



UNIVERSIDADE DA BEIRA INTERIOR

Faculdade de Ciências

# **Biotransformação de derivados de Guaienos**

**Raquel Craveiro Costa**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em

**Bioquímica**

(2º ciclo de estudos)

Orientador: Prof. Doutor Jesus Miguel Rodilla

Co-orientador: Prof. Doutor Pedro Rocha

**Covilhã, Outubro 2011**



*“Algo só é impossível até que alguém duvide  
e acabe provando o contrário”.*

*Albert Einstein*

# Agradecimentos

Ao longo deste tempo dedicado ao trabalho que culminou nesta tese, muitas são as pessoas que me têm apoiado, sem as quais jamais conseguiria ter alcançado os meus objectivos.

Gostaria de agradecer ao Professor Doutor Jesus Rodilla, por toda a ajuda a nível pedagógico e científico, por toda a disponibilidade e orientação que me prestou, sem as quais não seria possível finalizar este trabalho.

Ao professor Pedro Rocha, por todo o auxílio prestado na realização deste projecto de investigação, nomeadamente, por me ter disponibilizado as suas instalações e material. E às minhas colegas do laboratório Dr. Brito Rocha, Doutora Celina, Licenciadas Mariana e Cleide pela sua ajuda e conhecimentos.

Aos meus colegas do laboratório da Universidade da Beira Interior, Laura, Sofia, Patrícia, Nelson e João, a companhia, os bons momentos, a ajuda e a amizade que trocaram comigo.

A todos os meus Amigos, agradeço todo o apoio que me deram e toda a paciência que tiveram comigo ao longo da minha vida e que me ajudaram a alcançar este objectivo tão importante. A todos eles que estiveram sempre comigo, um muito obrigado.

À minha família por todo o incentivo e apoio que me tem dado nas minhas decisões, mas, principalmente, aos meus pais, sem os quais não conseguiria ter chegado aqui. Foi grande o esforço e, acima do orgulho que têm em mim, tenho muito orgulho neles.

A todos os que contribuíram muito ou pouco em todos os passos da minha vida...

OBRIGADA POR TUDO

# Resumo

As reacções químicas e as biotransformações desde a antiguidade que são utilizadas. No entanto, com o aumento do seu conhecimento, o seu uso foi aumentado e melhorado e são bastante utilizadas na indústria.

No presente trabalho, realizou-se uma reacção de acetilação utilizando piridina e anidrido acético para o guaiol e um tratamento com cromato de sódio utilizando, para além deste, anidrido acético e ácido acético, tanto para o guaiol como para o bulnesol.

Posteriormente, foram realizadas biotransformações com *Aspergillus niger* para o bulnesol e com *Rhizopus stolonifer* para o bulnesol e para os produtos obtidos destas reacções referidas anteriormente. Para as biotransformações, fez-se o cultivo dos fungos e inoculou-se o produto a transformar no meio. O tempo que demorou cada biotransformação foi controlado.

Os produtos foram extraídos tanto das transformações químicas como das biotransformações por extracção líquido - líquido. Para a purificação dos compostos, estes foram separados por cromatografia em coluna e verificou-se o grau de separação por cromatografia em camada fina.

Por fim, os compostos obtidos foram caracterizados através de métodos espectroscópicos: técnicas de ressonância magnética nuclear (RMN), de protão (RMN  $^1\text{H}$ ), de carbono (RMN  $^{13}\text{C}$ ) e bidimensionais; infravermelho (IV) e espectros de massa (EM).

Os compostos obtidos foram: o 5,11-epoxiguaien-1( $\alpha,\beta$ )-ol no tratamento químico do guaiol com cromato de sódio, acetato de guaiol na reacção de acetilação, o 5-hidroxihamamyol na biotransformação do bulnesol com o *Rhizopus stolonifer* e o 5,11-epoxiguaien-1( $\alpha,\beta$ ),7( $\alpha,\beta$ )-diol da biotransformação do 5,11-epoxiguaien-1( $\alpha,\beta$ )-ol com *Rhizopus stolonifer*.

Do tratamento com cromato de sódio do bulnesol, da biotransformação do acetato de guaiol com o *Rhizopus stolonifer* e do bulnesol com *Aspergillus niger* não se obtiveram os produtos desejados.

Concluiu-se que as reacções químicas são mais rápidas e têm maior rendimento do que as biotransformações, e que o *Rhizopus stolonifer* se aplica mais a estes compostos do que o *Aspergillus niger*.

Palavras chave: *Rhizopus stolonifer*, *Aspergillus niger*, biotransformação, oxidação alílica, acetilação, adição.

# Abstract

Since antiquity that chemical reactions and biotransformations have been used in day-to-day life. However, with the increasing of their knowledge its use has been expanded and improved and, are widely used in industry.

In the present work was made a reaction of acetylation using acetic anhydride and pyridine to treat guaiol and another reaction with sodium chromate using, in addition to this, acetic anhydride and acetic acid, to treat both guaiol and bulnesol.

Later, biotransformations were carried out with *Aspergillus niger* for bulnesol and, with *Rhizopus stolonifer* for bulnesol and for the products of the reactions mentioned above. For these biotransformations the fungi was cultivated, and the product for transformation was inoculated in the medium. The time that each biotransformation took to finish was controlled.

The products were extracted from both of chemical reactions and biotransformations by extraction liquid - liquid. The product compounds from the extraction were separated by column chromatography, as a way of purification, and the degree of separation was analyzed by thin layer chromatography.

Finally, the compounds were characterized by spectroscopic methods: nuclear magnetic resonance (NMR) of proton ( $^1\text{H}$  NMR), carbon ( $^{13}\text{C}$  NMR) and dimensional; infrared (IR) and mass spectra (MS).

The compounds obtained were: 5,11-epoxiguaien-1 ( $\alpha$ ,  $\beta$ )-ol from the guaiol chemical treatment with sodium chromate, guaiol acetate from the acetylation reaction, 5-hidroxihamyol from the biotransformation of bulnesol with *Rhizopus stolonifer* and 5,11-epoxiguaien-1 ( $\alpha$ ,  $\beta$ ), 7 ( $\alpha$ ,  $\beta$ )-diol from the biotransformation of 5,11-epoxiguaien-1 ( $\alpha$ ,  $\beta$ )-ol with *Rhizopus stolonifer*.

From the treatment of bulnesol with sodium chromate, biotransformation of guaiol acetate with *Rhizopus stolonifer* and biotransformation of bulnesol with *Aspergillus niger*, the desired products were not yielded.

It was concluded that the chemical reactions are faster and have higher income than the biotransformations, also *Rhizopus stolonifer* seems to be more adequate to these compounds than the *Aspergillus niger*.

Keywords: *Rhizopus stolonifer*, *Aspergillus niger*, biotransformation, alilic oxidation, acetylation, addition.

# Índice

Resumo.....	v
Abstract.....	vi
Lista de acrónimos.....	xiii
1. Introdução Geral .....	1
2. Introdução teórica .....	3
a. Reacções químicas .....	3
a) Oxidação alílica .....	3
b) Acetilação.....	4
b. Biotransformações .....	5
c. Terpenos .....	8
c.1. Bulnesia sarmientoi.....	8
c.2. Guaiol (C <sub>15</sub> H <sub>26</sub> O).....	9
c.3. Bulnesol (C <sub>15</sub> H <sub>26</sub> O).....	9
d. Microbiologia .....	11
1) Classificação de microrganismos.....	11
2) Nutrição Microbiana .....	14
3) Meios de cultura .....	16
4) Crescimento microbiano.....	18
e. Fungos.....	26
Características gerais .....	27
Estrutura fúngica .....	27
Nutrição e metabolismo .....	28
Crescimento fúngico .....	28
Reprodução.....	29
Taxonomia .....	30

<b>3. Materiais e métodos</b> .....	33
<b>a. Técnicas cromatográficas</b> .....	33
Cromatografia em camada fina (CCF) .....	33
Cromatografia em coluna .....	33
<b>b. Técnicas espectroscópicas</b> .....	33
Infravermelhos (IV) .....	33
• Espectros de RMN e Bidimensionais .....	33
• Espectros de massa .....	34
Densidade óptica .....	34
<b>c. Separação do guaiol e do bulnesol</b> .....	34
<b>d. Obtenção do acetato de guaiol</b> .....	34
<b>e. Reacções</b> .....	35
-Preparação da reacção .....	35
-Fim da reacção .....	35
-Extracção dos produtos da reacção .....	36
-Separação dos componentes .....	36
-Characterização dos produtos .....	36
<b>f. Biotransformações</b> .....	36
<i>Rhizopus stolonifer</i> .....	37
<i>Aspergillus niger</i> .....	39
<b>4. Resultados e discussão</b> .....	40
Separação do guaiol e do bulnesol .....	40
Reacção de acetilação do guaiol .....	40
Tratamento com Na <sub>2</sub> CrO <sub>4</sub> .....	40
-Tratamento do guaiol .....	40
-Tratamento do bulnesol .....	46
Biotransformação do bulnesol pelo <i>Rhizopus stolonifer</i> .....	49



Biotransformação do acetato de guaiol pelo <i>Rhizopus stolonifer</i> .....	51
Biotransformação do bulnesol pelo <i>Aspergillus niger</i> .....	52
Biotransformação do 5,11-epoxiguaien-1( $\alpha$ , $\beta$ )-ol pelo <i>Rhizopus stolonifer</i> .....	52
Valores dos $[\alpha]_D^{Temp}$ medidos .....	55
<b>5. Conclusões</b> .....	<b>56</b>
<b>6. Bibliografia</b> .....	<b>58</b>
<b>7. Anexos</b> .....	<b>60</b>
Anexo 1 .....	61
Anexo 2 .....	69

# Lista de figuras

Figura 1- <i>Bulnesia sarmientoi</i> .....	8
Figura 2- Guaiol .....	9
Figura 3 - Bulnesol.....	9
Figura 4 - Célula procarióta .....	12
Figura 5 - Protozoário .....	13
Figura 6 - Fungo.....	13
Figura 7- Alga.....	13
Figura 8- Crescimento celular .....	18
Figura 9 - Curva de crescimento celular num sistema fechado .....	19
Figura 10 - Crescimento microbiológico exponencial .....	19
Figura 11 - Crescimento em função da temperatura .....	22
Figura 12 - Temperaturas ideais para o crescimento dos diferentes microrganismos.	23
Figura 13 - Fungo .....	27
Figura 14 - Espectro de $^1\text{H}$ .....	41
Figura 15 - Espectro de $^{13}\text{C}$ .....	41
Figura 16 - Atribuição dos valores dos carbonos do composto .....	42
Figura 17- Bidimensionais HMQC. Correlações de H - C a uma relação. ....	42
Figura 18 - Ampliação dos bidimensionais HMQC. Correlações de H-C a uma ligação.	43
Figura 19 - Bidimensionais HMBC. Correlações de H-C a duas e três ligações. ....	43
Figura 20 - Ampliação dos bidimensionais HMBC. Correlações de H-C a duas e três ligações. ....	44
Figura 21 - Infravermelho .....	44
Figura 22 - Espectro de massa .....	45
Figura 23- Estrutura molecular do 5,11-epoxiguaien-1( $\alpha,\beta$ )-ol .....	45
Figura 24 - Espectro de $^1\text{H}$ .....	46
Figura 25 - Espectro de $^{13}\text{C}$ .....	47
Figura 26 - Atribuição dos valores dos carbonos .....	47

Figura 27 - Infravermelho .....	48
Figura 28 - Espectro de massa .....	48
Figura 29 - Estrutura molecular do 4,8-dimetil-7-(3'-oxobutil)-5-oxononan-1,8-olida	49
Figura 30 - Espectro $^1\text{H}$ .....	49
Figura 31 - Espectro de $^{13}\text{C}$ .....	50
Figura 32 - Atribuição do valor dos carbonos. ....	50
Figura 33 - Infravermelho .....	51
Figura 34 - Estrutura química do 5-hidroxihamyol .....	51
Figura 35 - Espectro de $^1\text{H}$ .....	52
Figura 36 - Espectro de $^{13}\text{C}$ .....	53
Figura 37 - Atribuição dos valores das ligações de carbonos. ....	53
Figura 38 - Infravermelho .....	54
Figura 39 - Estrutura química do 5,11-epoxiguaien-1( $\alpha$ , $\beta$ ),7( $\alpha$ , $\beta$ )-diol.....	55

# Lista de tabelas

Tabela 1 - Classificação dos microrganismos de acordo com a sua nutrição. ....	16
Tabela 2 - Fases do crescimento microbiano.....	20
Tabela 3 - Taxonomia dos Fungos.....	31
Tabela 4 - Atribuição dos valores das ligações de carbonos do isómero do composto apresentado na figura 37. ....	54

# Lista de acrónimos

$a_w$  - Actividade da água

S - Nutriente limitante

CCF - Cromatografia em camada fina

CC - Cromatografia em coluna

Ru - Ruténio

Cr - Cromo

Mn - Manganês

IV- Infravermelho

IR - Infrared

EM - Espectro de massa

MS - Mass spectra

RMN - Ressonância Magnética Nuclear

NMR - Nuclear Magnetic Resonance

RMN  $^1\text{H}$  - Ressonância Magnética Nuclear de Protão

RMN  $^{13}\text{C}$  - Ressonância Magnética Nuclear de Carbono

NMR  $^1\text{H}$  - Proton Nuclear Magnetic Resonance

NMR  $^{13}\text{C}$  - Carbon Nuclear Magnetic Resonance

# 1. Introdução Geral

A utilização de plantas, sistemas químicos e processos microbiológicos no dia-a-dia da humanidade é difícil ser quantificado. Com o aumento do conhecimento e de uma cada vez maior curiosidade, uma vasta gama nos é apresentada, actualmente, em várias áreas, de produtos comerciais.

Desde a antiguidade que a Química e a Microbiologia são usadas para a preparação de alimentos e bebidas, e as plantas, dotadas de maior ou menor toxicidade, são usadas como potencial curativo.

Os avanços dos processos químicos analíticos, nomeadamente, dos novos métodos cromatográficos e espectrométricos, apoiados em aparelhos cada vez mais sofisticados, têm possibilitado um melhor conhecimento da composição química das plantas e a estrutura dos seus componentes activos, para verificar as suas aplicações conhecidas.

Começando por terem sido usados para preparar alimentos, muito antes de se saber da sua existência, têm sido usados microrganismos, principalmente bactérias, fungos e leveduras, para se proceder à biotransformação de compostos. Com o aumento do conhecimento acerca dos microrganismos, o seu uso foi aumentado e melhorado e, a sua aplicação industrial, representa uma indústria extremamente diversificada com rendimentos muito importantes.

A biotransformação é a conversão química de substâncias através de organismos vivos ou preparações enzimáticas. É uma ferramenta que aporta métodos inovadores, selectivos e não tão agressivos, para a obtenção de novos compostos frente à síntese química. As biotransformações são usadas para a realização de conversões específicas de substratos complexos ou introduzir diferentes grupos funcionais em posições difíceis, através de métodos químicos.

O presente trabalho, visa a obtenção de novos compostos com potencial actividade biológica, através da transformação química e microbiológica de produtos naturais.

Reacções químicas, processos cromatográficos, RMN de protão e carbono, espectros de massa e infravermelhos, foram utilizados para a obtenção dos novos compostos e caracterização estrutural.

Neste trabalho, submeteu-se o guaiol e o bulnesol, como produtos de partida, a reacções químicas utilizando o ácido metacloroperbenzoico, trióxido de crómio e cromato de sódio. Realizou-se a biotransformação do acetato de guaiol e de dois compostos resultantes da reacção química com o cromato de sódio, 5,11-epoxiguaien-1( $\alpha,\beta$ )-ol, utilizando o fungo *Rhizopus stolonifer*, e do bulnesol utilizando tanto o fungo *Rhizopus stolonifer* como o *Aspergillus niger*. Os fungos foram cultivados e inoculados, e através de cromatografia em camada fina (CCF) foi se controlando o grau da biotransformação dos produtos.

Após a extracção e a separação, por cromatografia, dos diversos compostos resultantes das reacções e das biotransformações, estes foram caracterizados através dos métodos espectroscópicos: de técnicas de ressonância magnética nuclear (RMN), de protão, de carbono e bidimensionais; infra-vermelho e espectros de massa.

## 2. Introdução teórica

### a. Reacções químicas

#### a) Oxidação alílica

A oxidação alílica define-se como a oxidação, habitualmente por formação de uma nova ligação C-O (Ex: cetonas, álcoois, ésteres, éteres, etc.) em posição alílica a um grupo funcional, geralmente uma dupla ligação C=C ou sistema aromático. No caso particular em que a oxidação ocorre em posição  $\alpha$  em relação a um composto aromático, designa-se oxidação benzílica.

A oxidação alílica e a epoxidação são dois processos competitivos, tanto *in vivo* como *in vitro*. Tipicamente, os produtos da oxidação alílica ocorrem quando a abstracção do hidrogénio é a reacção dominante em relação ao ataque electrofílico à dupla ligação. Em contraste com a epoxidação, a oxidação alílica permite que se mantenha a dupla ligação no produto, sendo assim permitidas posteriores funcionalizações.

A oxidação alílica é um processo que envolve radicais livres e, tendencialmente, ocorre na presença de metais de transição com baixos estados de oxidação. Por outro lado, a epoxidação está geralmente associada a espécies oxometálicas tais como Ru, Cr e Mn. Na prática, contudo, a epoxidação e a oxidação alílica são, muitas vezes, processos competitivos e frequentemente ocorrem em simultâneo. O predomínio de uma reacção sobre a outra está também muito dependente da natureza da olefina usada e da estabilidade relativa do radical alílico intermediário formado.

Neste trabalho recorreu-se às oxidações alílicas de forma a transformar o guaiol e o bulnesol num composto mais funcional e menos tóxico para os fungos facilitando a sua absorção para a biotransformação. [Salvador *e tal*, 2006]

#### - Exemplo de oxidação alílica

Foi descrito recentemente que reacções de alguns enois benzoatos alicíclicos, tratados com cromato de sódio, originam produtos formados por reacções de oxidação alílica. Assim, o enol benzoato do 5 $\alpha$ -colestan-3-ona originou 1-oxo-5 $\alpha$ -colestan-2-en-3-il benzoato; pela hidrólise foi obtido o 5 $\alpha$ -colestan-1,3-diona. Esta oxidação segue um caminho diferente do que segue a maior parte dos esteris enólicos, que têm lugar na própria dupla ligação em vez de reagir nas suas posições alílicas.

A reacção descrita foi aplicada a vários tipos de benzoatos enólicos cilclicos. Em adição à oxidação alílica previamente descoberta, foi observado um rearranjo num  $\alpha$ -benzoiloxi-cetona na maior parte dos casos. As fracções e o rendimento dos produtos da reacção alílica e os rearranjos variam grandemente, e dependem, aparentemente ambos, dos factores eléctricos e estéricos.



As condições de oxidação foram idênticas às descritas anteriormente, nomeadamente o cromato de sódio em ácido acético, anidrido acético, e tetracloreto de carbono. Os produtos neutros foram separados por cromatografia [Goldblum *et al*, 1977].

- Exemplo de oxidação de grupos funcionais

A oxidação de álcoois secundários de esteróides a cetonas é afectado por uma grande variedade de agentes, varias vezes com quase fracções quantitativas. A aplicação desta conversão na análise de misturas complexas de esteroides parece promissora, já que no geral é mais fácil a detecção e a medição de quantidades muito pequenas de cetonas do que dos seus álcoois correspondentes. Para realizar efectivamente a reacção numa amostra analítica com uma composição desconhecida é necessário um oxidante que, mesmo quando usado em grande excesso, actue de uma maneira previsível, de modo que a medição e a identificação dos produtos da reacção nos dê informação acerca das quantidades e identidades dos compostos em investigação.

Oppenauer e Oberrauch (1949) introduziram o cromato de tert-butilo como um agente oxidante e empregaram-no numa mistura de 2-metilpropan-2-ol num solvente orgânico não polar inerte. Eles observaram que um aumento da acidez tornou a oxidação mais vigorosa e menos selectiva. Na experiência indicada esperou-se aumentar a selectividade do reagente executando a oxidação na presença de uma base orgânica. O complexo anidrido crómico-piridina não parece muito aplicável para o nosso fim visto que este reagente, preparado e usado como uma suspensão em piridina, e é menos fácil de controlar em pequenas quantidades. [Menini *et al*, 1962].

### b) Acetilação

Acetilação (ou na nomenclatura da IUPAC, etanoilação) descreve uma reacção que introduz um grupo funcional acetilo num composto orgânico, a partir de um grupo álcool. Deacetilação é a remoção do grupo acetilo.

Além disso, é o processo de introdução de um grupo acetilo no composto, ou seja, a substituição de um átomo activo de hidrogénio por um grupo acetilo. Uma reacção envolvendo a substituição do átomo de hidrogénio de um grupo hidroxilo com um grupo acetilo (CH<sub>3</sub>CO) rende um éster específico, o acetato. O anidrido acético, ou o cloreto de etanoilo, são comumente usados como agentes acetilantes reagindo com grupos hidróxilos livres.

## b. Biotransformações

O termo biotransformação, ou bioconversão, utiliza-se para designar uma série de processos químicos que visam a transformação de um composto, catalisada por enzimas existentes na funcionalidade de microrganismos. Através do estudo metabólico dos microrganismos podem-se prever determinadas reacções que induzem a modificação de uma certa molécula em estudo, numa outra diferente, nomeadamente a nível de grupos funcionais da mesma [Prescott *et al*, 2008].

Na procura de modificações estruturais para a obtenção de moléculas com maior potencial terapêutico, as reacções de biotransformação. São inegáveis as potencialidades existentes na moderna biotecnologia da cultura de células e seu uso na biotransformação.

As reacções de biotransformação, que podem providenciar meios económicos e ambientais amigáveis [Arantes *et al*, 2007], são altamente específicas ao substrato, permitindo reconhecê-lo de forma régio e estereoseletiva, sendo, portanto, capazes de realizarem reacções não acessíveis por processos químicos clássicos [Petersen *et al*, 2006].

A preferência pela utilização dos microrganismos nos processos de biotransformação deve-se a quatro razões: [Faber *et al*, 1997]

- Condições reaccionais:

As reacções enzimáticas não induzem a destruição de substratos sensíveis porque estas são moderadas. Deste modo, podem-se combinar várias reacções através de conversões escaladas utilizando diferenciadas espécies de microrganismos, ou então, apenas uma etapa de fermentação com apenas um organismo contendo um adequado sistema enzimático. Os compostos sensíveis a ácidos, bases ou a altas temperaturas, encontram nas biotransformações as condições perfeitas para a sua subsistência [Faber *et al*, 1997].

- Especificidade do substrato:

Como as enzimas apenas catalisam uma determinada etapa da reacção, não há problema em mudar um certo grupo químico de uma molécula noutra semelhante, que não seja o pretendido. Assim, utilizam-se os microrganismos para a realização de reacções difíceis de transformação na indústria [Faber *et al*, 1997].

- Estereoespecificidade:

Quando se utiliza uma mistura racémica, o organismo apenas a utiliza de forma eficaz para a conversão de um dos isómeros. Também se podem introduzir ou alterar estereoespecificamente, outros grupos substituintes para uma possível formação de centros opticamente activos [Faber *et al*, 1997].

- Regioespecificidade:

Só afecta uma posição específica de um determinado tipo de grupo funcional da molécula, mesmo na presença de outros grupos funcionais semelhantes. Deste modo, não existe a necessidade de utilizar os métodos de protecção de grupos funcionais que se usam em Química Orgânica na síntese de moléculas [Faber *et al*, 1997].

As reacções da biotransformação, destacam-se pelo uso de diferentes sistemas. A utilização da biotransformação permitiu a introdução de reacções catalisadas por enzimas com controlo régio e estereoquímico, gerando compostos opticamente puros além do desenvolvimento de rotas mais eficientes [Petersen *et al*, 2006].

Existe uma grande diversidade de microrganismos utilizados nestes processos de biotransformação. Bactérias unicelulares actinomicetes, leveduras e bolores são os mais utilizados. Os biocatalíticos (micróbios que crescem especificamente para a finalidade de bioconversão) podem crescer e ser processados de várias formas, ou seja, as células podem ser produzidas em série ou por cultura contínua, submetendo-se de seguida a uma secagem para uso directo, ou de formas mais específicas para a bioconversão em causa. [Prescott *et al*, 2008]

Segundo Leuengerger, um importante investigador neste campo científico, uma biotransformação pode ser executada por um dos seguintes métodos [Faber *et al*, 1997]:

- Células colectadas

Consiste no crescimento abundante de células num meio de cultura fertilizante e especialmente enriquecido (meio de cultura em crescimento), depois separam-se estas células e incorporam-se num meio de cultura para a biotransformação, que contém os agentes precursores. A utilização de esporos microbianos ou de células vegetarianas como biocatalizadores é um exemplo da utilização deste método [Faber *et al*, 1997].

- Células em crescimento

O composto precursor é incorporado no meio de cultura adequado, ou na inoculação, ou por outro lado no decurso de etapas posteriores, enquanto se dá o crescimento microbiano [Faber *et al*, 1997].

- Células imobilizadas

Existe a necessidade primária de se produzirem as células num meio apropriado para que de seguida se separem e imobilizem [Faber *et al*, 1997].

Constituem sistemas mais resistentes, podendo ser utilizados por longos períodos; inclui a utilização de um sistema de aprisionamento realizado por diversas substâncias, tais como géis, através de precipitação, polimerização ou troca iónica [Petersen *et al*, 2006].

- Enzimas purificadas

Estas podem ser utilizadas na sua forma livre ou imobilizada. No entanto, têm de, incondicionalmente, apresentar um elevado nível de purificação para evitar que não haja uma difusão apropriada dos precursores através da membrana microbiana, ou que o produto resultante da transformação se difunda na fase final da reacção. Outra condição fundamental ao se recorrer a este método é a de que a enzima deve ser separada e purificada com relativa facilidade, ou deve-se encontrar disponível comercialmente [Faber *et al*, 1997].

- Sistemas de multiconversão

Utiliza-se este método para casos cuja bioconversão necessite de dois ou mais passos sequenciais [Faber *et al*, 1997].

- Sistemas de multifase

Apenas se usa no caso dos produtos e precursores, ou ambos, serem insolúveis em água mas lipofílicos. Recomenda-se que se trabalhe em duas fases, uma aquosa contendo os microrganismos ou a enzima, e um solvente imiscível em água [Faber *et al*, 1997].

