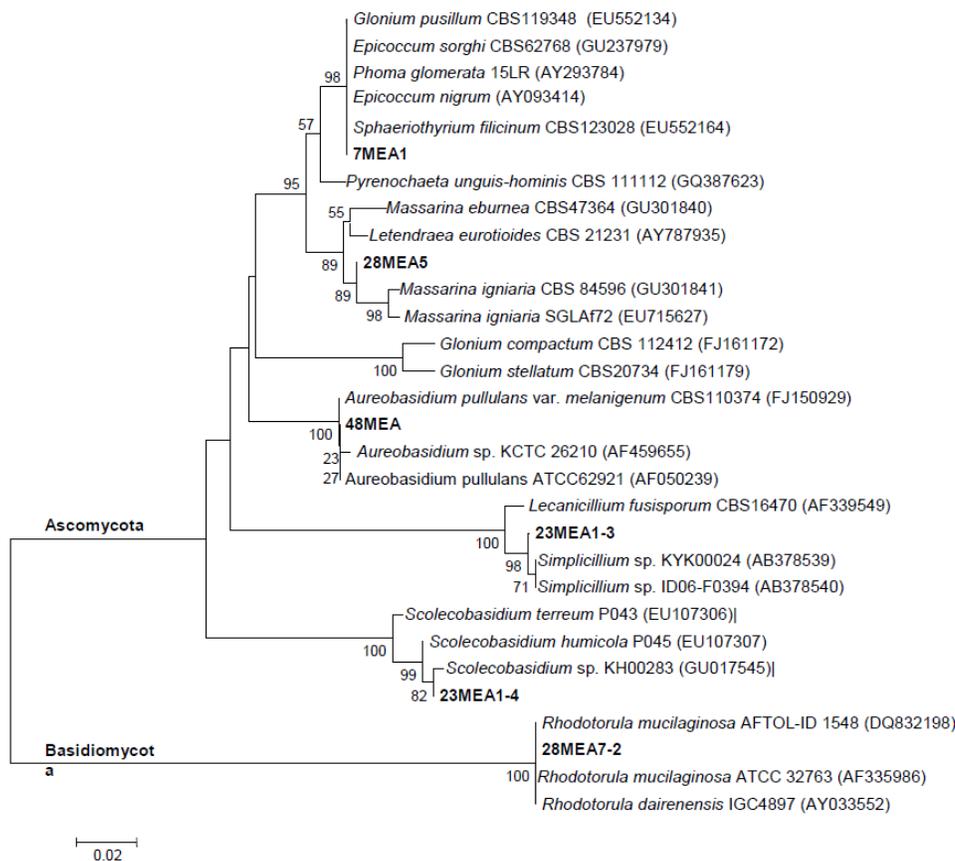


Figura 4. Árvore filogenética estruturada com base nas seqüências de DNAr 28S (500 pb), filo Ascomycota e Basidiomycota.

Os resultados das análises moleculares da região D1/D2 permitiram a identificação dos isolados 48MEA, 28MEA7-2, 28MEA5 e a confirmação do gênero para os isolados 23MEA1-3 e 23MEA1-4 (Figura 4). Em adição, o isolado 7MEA1 que agrupou com fungos do banco de dados de diferentes gêneros próximos filogeneticamente, quando analisado separadamente (Figura 5) agrupou-se com o gênero *Epicoccum*, permitindo sua identificação como *Epicoccum* sp..

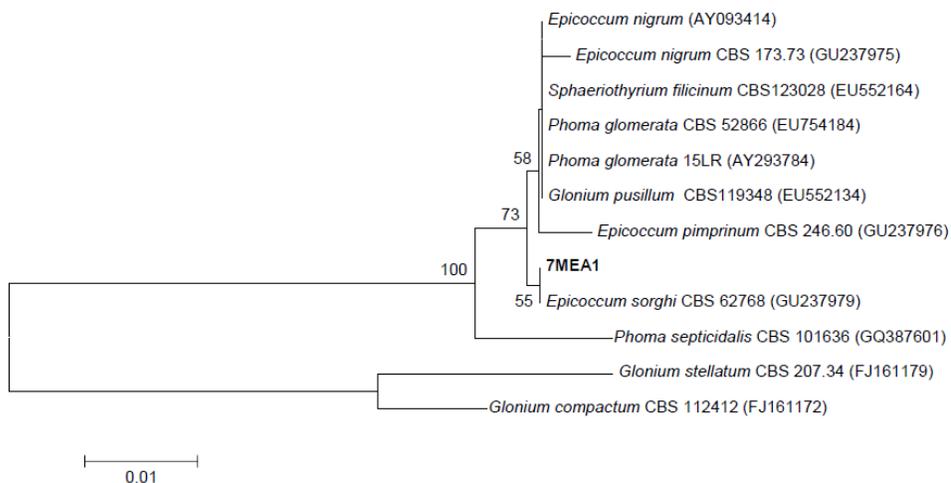


Figure 5. Árvore filogenética estruturada com base nas sequências de DNAr 28S (500 pb) do isolado 7MEA1.

2.3. Conclusões

A metodologia empregada para as análises de avaliação de polimorfismo genético pelo método de ARDRA e identificação molecular dos 41 fungos estudados foi empregada com sucesso, pois permitiu o conhecimento da diversidade dos isolados, bem como a identificação em nível de gênero de 28 isolados dentre os 31 submetidos ao seqüenciamento e análise filogenética.



Referências

- Gomes, E.A.; Kasuya, M.C.M.; Barros, E.G.; Borges, A.C. Polymorphism in the internal transcribed spacer (ITS) of the ribosomal DNA of 26 isolates of ectomycorrhizal fungi. *Genetics and Molecular Biology*. 25: (4) 477-483, 2002.
- Guarro, J.; Gene, J.; Stchigel, A.M. Developments in Fungal Taxonomy. *Clinical Microbiology Reviews*. 12: 454-500, 1999.
- Kimura, M. A simple model for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution*. 16: 111-120, 1980.
- O'Donnell, K. *Fusarium* and its near relatives. In *The Fungal Holomorph: Mitotic, Meiotic and Pleomorphic Speciation in Fungal Systematics* ed. Reynolds, D.R. and Taylor, J.W. pp. 225-233. Wallingford, CT: CAB International, 1993.
- O'Donnell, K.F.; Lutzoni, T.J.; Ward, G.L.B. Evolutionary relationships among mucoralean fungi (Zygomycota): evidence for family polyphyly on a large scale. *Mycologia*. 93:286-296, 2001.
- Raeder, J.; Broda, P. Rapid preparation of DNA from filamentous fungi. *Letters in Applied Microbiology*. 1: 17-20, 1985.
- Schlotterer, C.; Hauser, M.T.; Huesler, A.; Tautz, D. Comparative evolutionary analysis of rDNA ITS regions in *Drosophila*. *Molecular Biology and Evolution*, 11: (3) 513-522, 1994.
- Sullivan, R.F.; White, J.F. JR. *Phoma glomerata* as a Mycoparasite of Powdery Mildew. *Applied and Environmental Microbiology*. 66: 425-427, 2000.
- Tamura, K., Dudley, J., Nei, M., Kumar, S. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution*. 24: 1596-1599, 2007.
- Thompson, J.D., Higgins, D. G., Gibson, T. J., Clustal, W. Improving the sensitivity of progressive multiple alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*. 22: 4673-4680, 1994
- White, T.; Bruns, T.; Lee, S.; Taylor, J. *Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics*, p. 315-322. In M. Innis, D. Gelfand, J. Sninsky, and T. White (ed.), PCR protocols. Academic Press, Inc., New York, N.Y. 1990.

