



Universidade da Beira Interior  
Ciências

**Transformação Microbiológica de Guaienos**  
**Biotransformação do guaiol**

**Andreia Cristina Barroso**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em  
**Química Industrial**  
(2º Ciclo de estudos)

Orientador: Prof. Doutor Jesus Miguel Rodilla  
Co - orientador: Prof. Doutor Pedro Miguel Rocha

**Covilhã, Junho de 2011**



*Determinação, coragem e autoconfiança são factores decisivos para o sucesso.*

*Não importa quais sejam os obstáculos e as dificuldades.*

*Se estamos possuídos de uma inabalável determinação, conseguiremos superá-los.*

*Independentemente das circunstâncias, devemos ser sempre humildes, recatados e despidos de orgulho.*

*Dalai Lama*

# Agradecimentos

Depois de muitos meses dedicados ao trabalho que culmina nesta dissertação, é com alguma emoção que me sento para escrever estas poucas linhas de agradecimento a todos que, de alguma forma me ajudaram a levar a bom porto esta tarefa.

Tenho muitas pessoas a quem agradecer e pouco espaço para o fazer. Não sou porém de recuar perante um desafio; por isso aqui vai...

Gostaria em primeiro lugar de agradecer ao Professor Doutor Jesus Rodilla por toda a orientação científica que me prestou, sem a qual não estaria a concluir este trabalho. Agradeço também ao Professor Doutor Pedro Rocha, por todo o incentivo e por todo o material que me disponibilizou para a realização deste projecto. Obrigada.

À Professora Doutora Ana Carreira, não só por toda a orientação durante estes meses, mas por toda a pronta disponibilidade durante estes anos passados na Universidade da Beira Interior. Obrigada.

Às minhas colegas do laboratório Dr. Brito Rocha, Doutora Celina, Mariana e Cleide, a vossa ajuda foi fundamental. Obrigada por todos os conhecimentos que me transmitiram. E às restantes colegas, Andreia e Eunice, agradeço os poucos mas bons momentos partilhados.

Pelos bons tempos passados no laboratório de Produtos Naturais da Universidade da Beira Interior, recordo com gratidão a companhia de todas as pessoas que o frequentavam, que pouco a pouco foram trocando comigo amizade e conhecimentos que nos fizeram enriquecer de parte a parte.

Não posso deixar de agradecer a todas as pessoas que trabalham no laboratório de Electroquímica Ambiental. À Professora Doutora Maria José, obrigada por todas as palavras sábias.

A todos os meus Amigos, agradeço todo o apoio e paciência. Obrigada por estarem sempre comigo. Apesar de eu não poder estar sempre presente, sei que vocês me entenderam e que nunca deixaram de estar aí.

Não posso deixar de fazer um agradecimento especial à Débora. Obrigada pelas risadas nas horas mais avançadas, quando o nosso cérebro já não nos deixava pensar, por todos os momentos de partilha de emoções e de experiências de vida... A Ti, que por fora és um “bloco de gelo”, mas que no fundo és um grande coração mole, e só quem verdadeiramente te conhece sabe que assim és... Obrigada por tudo Beby!!! Sabes que poderás contar sempre comigo...

A Ti, que quando estiveste longe não deixaste de estar por perto... Obrigada por voltares a estar presente na minha vida... Fazes-me muito feliz!

Agradeço à minha família por todo o incentivo dado não só ao longo destes anos, mas em todo o decorrer da minha vida.

Por fim, mas não menos importantes, antes pelo contrário, aos meus Pais. Sem eles não teria chegado aqui. O esforço foi mútuo mas sabemos que valeu a pena. Sei que estão orgulhosos, mas eu ainda estou mais orgulhosa neles... OBRIGADA por tudo.

***Palavras são poucas próximas de actos. Os actos de cada um muito me ajudaram, e com todo o carinho venho agradecer por isso. Muito obrigada!***

# Resumo

Nos últimos anos, a biotransformação ou transformação microbiológica tem evidenciado o seu potencial nas mais variadas áreas e uma importante aplicação desta é na produção de novos compostos com diferentes actividades biológicas (principalmente a actividade antimicrobiológica).

Para desenvolver este projecto de investigação foram utilizados dois fungos: o *Rhizopus stolonifer* e o *Aspergillus niger*. O produto natural a ser biotransformado foi um derivado de esqueleto guaiano, o guaiol, extraído da planta *Bulnesia sarmientoi*, que possui forte actividade biológica.

O guaiol teve que ser purificado através de uma coluna cromatográfica realizada a partir da essência cristalizada da planta *Bulnesia sarmientoi*. Este produto foi purificado com cerca de 50 % de rendimento de purificação.

Inicialmente para a biotransformação propôs-se utilizar um tempo de incubação de 13 dias, mas depois, e tendo em conta os resultados obtidos para o tempo proposto optou-se por testar também para 5 dias de incubação.