As biotrasformações são, tipicamente, desenvolvidas por células inteiras ou por enzimas isoladas. Apesar de, em anos recentes, terem sido isoladas enzimas responsáveis pela hidroxilação fúngica, a fermentação por toda a célula é a técnica mais implementada na hidroxilação fúngica. Uma grande dificuldade para a biohidroxilação de um certo substrato é achar um microrganismo apropriado, sendo a técnica mais utilizada, para a resolução deste problema, a realização de um rastreio com diferentes estirpes de fungos.

Das diferentes transformações catalisadas por sistemas enzimáticos, a hidroxilação selectiva de átomos de carbono não activados é, particularmente, interessante, devido ao facto desta transformação ser difícil de alcançar por métodos químicos clássicos. Estas biohidroxilações têm sido desenvolvidas principalmente em campos de esferóides e terpenóides devido às exigências industriais para os seus produtos finais. Problemas como a aceitação do substrato, reacções paralelas indesejadas, selectividade e a previsão da posição de hidroxilação, dificultam a utilização de biotransformações [García-Granados *et al*, 2004].

A biotecnologia consiste no uso de sistemas celulares para o desenvolvimento de processos e produtos de interesse económico ou social. Entre os sistemas celulares, os fungos são de grande interesse biotecnológico e os mais utilizados em reacções de biotransformação devido ao rápido crescimento e metabolismo [Petersen *et al*, 2006].

## c. Terpenos

Os produtos naturais são na sua grande maioria extraídos de plantas, nomeadamente das suas partes vegetativas, com solventes a frio ou a quente. Serão alguns destes produtos assim obtidos que irão servir como precursores nas reacções de biotransformação com microrganismos [Faustino, 2004]

Os terpenos, óptimos substratos para conversões estereoespecíficas [Junior *et al*, 2006], constituem uma classe de produtos naturais com grande diversidade estrutural e para a qual, até ao momento, verifica-se o maior numero de substâncias descritas. Dentre as estruturas de maior importância incluídas neste grupo, estão aquelas classificadas como monoterpenóides, sesquiterpenóides, diterpenóides, triterpenóides e carotenóides, derivadas sem excepção, de um mesmo precursor biossintético, o pirofosfato de isopentila. De maneira geral os aromas e óleos essenciais são constituídos por monoterpenos e sesquiterpenos.

Os compostos sesquiterpénicos destacam-se pela sua utilização em várias propostas sintéticas e actividades biológicas descritas. Muitas destas substâncias são isoladas directamente de amostras de óleos essenciais e apresentam como principais características estruturais a presença de grupos funcionais que incluem hidroxilos e carbonilos em várias posições e com efeitos significativos na actividade destes compostos [Petersen *et al*, 2006].

### c.1. *Bulnesia sarmientoi*

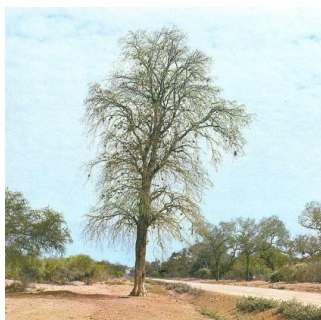


Figura 1- *Bulnesia sarmientoi* [[http://en.wikipedia.org/wiki/File:Bulnesia\\_sarmientoi.jpg](http://en.wikipedia.org/wiki/File:Bulnesia_sarmientoi.jpg)]

A *Bulnesia sarmientoi* Lorentz ex Griseb., é uma árvore do Chaco Boreal Sul-americano. Os serrines produzidos como subprodutos do processamento da madeira destilam-se para preparar um óleo essencial conhecido como óleo de guaiaco que é utilizado como ingrediente de perfumes e em usos medicinais externos. Este óleo apresenta uma composição de uma grande complexidade, é constituído por um numero importante de sesquiterpenos estruturalmente semelhantes e com muitos isómeros. A composição da essência está constituída fundamentalmente por sesquiterpenos derivados biogeneticamente: o germacreno, guaienos como os compostos maioritários guaiol e bulnesol, ou eudesmois, e um sesquiterpeno derivado da ciclização do bulnesol, o hanamyol (epóxido de bulnesol) [Dellacassa *et al*, 2006/2007].

### c.2. Guaiol (C<sub>15</sub>H<sub>26</sub>O)

É um álcool sesquiterpeno muito comum encontrado em quantidades significativas numa grande variedade de plantas medicinais e óleos essenciais. É um produto farmacológico utilizado na medicina humana, principalmente em tratamentos de pele [Craven *et al*, 2005].

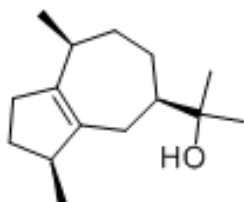


Figura 2- Guaiol [[http://www.chemicalbook.com/ChemicalProductProperty\\_EN\\_CB2198798.htm](http://www.chemicalbook.com/ChemicalProductProperty_EN_CB2198798.htm)]

### c.3. Bulnesol (C<sub>15</sub>H<sub>26</sub>O)

É um álcool sesquiterpeno muito comum encontrado em plantas medicinais e óleos essenciais [Craven *et al*, 2005].

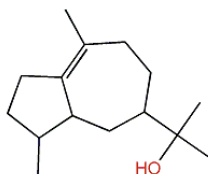


Figura 3 - Bulnesol [<http://www.pherobase.com/database/floral-compounds/floral-taxa-compounds-detail-bulnesol.php>]

-Exemplos de biotransformações:

-Biotransformação de um alcalóide esteroidal com *Rhizopus stolonifer*

A transformação fúngica envolve o uso de diferentes fungos para realizar reacções químicas nas quais as substancias de partida e os produtos são de complexidade química comparável. As enzimas microbianas são capazes de realizar uma grande diversidade de reacções incluindo a inserção de oxigénio nas ligações de C-H e C-C, a adição de oxigénio a um alceno, a transferência de uma unidade acilo ou de açúcar de um substrato para outro; a hidrólise ou a formação de amidas, epóxidos, ésteres e nitrilos, hidrogenação, hidrólise e eliminação de unidades pequenas, reacções de epimerização e isomerização e a formação de ligações C-C, C-O, C-S e C-N.

A transformação microbiana de um alcalóide esteroidal, dictyophlebine com *Rhizopus stolonifer* (ATCC 10404) originou três metabolitos oxidados a, b e c. Descobriu-se que o composto a é um novo produto. Os metabolitos foram caracterizados estruturalmente com base em técnicas espectroscópicas modernas. As suas actividades inibitórias para o acetil- e

butiril-colinesterase tem sido avaliado e o novo produto a descobriu-se ser mais potente do que os outros metabolitos [Devkota *et al*, 2007].

- Biotransformação da oxandrolona por *Rhizopus stolonifer*

Oxandrolona é um derivado anabólico sintético da testosterona que actua nos receptores de androgénios e é considerado o esteróide mais seguro.

Em continuação aos estudos de biotransformação de compostos bioactivos, foi descrita a síntese de derivados de oxandrolona hidroxilados por biotransformação com um fungo patogénico da planta, *Rhizopus stolonifer*. A oxidação da oxandrolona por *Rhizopus stolonifer* levou à formação de três novos metabolitos hidroxilados que foram identificados como 11 $\alpha$ -hidroxioxandrolona, 6 $\alpha$ -hidroxioxandrolona e 9 $\alpha$ -hidroxioxandrolona [Choudhary *et al*, 2009].

-Biotransformação da Carvona com *Aspergillus niger*

As suspensões de fungos filamentosos têm sido largamente utilizadas em reacções de biotransformação de terpenos. A habilidade de fungos filamentosos de transformar estes compostos tem sido direccionada principalmente para a obtenção de derivados oxigenados de maior valor agregado, principalmente visando a produção de flavorizantes, aromatizantes e fragrâncias. Esses microrganismos são seres simples e tem crescimento rápido, por isso geralmente promovem rápida metabolização dos substratos. Neste contexto, este trabalho descreve a investigação do potencial dos microrganismos *Aspergillus niger*, *Aspergillus ochraceus*, *Fusarium oxysporum*, *Penicillium citrinum*, e *Trichoderma sp.* produzirem metabolitos através da bioconversão dos monoterpénos (R)-(-)-Carvona e (S)-(+)-Carvona.

Todos os sistemas estudados mostraram habilidade na bioconversão dos substratos testados. O principal produto para a (R)-(-) Carvona foi o neo-dihidrocarveol e para a (S)-(+)-carvona foram os compostos iso-dihidrocarveol, neo-dihidrocarveol, neoiso-dihidrocarveol, trans-dihidrocarvona [Oliveira *et al*, 2009].

## d. Microbiologia

Microbiologia é a Ciência que estuda seres vivos de dimensões microscópicas e o seu nascimento deu-se quando começou a ser possível a observação destes seres [Ferreira *et al*, 2000].

A sociedade beneficia dos microrganismos de várias formas e são componentes indispensáveis do nosso ecossistema. São responsáveis pela realização dos ciclos de carbono, oxigénio, azoto e enxofre, que ocorrem nos sistemas aquático e terrestre. São também a fonte de nutrientes que está na base de todas as redes e cadeias ecológicas alimentares. De facto, a biotecnologia moderna baseia-se nos fundamentos microbiológicos [Prescott *et al*, 2008].

### 1) Classificação de microrganismos

Desde que o homem começou a conhecer melhor os seres vivos que sentiu a necessidade de os classificar, agrupar e organizar de maneira lógica e ordenada, de modo a facilitar o seu estudo e compreensão [Ferreira *et al*, 2000].

Os microrganismos estão classificados em cinco grandes grupos: bactérias, algas, fungos, protozoários e vírus. As principais diferenças destes grupos residem na estrutura dos respectivos microrganismos.

#### 1.1) Procariotas:

##### 1.1.1) Bactérias

As bactérias, protótipo dos procariotas, tem uma organização celular bastante simples e apresentam uma grande diversidade morfológica, tendo a sua maioria a forma de coco (esférica) ou de bastonete (bacilo).

A maioria das bactérias, após a replicação do seu material genético dividem-se por cisão binária e, de acordo com os planos da divisão celular, podem apresentar diversos agrupamentos.

Uma variedade de estruturas é encontrada nas células procariotas. Nem todas as estruturas são encontradas em todos os géneros. Para além disso, células gram-positivas e gram-negativas diferem nas suas paredes celulares. Apesar destas variações os procariotas são consistentes na sua estrutura fundamental e nos seus componentes mais importantes.

As células procariotas estão quase sempre ligadas por uma parede celular química complexa. Dentro desta parede e, separada desta pelo espaço periplasmático, encontra-se a sua membrana plasmática. Esta membrana pode formar invaginações para formar estruturas membranares internas simples. Como a célula procariota não contém organelos internos ligados por membranas, o seu interior aparenta ser morfológicamente simples. O material



genético está localizado numa região discreta, o nucleóide, e não está separado do resto do citoplasma por membranas. Os ribossomas e grandes massas denominadas de corpos de inclusão estão dispersados pela sua matrix citoplasmática. Tanto as células gram-positivas como gram-negativas, podem usar flagelos para a sua locomoção. Em adição, muitas células estão rodeadas por uma cápsula ou uma camada lisa do lado exterior da sua parede celular [Prescott *et al*, 2008].

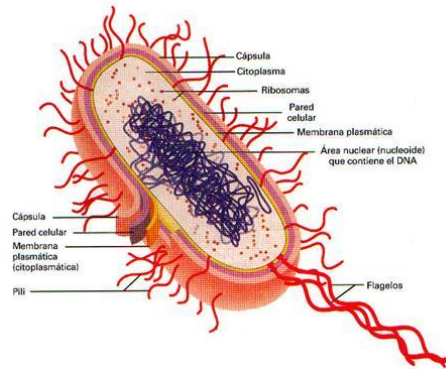


Figura 4 - Célula procariótica [http://sobreconceptos.com/procariota]

## 1.2) Eucariotas:

As células eucariotas existem quer como organismos unicelulares quer como constituintes de organismos multicelulares. Estas células são maiores e mais complexas; o seu genoma é maior e possuem mecanismos muito mais elaborados de regulação da expressão genética. O DNA das células eucarióticas encontra-se confinado num compartimento próprio delimitado por membranas, o núcleo. No citoplasma existem também vários compartimentos (organitos) delimitados por membranas e especializados em funções específicas. Dois destes organitos, as mitocôndrias (especializadas na produção de energia) e os cloroplastos (especializados na fotossíntese), são, muito provavelmente, descendentes de organismos procarióticos ancestrais que se estabeleceram como simbiotes de células maiores, anaeróbicas. Outra característica destas células é a presença, no citoplasma, de redes filamentosas (citoesqueleto) que servem tanto para apoio estrutural como desempenham funções de trilhos e motores responsáveis pelos movimentos celulares. A organização celular eucariota é comum aos fungos, algas e protozoários [Ferreira *et al*, 2000]:

### 1.2.1) Algas, fungos e protozoários

Os seres unicelulares eucarióticos mais simples são as leveduras, enquanto os protozoários são organismos unicelulares extremamente complexos que, apesar de não serem fotossintéticos, desenvolveram inúmeras especializações funcionais, tais como cílios sensoriais, fotoreceptores, cílios e flagelos, “boca”, e feixes contrácteis semelhantes a músculos. Alguns protozoários são carnívoros e têm a capacidade de perseguir, paralisar e capturar outras células [Ferreira *et al*, 2000].

As algas possuem cloroplastos e crescem nos mais variados ambientes, apesar de na sua maioria serem aquáticos. Formam a massa de organismos de fitoplancton que é a base das cadeias alimentares aquáticas.

Os fungos caracterizam-se por não ingerirem comida, ou seja, absorvem os nutrientes que se encontram disponíveis no seu meio ambiente.

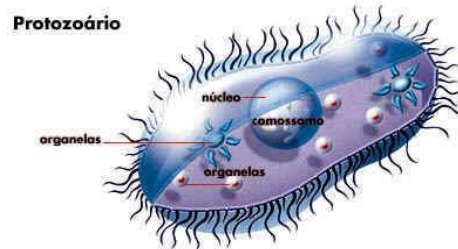


Figura 5 - Protozoário [http://www.google.pt/imgres?q=protozo%C3%A1rios&um=1&hl=pt-

PT&biw=1280&bih=607&tbm=isch&tbnid=Bkt4a9DX5i5J2M:&imgrefurl=http://www.enq.ufsc.br/labs/probio/disc\_eng\_bioq/trabalhos\_pos2004/microorganismos/PROTOZOARIOS.htm&docid=LyDetHUWncYYRM&w=400&h=221&ei=vMeRTsubAtCq8QOV4t0H&zoom=1&iact=hc&vpx=314&vpy=168&dur=399&hovh=150&hovw=271&tx=152&ty=67&page=1&tbnh=101&tbnw=182&start=0&ndsp=18&ved=1t:429,r:1,s:0]



Figura 6 - Fungo [http://www.google.pt/imgres?q=fungos&num=10&um=1&hl=pt-

PT&biw=1280&bih=607&tbm=isch&tbnid=zgRjezUJPAqlfM:&imgrefurl=http://www.fotoplatforma.pl/pt/fotos/1721/&docid=m1PmCnSgNuw\_FM&w=370&h=278&ei=BciRTuKBN8Sr8AOqgPUq&zoom=1&iact=hc&vpx=319&vpy=298&dur=1229&hovh=195&hovw=259&tx=146&ty=135&sqi=2&page=1&tbnh=110&tbnw=143&start=0&ndsp=21&ved=1t:429,r:15,s:0]



Figura 7- Alga [http://www.google.pt/imgres?q=algas&num=10&um=1&hl=pt-

PT&biw=1280&bih=607&tbm=isch&tbnid=luEFe4aQrfUN\_M:&imgrefurl=http://wonderfulseaworld.blogspot.com/2011/04/microorganismo-marinhos-e-algas.html&docid=XLHSoW\_NZDiGBM&w=1024&h=822&ei=bsiRTv2jG4ii8QOE7uzZAg&zoom=1&iact=hc&vpx=163&vpy=173&dur=309&hovh=201&hovw=251&tx=175&ty=134&sqi=2&page=1&tbnh=116&tbnw=136&start=0&ndsp=20&ved=1t:429,r:0,s:0]

### 1.3) Vírus

Os vírus têm, como características essenciais, dimensão submicroscópica, infecciosidade, replicação, parasitismo intracelular obrigatório e informação genética num único tipo de ácido nucleico, que tanto pode ser DNA como RNA, mas nunca ambos. Pode-se definir vírus como entidades potencialmente patogénicas cujos genomas são ácidos nucleicos que se replicam no interior de células vivas, usando a maquinaria sintética celular, e que causam a síntese de partículas que podem transferir o genoma para outras células. As partículas virais, ou viriões, são constituídas por uma cápsula proteica, a cápside, que encerra um nucleóide, composto pelo ácido nucleico viral, em regra associado a proteínas [Ferreira *et al*, 2000].

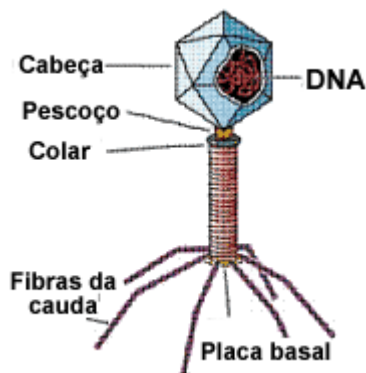


Figura 8 - Vírus [http://www.google.pt/imgres?q=virus&um=1&hl=pt-

PT&biw=1280&bih=607&tbm=isch&tbnid=U3QlwUoUEklv4M:&imgrefurl=http://dnaissuck.blogspot.com/2011/04/por-que-os-virus-sao-considerados-seres.html&docid=6Awv8cPw7x\_qEM&w=185&h=193&ei=FcqRTbZEMeu8QP7jsU5&zoom=1&iact=hc&vpx=640&vpy=325&dur=618&hovh=142&hovw=137&tx=74&ty=65&page=3&tbnh=118&tbnw=113&start=42&ndsp=21&ved=1t:429,r:10,s:42]

## 2) Nutrição Microbiana

Para obterem energia e reconstruírem os seus componentes celulares, os microrganismos tem de ter uma fonte de materiais e nutrientes. Os nutrientes são substâncias usadas na biosíntese e produção de energia e por isso são necessários para o crescimento microbiano.

Numa análise à composição da célula microbiana pode verificar-se que mais de 95% do seu peso seco se deve aos elementos: carbono, oxigénio, hidrogénio, nitrogénio, enxofre, fósforo, potássio, cálcio, magnésio e ferro. Estes são os macroelementos ou macronutrientes da célula pois são necessários aos microrganismos em grandes quantidades. Os primeiros seis macronutrientes são componentes dos carboidratos, lípidos, proteínas e ácidos nucleicos. Os outros quatro restantes existem na célula na forma de catiões e desempenham uma variedade de papéis.

Para além dos macronutrientes, são também necessários apesar de não limitarem o crescimento do microrganismo, pela maioria das células, micronutrientes ou elementos vestigiais como o magnésio, zinco, cobalto, molibdénio, níquel e cobre. Estes normalmente constituem enzimas e cofactores e participam na catálise de reacções e na manutenção da estrutura das proteínas.

Para além dos comuns macronutrientes e elementos vestigiais, os microrganismos podem ter requerimentos particulares que reflectem a natureza especial da sua morfologia e ambiente.

Todos os nutrientes têm de ser fornecidos numa mistura equilibrada, pois a redução de só um nutriente irá limitar o crescimento do microrganismo independentemente da concentração dos outros nutrientes [Ferreira *et al*, 2000].

### 2.1) Carbono, oxigénio e hidrogénio

As necessidades de carbono, hidrogénio e oxigénio são satisfeitas ao mesmo tempo. O carbono é necessário para o esqueleto ou estrutura de todas as moléculas orgânicas, e moléculas que servem como fontes de carbono normalmente também contribuem com átomos de oxigénio e hidrogénio. Devido ao facto de estes nutrientes orgânicos serem quase sempre reduzidos e terem electrões que pode doar a outras moléculas, também podem funcionar como fonte de energia.

Uma importante fonte de carbono que não fornece energia é o dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>). Isto porque o CO<sub>2</sub> é oxidado, e não possui hidrogénio. Provavelmente todos os microrganismos podem fixar CO<sub>2</sub> - isto é, reduzi-lo e incorpora-lo em moléculas orgânicas. No entanto, por definição, apenas os autotróficos podem usar CO<sub>2</sub> como a sua única ou principal fonte de carbono. Os heterotróficos dependem da presença de moléculas mais reduzidas e complexas como a glucose como fonte de carbono [Ferreira *et al*, 2000].

### 2.2) Azoto, fósforo e enxofre.

Para crescer, o microrganismo tem de conseguir incorporar grandes quantidades de azoto, fósforo e enxofre. Apesar destes elementos se poderem obter dos mesmos nutrientes que fornecem carbono, os microrganismos normalmente incorporam também de fontes inorgânicas.

O azoto é necessário para a síntese de aminoácidos, purinas, pirimidinas, alguns carboidratos, lípidos, cofactores enzimáticos, e outras substâncias.

O fósforo está presente nos ácidos nucleicos, fosfolípidos, nucleótidos como o ATP, vários cofactores, algumas proteínas, e outros componentes celulares. Quase todos os microrganismos usam fosfato inorgânico como a sua fonte de fósforo e incorporam-no directamente.

O enxofre é necessário para a síntese de substâncias como o aminoácido cisteína e metionina, alguns carboidratos, biotina e tiamina. Muitos microrganismos usam sulfato como fonte de enxofre e reduzem-no por redução do sulfato [Ferreira *et al*, 2000].

### 2.3) Tipos nutricionais de microrganismos

Para além da necessidade de carbono, hidrogénio e oxigénio, todos os organismos necessitam de fontes de energia e de electrões para que se de o seu crescimento.

Os microrganismos podem ser classificados:

- Quanto a sua fonte de carbono como autotrofos e heterotrofos;
- Quanto à sua fonte de energia como fototrofos ou quimiotrofos;
- Quanto à fonte de electrões como litotrofos ou organotrofos [Prescott *et al*, 2008]

Tabela 1 - Classificação dos microrganismos de acordo com a sua nutrição.

Nutrição			
Categoria	Fonte de energia	Fonte de carbono	Exemplos
Fotoautotrófico	Luz	CO <sub>2</sub>	Algas, bactérias fotossintéticas
Fotoheterotrófico	Luz	Compostos orgânicos	Bactérias fotossintéticas. Arqueobactérias halófilas.
Quimiolitoautotrófico	Inorgânica	CO <sub>2</sub>	Eubactérias nitrificantes. Eubactérias oxidantes de enxofre.
Quimiolitoheterotrófico	Inorgânica	Compostos orgânicos	Algumas arqueobactérias metanogénicas
Quimiorganoautotrófico	Orgânica	CO <sub>2</sub>	Eubactérias metilotróficas autotróficas
Quimiorganoheterotrófico	Orgânica	Compostos orgânicos	Fungos, protozoários. Maior parte das eubactérias.

### 3) Meios de cultura

O conhecimento das exigências nutricionais dos microrganismos permite elaborar meios que promovam o seu crescimento em meios de cultura, *in vitro*. Na sua composição, os meios de cultura deverão incluir os nutrientes indispensáveis ao organismo em causa, sob forma assimilável. Quantitativamente, os nutrientes deverão estar presentes em concentrações

adequadas e não tóxicas, tais que, a carência de qualquer um deles não impeça a utilização dos demais.

Para além dos nutrientes requeridos às exigências dos microrganismos o meio de cultura deve ser estéril, isto é, não deve conter quaisquer organismos vivos. Os micróbios têm uma distribuição ubiqüitária e, devido às suas reduzidas dimensões, dispersam-se facilmente. Devemos esterilizar o meio de cultura após a sua preparação, para eliminar os microrganismos contaminantes. É, também, necessário ter precauções durante o seu subsequente manuseamento, a fim de evitar posteriores contaminações. As técnicas usadas para a prevenção de contaminações durante a manipulação de culturas e meios de cultura estéreis, são designadas técnicas de assepsia.

Os meios de cultura, depois de inoculados, devem ser incubados a temperaturas adequadas. Outras exigências essenciais ao crescimento dos microrganismos deverão, também, ser contempladas, tais como o pH, tensão de oxigénio, actividade da água (aw), valores que deverão situar-se dentro da gama tolerada pelos diferentes microrganismos.

Em termos gerais, os meios de cultura podem ser classificados de acordo com três principais aspectos: estado físico, composição química, objectivos funcionais.

Quando se torne desejável utilizar meios sólidos em vez de meios líquidos, um agente solidificante, tal como o agar, deverá ser incorporado no meio de cultura. Nestes meios o crescimento das células vai dar origem a colónias. Os meios semi-sólidos têm uma consistência pouco firme, pois contem uma pequena quantidade de agente solidificante, e são usados, por exemplo, para permitir a motilidade de microrganismos móveis.

Quanto ao conhecimento da composição química dos meios, o meio diz-se quimicamente definido quando se conhece a sua composição, ou quimicamente complexos quando a sua composição química exacta não é conhecida.

O isolamento de uma estirpe microbiana em cultura pura (que contem apenas um tipo de microrganismo) a partir de uma cultura mista (contem mais de um tipo de microrganismo), requer o uso de meios de cultura selectivos e/ou diferenciais. Os meios selectivos são formulados para suprimir o crescimento dos microrganismos que não interessam ao fim em vista, permitindo o crescimento dos microrganismos que se desejam isolar. Num meio diferencial podem crescer vários tipos de microrganismos mas, devido ao diferente aspecto que tomam nesse meio, podem distinguir-se entre si as colónias microbianas. Esta diferenciação manifesta-se em variações, tais como: tamanho, cor da colónia, cor do meio de cultura, etc.

Existem também técnicas especiais de crescimento para os microrganismos anaeróbios e microaerofílicos [Ferreira *et al*, 2000].

#### 4) Crescimento microbiano

Os microrganismos necessitam de acesso a fontes de energia e materiais essenciais para a formação dos seus componentes celulares. A célula obtém estas substâncias por processos de transporte membranar, dos quais os mais importantes são: difusão facilitada, transporte activo, e translocação em grupo. As células eucariotas também utilizam a endocitose.