Campinas, 30 de Agosto de 2010,

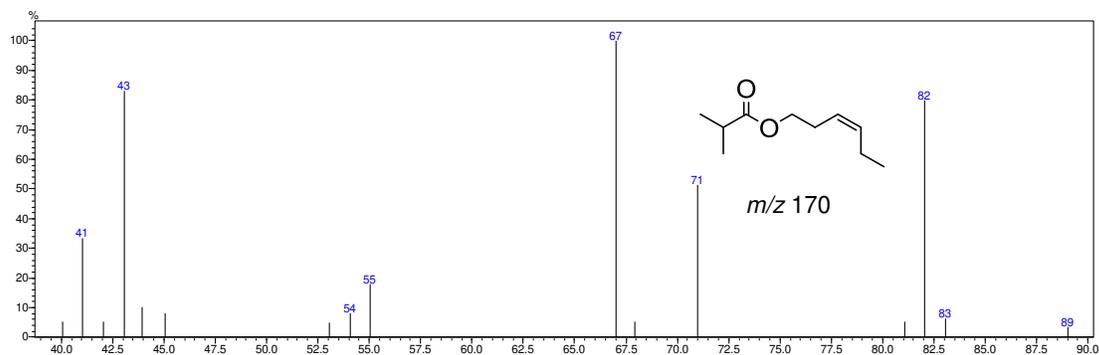
Dra. Lara Durães Sette

Curadora CBMAI/Pesquisadora DRM
CPQBA/UNICAMP

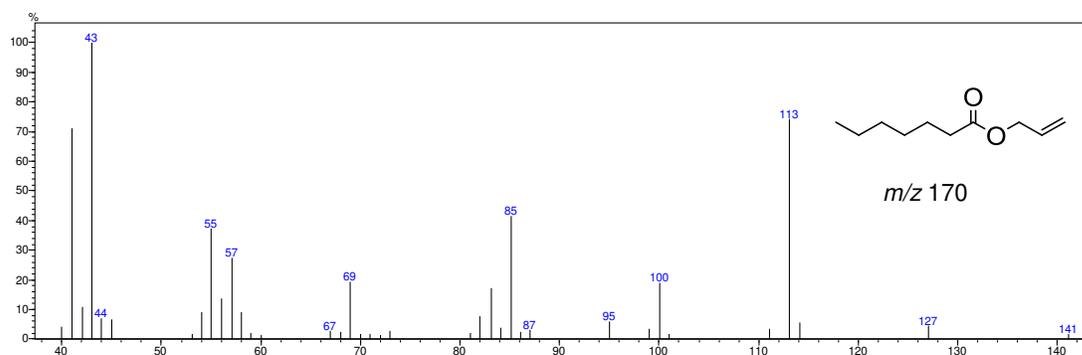
Dra. Rafaela Costa Bonugli Santos

Pesquisadora colaboradora DRM
CPQBA/UNICAMP

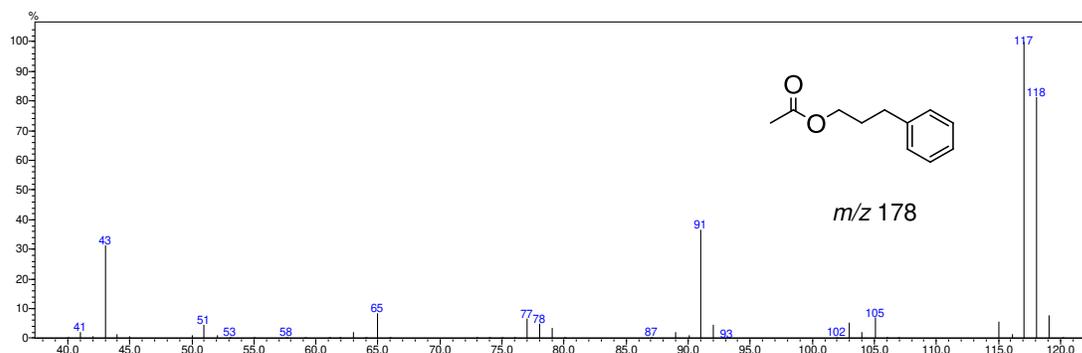
Anexo V – Espectros de Massas



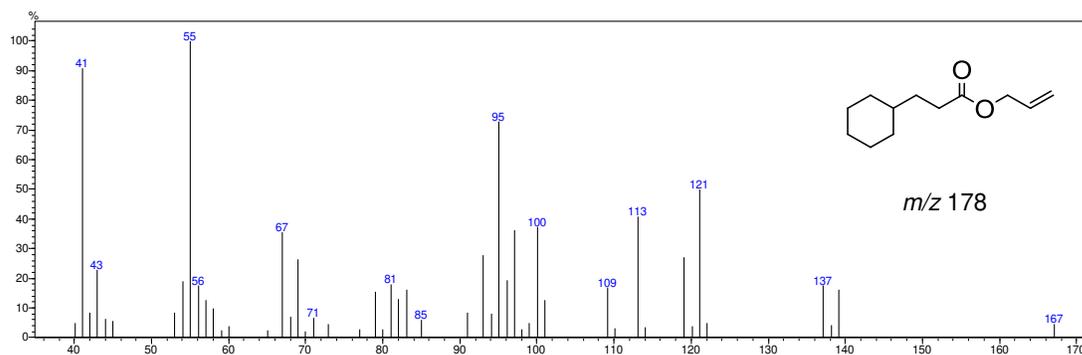
E-1. Espectro de massas obtido por impacto de elétrons (70 eV) do isoburitato de 3-hexenila (**18**).



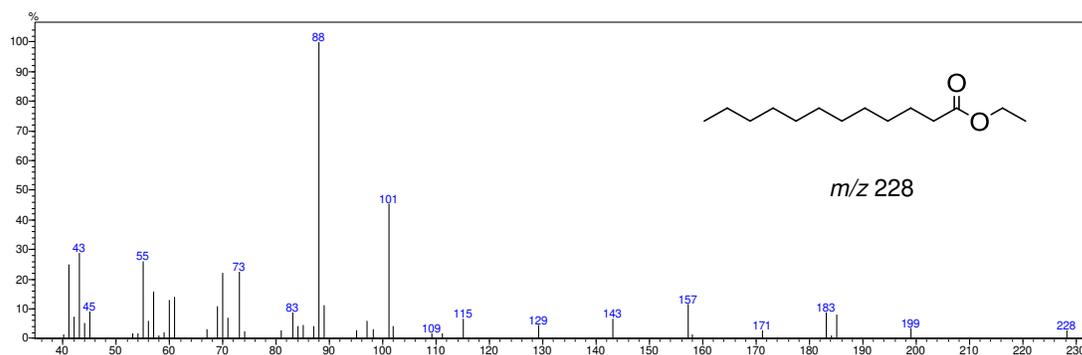
E-2. Espectro de massas obtido por impacto de elétrons (70 eV) do heptanoato de aliila (**19**).



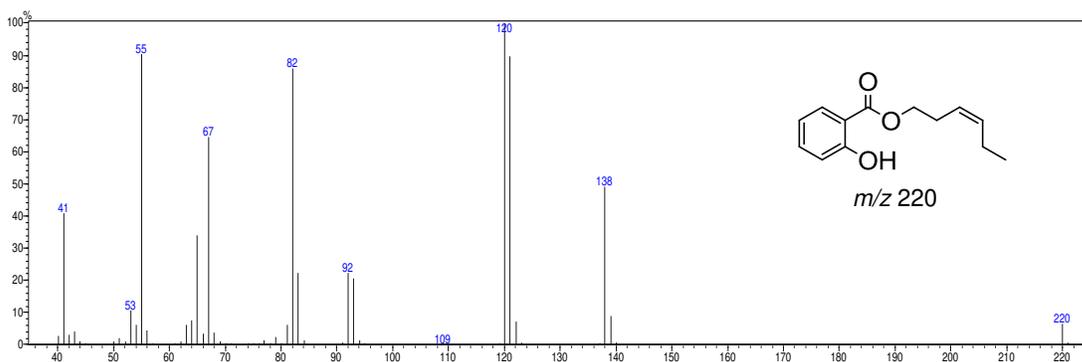
E-3. Espectro de massas obtido por impacto de elétrons (70 eV) do acetato de 3-fenilpropila (**20**).



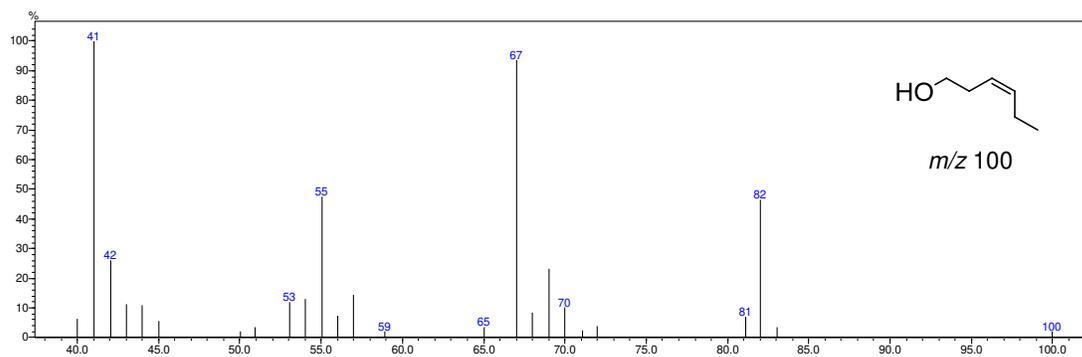
E-4. Espectro de massas obtido por impacto de elétrons (70 eV) do 3-ciclohexilpropanoato de alila (**21**).



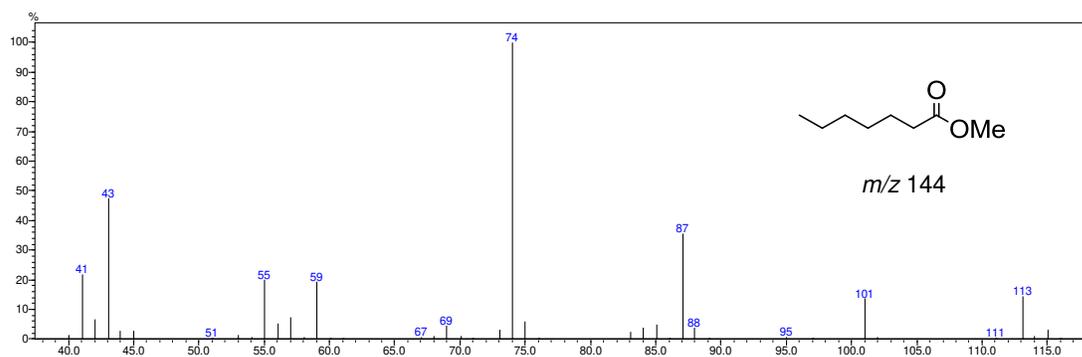
E-5. Espectro de massas obtido por impacto de elétrons (70 eV) do laurato de etila (**22**).