Depois da biotransformação foi feita a extracção dos produtos com solventes orgânicos. Procedeu-se à evaporação do solvente e obteve-se uma mistura de compostos. A sua separação foi efectuada através de uma coluna cromatográfica (coluna de sílica gel) e os mesmos foram caracterizados por diferentes técnicas espectroscópicas. Foram realizados espectros de infravermelho (IV), espectros de ressonância magnética nuclear de protão e de carbono ( $^1\text{H-RMN}$  e  $^{13}\text{C-RMN}$ ) e realizou-se o seu espectro de massa por cromatografia de massa gasosa (GC-MS).

Conseguiram obter-se dois produtos, um com cada fungo e para um tempo de incubação de 13 dias. Para um período de 5 dias a biotransformação não se mostrou ser efectiva para nenhum dos microrganismos.

Para o fungo *Rhizopus stolonifer* obteve-se um composto com 6 mg, de fórmula química  $\text{C}_{15}\text{H}_{24}\text{O}_2$ , o 9-hidroxi-5,11-epoxiguaien-1-eno, e para o *Aspergillus niger* obteve-se um composto com 12,5 mg, de fórmula química  $\text{C}_{15}\text{H}_{26}\text{O}_2$ , o 11,15-dihidroxiguaien-1(5)-eno.

Como tal, concluiu-se que a biotransformação com o *Aspergillus niger* durante 13 dias foi mais eficiente, sendo este fungo mais sensível ao substrato, mostrando-se mais selectivo.

**Palavras-chave:** Biotransformações; Guaiol; *Rhizopus*; *Aspergillus*.

# Abstract

In recent years, biotransformation or microbial transformation has demonstrated its potential in various areas and an important application of this is to produce new compounds with different biological activities (mainly the antimicrobial activity). To develop this research project we used two fungi: *Rhizopus stolonifer* and *Aspergillus niger*. The natural product to be biotransformed was a derivative of guaiane, the guaiol, which is extracted from the plant *Bulnesia sarmientoi* which has strong biological activity. The guaiol had to be purified through a chromatography column, made from the crystallized essence of the plant *Bulnesia sarmientoi*. The guaiol was purified with 50% yield of purification.

Initially for the biotransformation, it was proposed to use an incubation time of 13 days but then, taking into account the results obtained for the initial time, we decided to test also for 5 days of incubation.

After the biotransformation, the products extraction was performed with organic solvents. After the solvent evaporation it was obtained a mixture of compounds. Their separation was carried out by a column chromatography (silica gel column) and they were characterized by different spectroscopic techniques. Spectra were infrared (IR), nuclear magnetic resonance spectra of proton and carbon ( $^1\text{H-NMR}$  and  $^{13}\text{C-NMR}$ ) and held their mass spectra by gas chromatography mass (GC-MS).

It was obtained two products, one for each fungus and with an incubation time of 13 days. For five days the biotransformation was not shown to be effective for any microorganism.

For the fungus *Rhizopus stolonifer* was obtained a compound with 6 mg, with  $\text{C}_{15}\text{H}_{24}\text{O}_2$  for chemical formula, the 9-hidroxi-5,11-epoxiguaien-1-ene, and for the *Aspergillus niger* was obtained a compound with 12.5 mg, with  $\text{C}_{15}\text{H}_{26}\text{O}_2$  for chemical formula, the 11,15-dihidroxiaguaien-1(5)-ene.

As such, it was concluded that the biotransformation with *Aspergillus niger* during 13 days was more efficient and more selective.

**Keywords:** Biotransformations; Guaiol; *Rhizopus*; *Aspergillus*.

# Lista de Figuras

Figura 1 - Esquema da biossíntese de terpenos.....	4
Figura 2 - <i>Bulnesia sarmientoi</i> .....	6
Figura 3- Compostos maioritários da <i>Bulnesia sarmientoi</i> .....	6
Figura 4 - Meios de cultura sólidos e líquidos .....	10
Figura 5 - Reprodução de uma célula procariótica por fissão binária .....	11
Figura 6 - Curva representativa do crescimento microbiano .....	12
Figura 7 - Efeito da temperatura na velocidade de crescimento microbiano .....	13
Figura 8 - Oxigénio como factor condicionante do crescimento microbiano .....	14
Figura 9 - Classificação de microrganismos quanto à gama de pH óptima.....	15
Figura 10 - Bolor, coloração esverdeada, em laranjas .....	17
Figura 11 - A negro vê-se o fungo utilizado para a produção de queijo.....	18
Figura 12 - A) fungo unicelular; B) ultra - estrutura de um fungo filamentosos .....	18
Figura 13 - Hifas septadas e não septadas.....	19
Figura 14 - Micélio fúngico .....	19
Figura 15 - Diversas formas das leveduras.....	19
Figura 16 - Ciclo de vida generalizado de um fungo .....	20
Figura 17 - Reprodução Assexuada.....	21
Figura 18 - Reprodução Sexuada .....	22
Figura 19 - Ciclo de vida generalizado de um Zigomicota. ....	23
Figura 20 - Ciclo de vida generalizado de um Ascomicota.....	23
Figura 21 - Zigósporo e gametângios de <i>Rhizopus stolonifer</i> .....	24
Figura 22 - <i>Rhizopus stolonifer</i> no pão.....	24
Figura 23 - Ciclo de vida do <i>Rhizopus stolonifer</i> .....	24
Figura 24 - <i>Aspergillus niger</i> .....	25
Figura 25 - A negro evidencia-se o asco de <i>Aspergillus niger</i> .....	26
Figura 26 - Possível relação tridimensional entre a ligação do substrato e o local da hidroxilação.....	31
Figura 27 - Estrutura do guaiol com dados de <sup>13</sup> C-RMN.....	39
Figura 28 - Bulnesol à esquerda, ao centro o hanamyol e à direita o $\alpha$ -bulneseno .....	39
Figura 29 - Espectro de IV para o guaiol. ....	41
Figura 30 - Espectro de IV para o bulnesol. ....	41
Figura 31 - Espectro de IV para o hanamyol.....	42
Figura 32 - Espectro de <sup>1</sup> H-RMN para o bulnesol. ....	42
Figura 33 - Espectro de <sup>13</sup> C-RMN para o bulnesol.....	43