Crescimento celular pode ser definido como um aumento dos constituintes celulares. Isto leva a um aumento de células quando os microrganismos se reproduzem por processos como germinação ou fissão binária. Seguidamente, as células individuais aumentam e dividem-se para dar origem a duas células de igual tamanho [Prescott *et al*, 2008].

Este crescimento pode ser processado em sistemas de cultura descontínuos ou em sistemas de cultura contínuos [Brock *et al*, 1994].

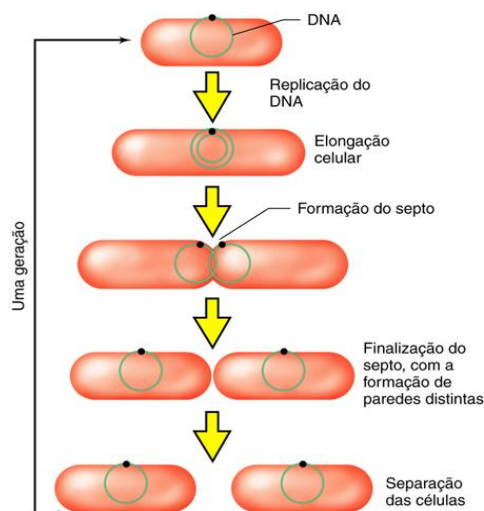


Figura 9- Crescimento celular [www.dms.ufsc.br/mipb131/arquivos/132\_Nutricao%20e%20crescimento.ppt]

O padrão típico de crescimento microbiano é exponencial e é estudado por análise da curva de crescimento da cultura microbiana. Quando os microrganismos são cultivados em meio líquido, normalmente crescem em culturas batch ou em sistemas fechados, ou seja, são incubados num meio de cultura fechado com um único meio batch. Devido a não ser providenciado meio novo durante a incubação, as concentrações de nutrientes decrescem e as concentrações de resíduos celulares aumentam. O crescimento da reprodução celular por fissão binária pode ser analisado como o logaritmo do número de células viáveis versus o tempo de incubação [Ferreira *et al*, 2000].

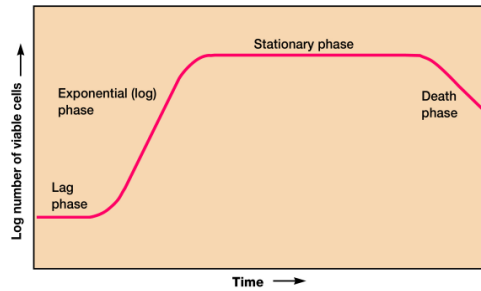


Figura 10 - Curva de crescimento celular num sistema fechado [Adaptado de Prescott *et al*].

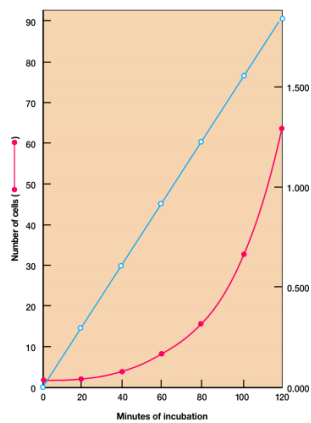


Figura 11 - Crescimento microbiológico exponencial [Adaptado de Prescott *et al*]

Quanto à equação que traduz o crescimento microbiano (1) para microrganismos filamentosos, é conveniente aplicar-se uma equação mais geral, onde se considera a variação da massa (X), em função do tempo como sendo proporcional à concentração de biomassa presente:

$$\frac{dX}{dt} \propto X \quad (1)$$

#### 4.1) Sistemas de cultura descontínuos

O método tradicional de estudar o crescimento microbiano tem sido o da cultura em descontínuo ou sistema fechado (batch). Consideremos um meio de cultura líquido, com uma adequada fonte de energia, os nutrientes necessários, condições químicas e físicas favoráveis. Se nele inocularmos uma população viável de microrganismos e seguirmos o seu crescimento ao longo do tempo, obter-se-á uma curva que mostra as várias fases de crescimento características do crescimento de populações microbianas num sistema fechado [Ferreira *et al*, 2000].



Tabela 2 - Fases do crescimento microbiano

Fase de crescimento	Taxa de crescimento	Características
"Lag" ou Latência	Zero	Sintetização de novas enzimas para o microrganismo s adaptar ao novo meio. Não se verifica aumento do número de células, mas estas aumentam de tamanho. A sua duração depende da espécie de microrganismo e da natureza do meio
Exponencial	Máxima ou constante	Os microrganismos crescem e dividem-se na taxa máxima possível. A taxa de crescimento é constante, isto é, dividem-se e ligam-se em número em intervalos regulares. As células são uniformes em termos de composição química e actividade metabólica e fisiológica.
Estacionária	Zero	Não estão metabolicamente inactivos. Apesar de o numero de células viáveis diminuir, alguns microrganismos podem sobreviver longos períodos sem perda de viabilidade, usando as suas reservas endógenas, enquanto que outros começam a morrer, logo que entram na fase estacionária, levando a que a taxa de crescimento se anule. Acumulação de produtos metabólicos tóxicos e/ou exaustão de nutrientes.
Morte	Negativa	Morte celular devido a efeitos de metabólicos tóxicos, ou à autólise das células por enzimas líticas. Perda da capacidade de divisão celular, processo irreversível do qual resulta um decréscimo exponencial da população viável ao longo do tempo.

#### 4.2) Sistemas de culturas descontínuos

Os sistemas de cultura contínua, são sistemas em que a população microbiana é mantida, continuamente, numa fase de crescimento exponencial equilibrado, por remoção de parte da cultura de microrganismos que é substituída por meio fresco, previamente esterilizado, sendo o caudal de alimentação igual ao caudal de saída, mantendo-se constante o volume da cultura [Ferreira *et al*, 2000].

#### 4.3) Factores que afectam o crescimento microbiano

Uma vez que o crescimento é o resultado de muitas reacções bioquímicas, os factores que afectam o crescimento são os que afectam as taxas de reacções químicas em geral. Cada microrganismo necessita de condições específicas de crescimento, a fim de que possa atingir uma taxa máxima (Ferreira).

Os compostos orgânicos que são componentes essenciais das células ou precursores são chamados de factores de crescimento. Existem três grandes classes de factores de crescimento:

- Aminoácidos - necessários para a síntese de proteínas;
- Purinas e pirimidinas - necessários para a síntese de ácidos nucleicos;
- Vitaminas - pequenas moléculas orgânicas que fazem parte dos cofactores das enzimas e são apenas necessárias em pequenas quantidades para manter o crescimento [Prescott *et al*, 2008].

Os microrganismos caracterizam-se, também, pela sua grande diversidade metabólica e capacidade de adaptação a diferentes condições ecológicas. É, por isso, fundamental conhecer o modo como a taxa de crescimento pode ser afectada pelos diferentes parâmetros e os mecanismos pelos quais as células respondem ou se adaptam a condições desfavoráveis, para assim ser possível o seu controlo [Ferreira *et al*, 2000].

Os principais factores em causa são:

- Concentração de nutrientes

A taxa específica de crescimento microbiano ( $\mu$ ) (2) é uma função da concentração de nutriente ( $s$ ) presente ( $s$ ) no meio de cultura. A sua dependência de um nutriente ( $S$ ), mantendo-se invariáveis os outros parâmetros que afectam o valor de ( $\mu$ ), pode ser expressa pela equação de Monod:

$$\mu = \mu_{max} \times \frac{S}{S + K_S} \quad (2)$$

Na qual:

$\mu$  = velocidade específica de crescimento (tempo<sup>-1</sup>)

$\mu_{max}$  = velocidade específica de crescimento máxima (tempo<sup>-1</sup>)

$S$  = concentração de substrato limitante (massa/unidade de volume)

$K_S$  = constante de meia velocidade (massa/unidade de volume)

A curva hiperbólica representada na figura é baseada nesta equação e estabelece a relação entre a variação da taxa específica e a concentração do nutriente limitante do crescimento. Se as condições do meio se mantiverem constantes e para concentrações

saturantes do nutriente limitante ( $S$ ), a taxa específica de crescimento atinge o seu valor máximo ( $\mu_{\max}$ ).

Para valores de ( $S$ ) não saturantes, a taxa específica de crescimento ( $\mu$ ) diminui à medida que ( $S$ ) decresce. Esta diminuição não se torna, contudo, evidente até que se atinjam concentrações relativamente baixas do substrato limitante. Nesta altura, os sistemas de permease das células não são mais capazes de manter concentrações intracelulares saturantes e a taxa específica de crescimento diminui [Ferreira *et al*, 2000].

- Temperatura

A temperatura é um dos parâmetros mais importantes, que influenciam o crescimento e sobrevivência dos microrganismos.

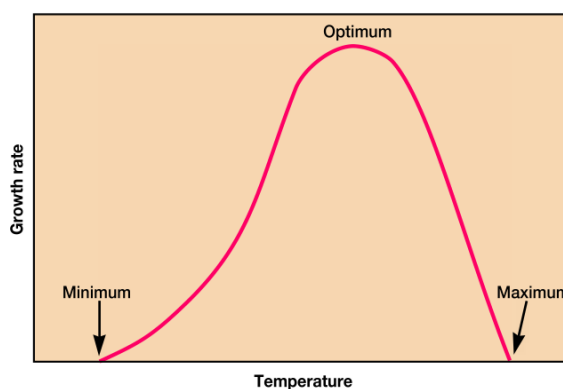


Figura 12 - Crescimento em função da temperatura [adaptado do Prescott *et al*]

Por representação da taxa específica de crescimento de um microrganismo em função do inverso do tempo ( $t^{-1}$ ) verifica-se que a curva é linear, apenas numa determinada zona da gama de temperaturas que permitem o crescimento, verificando-se que a taxa de crescimento cai abruptamente nos limites desta gama. Cada microrganismo tem valores precisos de temperatura máxima e mínima que permitem o seu crescimento e de temperatura ótima, à qual é máxima a sua taxa de crescimento.

Na realidade as proteínas estão sujeitas a desnaturação a temperaturas elevadas e à perda da sua estrutura tridimensional a baixas temperaturas, por enfraquecimento das ligações hidrofóbicas intramoleculares. Por outro lado, a composição fosfolipídica da membrana citoplasmática de quase todos os microrganismos altera-se com a temperatura de crescimento. Quando a temperatura diminui, o teor relativo de ácidos gordos insaturados, dos fosfolípidos da membrana citoplasmática, aumenta. O grau de saturação dos ácidos gordos nos fosfolípidos da membrana, determina o seu grau de fluidez, a uma dada temperatura.

Os valores numéricos das temperaturas cardeais (mínimo, ótimo e máximo) e a gama de temperaturas que permitem o crescimento variam, significativamente, entre os microrganismos, sendo comum definir-se, embora com alguma arbitrariedade, quatro grandes grupos: psicrófilos, mesófilos, termófilos e hipertermófilos [Ferreira *et al*, 2000].

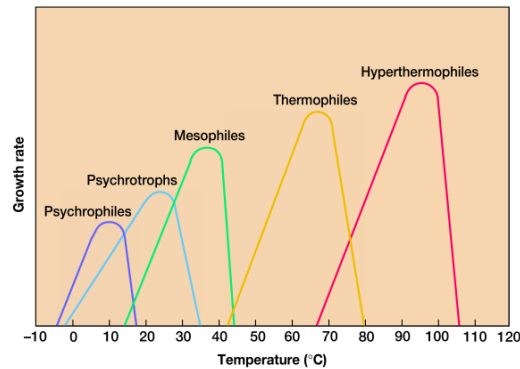


Figura 13 - Temperaturas ideais para o crescimento dos diferentes microrganismos [adaptado de Prescott *et al*]

#### a) Microrganismos psicrófilos

Crescem bem a uma temperatura de 0°C, têm uma temperatura óptima de crescimento igual ou inferior aos 15°C, sendo a máxima de 20°C.

Exemplos: *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Vibrio*. As enzimas, sistemas de transporte e proteínas destes microrganismos funcionam bem a baixas temperaturas. As membranas têm altos níveis de ácidos gordos insaturados ficando mais fluidas a baixas temperaturas.

Muitas espécies podem crescer entre os 0°C e 7°C embora tenham a sua temperatura óptima de crescimento entre os 20°C e os 30°C, e a máxima aos 35°C. a estes microrganismos dá-se o nome de microrganismos psicrófilos facultativos ou psicotróficos [Prescott *et al*, 2008].

#### b) Microrganismos mesófilos

São microrganismos com temperatura óptima de crescimento entre os 20°C até aos 40°C, tem normalmente uma temperatura mínima de crescimento desde os 15°C até aos 20°C e uma temperatura máxima de 45°C. A maioria dos microrganismos pertence a esta categoria. Quase todos os microrganismos patogénicos humanos são mesófilos, tal como esperado, já que o ambiente em que se encontram é de 37°C, aproximadamente [Prescott *et al*, 2008]

#### c) Microrganismos termófilos

Podem crescer a temperaturas iguais ou superiores a 55°C. a sua temperatura mínima de crescimento é de 45°C e a óptima encontra-se entre os 55°C e os 65°C.

Têm enzimas mais estáveis a temperaturas elevadas e sistemas de síntese proteica capazes de funcionar a temperaturas elevadas. Os seus lípidos membranares são mais saturados e tem valores mais elevados do ponto de fusão, assim sendo, as membranas destes microrganismos permanecem intactas a temperaturas elevadas [Prescott *et al*, 2008].

Ainda deve ser feita distinção entre termófilos e termodúricos. Enquanto os primeiros crescem a temperaturas relativamente elevadas, termodúricos resistem ou podem tolerar choques térmicos elevados, durante curtos intervalos de tempo [Ferreira *et al*, 2000].

d) Microrganismos hipertermófilos

Têm temperatura óptima de crescimento entre os 80°C e os 113°C e mínima de 55°C. [Prescott *et al*, 2008].

- Actividade da água

Para todos os organismos a água é o principal componente da célula (cerca de 80%) e é o meio onde ocorrem as reacções celulares. A disponibilidade da água para um microrganismo expressa-se, normalmente, em termos físicos, como actividade da água ( $a_w$ ) ou pressão osmótica, cujos valores variam entre 0 e 1 [Ferreira *et al*, 2000].

Como os microrganismos são separados do seu ambiente por uma membrana plasmática permeável selectiva, eles podem ser afectados por alterações da concentração osmótica à sua volta. Se um microrganismo for colocado numa solução hipotónica (com uma baixa concentração osmótica), a água irá entrar na célula, a qual irá inchar e rebentar a menos que seja controlada a sua entrada. Se forem colocados num ambiente hipertónico, a água irá sair da célula e a membrana plasmática irá encolher separando-se da parede celular, processo conhecido como plasmólise. Isto leva à desidratação da célula e pode causar danos na membrana plasmática; a célula normalmente torna-se metabolicamente inactiva e para de crescer [Prescott *et al*, 2008].

Alguns microrganismos conseguem crescer numa gama relativamente ampla de actividade de água, mas a maior parte só consegue crescer, a valores de  $a_w$  de cerca de 0,98 ou superiores. Contudo, alguns microrganismos particulares são capazes de viver em condições de baixa actividade de água. É o caso dos microrganismos halófilos que se adaptaram de tal forma a concentrações elevadas de sal que precisam dele para poderem crescer. Os microrganismos osmófilos, como certos fungos, são capazes de viver em ambientes com elevada concentração de açúcar, outros, resistem a condições de elevada desidratação.

De forma a ajustarem o  $a_w$ , a célula sintetiza compostos, ou retira compostos do meio, e utiliza-os no seu interior para aumentarem a concentração interna de solutos, solutos compatíveis [Ferreira *et al*, 2000].

- Oxigénio

O comportamento dos microrganismos em relação ao oxigénio é heterogéneo. É também possível classificar os microrganismos de acordo com a sua necessidade de oxigénio:

a) Microrganismos Aeróbios

São organismos que crescem na presença de oxigénio atmosférico.

Quase todos os microrganismos multicelulares são completamente dependentes da presença de oxigénio atmosférico, ou seja, são aeróbios obrigatórios ou estritos. Para estes microrganismos o oxigénio é o receptor final de electrões na cadeia de transporte de electrões da respiração aeróbica.

Existem aeróbios que são lesados pelo nível normal de oxigénio atmosférico requerendo apenas cerca de 2-10% de oxigénio para crescer, os quais se denominam microaerófilos.

#### b) Microrganismos Anaeróbios

São organismos que crescem sem a presença de oxigénio atmosférico.

Os microrganismos que não necessitam de oxigénio para crescer, apesar de crescerem melhor na sua presença, são os anaeróbios facultativos.

Os anaeróbios aerotolerantes são microrganismos que crescem de igualmente na presença ou ausência de oxigénio atmosférico. No caso da presença de oxigénio estes não o usam, ignoram-no.

Os microrganismos que não toleram oxigénio e morrem na sua presença são os anaeróbios obrigatórios ou estritos. Tanto estes microrganismos como os aerotolerantes obtêm a energia somente pela fermentação ou respiração anaeróbia [Prescott *et al*, 2008].

- Ph

Cada microrganismo tem um valor de pH óptimo, desenvolvendo-se numa gama de valores de pH que permitem o seu crescimento.

Apesar das variações de pH extracelular, o pH intracelular dos microrganismos permanece próximo da neutralidade. Isto pode resultar da relativa impermeabilidade da membrana citoplasmática a protões. Por outro lado, os protões podem ser bombeados para fora da membrana de modo a manter a estabilidade do pH intracelular.

As diminuições dos valores de pH ocorrem quando os microrganismos crescem em meios de cultura contendo açúcares. A fim de evitar variações bruscas de pH, incompatíveis com o crescimento microbiano, os meios de cultura são tamponados com fosfatos.

A maior parte dos ambientes naturais têm valores de pH entre 5 a 9,0 que é favorável ao crescimento da maioria dos microrganismos.

Pode classificar-se os microrganismos de acordo com o intervalo de pH a que crescem:

- Acidófilos: crescem a baixos valores de pH (1,0-5,5)
- Alcalófilos: desenvolvem-se a valores elevados de pH (8,5-11,5)
- Neutrófilos: crescem melhor em condições de neutralidade (5,5-8,0) [Ferreira *et al*, 2000].

- Pressão

Podem também classificar-se os microrganismos de acordo com a pressão atmosférica que toleram.

Os microrganismos barotolerantes são aqueles que o aumento de pressão causa algum efeito no seu crescimento mas não tanto como nos microrganismos não tolerantes. Os microrganismos barofílicos crescem mais rapidamente a altas pressões [Ferreira *et al*, 2000].

- Esterilização

Os meios de cultura devem ser estéreis, isto é, não devem conter quais quer organismos vivos. Os micróbios têm uma distribuição ubiqüitária e, devido às suas reduzidas dimensões, dispersam-se facilmente. Devemos esterilizar o meio de cultura após a sua preparação, para eliminar os microrganismos contaminantes. É, também, necessário ter precauções durante o seu subsequente manuseamento, a fim de evitar posteriores contaminações [Ferreira *et al*, 2000].

A esterilização [do Latim *sterilis*, incapaz de reproduzir-se] é o processo pelo qual todas as células vivas, esporos viáveis e vírus são destruídos ou eliminados de um objecto ou habitat.

O calor e outros agentes físicos costumam-se utilizar para esterilizar objectos, como o demonstra o uso que tem a autoclave em todos os laboratórios de microbiologia. Os quatro agentes empregues com mais frequência como agentes físicos são: calor, filtração, radiação ultravioleta e radiação ionizante [Clara, 2001]

As técnicas usadas para a prevenção de contaminações durante a manipulação de culturas e meios de cultura estéreis, são designadas técnicas de assepsia [Ferreira *et al*, 2000].

## e. Fungos

O termo Micologia deriva do grego, [*mýkes* + *lógos*] = cogumelo + dissertação, e, etimologicamente, significa o estudo dos cogumelos. Com efeito, estes foram, durante muitos anos, os únicos fungos conhecidos e foi com Leeuwenhoek que se observaram os primeiros fungos microscópicos.

Hoje, Micologia define-se como a ciência que estuda os fungos, palavra derivada do latim *fungus*, que significa cogumelo (plural: *fungi*).

Os fungos desempenham um papel importante na vida do homem, quer de maneira benéfica, que de um modo prejudicial.

São dos principais microrganismos responsáveis pela decomposição da matéria orgânica, interferindo no ciclo do carbono, do azoto e de outros nutrientes da biosfera e de produtos e bens de consumo do Homem.

O poder patogénico do fungo é particularmente importante nos vegetais, sendo responsáveis por grandes prejuízos económicos. No entanto, os fungos são usados em numerosos processos industriais de fabricação de pão, cerveja, vinhos e determinados tipos de queijos, na produção comercial de muitos ácidos gordos, alguns fármacos, na obtenção de diferentes antibióticos e de substâncias imunossupressoras [Ferreira *et al*, 2000].

## Características gerais

Os fungos são células eucariotas, desprovidas de clorofila e que se reproduzem por esporos. Neles estão incluídos organismos de forma e dimensões muito variadas, conhecidos correntemente como leveduras, bolores, mofo, mofo e cogumelos.

Os fungos leveduriformes, designados em linguagem corrente por leveduras, são fungos unicelulares. Os outros, que constituem a grande maioria, são fungos filamentosos ou pluricelulares [Ferreira *et al*, 2000].

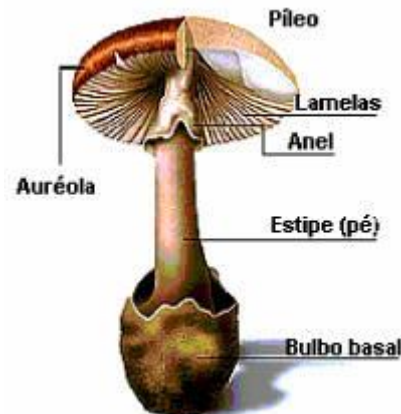


Figura 14 - Fungo [http://www.google.pt/imgres?q=fungos&um=1&hl=pt-

PT&biw=1280&bih=607&tbm=isch&tbnid=d05yLQLlmbKfGM:&imgrefurl=http://www.br-

business.com.br/port/fungos.htm&docid=fVnrjbsyS4bngM&w=202&h=241&ei=SeORTpj4LJPE8QP596gO&zoom=1&iact=hc&vpx=193&vpy=309&dur=270&hovh=1

85&hovw=156&tx=87&ty=104&page=1&tbnh=118&tbnw=99&start=0&ndsp=21&ved=1t:429,r:7,s:0]

## Estrutura fúngica

A estrutura vegetativa ou somática de um fungo denomina-se talo. Nos fungos filamentosos, o talo é constituído por filamentos ou hifas, do crescimento das quais resulta o micélio. Embora a hifa seja a unidade estrutural característica dos fungos, em alguns deles o soma é formado por uma única célula, sendo por isso denominados fungos unicelulares ou leveduriformes. Em ambos os casos o talo é envolvido por uma parede celular rígida, e lhe confere a forma.

Nos fungos filamentosos, o protoplasma pode ser contínuo e multinucleado, constituindo a hifas asseptadas ou cenocíticas. Nestas hifas pode observar-se o aparecimento, ocasional e irregular, de septos sem poros ou septos totais que desempenham funções protectoras.

As hifas em que o citoplasma é interrompido regularmente por invaginações interiores da parede, septos, que dividem as hifas em compartimentos ou “células”, são designadas hifas septadas. Neste tipo de hifas os septos são perfurados, permitindo a passagem do citoplasma e dos seus organitos através deles.



Também a composição química da parede é característica dos diferentes grupos taxonómicos. Os principais constituintes químicos parietais são os polissacáridos, associados a proteínas e lípidos. O tipo de polissacáridos varia entre os principais grupos. Assim, a análise química de fungos septados e leveduriformes (Ascomycota e Basidiomycota) mostra a presença de quitina (o único elemento parietal constante, encontrando-se ligada a outros polissacáridos, a proteínas e a lípidos) e de glucanos, enquanto a dos fungos asseptados (Zigomicota) apresenta uma mistura de quitina e quitosano, associados a ácidos glucorónicos, em vez de glucanos.

A membrana citoplasmática dos fungos é constituída, essencialmente, por esteróis, lípidos e proteínas.

Certos fungos podem apresentar a forma unicelular quando parasitam o hospedeiro, e a forma de micélio quando crescem como saprófitas. Estes fungos denominam-se dimorfos [Ferreira *et al*, 2000].

## Nutrição e metabolismo

Os fungos são organismos heterotróficos, que obtêm a sua energia a partir da oxidação de compostos orgânicos carbonados, como a glucose.

De um modo geral são organismos aeróbios, no entanto os fungos que podem obter energia através de processos de fermentação designam-se anaeróbios (anaeróbios facultativos).

A maioria dos fungos são saprófitas, pois desenvolvem-se a partir de matéria orgânica morta ou à superfície de células vivas, como as plantas, sem lhe causarem dano.

Alguns destes organismos desenvolvem-se à custa de outro organismo vivo, no qual produzem lesões, denominando-se, por isso, fungos parasitas.

Fungos simbiotes são os que vivem em associação com outro organismo vivo, resultando um benefício mútuo [Ferreira *et al*, 2000].

## Crescimento fúngico

O crescimento das hifas faz-se por alongamento do seu topo ou zona apical, e por ramificação lateral.

O alongamento, verifica-se, aquando do crescimento, uma acumulação de vesículas citoplasmáticas no hápice da hifa, sugerindo a implicação das mesmas no crescimento fúngico. Estas vesículas, provenientes do aparelho de Golgi, fundem com a membrana citoplasmática apical e libertam os seus diferentes conteúdos, os quais contribuem para o alongamento da hifa. Existem diferentes tipos de vesículas: as que transportam enzimas responsáveis pela destruição das ligações parietais, como a quitinase, a celulase e a  $\beta$ -1,3-glucanase; as semelhantes a quitosomas, que transportam enzimas que intervêm na síntese da parede; e as que são transportadoras de alguns precursores da parede celular. É da acção

conjunta e consertada destas vesículas que o ápice da hifa pode ter uma plasticidade específica, permitindo a intervenção das enzimas de síntese e a inserção de alguns componentes pré-formados, de que resulta o aumento ou a extensão da superfície apical da parede fúngica.

A ramificação parece ocorrer sempre que a zona apical acumula um volume crítico ou excessivo de citoplasma. Nesta altura, o seu núcleo alonga-se, divide-se e dá-se a formação de um septo que separa a célula em duas. Na penúltima célula (célula subapical) forma-se uma ramificação para a qual migram o citoplasma e o núcleo [Ferreira *et al*, 2000].