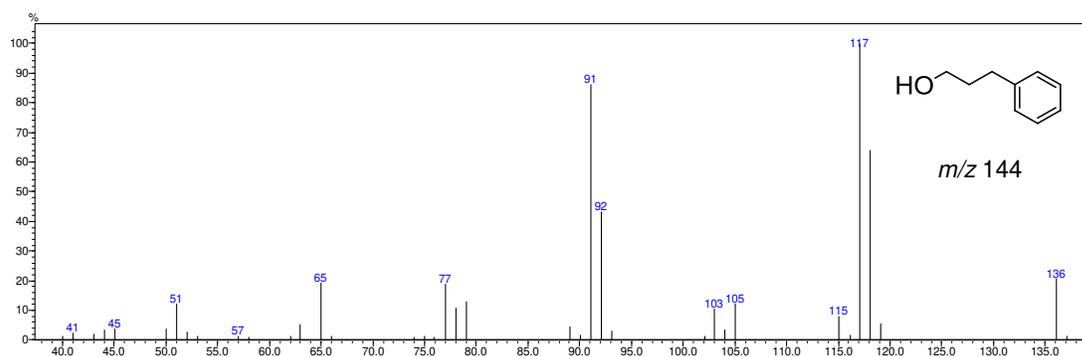
E-6. Espectro de massas obtido por impacto de elétrons (70 eV) do salicilato de 3-hexenila (**23**).



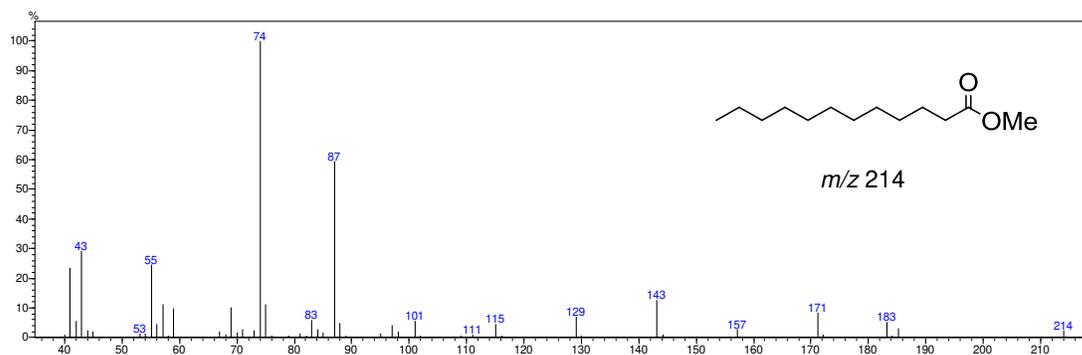
E-7. Espectro de massas obtido por impacto de elétrons (70 eV) do *cis*-3-hexenol (18.1).



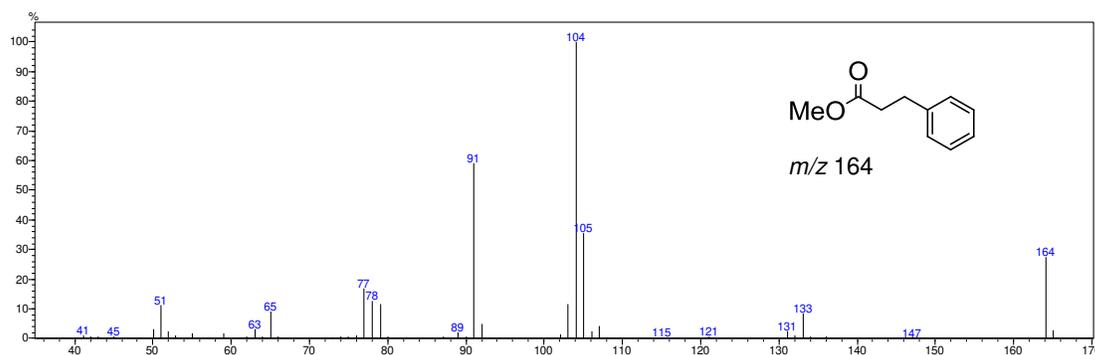
E-8. Espectro de massas obtido por impacto de elétrons (70 eV) do ácido heptanóico derivatizado na forma de éster metílico (19.1).



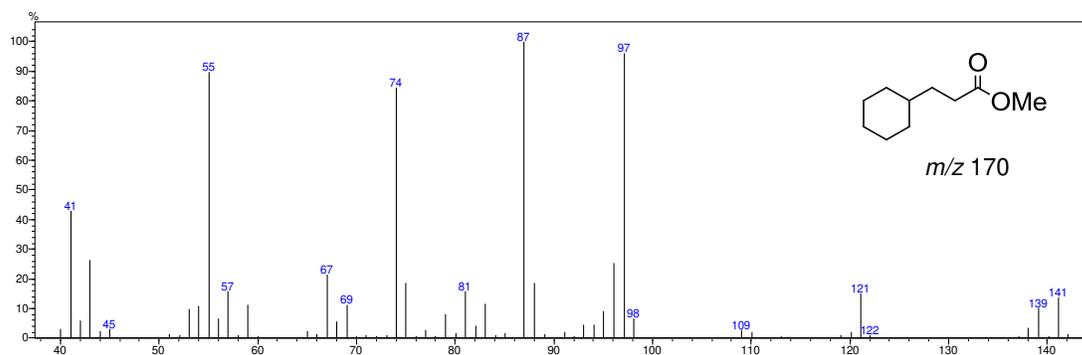
E-9. Espectro de massas obtido por impacto de elétrons (70 eV) do 3-fenilpropanol (20.1).



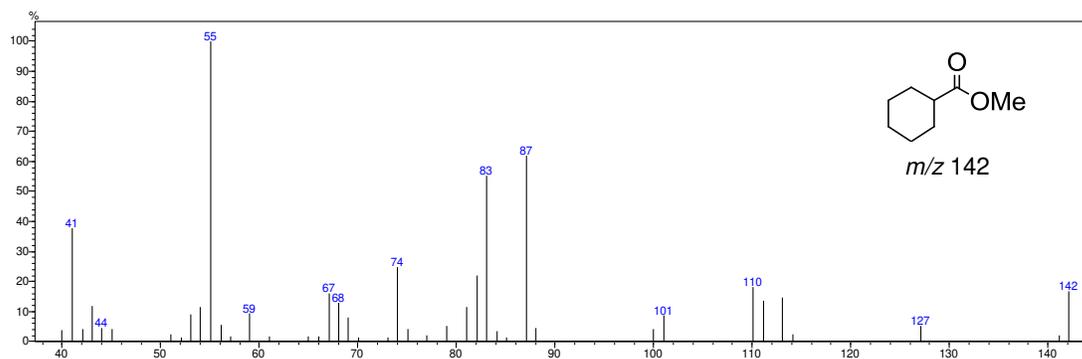
E-10. Espectro de massas obtido por impacto de elétrons (70 eV) do laurato de metila (22.1).



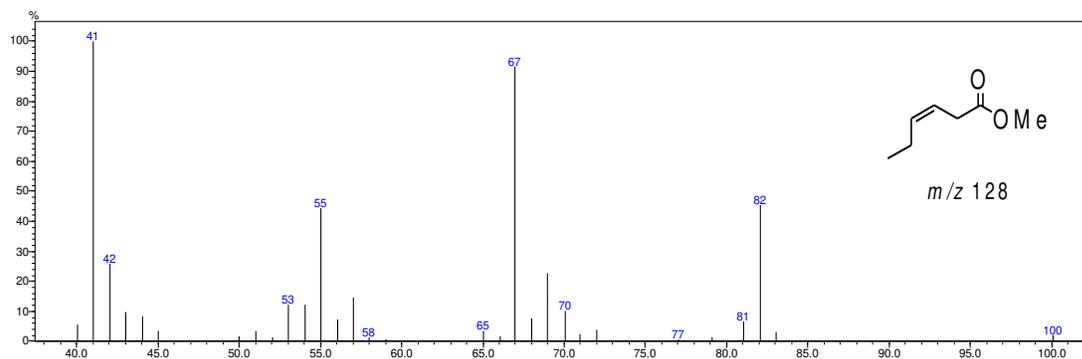
E-11. Espectro de massas obtido por impacto de elétrons (70 eV) do ácido 3-fenilpropanóico (20.2).



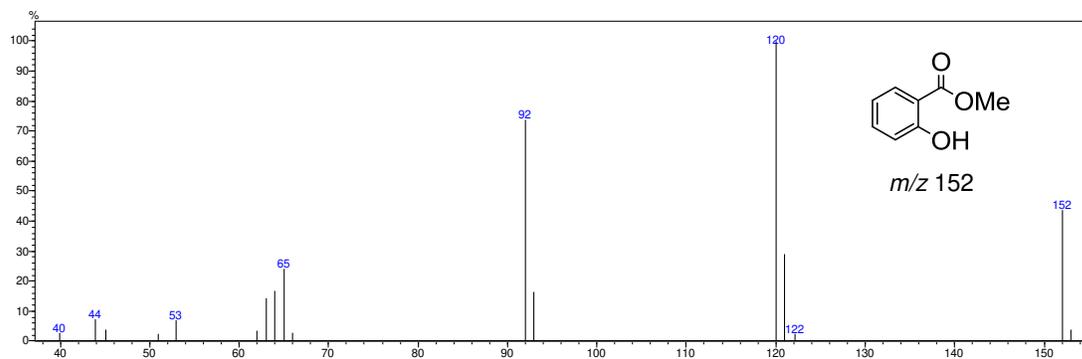
E-12. Espectro de massas obtido por impacto de elétrons (70 eV) do 3-cicloexilpropanoato de metila (21.1).