## Reprodução

Os fungos reproduzem-se através de esporos sexuais (reprodução sexuada), que envolve a união de duas células ou de dois órgãos sexuais sexualmente compatíveis, através de esporos assexuados (reprodução assexuada) e ainda através da reprodução vegetativa em que não são necessárias estruturas reprodutoras específicas, uma pequena parte de hifa, em meios próprio, é capaz de dar origem a um novo micélio [Ferreira *et al*, 2000].

### Reprodução assexuada

É, normalmente, a reprodução mais importante para a propagação da espécie, por se repetir várias vezes durante o ano. O estado assexuado ou imperfeito dos fungos é, também, designado estado anamorfo.

A formação dos esporos assexuados pode fazer-se de duas maneiras:

- Dentro de estruturas unicelulares, dando origem a endósporos ou esporangiósporos;
- Esternamente, a partir do soma fúngico, dando origem a exósporos ou conídios [Ferreira *et al*, 2000].

### -Endósporos/Esporangiósporos

Os endósporos são produzidos por fungos filamentosos asseptados, cuja classificação se baseia, essencialmente, na morfologia do esporângio, do esporangióforo, isto é, da hifa diferenciada que suporta o esporângio e, em alguns casos, da columela.

Os esporangiósporos são produzidos no interior de uma estrutura semelhante a um saco, esporângio, cujo citoplasma é convertido, por clivagem, em um ou mais - normalmente muitos -, esporos. Estes esporangiósporos podem ser móveis ou imóveis. Os imóveis ou aplanósporos são os que caracterizam os fungos patogénicos para o Homem. Os esporos móveis podem ser providos de um ou dois flagelos, e denominam-se zoósporos [Ferreira *et al*, 2000].

### -Exósporos/Conídios

Os conídios são produzidos por fungos pertencentes às divisões Ascomycota e Basidiomycota e à classe Deuteromycetes (*Fungi imperfecti*).

Estes conídios ou exósporos, característicos dos fungos septados responsáveis por micoses humanas, são produzidos por células especiais, denominadas células conidiogêneas, que podem estar assentes em estruturas diferenciadas, designadas conidióforos. Existem dois processos fundamentais de conidiogénese:

- A conidiogénese tálica: verifica-se a conversão de um elemento pré-existente da hifa fértil em conídio.
- A conidiogénese blástica: a célula conidiogénica ou a hifa fértil começa a formar um rebento, mais ou menos esférico, que, uma vez individualizado por um septo, dará origem ao novo conídio, denominado blastósporo. Se a célula conidiogénica está isolada e não faz parte de um sistema micelar, como acontece nos fungos leveduriformes, o processo denomina-se gemulação [Ferreira *et al*, 2000].

### Reprodução Sexuada

A reprodução sexuada implica a existência de três fases distintas, denominadas plasmogamia, cariogamia e meiose. Na plasmogamia verifica-se a união dos protoplasmas de duas células sexualmente compatíveis, dando origem a uma única célula com dois núcleos (célula dicariótica). A fusão dos dois núcleos, cariogamia, dá origem a um zigoto diplóide. Este, mais cedo ou mais tarde, sofre uma meiose que, reduzindo o número de cromossomas, devolve o carácter haplóide às quatro células formadas, as quais, ulteriormente, podem sofrer uma ou mais mitoses.

Os fungos que se reproduzem sexualmente são classificados nas divisões Zigomicota, Ascomicota, e Basidiomicota, consoante as estruturas reprodutoras a que dão origem. Os que só se reproduzem assexualmente, ou melhor, os de que se conhece apenas a reprodução assexuada, pertencem à classe Deuteromicetes, mas, logo que se encontre a sua forma sexuada, serão imediatamente transferidos para os Ascomicota ou Basidiomicota [Ferreira *et al*, 2000].

### Taxonomia

A classificação tradicional dos fungos tem sido feita com base na morfologia comparativa das estruturas sexuais. Hoje, esta classificação está a ser revista, tendo em atenção os resultados obtidos pela aplicação das técnicas de sequenciação dos ácidos nucleicos e, muito especialmente, a dos genes do ARN ribossomal [Ferreira *et al*, 2000].

Tabela 3 - Taxonomia dos Fungos

Reino	Fungi			
Filo	Zigomicota	Ascomicota	Basidiomicota	Deuteromicota

### Reino Fungi (Fungos)

Organismos eucariotas, saprófitas, simbioses ou parasitas. O seu soma, que pode ser unicelular ou filamentosos, é normalmente envolvido por uma parede celular, cuja composição química é variável e um factor importante na classificação dos fungos. A quitina é o único elemento parietal constante, encontrando-se ligada a outros polisacáridos, a proteínas e a lípidos.

- Filo Zigomicota

Compreende fungos saprófitas do solo e parasitas dos mamíferos e das plantas. As hifas são cenocíticas; a sua reprodução assexuada faz-se por aplanósporos; a reprodução sexuada, quando conhecida, faz-se, normalmente, por fusão de isogametângios, do qual resulta um zigosporângio, que contém um zigósporo [Ferreira *et al*, 2000].

- Filo Ascomicota

É uma divisão muito importante, que integra fungos saprófitas, simbioses e parasitas do Homem, do animal e das plantas. O seu soma pode ser unicelular, mas, na grande maioria dos casos, é filamentosos e septado. Os septos podem ser fechados por elementos especiais, denominados corpos de Woronin. Reproduzem-se assexualmente por conídios e sexualmente por ascósporos produzidos em ascos, estruturas semelhantes a sacos. Os ascos podem estar livres ou contidos no interior de estruturas especiais, denominadas ascocarpos [Ferreira *et al*, 2000].

- Filo Basidiomicota

Constituída por fungos saprófitas, simbioses e parasitas, cujo soma pode ser unicelular ou, como sucede na maioria dos casos, formado de micélio septado. Neste caso, os septos têm a forma especial e característica de barril e a designação de doliporos. Podem, também, ter estrutura de levedura. A sua reprodução sexuada faz-se por basidiósporos, implantados exteriormente em basídios, cujas formas e tipos são importantes em taxonomia. Muitos destes fungos produzem os seus basídios em basidiocarpos [Ferreira *et al*, 2000].

- Filo Deuteromicota

Esta divisão inclui fungos que podem ser saprófitas, simbioses ou parasitas. O seu soma pode ser unicelular ou filamentosos septado, podendo os poros septais serem fechados por

corpos de Woronin. A única reprodução conhecida, a assexuada, faz-se através de conídios provenientes de diferentes células conidiogêneas. Tanto estas como o tipo de conídios são dois elementos decisivos no posicionamento taxonómico destes fungos. Embora não se lhes conheça reprodução sexuada, a maioria das suas características aparentam-nos com os Ascomicota [Ferreira *et al*, 2000].

- *Rhizopus stolonifer*

O *Rhizopus stolonifer*, muito conhecido por ser o bolor do pão, pertence à divisão dos zigomicotas e, como todo e qualquer fungo, desenvolve-se em habitats húmidos, ricos em hidratos de carbono e escuros onde existe matéria orgânica. É conhecido por ser saprófita, isto é, obtém os nutrientes que necessita para o seu desenvolvimento de toda a matéria morta que o rodeia.

Como as bactérias, o *Rhizopus stolonifer*, liberta exoenzimas hidrolíticas com as quais vai digerir os substratos externos, absorvendo os produtos solúveis. É quimiorgano-heterótrofo e emprega compostos orgânicos como fonte de carbono, electrões e energia. O glicogénio é o polissacárido de armazenamento primário. Como a maioria dos fungos, o *Rhizopus stolonifer* utiliza hidratos de carbono (glicose) e compostos nitrogenados para sintetizar os seus próprios aminoácidos e proteínas.

O género *Rhizopus* reproduz-se normalmente de forma assexuada, mas também pode realizar a reprodução sexuada, quando o alimento escasseia e quando as condições ambientais são desfavoráveis. As suas hifas são coenocíticas com muitos núcleos haplóides. Os esporos assexuais, geralmente dispersos pelo vento, desenvolvem-se em esporângios na ponta das hifas suspensas. Porém, na reprodução sexuada formam-se paredes espessas de zigotos, os zigosporos, que podem permanecer nem estado de dormência enquanto as condições do meio ambiente não forem propícias ao seu desenvolvimento [Prescott *et al*, 2008].

- *Aspergillus niger*

O *Aspergillus niger* é um fungo ascomicete filamentoso, ubíquo no ambiente e que tem sido implicado em infecções humanas infecciosas. O *Aspergillus niger* é o mais conhecido pelo seu papel na produção de ácido cítrico, o qual serve como um processo modelo de fermentação fúngica. Como um membro comum das comunidades fúngicas encontradas no solo, o *Aspergillus niger* desempenha um papel significativo no ciclo do carbono. Este organismo é um saprófita do solo com uma grande quantidade de enzimas hidrolíticas e oxidativas envolvidas na destruição das plantas. A variedade destas enzimas é importante na indústria biotecnológica [Baker *et al*, 2006].

As espécies *Aspergillus*, além de saprófita, é também um fungo termotolerante que sobrevive e cresce em detritos orgânicos que liberta conídios no ar, os quais são inalados por humanos em quantidades de centenas por dia sem causarem complicações. No entanto, a espécie *Aspergillus niger* provoca doença, esta denominada de Aspergilose [Perfect *et al*, 2001].

## 3. Materiais e métodos

### a. Técnicas cromatográficas

#### Cromatografia em camada fina (CCF)

A cromatografia em camada fina foi executada sobre placas de sílica gel de 0,2 mm. Os cromatogramas revelaram-se por imersão das placas numa solução de ácido fosfomolibdico 5% em etanol, sendo posteriormente colocadas numa estufa a aproximadamente 120°C durante alguns minutos, de forma a que os produtos apareçam revelados.

#### Cromatografia em coluna

A cromatografia em coluna efectuou-se com a utilização de sílica gel flash de espessura de 0,04-0,06mm como sólido absorvente e posteriormente molhada com n-hexano, já depois de colocada dentro da coluna. Como eluente utilizou-se uma solução de n-Hexano:acetato de etilo na proporção 98:2 com polaridade crescente. O cálculo da altura da sílica a utilizar em função da massa de substancia a cromatografar foi realizado através da seguinte expressão (3):

$$h_{sílica} = \frac{100 \times m}{\pi \times r^2} \quad (3)$$

m=massa da amostra (g)

r=raio da coluna de cromatografia (cm)

### b. Técnicas espectroscópicas

- Infravermelhos (IV)

Os IV são-nos dados em valores de transmitância. Foram utilizados dois aparelhos: Mattson Genesis II FTIR; e Nicolet iS10. Neste segundo aparelho para as amostras sólidas foi usada a cabeça Smart iTR e para as amostras viscosas ou líquidas a cabeça Smart OMNI. As amostras viscosas ou líquidas são colocadas e bem espalhadas em janelas de cloreto de sódio.

- Espectros de RMN e Bidimensionais

Os espectros de RMN de protão,  $^1\text{H}$ , e carbono,  $^{13}\text{C}$ , foram realizados num espectrofotómetro Varian 200 MHz e Bruker 400 MHz, e Varian 50,1 MHz e Bruker 100 MHz, respectivamente, cujo solvente utilizado foi clorofórmio deuterado,  $\text{CDCl}_3$ . Os desvios químicos,  $\delta$ , são expressos em ppm, tendo como referencia o resto do solvente residual, e as constantes de acoplamento, J, em Hz.

- Espectros de massa

Os espectros de massa realizaram-se num espectrómetro Simazhu QP5000.

### Densidade óptica

A densidade óptica foi medida no aparelho ADP 220 Polarimeter. Foram preparadas soluções, em balões volumétricos de 5 mL, com a massa controlada do composto que pretendíamos ler, dissolvido em clorofórmio. Posteriormente a solução seria colocada numa célula para ser lido o valor do  $\alpha$  pelo aparelho.

Para o cálculo do  $[\alpha]_D$  aplica-se a fórmula (4):

$$[\alpha]_D^{Temp} = \frac{\alpha \times 100}{C} \quad (4)$$

Onde:

$\alpha$ - Valor lido pelo aparelho

C- Valor da concentração da solução colocada na célula do aparelho para leitura ( $\text{g}/\text{dm}^3$ )

Temp- Valor da temperatura à qual foi lido o valor do  $\alpha$  ( $^{\circ}\text{C}$ )

## c. Separação do guaiol e do bulnesol

Dos cristais obtidos por cristalização da essência pura da árvore *Bulnesia sermientoi*, foram pesadas 40 gramas para uma coluna de cromatografia. Realizou-se uma cromatografia em coluna, com uma mistura de n-hexano:acetato de etilo na proporção de 95:5 como eluente inicial e seguidamente passaram-se misturas de polaridade crescente, para que ocorre-se a separação dos compostos da essência pura. Para avaliar o grau de separação dos componentes realizaram-se cromatografias em camada fina, cujo eluente foi uma solução de n-hexano:acetato de etilo numa proporção inicial de 9:1, aumentando-se esta polaridade com o aumento da polaridade da mistura de eluentes passada na coluna.

## d. Obtenção do acetato de guaiol

O acetato de guaiol foi obtido por acetilação em directo do guaiol. Foram pesadas 20 gramas de guaiol e colocadas dentro de um balão de 250 mL e adicionou-se 4-dimetilamino piridina, que funcionou como catalizador. A proporção adicionada foi de 2:1 (guaiol:catalizador).

Posteriormente adicionou-se piridina, que funciona como base, e em ultimo lugar o anidrido acético na mesma proporção de moles que o guaiol, ou seja, 1:1:1.

Foi colocado um agitador magnético e deixou-se ficar a reacção em agitação durante 2 dias à temperatura ambiente. O desenvolvimento da reacção foi controlado por várias cromatografias em camada fina.

Depois de terminada a reacção, utilizou-se um evaporador rotativo de baixa pressão, a cerca de 200 mbar, à temperatura aproximada de 40°C, para evaporar o excesso de ácido presente no balão.

Posteriormente, a massa de produto presente no balão foi controlada e, com a ajuda de n-hexano, foi transferido todo o conteúdo do balão para o interior de uma coluna de cromatografia. Realizou-se com esta uma filtração em suporte de coluna cromatografica, usando uma solução de n-hexano:acetato de etilo com polaridade inicial de 80:20 passando-se depois polaridades crescentes até atingir a polaridade 70:30 de forma a separar o acetato de guaiol formado de todos os outros compostos presentes na reacção de acetilação.

Para avaliar a separação do acetato de etilo realizaram-se cromatografias em camada fina, cujo eluente foi uma solução de n-hexano:acetato de etilo numa proporção inicial de 9:1, aumentando-se esta polaridade com o aumento da polaridade da mistura de eluentes passada na coluna.

## e. Reacções

### -Preparação da reacção

A reacção de oxidação alílica foi feita utilizando os seguintes compostos:

- cromato de sódio ( $\text{Na}_2\text{CrO}_4$ ),
- acetato de sódio ( $\text{CH}_3\text{COONa}$ ),
- anidrido acético,
- ácido acético,
- benzeno a seco.

Do composto que se pretende transformar, o guaiol, foi pesada 1 grama e colocada dentro de um balão de 100 mL, com um agitador magnético, e adicionados 25 cm<sup>3</sup> de benzeno a seco, de forma a dissolver o composto. Num goblé à parte juntaram-se 3 mmol de  $\text{Na}_2\text{CrO}_4$  com 3mmol  $\text{CH}_3\text{COONa}$  que depois foram transferidas para dentro do balão que continha o composto. Adiciona-se também ao balão 4 cm<sup>3</sup> anidrido acético e 4cm<sup>3</sup> ácido acético, tapa-se o balão e deixa-se ficar a reacção a decorrer em agitação à temperatura ambiente. O desenvolvimento da reacção foi controlado por cromatografias em camada fina.

### -Fim da reacção

Depois de todo o produto ser transformado adicionou-se metanol à reacção de forma a destruir o resto de oxidante presente nesta.



Realizou-se uma filtração a vácuo para separar da reacção os cristais de crómio formados, utilizando o acetato de etilo para ir lavando o balão, e celite, que foi colocada com dois dedos de altura por cima do papel de filtro usado na filtração para ajudar a reter os cristais.

#### -Extracção dos produtos da reacção

Colocou-se o filtrado numa ampola de decantação e efectuou-se a lavagem com uma base ( $\text{NaHCO}_3$  a 10% (m/v)) de forma a neutralizar os produtos ácidos da reacção, e posteriormente procede-se à lavagem com água destilada, a fim de se extraírem o excesso de base da fase orgânica. Depois de concluída a extracção, a fase orgânica foi seca com sulfato de sódio anidro, ficando em repouso durante a noite, de forma a eliminar resíduos de água.

Transferiu-se o conteúdo orgânico para um balão de 100mL através de uma filtração, de forma a separar o sulfato de sódio anidro da fase orgânica, e evaporou-se o solvente num evaporador rotativo de baixa pressão, a cerca de 220 mbar, à temperatura aproximada de 40°C.

#### -Separação dos componentes

Depois de evaporada e de controlado o peso do produto contido no balão, realizou-se uma cromatografia em coluna, com uma mistura de n-hexano:acetato de etilo na proporção de 98:2 como eluente inicial e seguidamente passaram-se misturas de polaridade crescente, para que ocorresse a separação dos compostos da reacção química. Para avaliar o grau de separação dos componentes realizaram-se cromatografias em camada fina, cujo eluente foi uma solução de n-hexano:acetato de etilo numa proporção inicial de 8:2, aumentando-se esta polaridade com o aumento da polaridade da mistura de eluentes passada na coluna.

#### -Caracterização dos produtos

Os vários compostos existentes nos produtos foram caracterizados por técnicas de espectroscopia de H-RMN, C-RMN, IV, de massa e densidade óptica.

## f. Biotransformações

A escolha dos microrganismos, que vão funcionar como biocatalisadores, a utilizar em biotransformações é muito importante para que as reacções tenham sucesso.

Os microrganismos utilizados neste trabalho foram dois:

- *Rhizopus stolonifer* CECT 2344
- *Aspergillus niger* CECT 2088

### *Rhizopus stolonifer*

Do microrganismo que já se encontrava inoculado num meio de cultura selectivo SDA (Sabouroud Dextrose Agar) foi feita uma repicagem, para um meio novo igual, e deixou-se em cultura durante 48h a 30°C, de forma que a cultura do organismo a usar para a posterior biotransformação fosse a mais recente. Assim este fungo é submetido ao processo de biotransformação na sua fase vegetativa para evitar a interferência de ácidos libertados ao passar da sua fase de esporos para a vegetativa, que poderiam alterar os produtos resultantes.

#### -Meio de cultura de crescimento

Para que o microrganismo se possa desenvolver, o seu meio de cultura de crescimento tem de possuir uma fonte de carbono e de azoto.

O meio de cultura utilizado tem a seguinte constituição (para 1L de meio):

- 5g Peptona
- 20g Glucose
- 5g Hidrogenofosfato de potássio

O meio de cultura foi colocado em erlenmeyers (prepararam-se 9 erlenmeyers com 100 mL de meio cada um) e esterilizaram-se na autoclave durante 30 minutos, a 121°C e a uma pressão de 18psi.

Depois de se retirarem os meios da autoclave e de arrefecerem, o fungo foi inoculado (cultura de 24h) com uma ansa já estéril num dos 9 erlenmeyers. O inoculo efectua-se passando a ansa, sempre no mesmo sentido, na placa de petri que contém a cultura vegetativa, e inocula-se no meio de crescimento previamente esterilizado.

Colocou-se o erlenmeyer com o inóculo numa incubadora orbital a uma temperatura média de 30°C durante 24 horas, a uma agitação de 140 rpm. Após este período de incubação, e utilizando uma pipita volumétrica (P1000) com as pontas esterilizadas, pipetam-se 2 mL de biomassa que se formou durante este ultimo inoculo, para cada um dos outros 8 erlenmeyers. Estes são colocados posteriormente na incubadora orbital mantendo as mesmas condições que as anteriores durante 48 horas.

#### Meio para a bioconversão

O meio de bioconversão vai conter o substrato orgânico que se quer transformar, para que a reacção de biotransformação se dê. Assim, aos oito erlenmeyers, passadas as 48h, foi adicionado o substrato orgânico numa proporção de 0,025mg/100mL de meio de cultura, dissolvido na menor quantidade possível de acetona.

Depois de preparados, os erlenmeyers, e para que se pudesse dar a conversão, foram colocados na incubadora orbital a 30°C, a 140 rpm. O tempo de incubação foi controlado com cromatografias em camada fina que se iam fazendo de 3 em 3 dias de forma a controlar a transformação do produto.

#### -Desintegração celular

Depois de o tempo de incubação ser alcançado, procedeu-se a uma filtração a vácuo para separar o meio de cultura da biomassa, enquanto que com a ajuda de um pilão se iam esmagando as células no funil de buchner para que estas libertassem produtos que estivessem no seu interior. Durante a filtração ia-se usando acetato de etilo para se lavarem as células.

Para evitar perdas de produtos que ficassem retidos nas células e que não fossem retirados na filtração, procedeu-se a uma destilação. As células depois de esmagadas foram transferidas para um balão volumétrico de 250 mL e foi-lhes adicionado acetato de etilo que forma a embebe-las. Esta balão foi colocado numa manta de aquecimento onde a destilação ficou a decorrer durante 12h. No fim da destilação realizou-se outra filtração a vácuo para separar as células do acetato de etilo.

#### -Extracção dos produtos de biotransformação

Juntou-se o acetato de etilo da destilação, depois de filtrado, com o meio de cultura liquido extraído anteriormente da primeira filtração e colocou-se tudo numa ampola de decantação, verificando-se a formação de duas fases, a orgânica, constituída pelo acetado de etilo com o produto, e a fase aquosa, constituída pelo meio de cultura. Neste caso, a fase orgânica fica por cima da fase aquosa pois o acetato de etilo é menos denso que a água que está presente no meio de cultura. Efectuou-se a lavagem da fase aquosa várias vezes com o acetato de etilo, a fim de se extraírem todos os produtos que pudessem estar eventualmente contidos nesta fase. Depois de concluída a extracção, a fase orgânica foi seca com sulfato de sódio anidro, ficando em repouso durante a noite, de forma a eliminar resíduos de água.

Transferiu-se o conteúdo orgânico para um balão de 100mL, através de uma filtração, de forma a separar a fase orgânica do sulfato de sódio anidro, e evaporou-se o solvente num evaporador rotativo de baixa pressão, a cerca de 220 mbar, à temperatura aproximada de 40°C.

#### -Separação dos componentes

Depois de evaporada e de controlado o peso do produto contido no balão, realizou-se uma cromatografia em coluna, com uma mistura de n-hexano:acetato de etilo na proporção de 98:2 como eluente inicial e seguidamente passaram-se misturas de polaridade crescente, para que ocorresse a separação dos compostos de biotransformação. Para avaliar o grau de separação dos componentes realizaram-se cromatografias em camada fina, cujo eluente foi uma solução de n-hexano:acetato de etilo numa proporção inicial de 8:2, aumentando-se esta polaridade com o aumento da polaridade da mistura de eluentes passada na coluna.

#### -Caracterização dos produtos

Os vários compostos existentes nos produtos foram caracterizados por técnicas de espectroscopia de RMN de próton , RMN de carbono, IV, de massa, densidade óptica e por bidimensionais.

#### *Aspergillus niger*

Procedeu-se da mesma forma que para o *Rhizopus stolonifer*, mantendo-se todas as técnicas laboratoriais.

## 4. Resultados e discussão

### Separação do guaiol e do bulnesol

Das 40 gramas colocadas na coluna para obter guaiol e bulnesol puros foram obtidas 0,8172 g de  $\alpha$ -bulneseno, 0,8931 g de mistura de compostos, 21,2056 g de guaiol, 12,1188 g de mistura de guaiol/bulnesol, 1,0316 g de bulnesol, 0,5855 g de mistura de bulnesol com outros compostos, 0,3310 g de hanamyol e 0,1629 g de mistura final.

Os compostos orgânicos puros obtidos desta separação, ou seja, o  $\alpha$ -bulneseno, guaiol, bulnesol e hanamyol puros foram caracterizados por espectros de RMN de próton, RMN de carbono e infravermelhos. Para o guaiol foi obtido um  $[\alpha]_D = -1,46$ , semelhante ao dado na bibliografia. Os espectros obtidos nestas caracterizações são concordantes com os descritos na literatura (em anexo 1).

### Reacção de acetilação do guaiol

Da reacção de acetilação realizada com 20 g de guaiol foram obtidas 21,8362 g de acetato de guaiol. Este excesso de peso no produto final da reacção deve-se à presença do grupo acetilo que irá aumentar o peso molecular da molécula. O acetato de guaiol obtido foi caracterizado por espectros de RMN de próton e de carbono que estão de acordo com os descritos na literatura (em anexo 2).

### Tratamento com $\text{Na}_2\text{CrO}_4$

#### -Tratamento do guaiol

Deste tratamento efectuado para 1 g de guaiol, na purificação por CC, obtiveram-se dois isómeros, que suspeitamos ser o  $\alpha$  e  $\beta$  do grupo -OH da posição 1, de entre outros compostos. Destes isómeros sabe-se que existem 0,091 g de um isómero e 0,090 g do outro, não se sabendo qual a quantidade que pertence ao  $\alpha$  ou ao  $\beta$ .