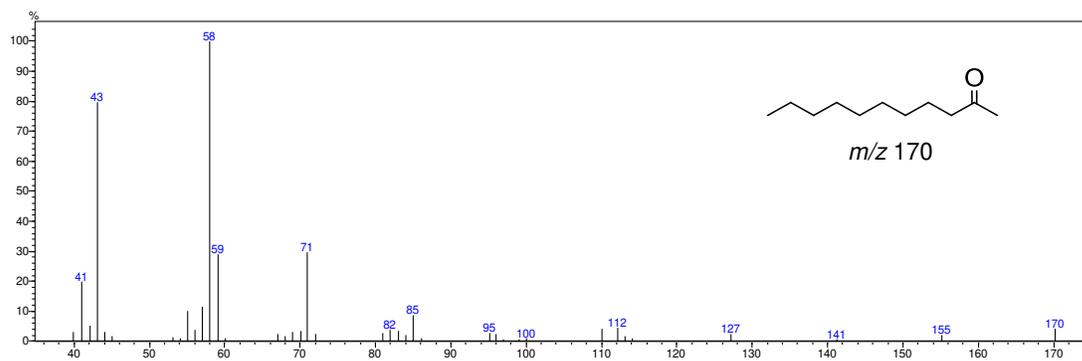
E-13. Espectro de massas obtido por impacto de elétrons (70 eV) do ácido cicloexanóico na forma de éster metílico (**21.2**).



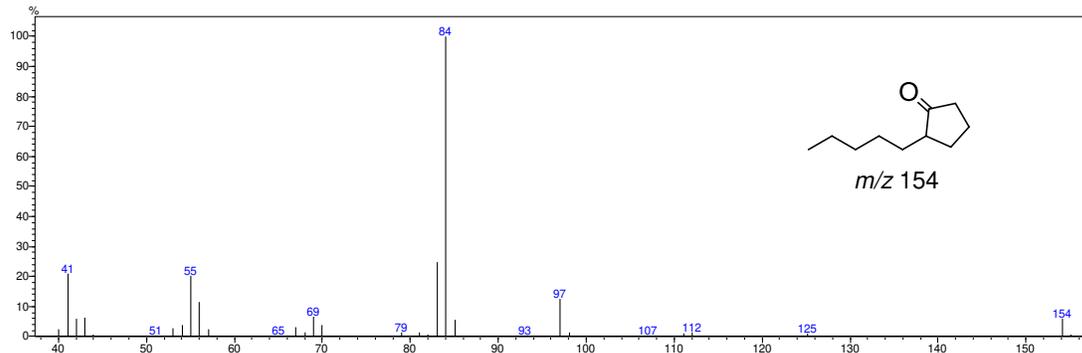
E-14. Espectro de massas obtido por impacto de elétrons (70 eV) do cis-3-ácido hexenóico na forma de seu éster metílico (**18.2**).



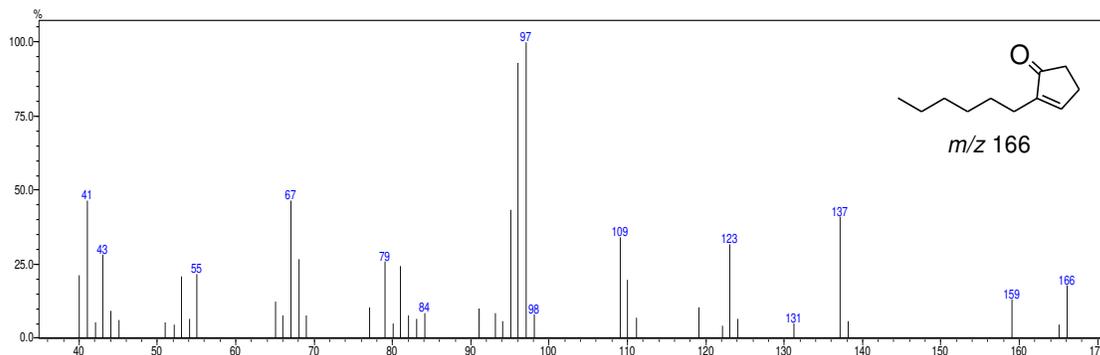
E-15. Espectro de massas obtido por impacto de elétrons (70 eV) do salicilato de metila (**23.1**, m/z 152, éster metílico).



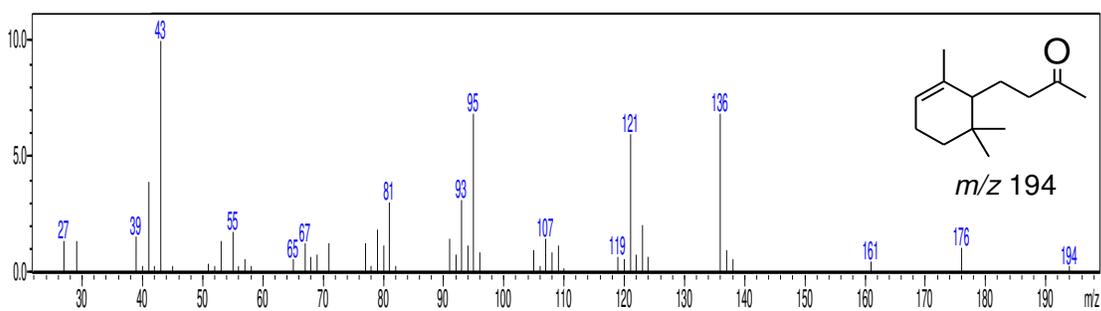
E-16. Espectro de massas obtido por impacto de elétrons (70 eV) da undecan-2-ona (**24**).



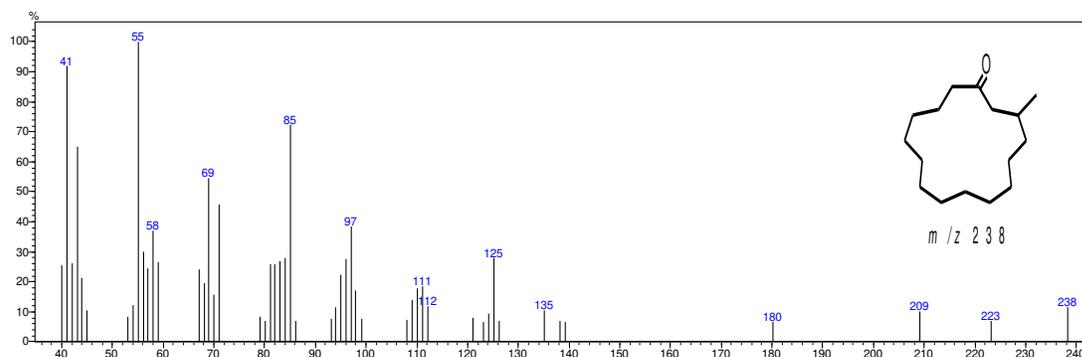
E-17. Espectro de massas obtido por impacto de elétrons (70 eV) da 2-pentilciclopentanona (**25**).



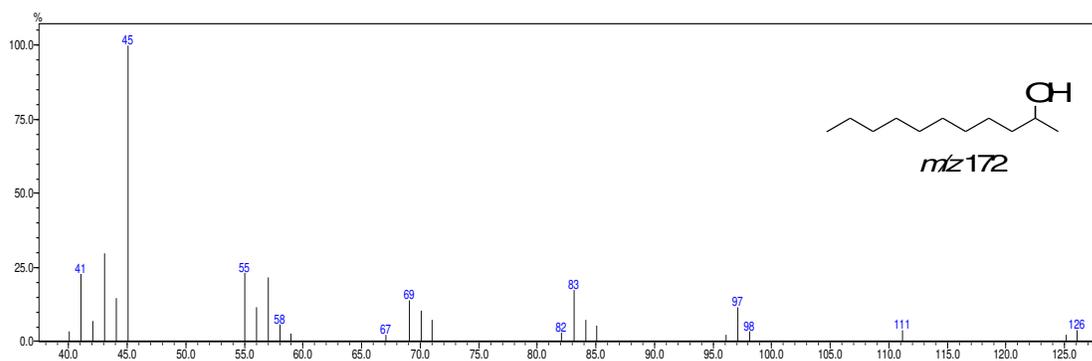
E-18. Espectro de massas obtido por impacto de elétrons (70 eV) da 2-hexilciclopent-2-en-1-ona (**26**).



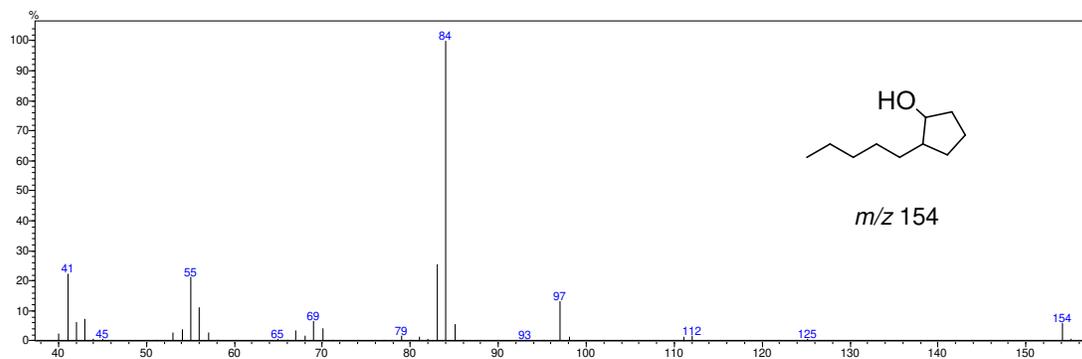
E-19. Espectro de massas obtido por impacto de elétrons (70 eV) da 4-(2,6,6-trimetilciclohexil)-2-butanona (**27**).



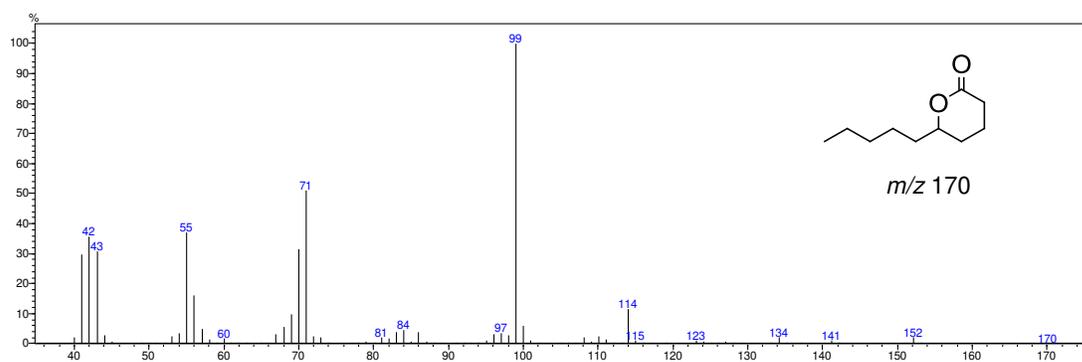
E-20. Espectro de massas obtido por impacto de elétrons (70 eV) do 3-metilciclopentadecanona (**28**).



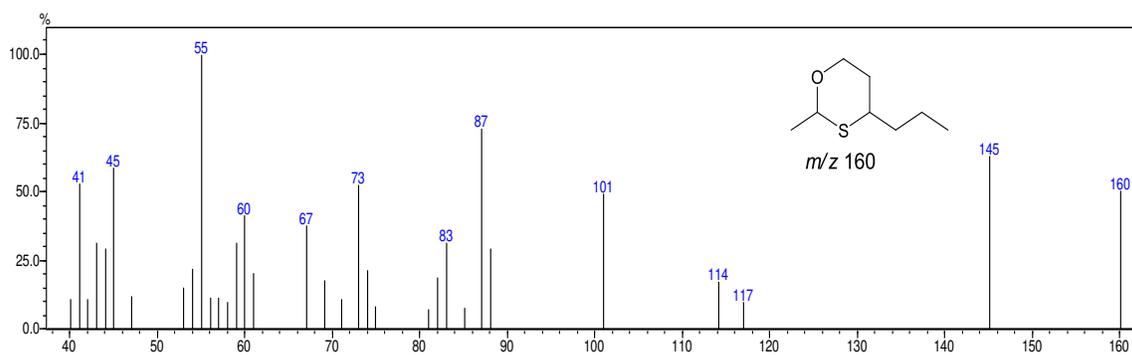
E-21. Espectro de massas obtido por impacto de elétrons (70 eV) do undecan-2-ol (**24.1**).



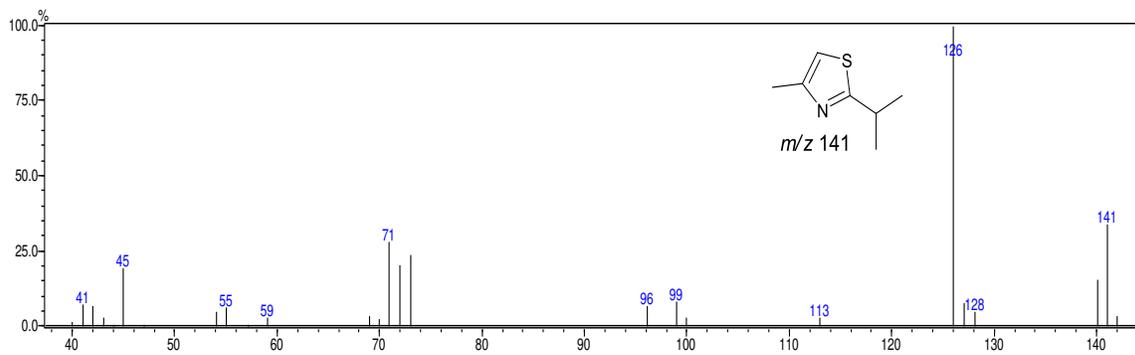
E-22. Espectro de massas obtido por impacto de elétrons (70 eV) do 2-pentilciclopentanol (25.1).



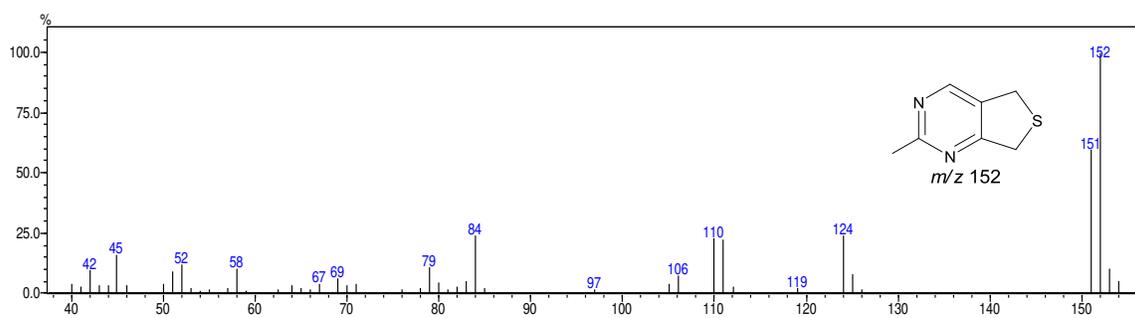
E-23. Espectro de massas obtido por impacto de elétrons (70 eV) da δ -decalactona (25.2).



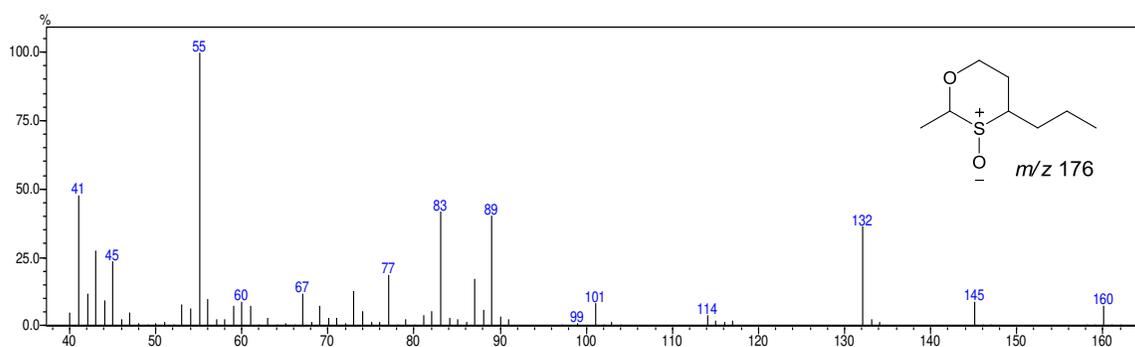
E-24. Espectro de massas obtido por impacto de elétrons (70 eV) do 2-metil-4-propil-1,3-oxatiano (29).



E-25. Espectro de massas obtido por impacto de elétrons (70 eV) do 2-isopropil-4-metiltiazol (**30**).

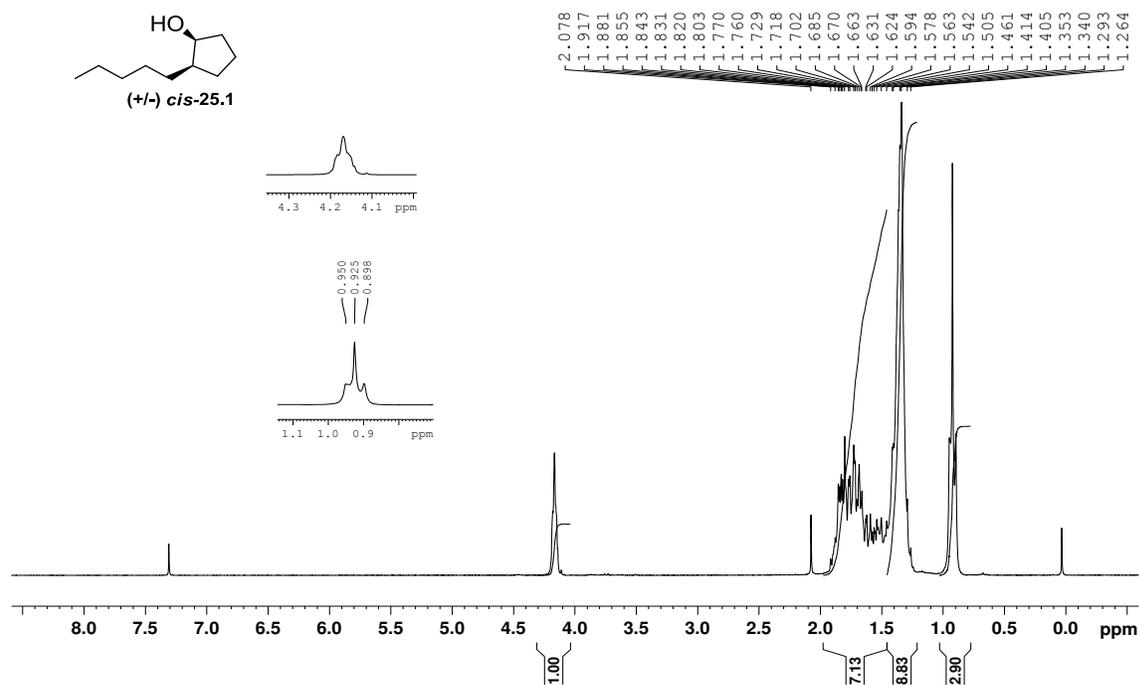


E-26. Espectro de massas obtido por impacto de elétrons (70 eV) do 2-metil-5,7-diidrotieno[3,4-d]-pirimidina (**31**).