A sua caracterização foi feita por espectros de próton:

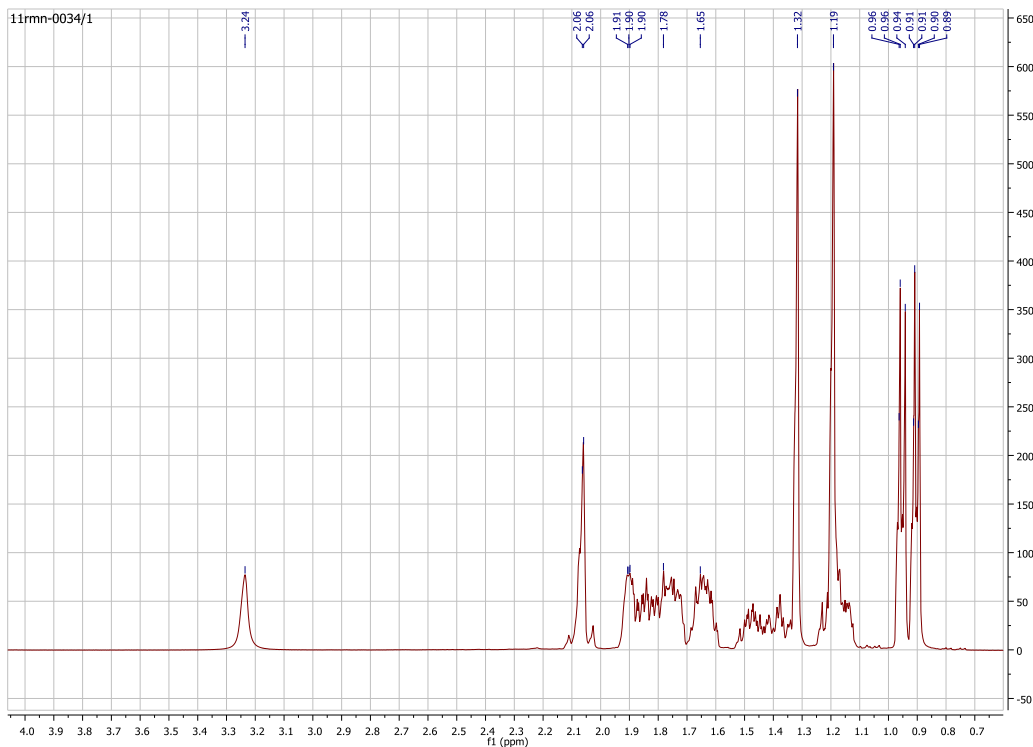


Figura 15 - Espectro de  $^1\text{H}$

Dados espectroscópicos:

3,24 ppm (s, 1H, -OH); 2,06 ppm (m, 2H, H-6); 2,00 – 1,10 ppm (m, 11H, H-2, H-3, H-4, H-7, H-8, H-9 e H-10); 1,32 ppm (s, 3H, H-12); 1,19 ppm (s, 3H, H-13); 0,95 ppm (d,  $J = 7,0$  Hz, 3H, H-15); 0,90 ppm (d,  $J = 6,7$  Hz, 3H, H-14).

Espectros de carbono:

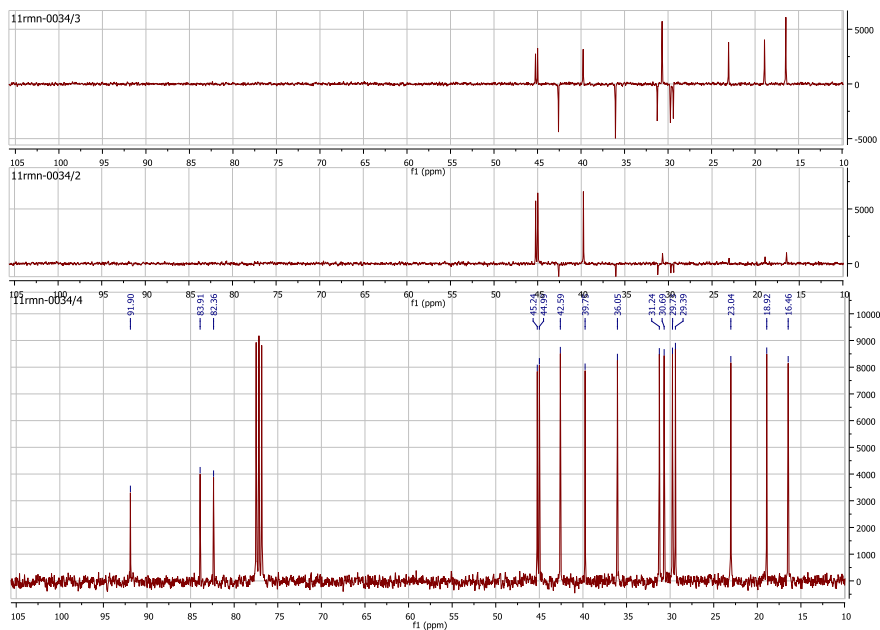


Figura 16 - Espectro de  $^{13}\text{C}$

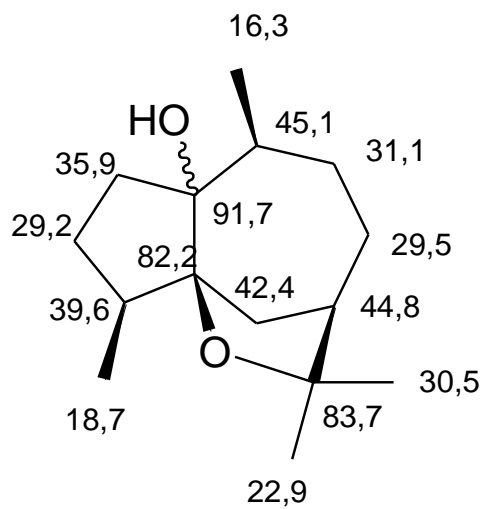


Figura 17 - Atribuição dos valores dos carbonos do composto

Bidimensionais:

HMQC:

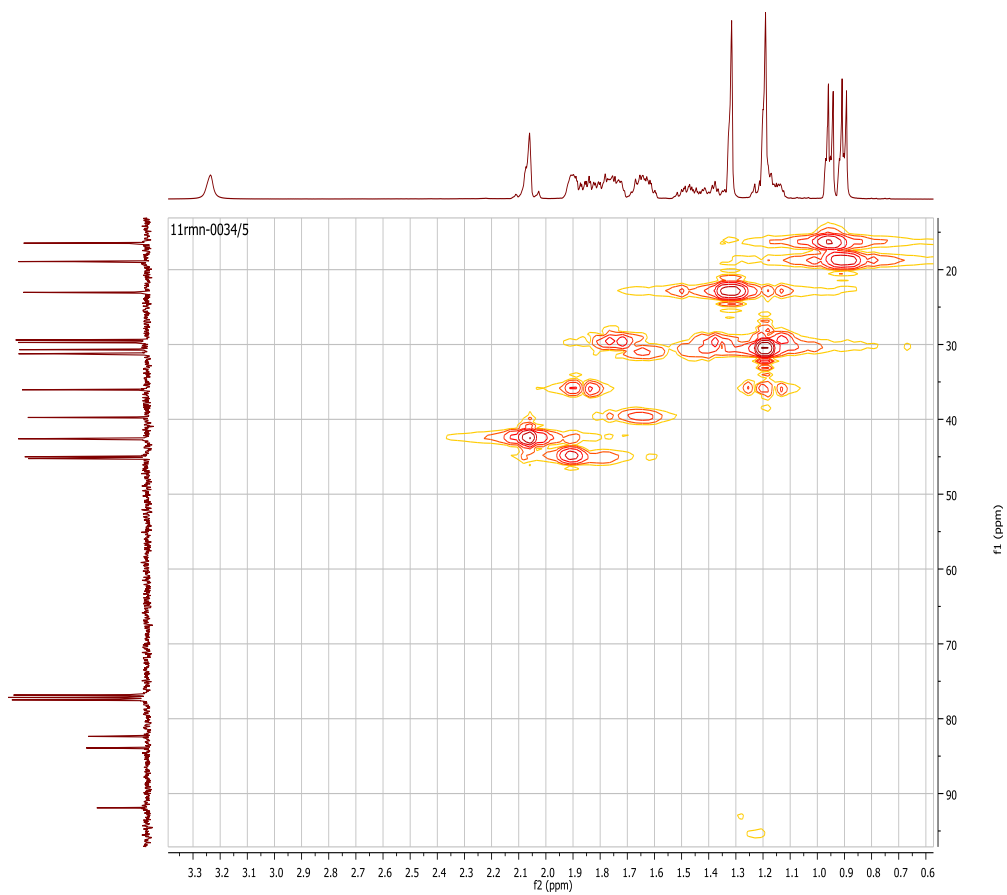


Figura 18- Bidimensionais HMQC. Correlações de H - C a uma relação.

Ampliação:

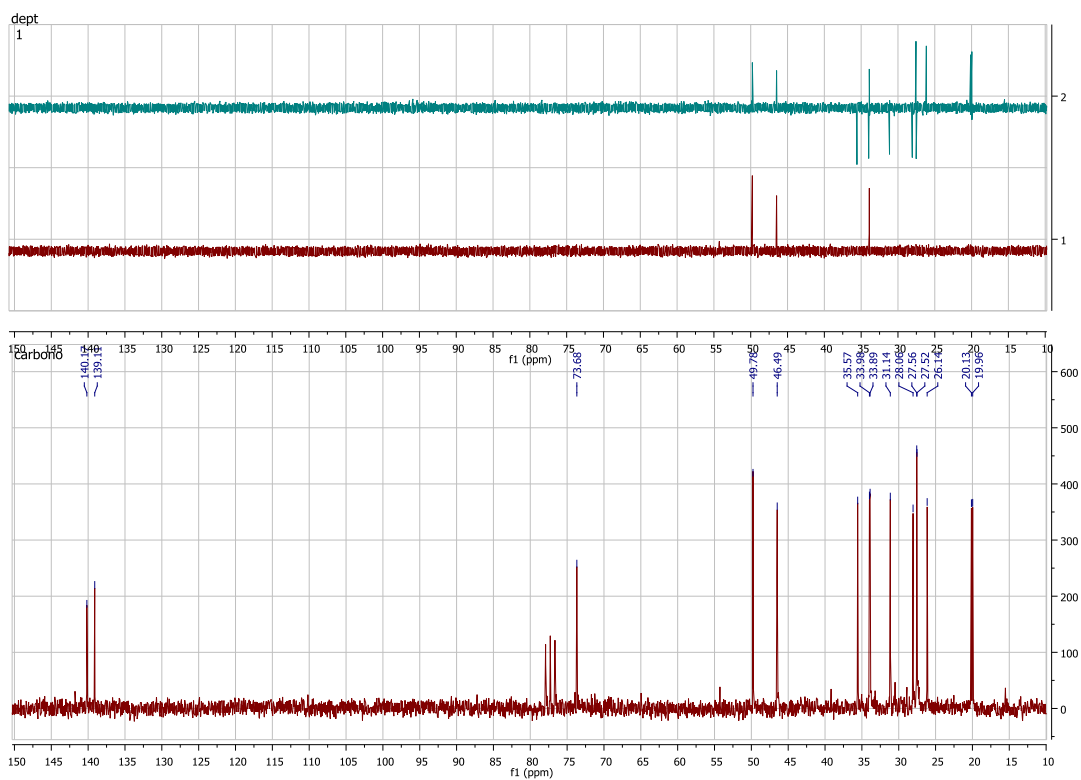


Figura 19 - Ampliação dos bidimensionais HMQC. Correlações de H-C a uma ligação.

HMBC:



Figura 20 - Bidimensionais HMBC. Correlações de H-C a duas e três ligações.



Ampliação:

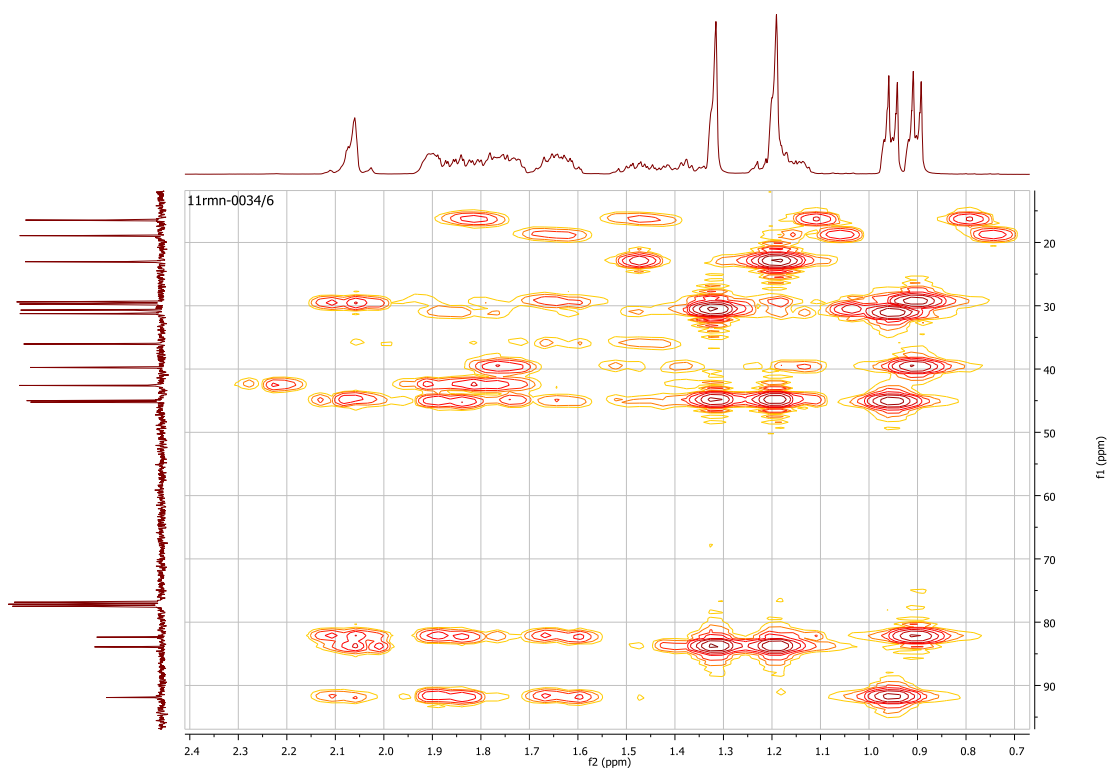


Figura 21 - Ampliação dos bidimensionais HMBC. Correlações de H-C a duas e três ligações.

Infravermelhos:

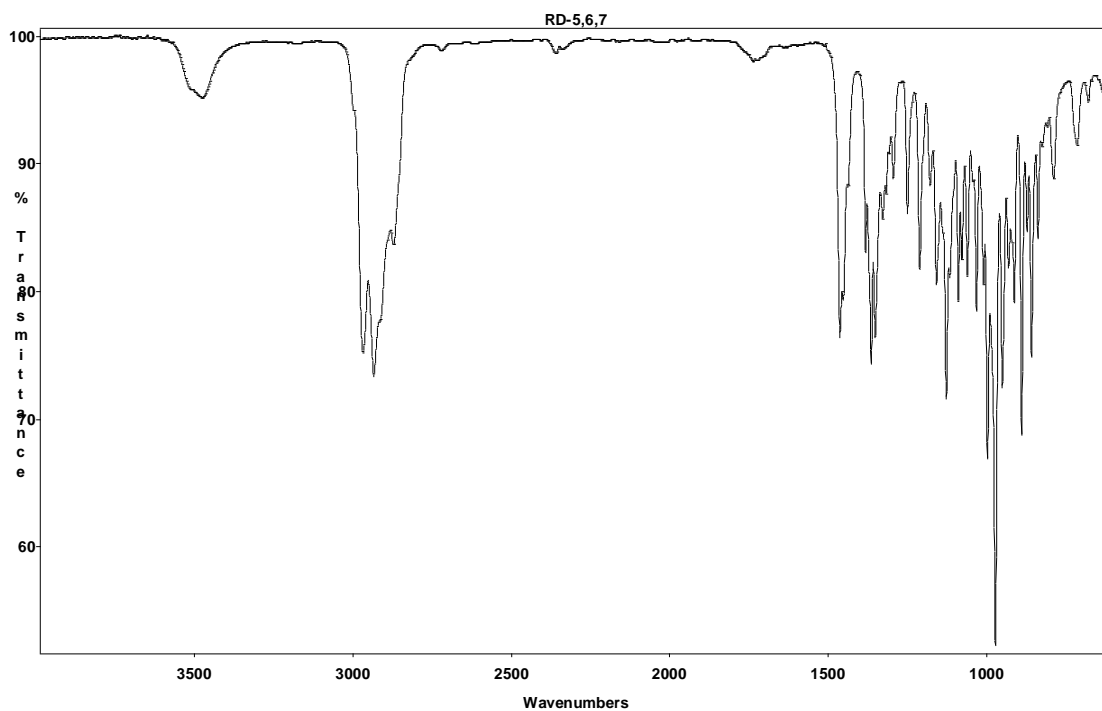


Figura 22 - Infravermelho

Espectros de massa exacta:

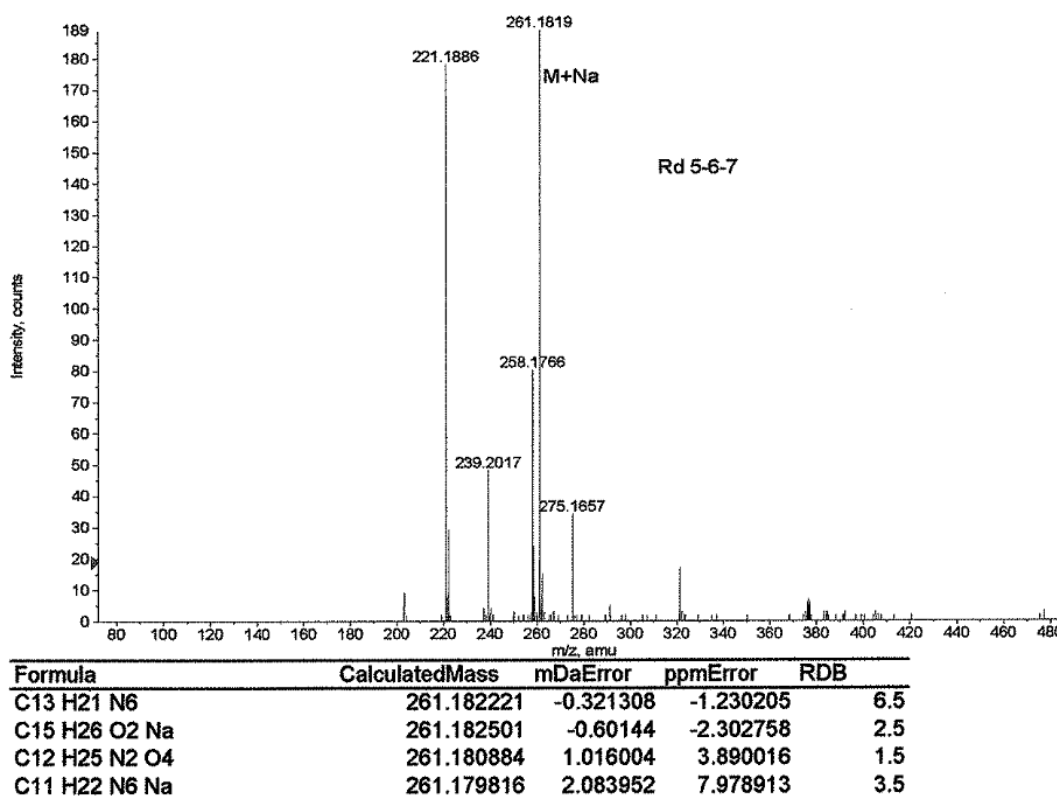


Figura 23 - Espectro de massa

Por análise de todos eles determinaram-se que os isómeros são 5,11-epoxiguaien-1( $\alpha,\beta$ )-ol cuja estrutura molecular é a seguinte:

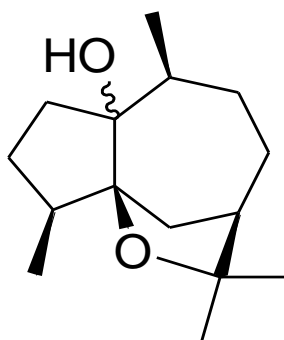


Figura 24- Estrutura molecular do 5,11-epoxiguaien-1( $\alpha,\beta$ )-ol

Observando esta estrutura verificou-se que não ocorreu uma reacção alílica. O que aconteceu foi uma adição à ligação dupla, tendo sido adicionado na posição 1 um grupo hidroxilo e na posição 5 um grupo álcool.

Neste caso só foram aqui demonstrados os dados espectroscópicos para um dos isómeros porque estes dados são idênticos para ambos.

### -Tratamento do bulnesol

Do tratamento efectuado para 0,200 g de bulnesol, e depois de feita a purificação por CC, obteve-se 0,0433 gramas de um composto que corresponde ao produto de oxidação e quebra dos dois anéis do bulnesol. Este resultado pode ser confirmado por:

#### Espectro de protão:

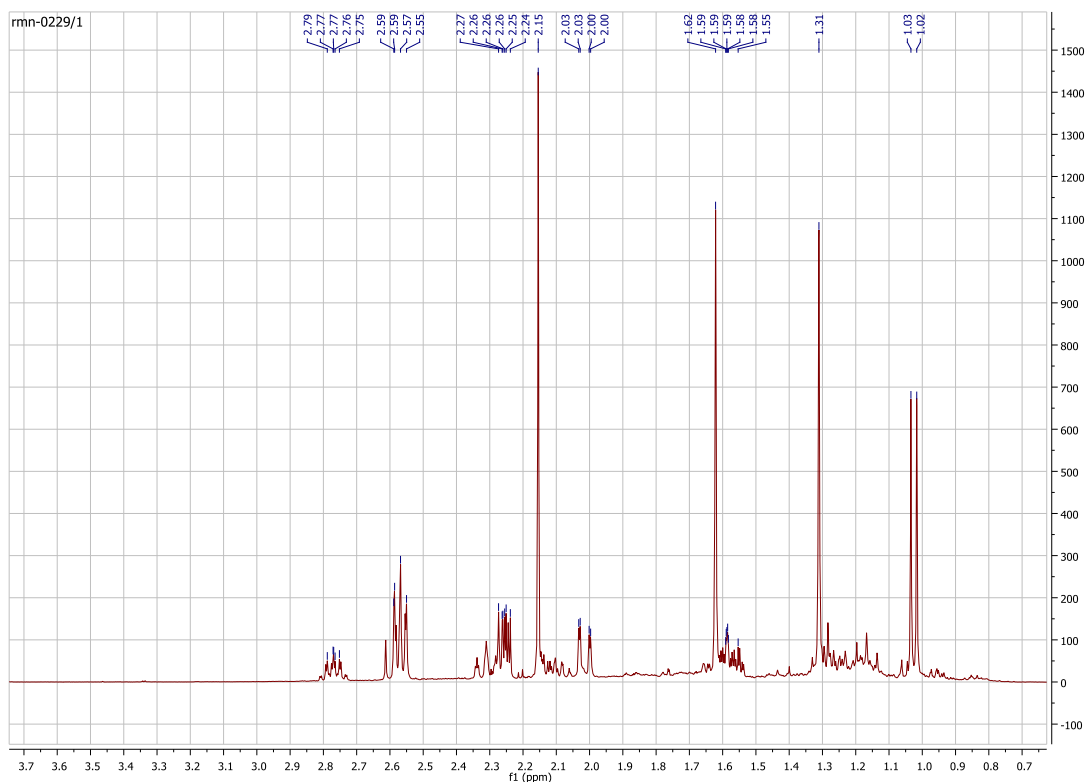


Figura 25 - Espectro de  $^1\text{H}$

#### Dados espectroscópicos:

1,03 ppm (d,  $J = 7,0$  Hz, 3H, 4-Me); 2,15 ppm (s, 3H, 4'-Me); 1,31 ppm (s, 3H, 8-Me); 1,62 ppm (s, 3H, 9-Me); 2,9-2,7 ppm (m, 2H, H-2); 2,6-2,0 ppm (3 grupos de sinais, 5H, H-6, H-2'e H4); 1,6-1,55 ppm (m, 2H, H-1'); 1,32-1,08 ppm (m, 3H, H-3 e H-7)

Espectro de carbono:

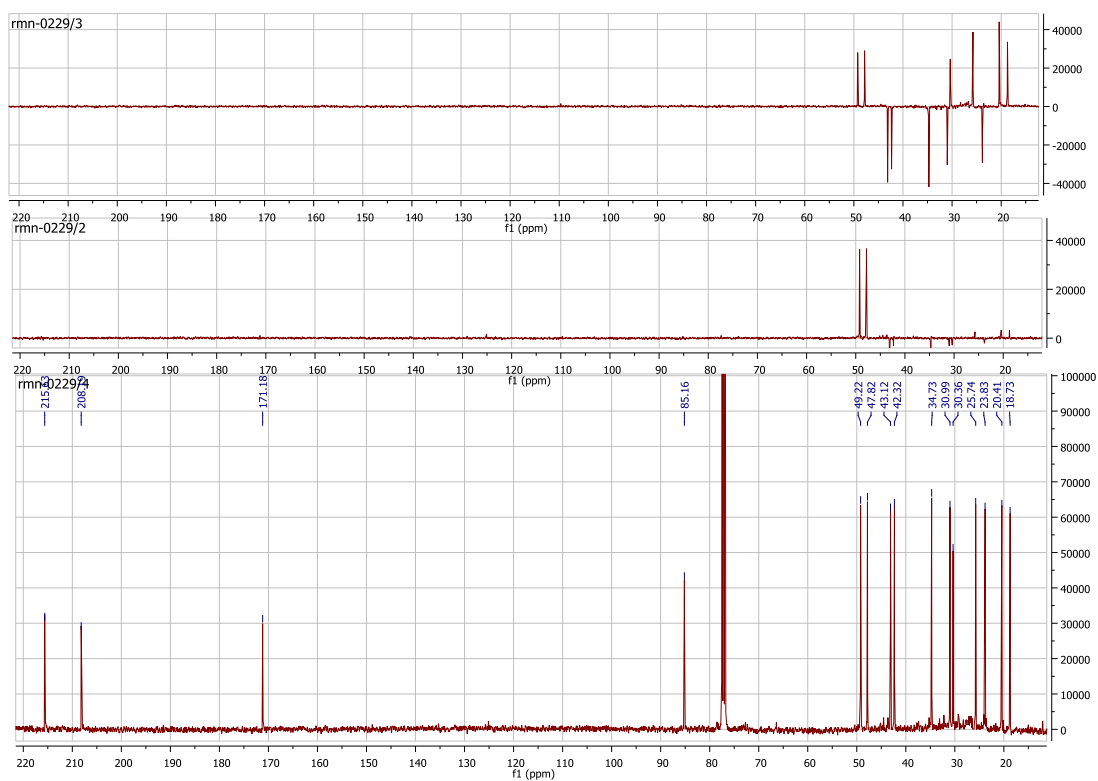


Figura 26 - Espectro de  $^{13}\text{C}$

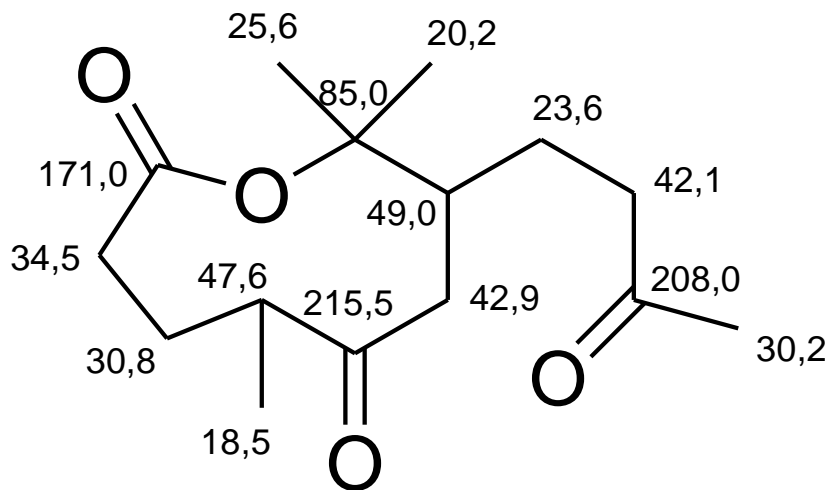


Figura 27 - Atribuição dos valores dos carbonos

Espectro de infravermelho:

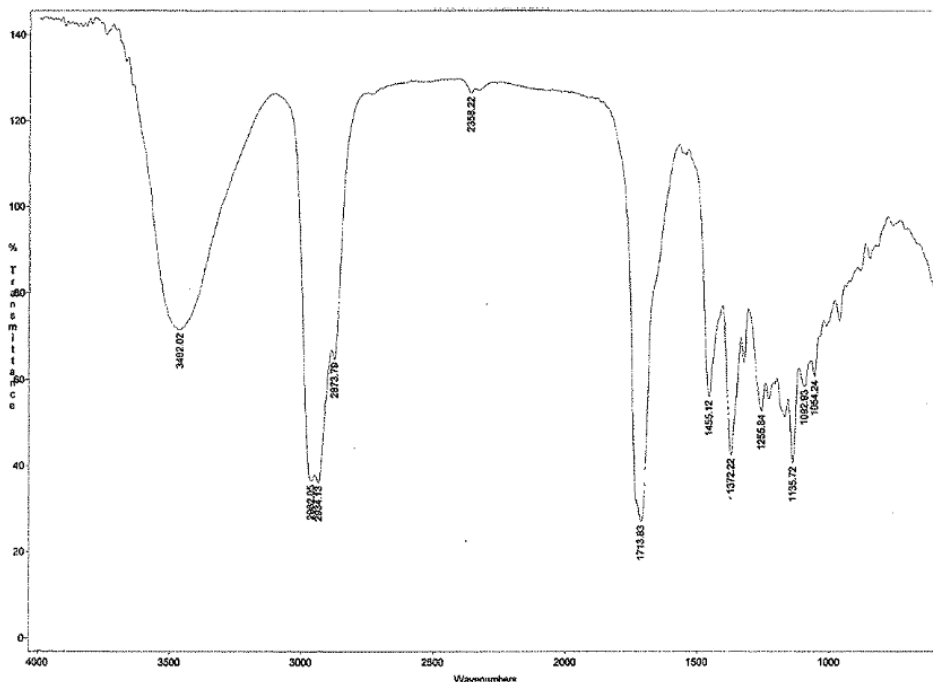
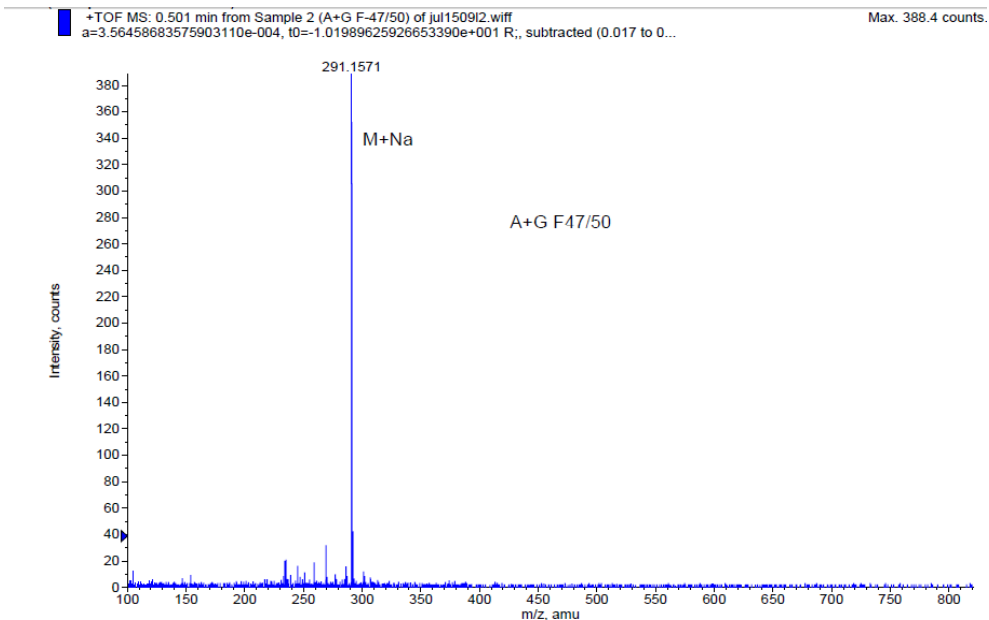


Figura 28 - Infravermelho

Espectro de massa:



Formula	CalculatedMass	mDaError	ppmError	RDB
C15 H24 O4 Na	291.156681	0.41936	1.440319	3,5
C13 H19 N6 O2	291.156401	0.699492	2.402451	7,5
C16 H20 N4 Na	291.158018	-0.917952	-3.152766	8,5
C17 H23 O4	291.159086	-1.9859	-6.820704	6,5
C12 H23 N2 O6	291.155063	2.036804	6.995537	2,5
C2 H19 N12 O5	291.159588	-2.488476	-8.546834	-0,5

Figura 29 - Espectro de massa

Dos quais se deduziu a seguinte estrutura química:

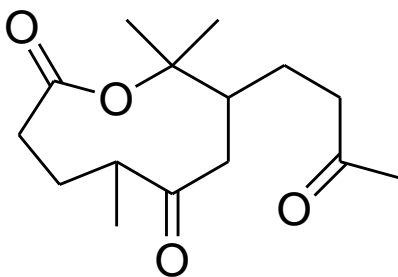


Figura 30 - Estrutura molecular do 4,8-dimetil-7-(3'-oxobutil)-5-oxononan-1,8-olida

## Biotransformação do bulnesol pelo *Rhizopus stolonifer*

Da biotransformação de 0,200 g de bulnesol com *R. stolonifer*, finalizada após 10 dias, obtiveram-se, entre vários compostos, 0,0103 g de um composto que, por análise do espectro de próton:

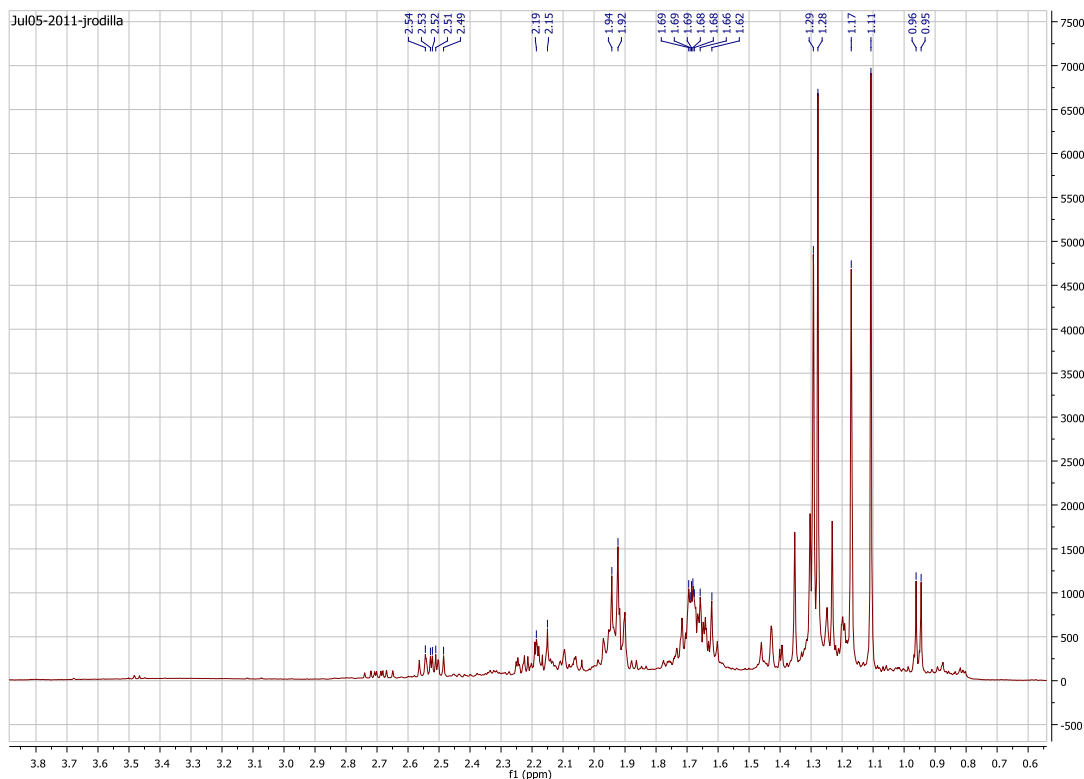


Figura 31 - Espectro  $^1\text{H}$

Dados espectroscópicos:

0,95 ppm (d,  $J = 6,5$  Hz, 3H, H-14); 1,11 ppm (s, 3H, H-12); 1,11 ppm (s, 3H, H-13); 1,28 ppm (s, 3H, H-15); 2,50 ppm (m, 1H, H-4); 2,19 ppm (m, 1H, H-7); 2,10-1,19 ppm encontram-se três séries de multipletos correspondentes a 10 H das posições 2, 3, 6, 8 e 9.

Do espectro de carbono:

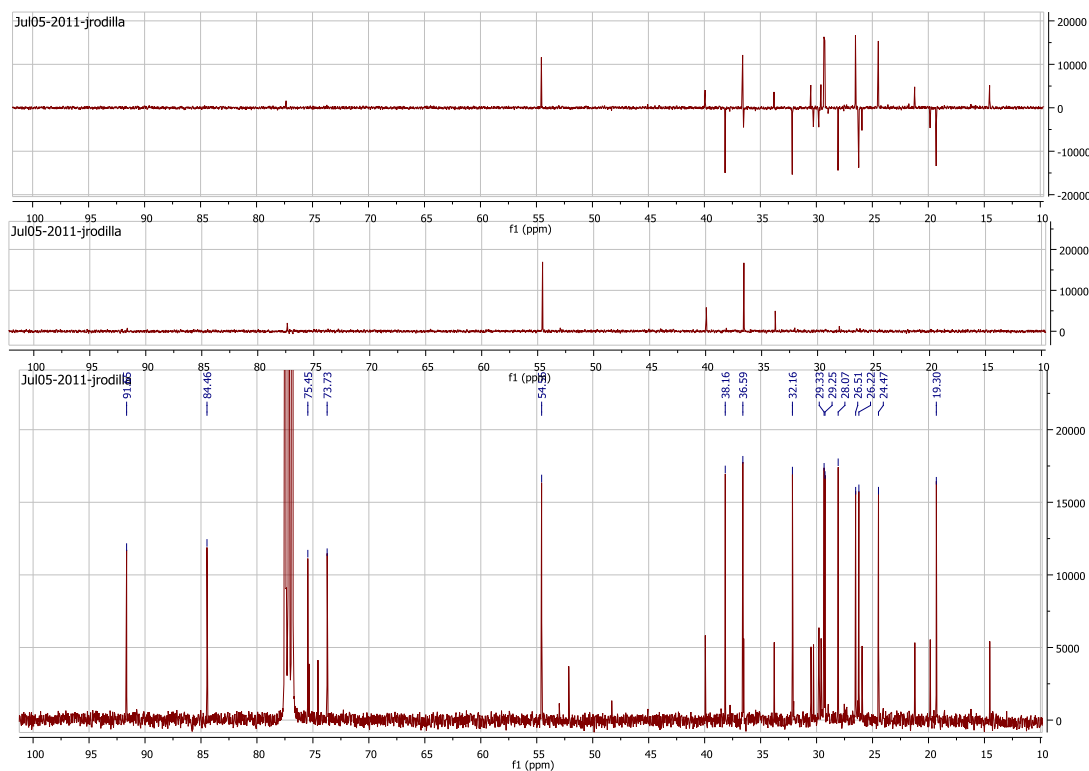


Figura 32 - Espectro de  $^{13}\text{C}$

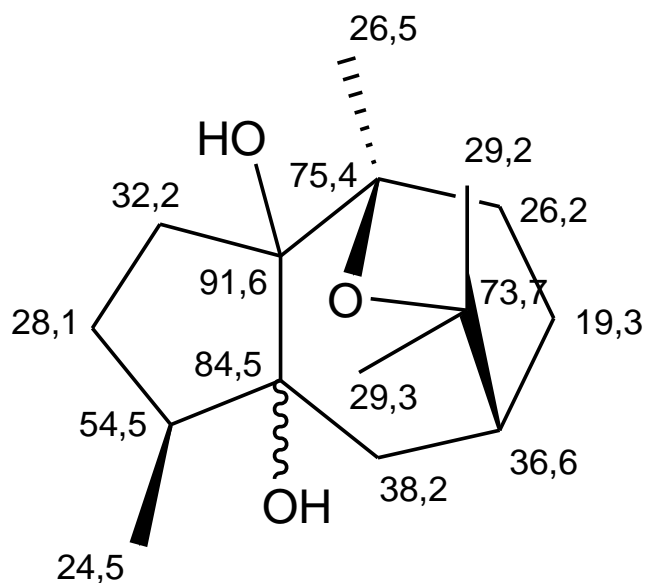


Figura 33 - Atribuição do valor dos carbonos

Infravermelho:

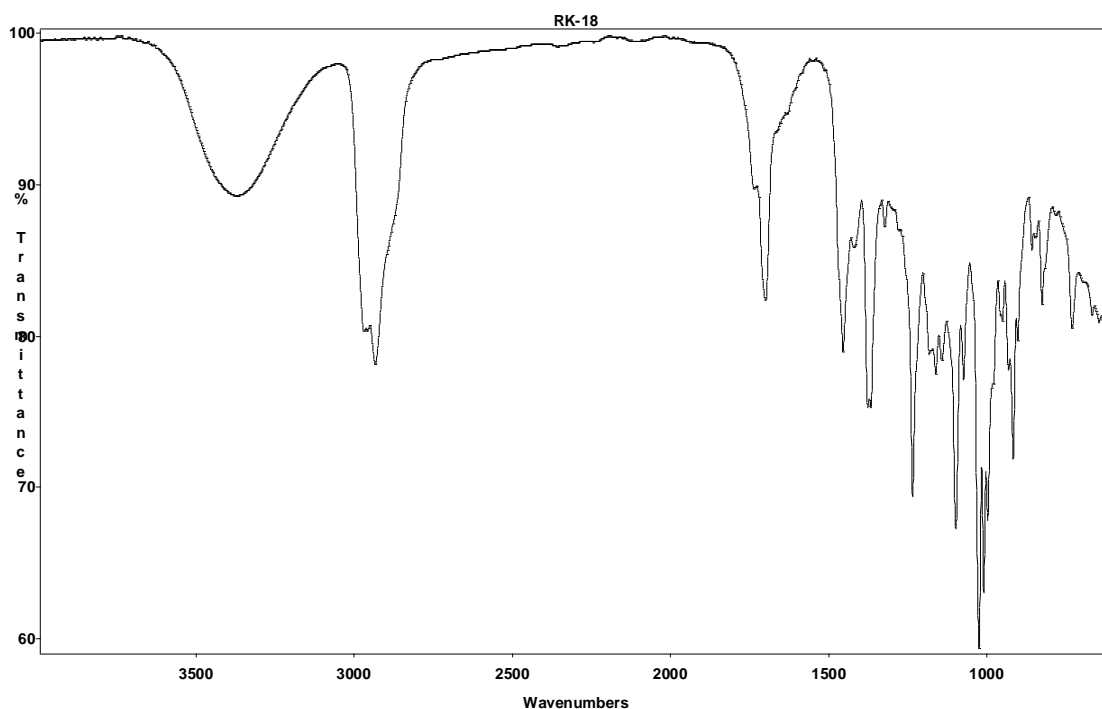


Figura 34 - Infravermelho

Têm a estrutura molecular:

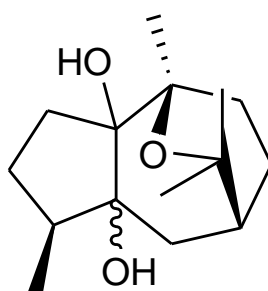


Figura 35 - Estrutura química do 5-hidroxihanamyol

Nesta biotransformação ocorreu a adição de um grupo hidroxilo da posição 11 sobre a posição 10, com hidroxilação simultânea na posição 1. Posteriormente dá-se outra hidroxilação na posição 5.

### Biotransformação do acetato de guaiol pelo *Rhizopus stolonifer*

Das 0,200 g de acetato de guaiol, que ficaram a biotransformar durante 10 dias, e após realizada a CC, recuperaram-se 0,108 g do composto inicial. As restantes 0,092 g pensa-se que tivessem sido utilizadas pelo fungo como alimento.



## Biotransformação do bulnesol pelo *Aspergillus niger*

Das 0,200 g de bulnesol que se colocaram a biotransformar num período de 16 dias, e após purificados os compostos por CC, recuperaram-se 0,090 g de bulnesol sem se transformar, e outros derivados. O resto do bulnesol foi usado pelo fungo como fonte de carbono.

## Biotransformação do 5,11-epoxiguaiien-1( $\alpha,\beta$ )-ol pelo *Rhizopus stolonifer*

Para a biotransformação destes isómeros foi atribuída a letra A para o isómero que tinha de peso 0,091 g, e a letra B para o isómero que tinha de peso 0,090 g.

Na biotransformação do composto A, que demorou 9 dias, e após a CC, obteve-se uma mistura de dois isómeros, com 0,0145 g de peso, que por análise:

Do espectro de protão:

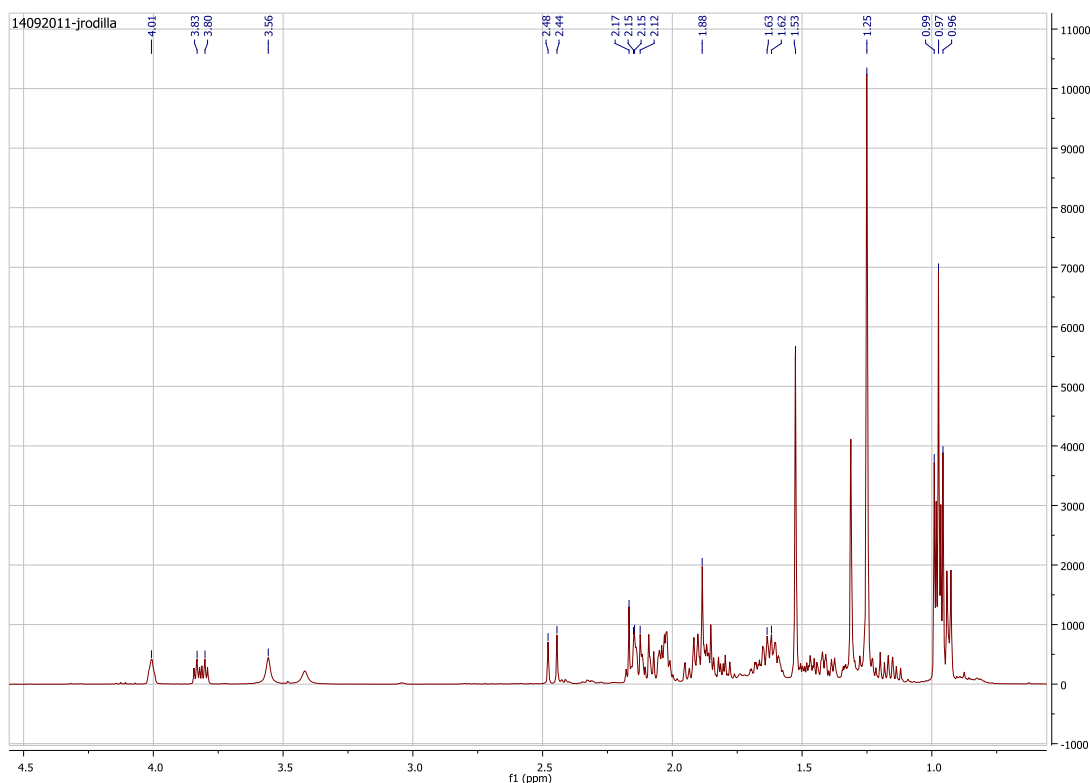


Figura 36 - Espectro de  $^1\text{H}$

Do espectro de carbono:

0,98 ppm (d,  $J = 6,5$  Hz, 3H, H- 14/15); 0,96 ppm (d,  $J = 6,9$  Hz, 3H, H- 14/15); 1,25 ppm (s, 3H, H- 12); 1,25 ppm (s, 3H, H- 13); 3,82 ppm (m, 1H, H-8); 4,01 ppm (s, 1H, -OH); 3,82 ppm (s, 1H, -OH)

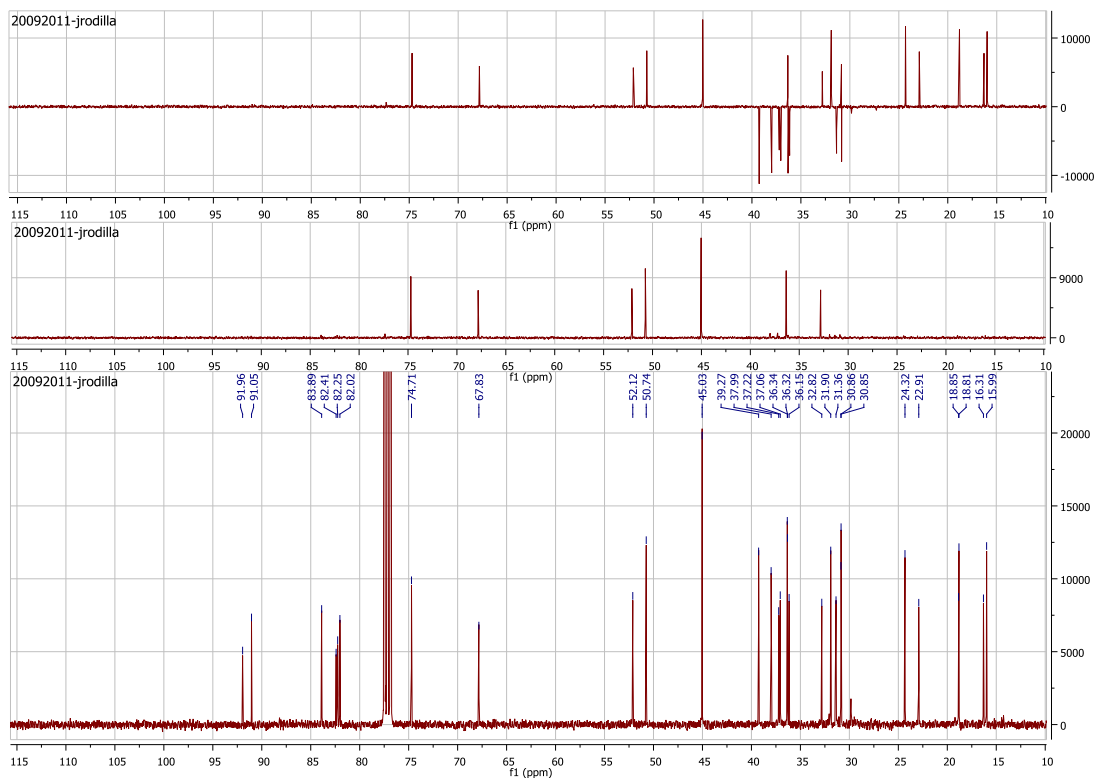


Figura 37 - Espectro de  $^{13}\text{C}$

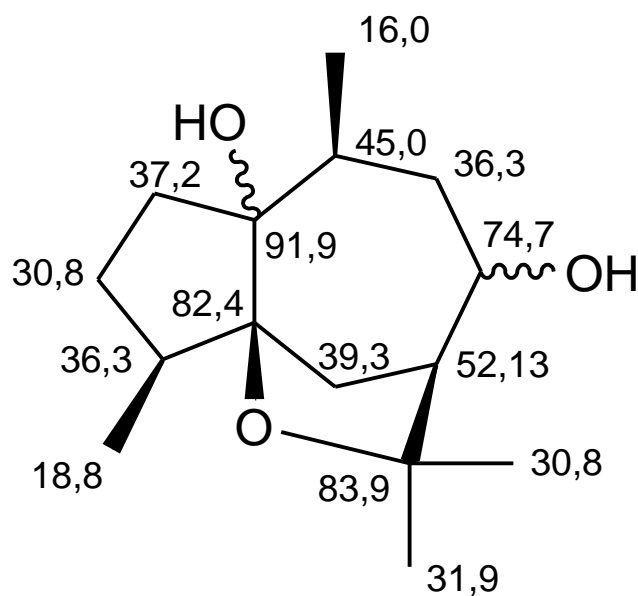


Figura 38 - Atribuição dos valores das ligações de carbonos.

Tabela 4 - Atribuição dos valores das ligações de carbonos do isômero do composto apresentado na figura 37.