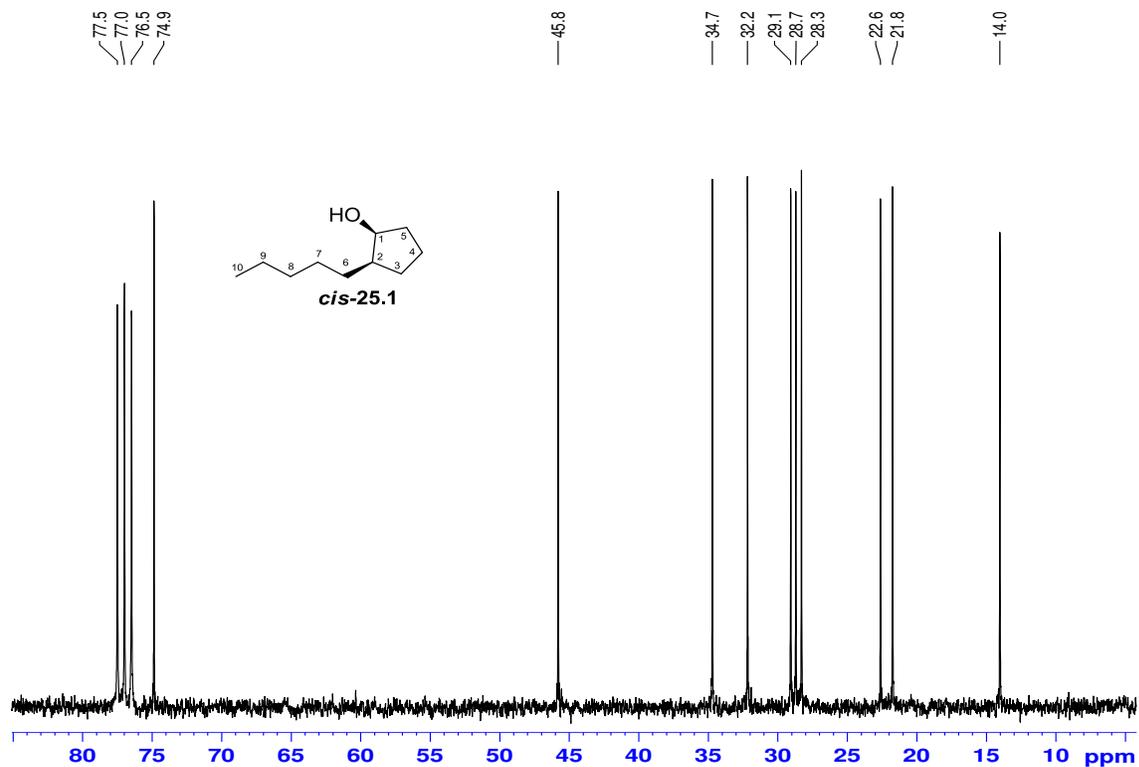
E-27. Espectro de massas obtido por impacto de elétrons (70 eV) do **29.1**.

Anexo VI – Espectros de RMN de ^1H e ^{13}C .



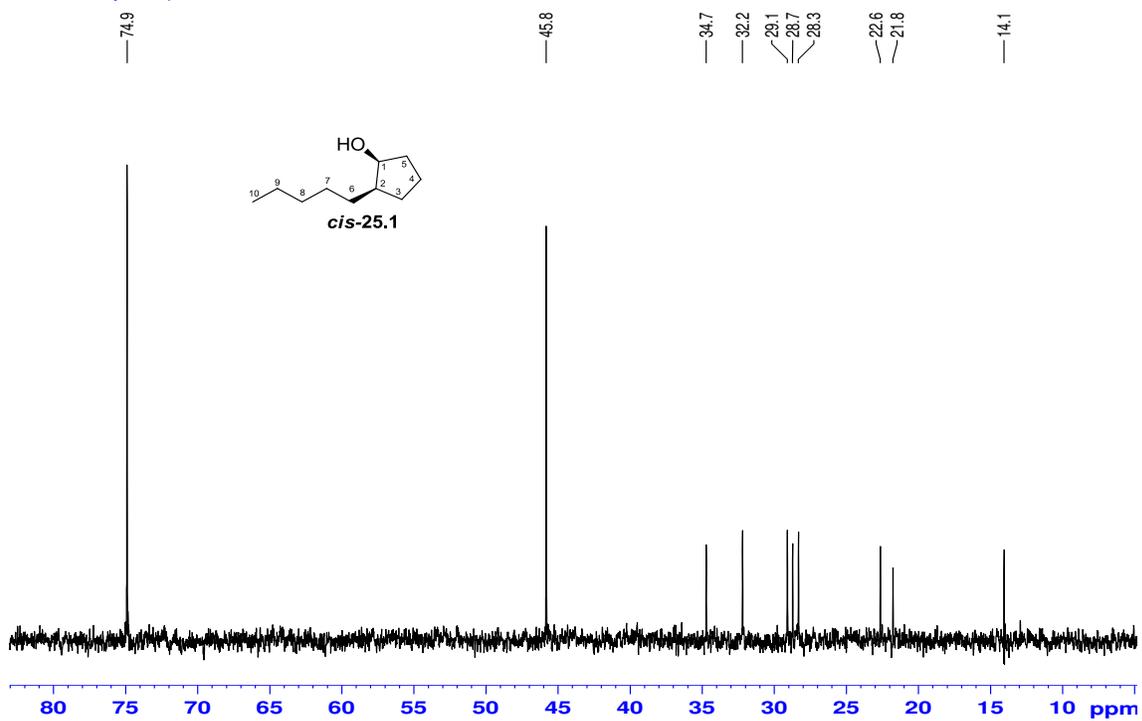
E-28. Espectro de RMN de ^1H (250 MHz, CDCl_3) do *cis*-25.1.