Posição do carbono	$\delta$ ppm	Ligação
1	91,1	C-O
2	37,1	CH <sub>2</sub>
3	31,4	CH <sub>2</sub>
4	32,8	CH
5	82,3	C-O
6	38	CH <sub>2</sub>
7	50,7	CH
8	67,8	CH-OH
9	36,2	CH <sub>2</sub>
10	45,1	CH
11	82	CO
12	32,8	CH <sub>3</sub>
13	31,4	CH <sub>3</sub>
14	18,8	CH <sub>3</sub>
15	16,3	CH <sub>3</sub>

Espectro de infravermelho:

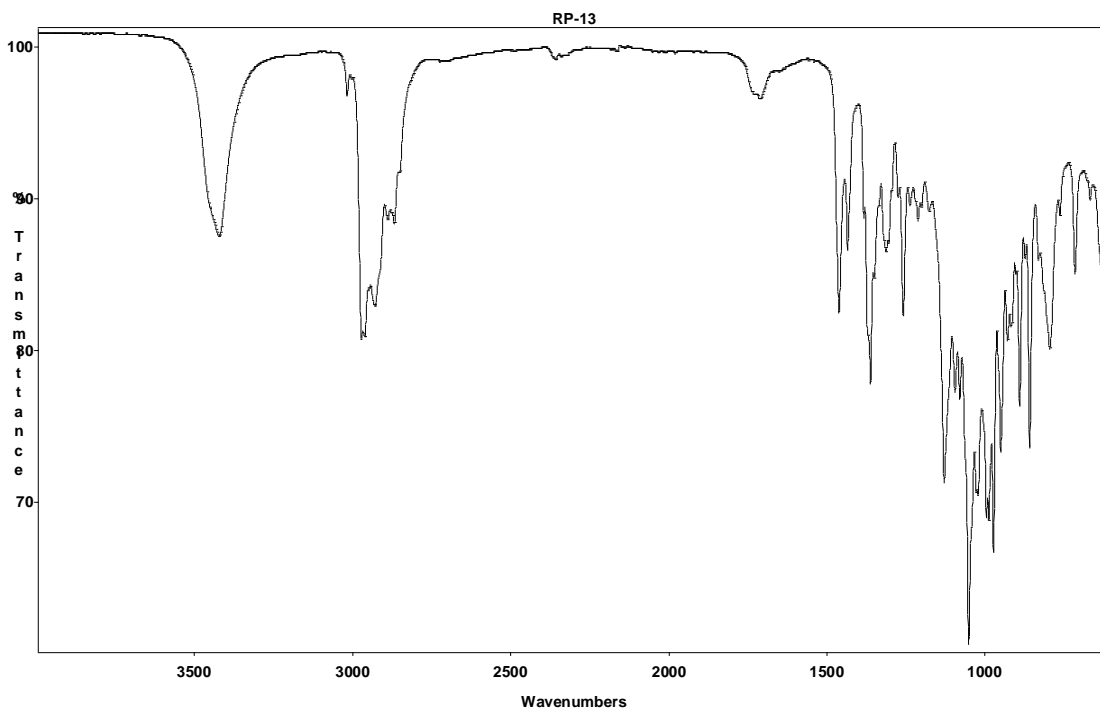


Figura 39 - Infravermelho

Chegamos à seguinte estrutura molecular:

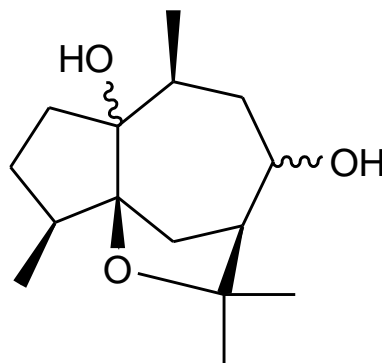


Figura 40 - Estrutura química do 5,11-epoxiguaien-1(α, β),7(α, β)-diol

Através da observação desta estrutura molecular, verifica-se que ocorreu a biohidroxilação, do composto inicial, no carbono da posição 8.

Na biotransformação do composto B, que levou 9 dias a decorrer, e após purificação por CC, verificou-se a obtenção da mesma mistura que para o composto A.

### Valores dos $[\alpha]_D^{Temp}$ medidos

Para o guaiol, o valor do  $\alpha = -0,22$ .

Depois de aplicada a fórmula, e tendo a solução do composto a concentração de  $15,04 \text{ g/dm}^3$ :

$$[\alpha]_D^{26,5} = -1,463$$

Para o composto que corresponde ao isómero A obtido do tratamento com cromato de sódio, o valor do  $\alpha = -0,26$ .

Depois de aplicada a fórmula, e tendo a solução do composto a concentração de  $9,56 \text{ g/dm}^3$ :

$$[\alpha]_D^{26,8} = -2,720$$

Para o composto que corresponde ao isómero B obtido do tratamento com cromato de sódio, o valor do  $\alpha = -0,21$ .

Depois de aplicada a fórmula, e tendo a solução do composto a concentração de  $7,08 \text{ g/dm}^3$ :

$$[\alpha]_D^{27,0} = -2,966$$

## 5. Conclusões

Com este trabalho pretendeu-se utilizar as transformações químicas de forma a modificar o guaiol e o bulnesol num produto menos tóxico a ser biotransformado pelos fungos.

Do tratamento químico do guaiol, com cromato de sódio, obteve-se o composto 5,11-epoxiguaien-1( $\alpha,\beta$ )-ol. Apesar de não ter sido obtida a reacção de oxidação alílica esperada, na realidade, verificou-se uma adição na posição 1 de um grupo hidroxilo e na posição 5 do grupo álcool da posição 11. Esta adição tornou o composto menos tóxico pois o grupo álcool deste composto não se encontra tão exposto para reagir como o grupo álcool do guaiol, tal como pretendido. Por análise dos espectros verifica-se a presença de dois isómeros pois não se sabe se a adição do grupo álcool é adicionado ao carbono pela frente ou por trás. Pela quantidade obtida desta mistura de isómeros determinou-se que o rendimento desta reacção é foi de 18,1 %.

Do tratamento do bulnesol com cromato de sódio, o resultado obtido não foi o esperado. Em vez de ser obtido um composto menos tóxico para o fungo, ocorreu a oxidação e quebra dos dois anéis do bulnesol formando-se um éster cíclico de 9 átomos. Por esta razão, como perdeu a estrutura guaieno não foi colocado para biotransformação. Para este composto formado o rendimento desta reacção foi de 21,65 %.

Da reacção de acetilação do guaiol o produto obtido está de acordo com o produto esperado, o acetato de guaiol. Neste composto desaparece o grupo álcool para formar um éster. O rendimento desta reacção foi de 91,8 %.

Das biotransformações efectuadas com *Rhizopus stolonifer*:

- Foi obtido 5-hidroxihanamyol quando se submeteu o bulnesol a este fungo. O bulnesol assumiu a formação estrutural do Hanamyol com a adição de um grupo álcool na posição 5, ou seja, ele transformou a estrutura do bulnesol numa mais estável. O rendimento desta biotransformação foi de 5,15%.
- Foi obtido o 5,11-epoxiguaien-1( $\alpha,\beta$ ),7( $\alpha,\beta$ )-diol quando se submeteu a este fungo o 5,11-epoxiguaien-1( $\alpha,\beta$ )-ol, ou seja, deu-se adição do grupo álcool na posição 8. Nesta biotransformação também se verificou a formação de isómeros na posição 8. No entanto, pensa-se que, devido à estrutura química bastante rígida e estável do composto que se colocou a biotransformar, o grupo álcool estará ligado ao carbono 8 na posição  $\alpha$  pois a posição  $\beta$  encontra-se impedida para haver aproximação do grupo álcool. Esta biotransformação teve 8,01% de rendimento.
- Foi obtido uma elevada quantidade de acetato de guaiol por transformar em relação a quantidade que se tinha submetido ao fungo. Isto leva-nos a pensar que a presença da ligação éster em vez do composto álcool torna o composto bastante estável e pouco tóxico para o fungo, o que levou a que este, em vez de o biotransformar, o tenha utilizado como fonte de carbono.

Da biotransformação do bulnesol com o *Aspergillus niger* recuperou-se bastante bulnesol por transformar. O restante bulnesol pensa-se que o fungo o possa ter utilizado como fonte de carbono para o seu crescimento.

Nas biotransformações realizadas podemos concluir, ao comparar o desempenho dos fungos, que o *Rhizopus stolonifer* é uma boa escolha para este tipo de compostos pois, para além de não necessitar de muito tempo para biotransformação, duas das três biotransformações realizadas com este fungo, deram resultados positivos. Quanto ao desempenho do *Aspergillus niger*, para além de demorar mais tempo que o *Rhizopus stolonifer* na biotransformação, pode concluir-se que talvez a sua cinética enzimática não seja a mais apropriada para este tipo de compostos orgânicos, visto não se terem obtido produtos.

Numa comparação aos tipos de transformação, conclui-se que as transformações químicas, para além de mais rápidas, possuem maior rendimento que as biotransformações. Contudo, não são tão específicas. Pode também verificar-se que, como todas as adições ocorrem nos carbonos que pertencem ao anel de 7, que estes são mais activos que os do anel de 5.

Em conclusão final, os resultados obtidos foram bons. Extraíram-se das reacções químicas produtos menos tóxicos para os fungos, tal como o esperado, e obtiveram-se dos fungos produtos de biotransformação.

Não foram testadas as actividades dos compostos.

## 6. Bibliografia

Prescott, Harley, Klein's, *Microbiology 7<sup>th</sup> edition*, Mc-Graw Hill (2008)

K. Faber, *Biotransformations in Organic Chemistry 3<sup>th</sup> Edition*, Springer (1997)

W. Ferreira, J. C. Sousa, *Microbiologia vol.1 e 2*, LIDEL (2000)

T. D. Brock, M. T. Michael, J. M. Martinko, J. Parker, *Biology of Microorganisms 7<sup>th</sup> Edition*, Prentice Hall International (1994)

E. Dellacassa, N. Martinez, D. Davyt, L.Castilla, A. González-Colonea, C. Giménez, R. Cabrera, L. Silva, J. M. Rodilla, *Óleo essencial de Guaiaco: composição e bioatividade* (2006/2007)

A. García-Granados, A. Fernández, M. C. Gutiérrez, A. Martínez, R. Quirós, F. Rivas, J. M. Arias, *Phytochemistry* **65** (2004) 107-115

R. Z. Petersen, Biotransformação de terpenóides por culturas de células vegetais e fungos filamentosos, Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas - Universidade Federal do Rio Grande do Sul (2006)

E. Menini, J. K. Norymberski, *Biochem. J.* **84** (1962) 195

A. Goldblum, R. Mechoulam, *Sodium Chromate Oxidation of Enol Benzoates. Allylic Oxidation versus a Novel Rearrangement* (1977)

J. A. R. Salvador, S. M. Silvestre, *Processo para a oxidação alílica de compostos insaturados usando hidroperóxido de t-butilo e catalisadores de bismuto capítulo III* (2006)

K. P. Devkota, M. I. Choudhary, S. A. Nawaz, A. M. Lannang, B. N. Lenta, P. A. Fokou, N. Sewald, *Chem. Pharm. Bull.* **55** (2007) 682-684

B. Oliveira, Biotransformação da R- (+) e S- (-) Carvona por Fungos Filamentosos, Programa de Pós-Graduação em Ciências Moleculares - Universidade Estadual de Goiás (2009)

S. E. Baker, *Medical Mycology* **44** (2006) S17-S21

M. I. Choudhary, M. Y. Mohammad, S. G. Musharraf, M. Parvez, A. Al-Aboudi, Atta-ur-Rahman, *Steroids* **74** (2009) 1040-1044

J. R. Perfect, G. M. Cox, J. Y. Lee, C.A. Kauffman, L. de Repentigny, S. W. Chapman, V. A. Morrison, P. Pappas, J. W. Hiemenz, D. A. Stevens, *Cin Infect Dis* **11** (2001)

S. F. Arantes, J. R. Hanson, *Current Organic Chemistry* **11** (2007) 657-663

R. A. Craven, N. W. Arp, E. Johnson, T. G. Waddell, *Journal of Undergraduate Chemistry Research* **81** (2005)

M. R. M. Junior, Biotransformação de terpenos para a produção de compostos de aroma e funcionais, Tese de Doutorado em Ciências de Alimentos - Universidade Estadual de Campinas (2006)

R. Clara, *Biotransformação de esclareol pelo Rhizopus stolonifer*, Projecto de Licenciatura em Química Industrial - Departamento de Química de Universidade da Beira Interior. (2001)

R. Faustino, *Biotransformação de esclareol pelo Rhizopus stolonifer*, Projecto de Licenciatura em Química Industrial - Departamento de Química de Universidade da Beira Interior. (2004)