RQ F9-11 jan02cpsC2

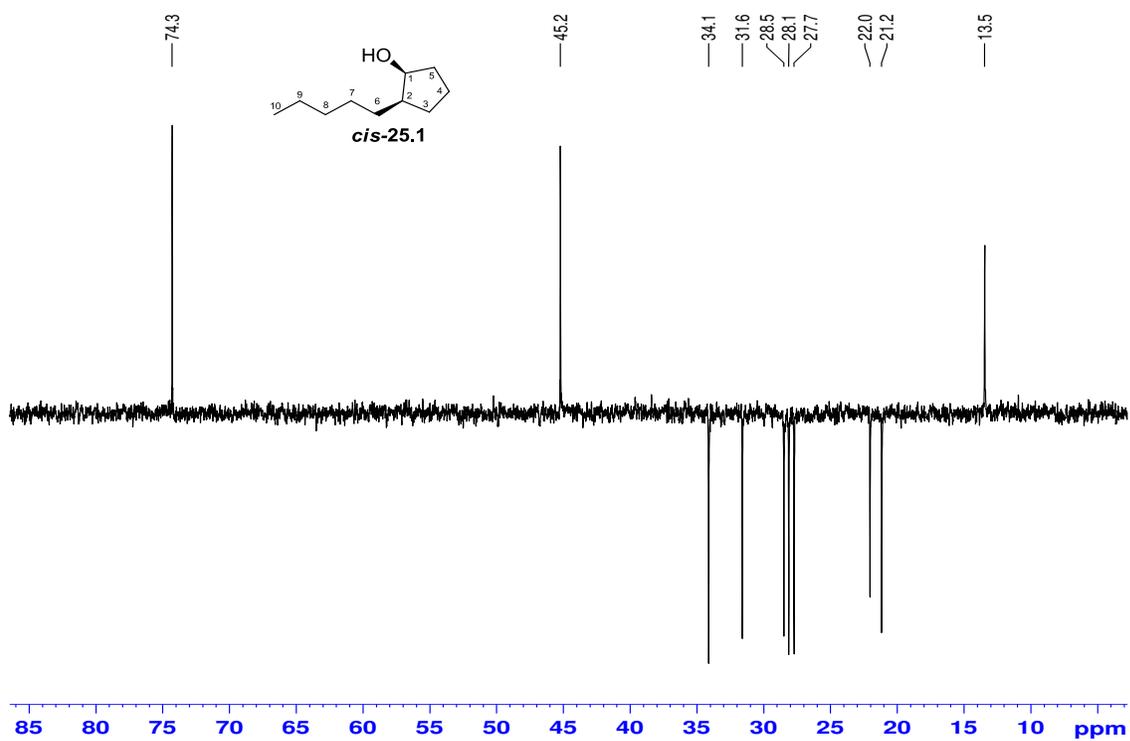


E-29. Espectro de RMN de ^{13}C (62,9 MHz, CDCl_3) do *cis*-25.1

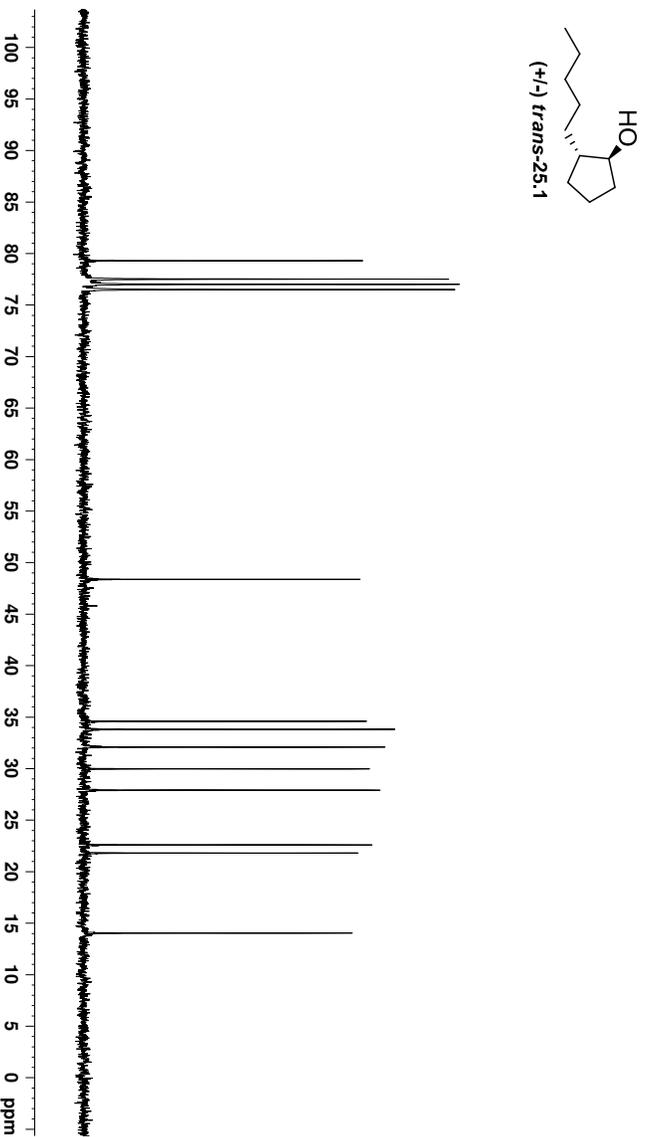
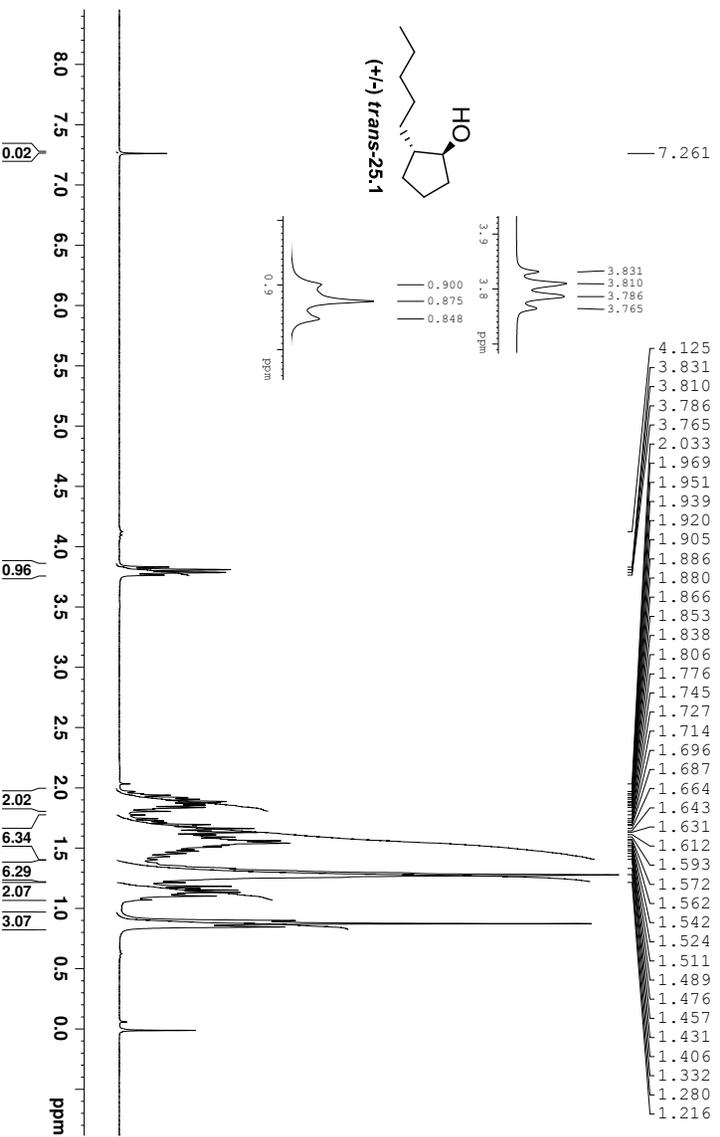
Dept90
RQ F9-11 jan02cpsD2



Dept 135
RQ F9-11 jan02cp

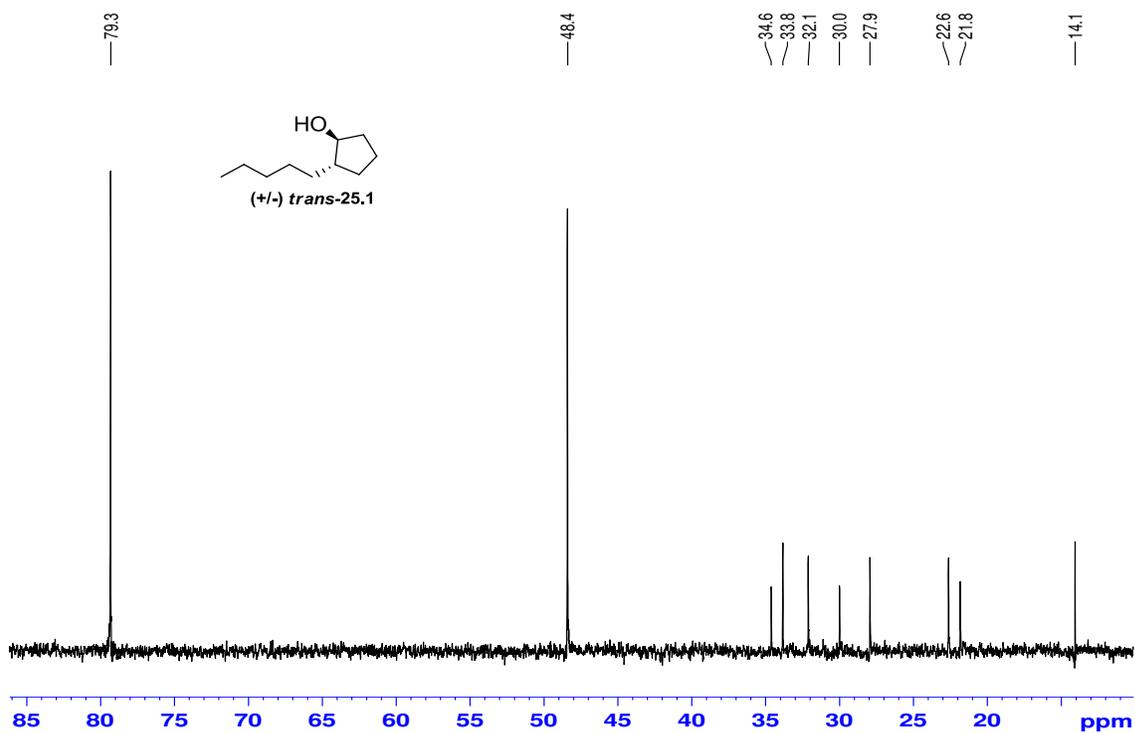


E-30. Espectro de RMN de ¹³C, DEPT 90° e 135° (62,9 MHz, CDCl₃) do *cis*-25.1



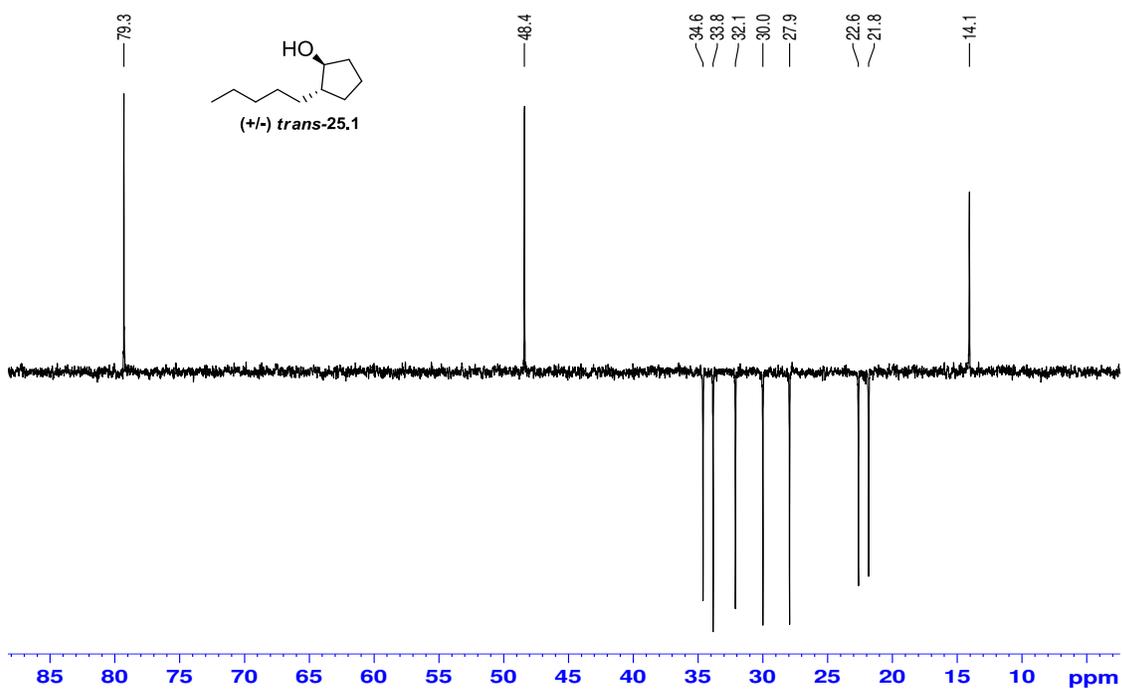
Dept 90

RQ 15-20 - CDCl₃ - Bruker 250 MHz - dez06cpsD1

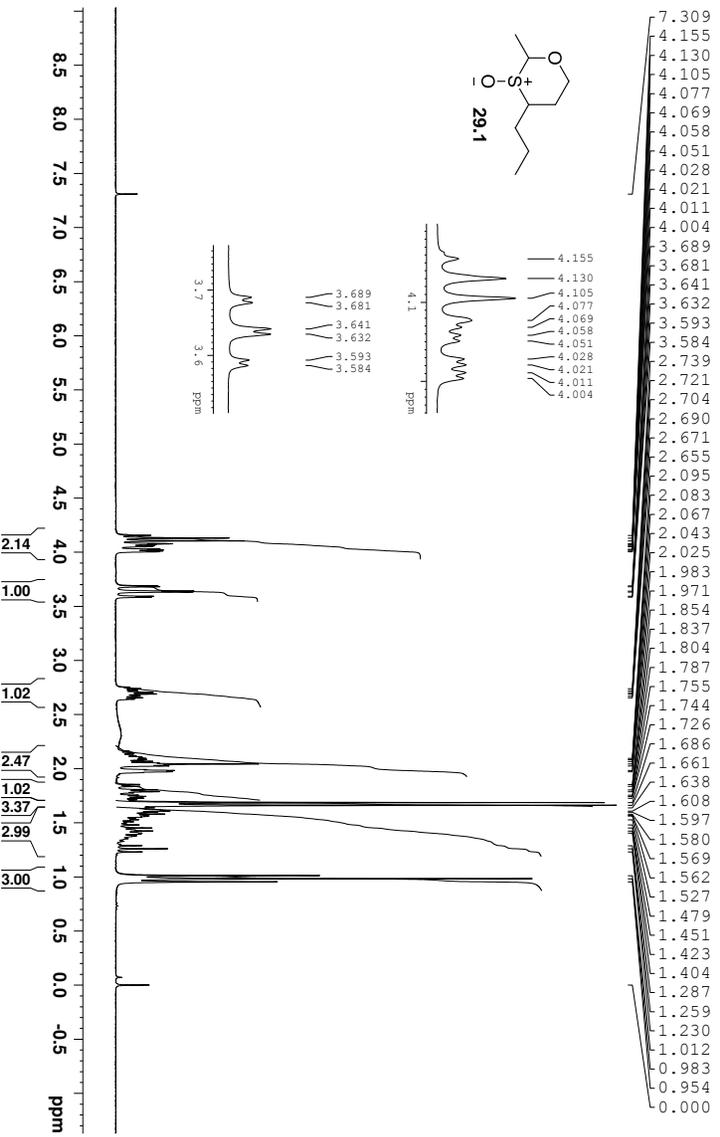


Dept 135

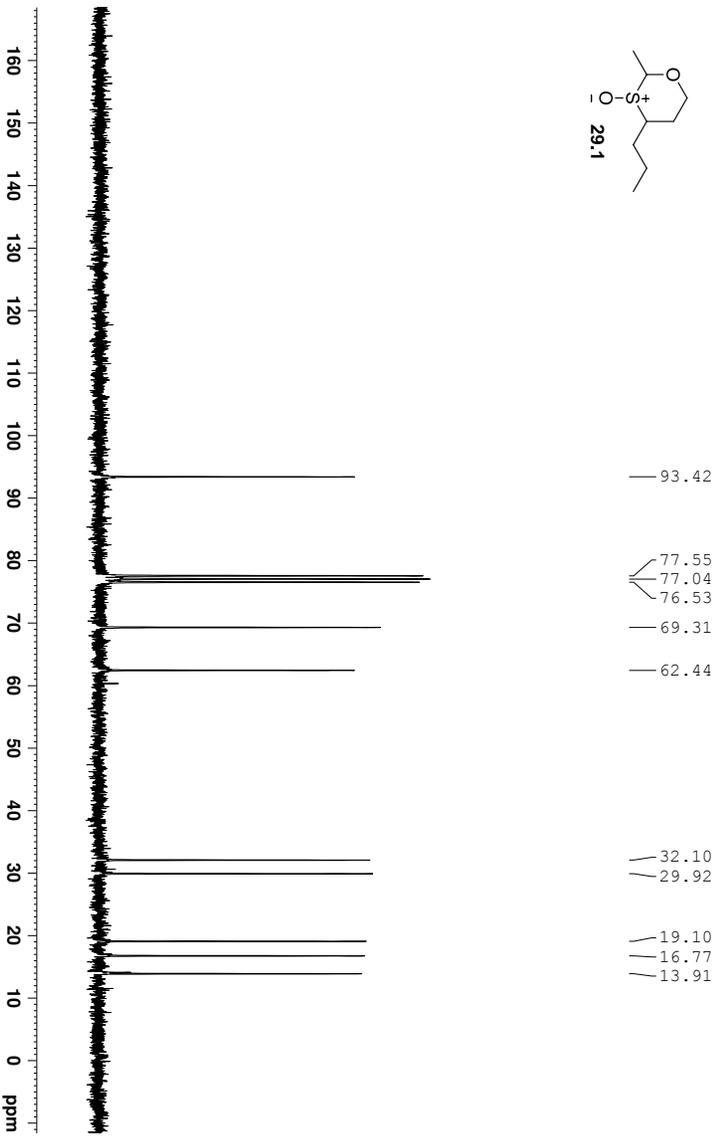
RQ 15-20 - CDCl₃ - Bruker 250 MHz - dez06cpsD1



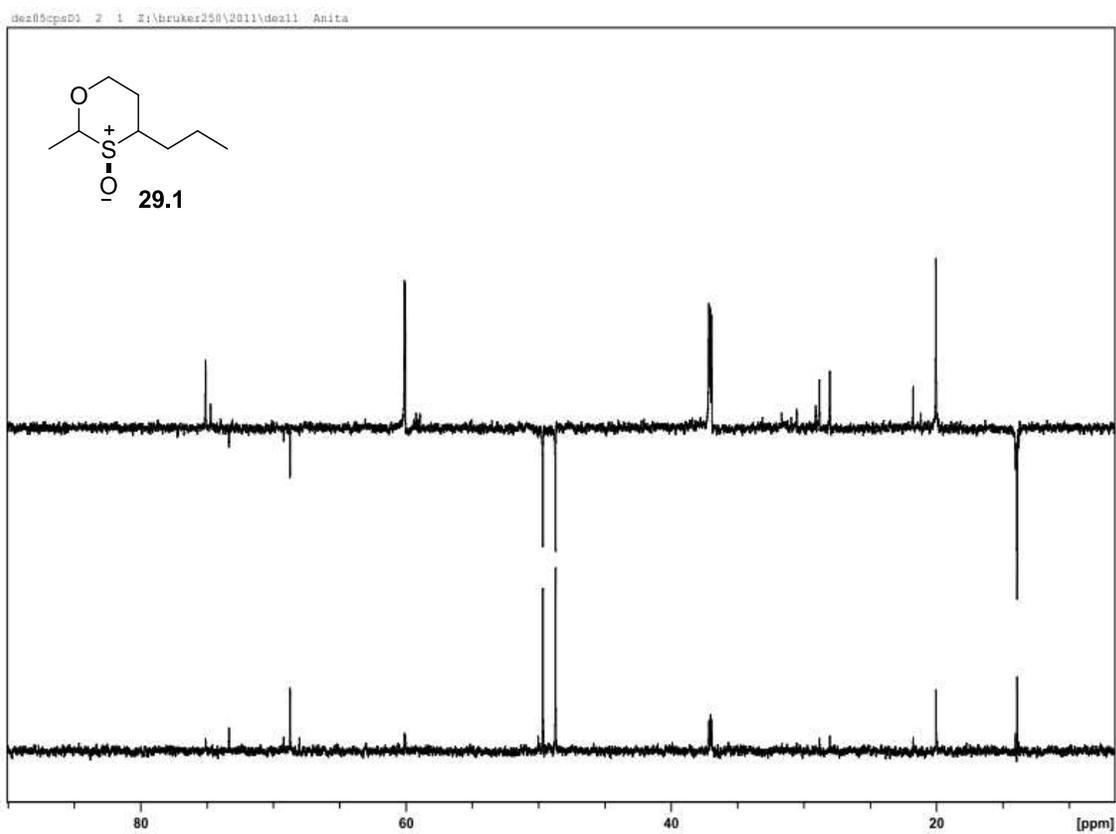
E-33. Espectro de RMN de ¹³C, DEPT 90° e 135° (62,9 MHz, CDCl₃) do *trans*-25.1.



E-34. Espectro de RMN de ^1H (250 MHz, CDCl_3) do 2,3-*trans*-3,4-*trans*-29.1.



E-35. Espectro de RMN de ^{13}C (62,9 MHz, CDCl_3) do 2,3-*trans*-3,4-*trans*-29.1.



E-36. Espectro de RMN de ^{13}C , DEPT 90° e 135° (62,9 MHz, CDCl_3) do 2,3-*trans*-3,4-*trans*-29.1.