## **Anexos**

## Anexo 1

### $\alpha$ -Bulneseno

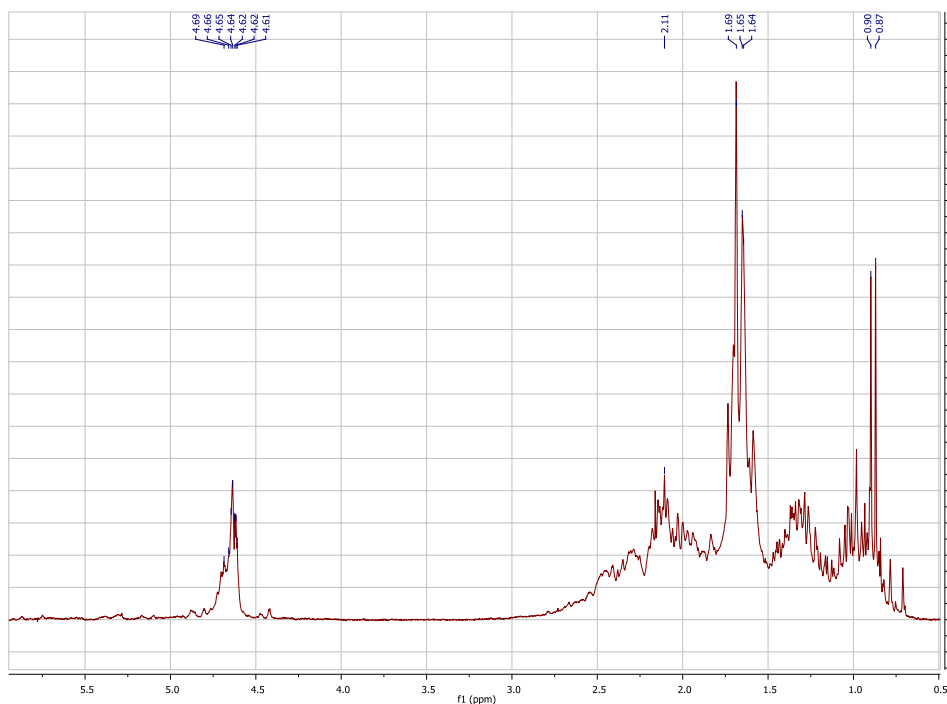


Ilustração 1 - RMN de  $^1\text{H}$  do  $\alpha$ -Bulneseno

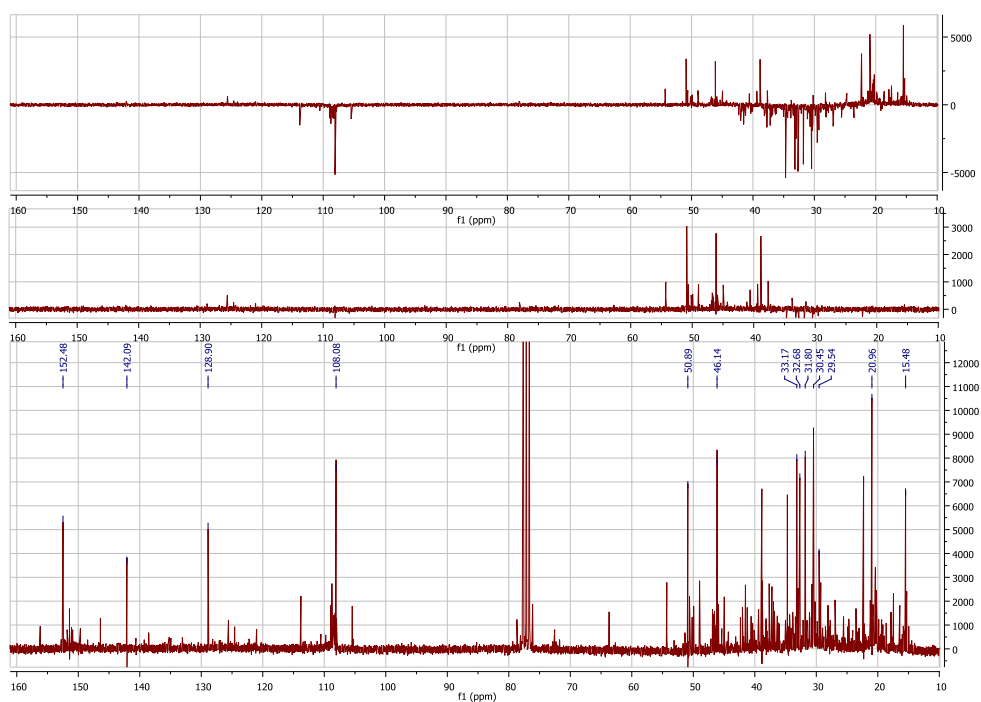


Ilustração 2- RMN de  $^{13}\text{C}$  do  $\alpha$ -Bulneseno

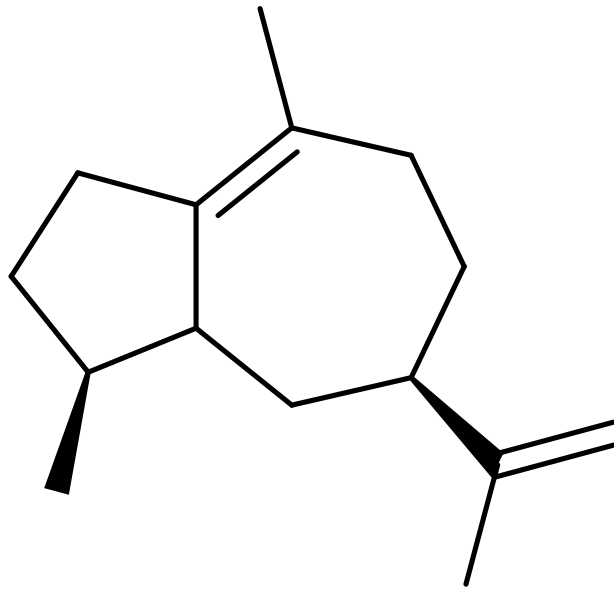


Ilustração 3 - Estrutura química do α-Bulneseno

## Guaiol

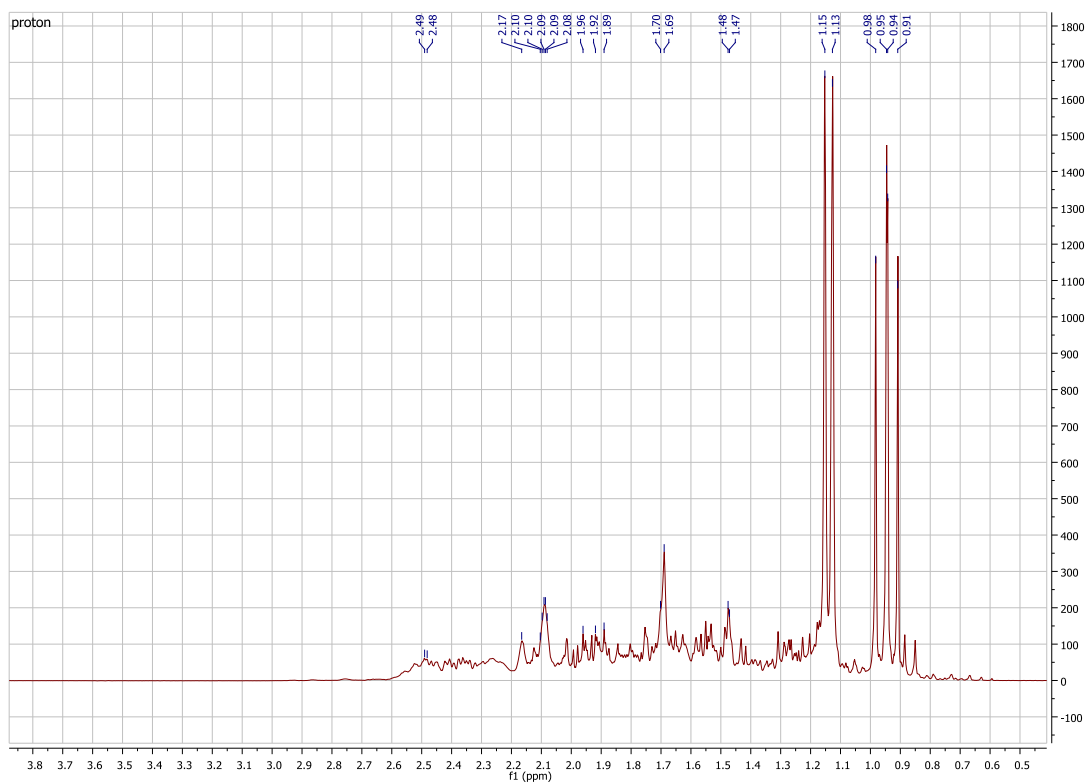


Ilustração 4 - RMN de <sup>1</sup>H do Guaiol

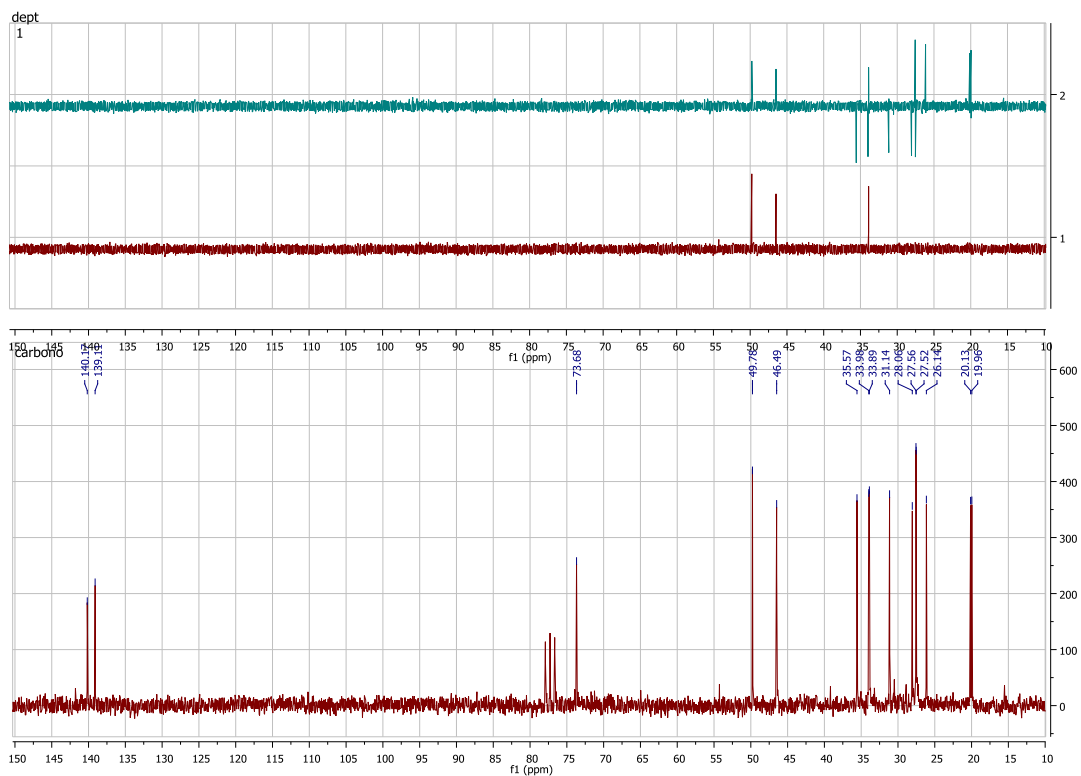


Ilustração 5 - RMN de  $^{13}\text{C}$  do Guaiol

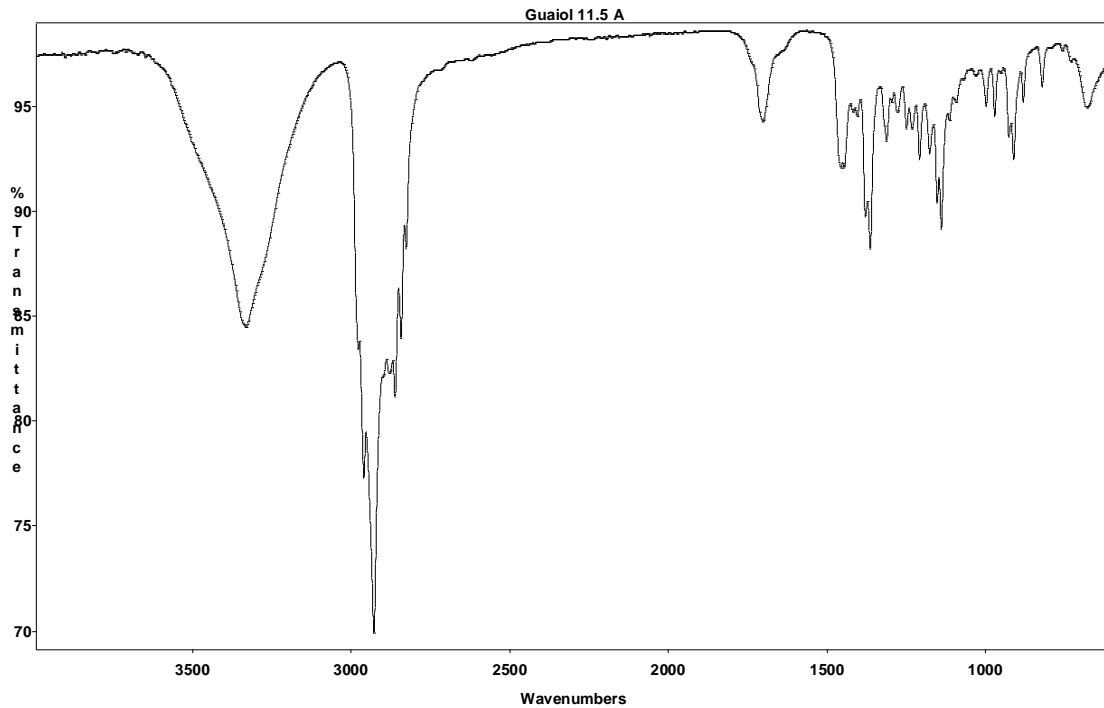


Ilustração 6 - Infravermelho do Guaiol

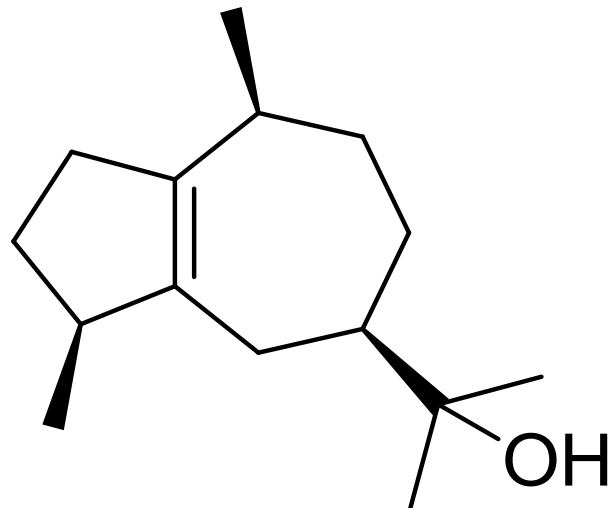


Ilustração 7 - Estrutura química do Guaiol

## Bulnesol

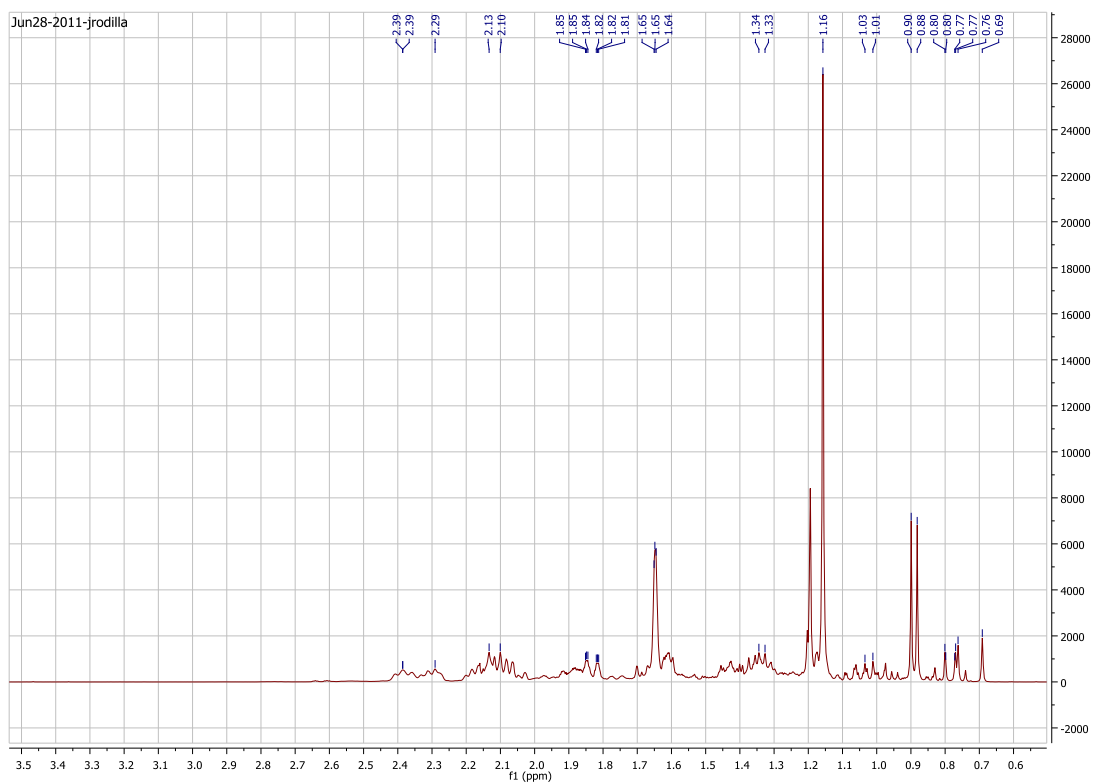


Ilustração 8 - RMN de <sup>1</sup>H do Bulnesol

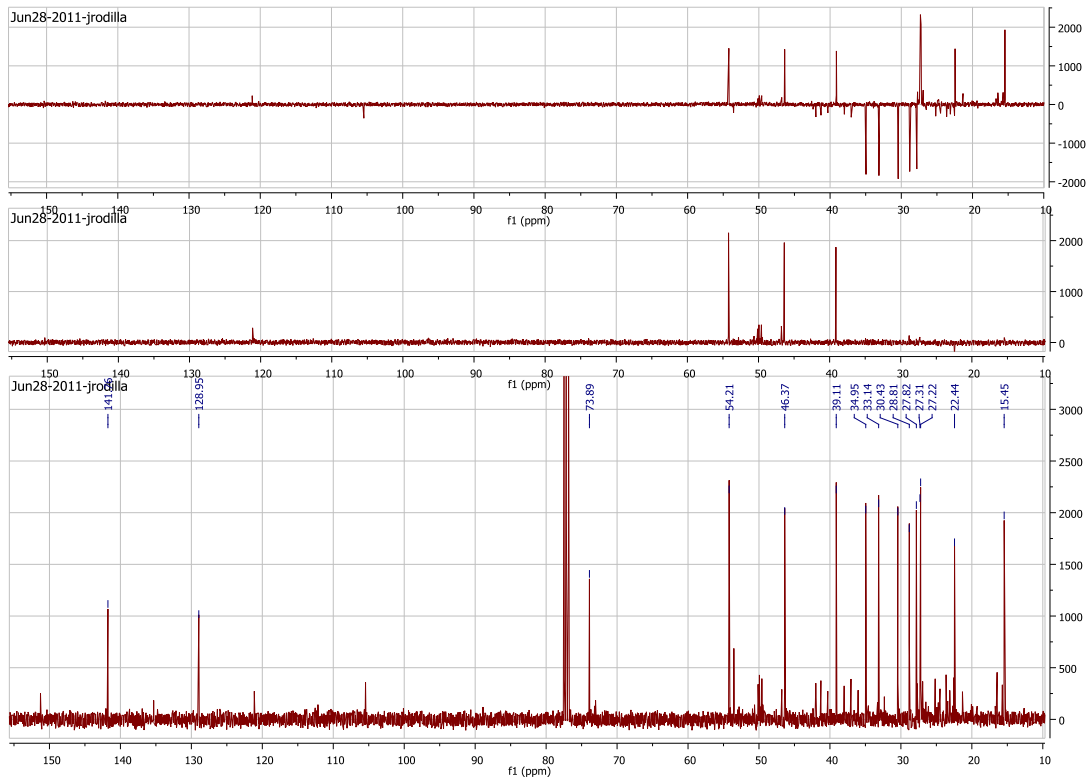


Ilustração 9 - RMN de  $^{13}\text{C}$  do Bulnesol

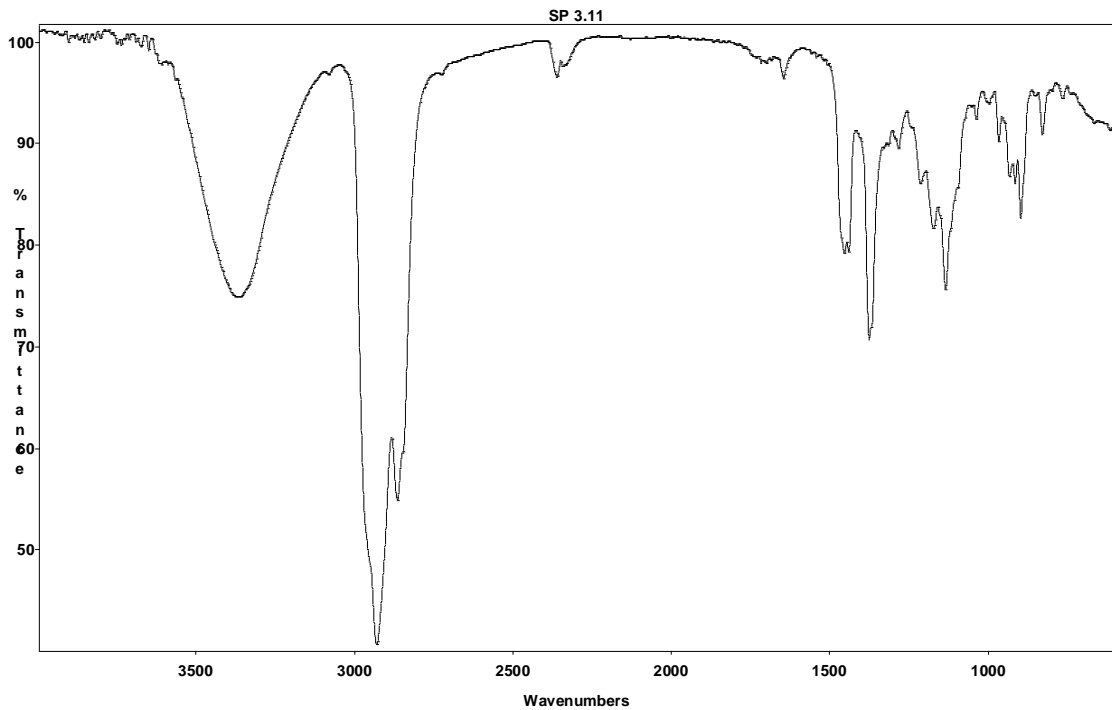


Ilustração 10 - Infravermelho do Bulnesol

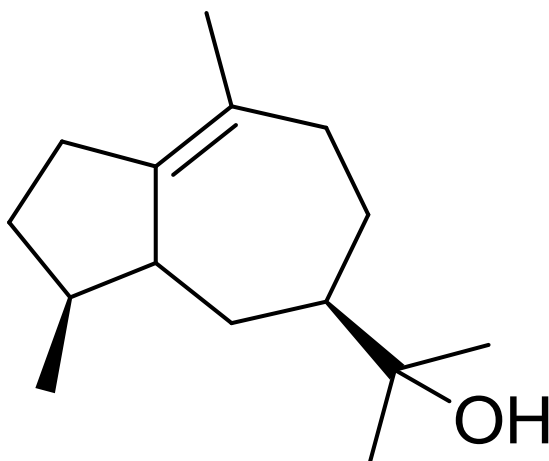


Ilustração 11 - Estrutura química do Bulnesol

## Hanamyol

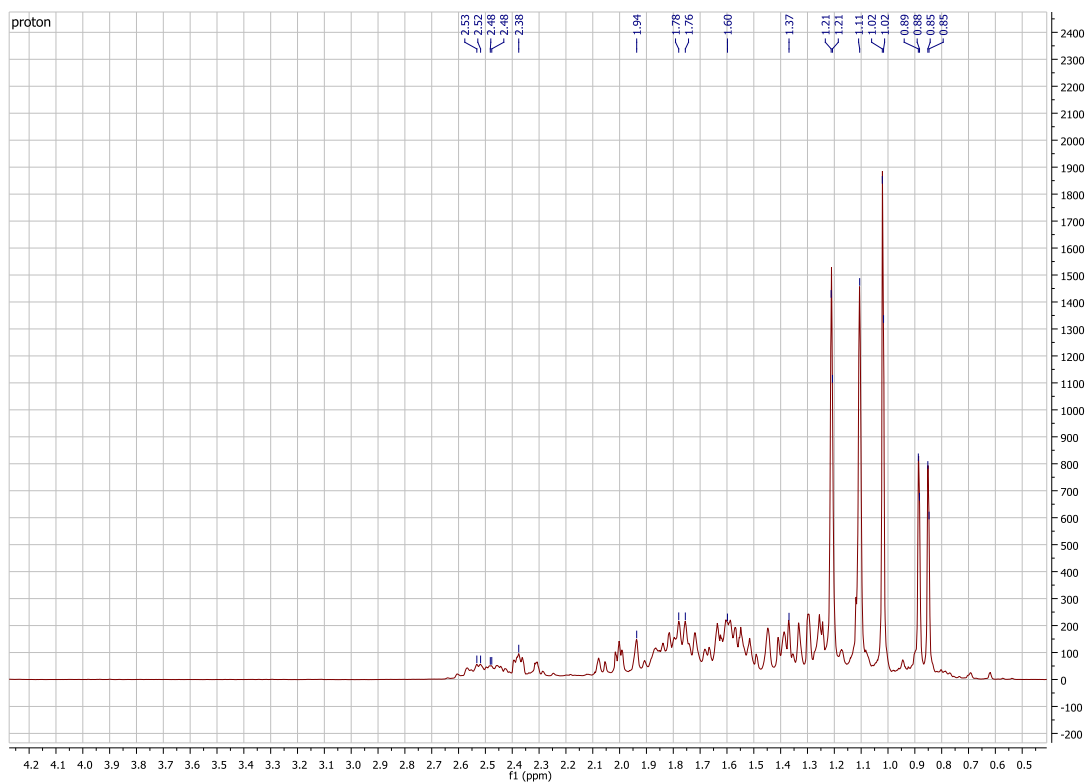


Ilustração 12 - RMN de <sup>1</sup>H do Hanamyol

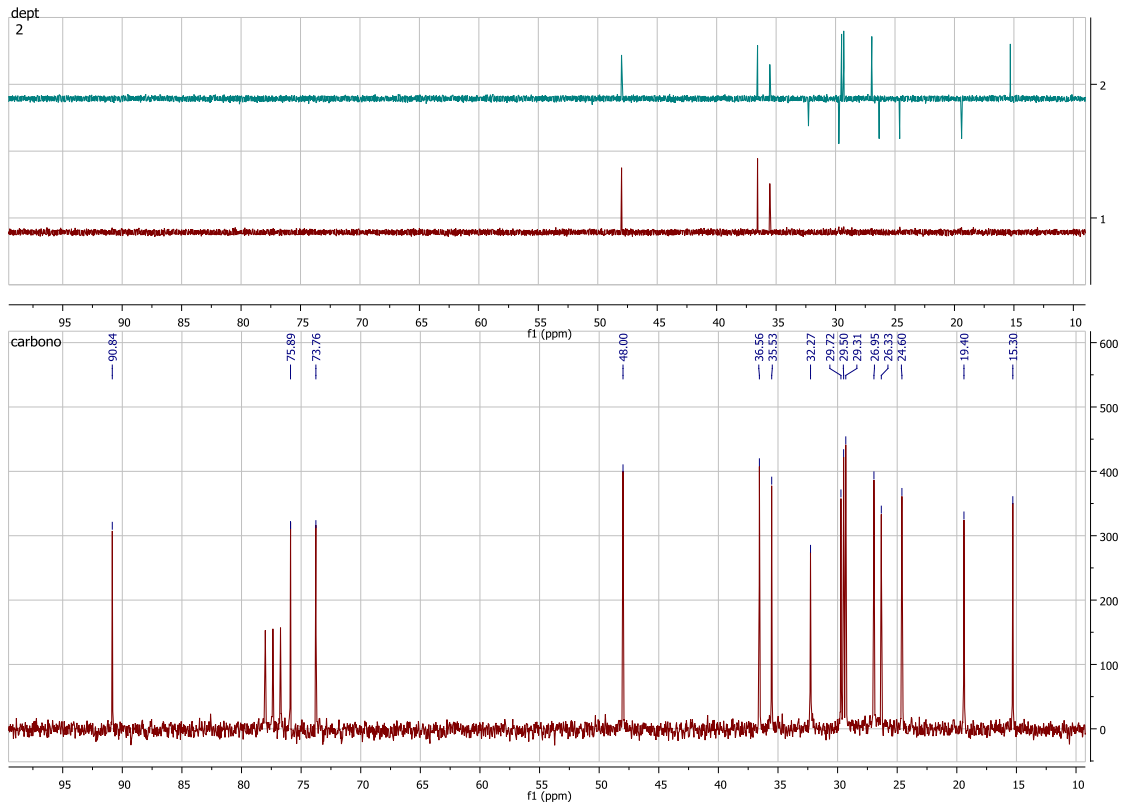


Ilustração 13 - RMN de <sup>13</sup>C do Hanamyol

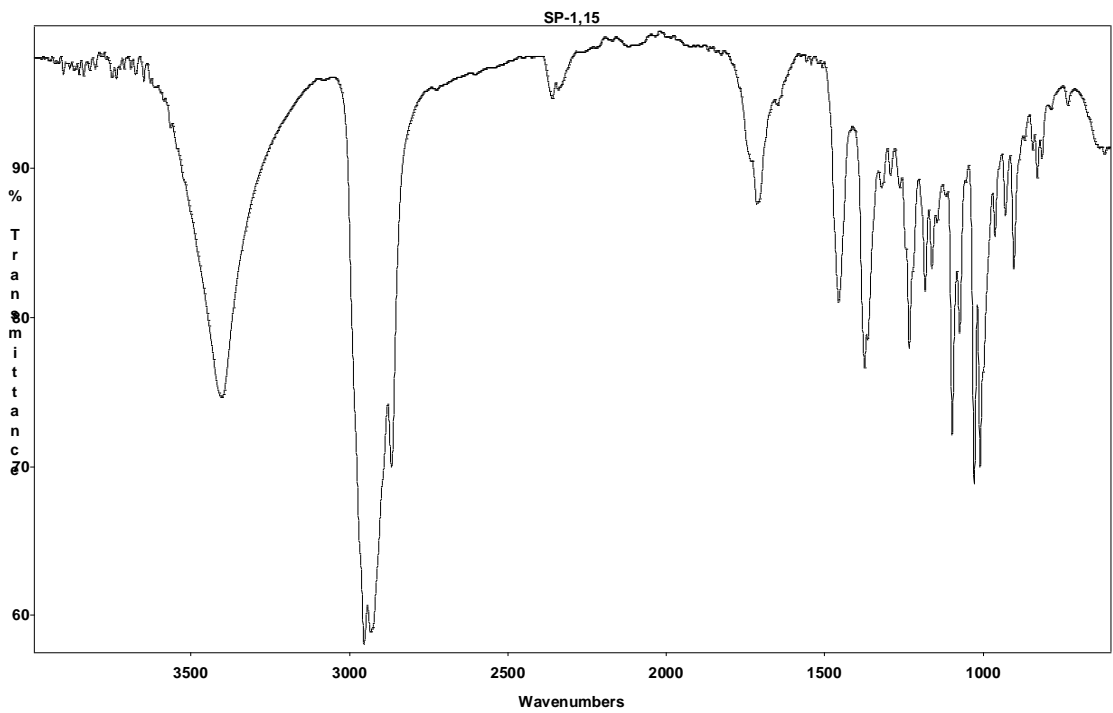


Ilustração 14 - Infravermelho do Hanamyol



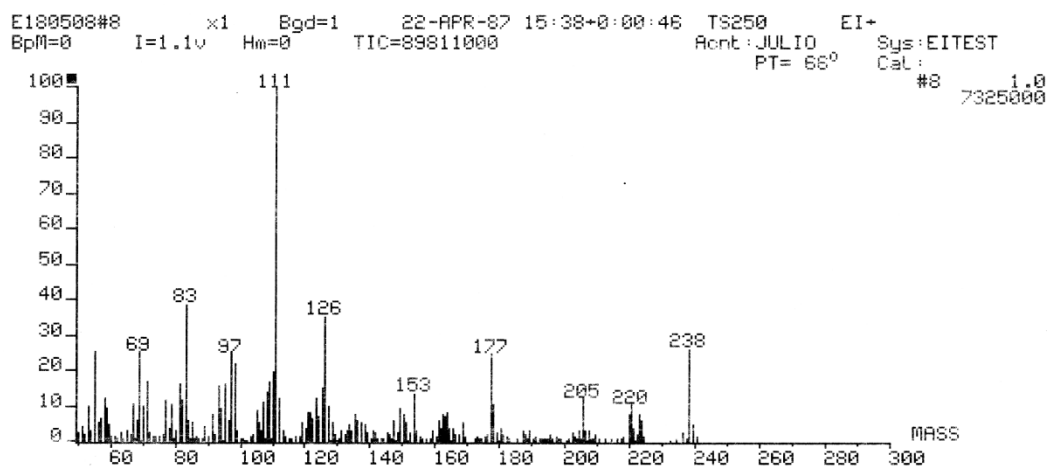


Ilustração 15 - Espectro de massa do Hanamyol

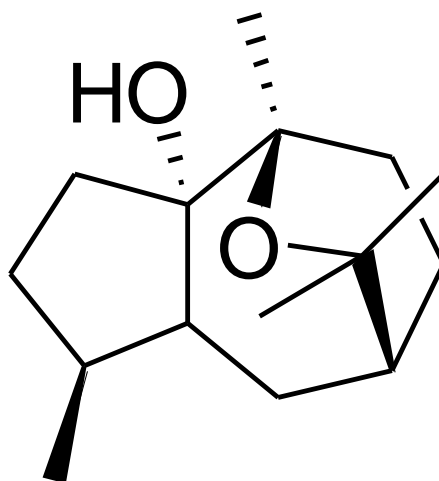


Ilustração 16 - Estrutura química do Hanamyol

## Anexo 2

### Acetato de Guaiol

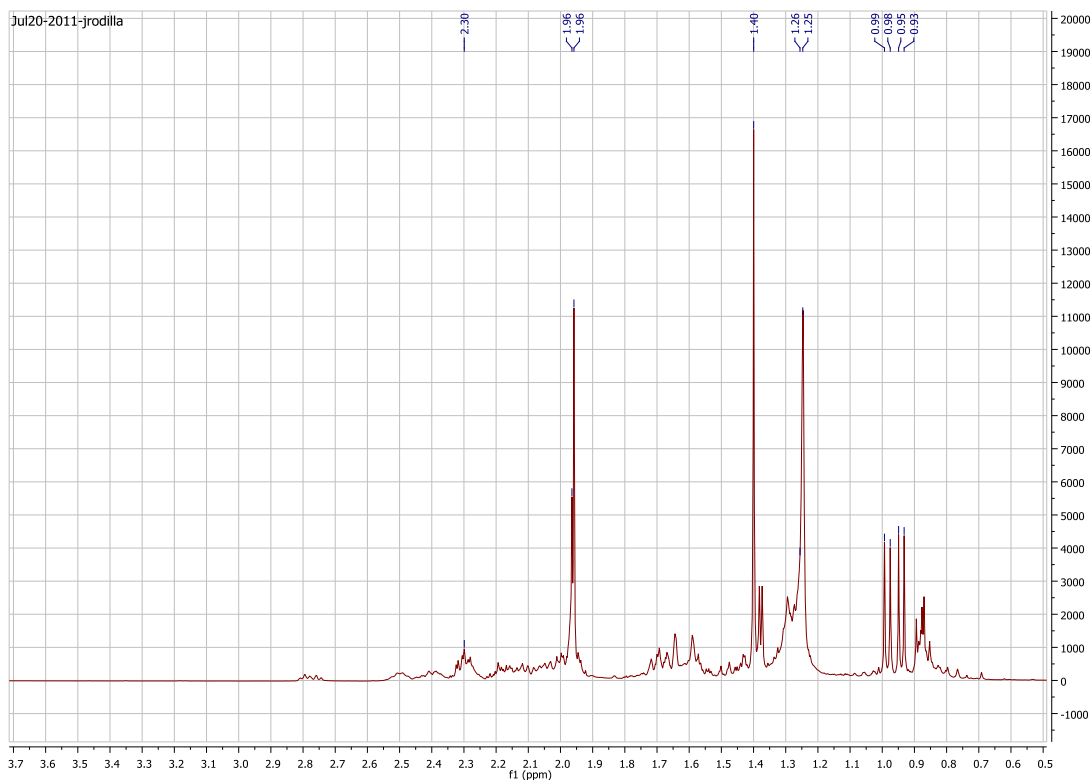


Ilustração 17 - RMN de <sup>1</sup>H do Acetato de Guaiol

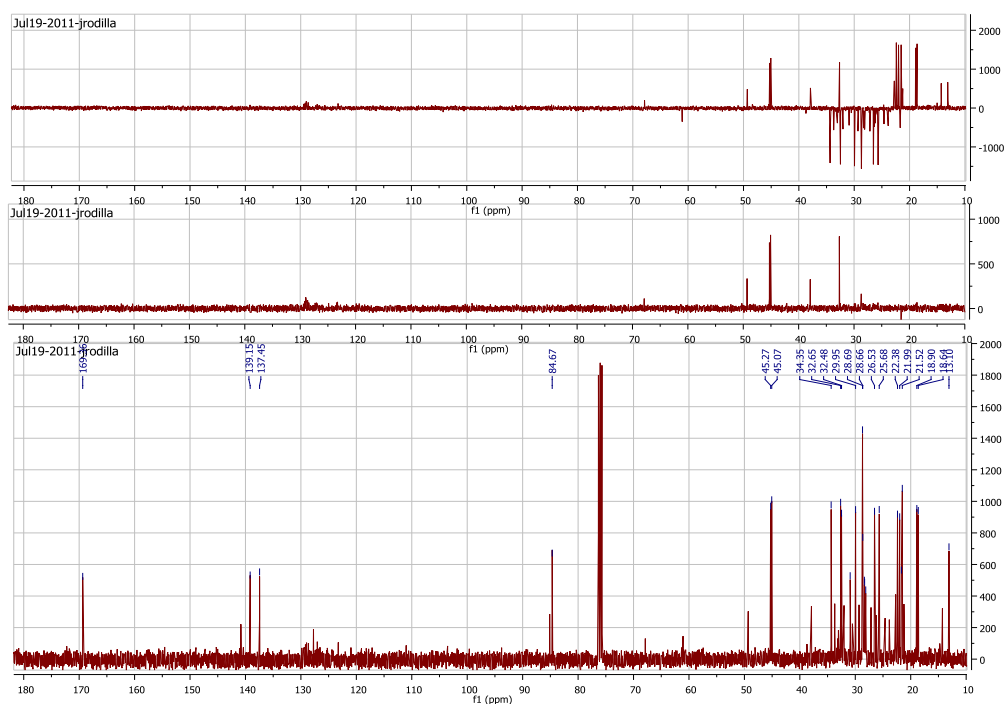


Ilustração 18 - RMN de <sup>13</sup>C do Acetato de Guaiol

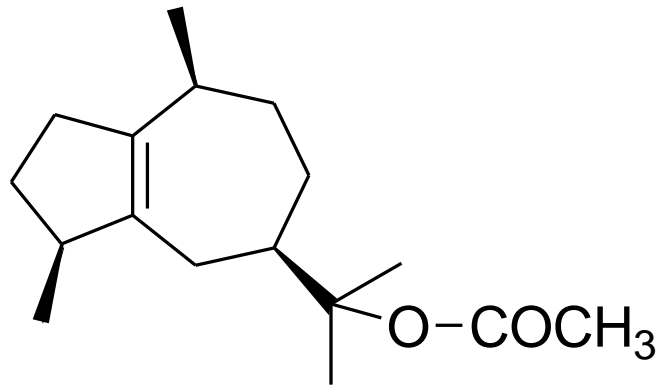


Ilustração 19 - Estrutura química do Acetato de Guaiol