Figura 34 - Espectro de <sup>1</sup> H-RMN para o $\alpha$ -bulneseno. ....	43
Figura 35 - Espectro de <sup>13</sup> C-RMN para o $\alpha$ -bulneseno. ....	44
Figura 36 - Espectro de <sup>1</sup> H-RMN para o hanamyol. ....	44
Figura 37 - Espectro de <sup>13</sup> C-RMN para o hanamyol. ....	45
Figura 38 - 2ª cultura de <i>Rhizopus stolonifer</i> em SGC 2. ....	48
Figura 39 - Erlenmeyers com meio de cultura e o fungo no incubador orbital. ....	48
Figura 40 - Cromatografia em camada fina da biotransformação ao longo do tempo. ....	49
Figura 41 - Biomassa (esferas) do <i>R. stolonifer</i> no meio de cultura, antes da extracção..	49
Figura 42 - Biomassa do <i>Rhizopus stolonifer</i> durante a filtração a vácuo. ....	50
Figura 43 - Extracção líquido - líquido. São visíveis a fase aquosa a castanho e a fase orgânica incolor. ....	50
Figura 44 - Fase orgânica à esquerda e à direita encontra-se a fase aquosa, resultado da extracção líquido - líquido. ....	50
Figura 45 - Resultado da biotransformação com <i>Rhizopus stolonifer</i> . ....	51
Figura 46 - Cromatografia em camada fina do resultado da biotransformação (à direita) comparado com o guaiol (mancha maior e mais escura, à esquerda). ....	51
Figura 47 - Espectro da fracção 7.6, onde se apresenta um ácido gordo. ....	52
Figura 48 - Espectro duma fracção final da coluna. ....	52
Figura 49 - Espectro de <sup>1</sup> H-RMN para o produto da biotransformação. ....	53
Figura 50 - Espectro de <sup>13</sup> C-RMN para o produto da biotransformação. ....	53
Figura 51 - Espectro de massa do produto de biotransformação com <i>Rhizopus stolonifer</i>	55
Figura 52 - Espectro de IV para o produto da biotransformação. ....	56
Figura 53 - Estrutura proposta para o composto obtido, com indicação dos desvios químicos (ppm) relativos aos carbonos. ....	56
Figura 54 - Cromatografia em camada fina da biotransformação com 5 dias de fermentação. ....	57
Figura 55 - Resultado da biotransformação com <i>Rhizopus stolonifer</i> com 5 dias de fermentação. ....	57
Figura 56 - Resultado da biotransformação com 5 dias de fermentação. ....	58
Figura 57 - Coluna cromatográfica do resultado da fermentação a 5 dias. ....	58
Figura 58 - Espectro de <sup>1</sup> H-RMN para o guaiol que ficou por transformar. ....	59
Figura 59 - Espectro de <sup>13</sup> C-RMN para o guaiol que ficou por transformar. ....	59
Figura 60 - Composto obtido por Choudhary <i>et al</i> (2007) pela biotransformação do guaiol com <i>Rhizopus stolonifer</i> . ....	60
Figura 61 - <i>Aspergillus niger</i> em SGC 2. Cultura com 72 h de maturação. ....	61
Figura 62 - Inóculo de <i>Aspergillus niger</i> com 24 h de maturação no meio líquido. ....	62
Figura 63 - Cromatografia em camada fina para a biotransformação com <i>A. niger</i> com um tempo de incubação de 5 dias. ....	62
Figura 64 - Biomassa do <i>Aspergillus niger</i> no final da biotransformação. ....	63

<b>Figura 65</b> - Produto final da biotransformação com <i>A. niger</i> após a extracção e evaporação do solvente.....	<b>63</b>
<b>Figura 66</b> - TLC para a biotransformação do guaiol com <i>A. niger</i> . .....	<b>63</b>
<b>Figura 67</b> - Espectro de <sup>1</sup> H-RMN para o guaiol por transformar.....	<b>64</b>
<b>Figura 68</b> - Espectro de <sup>13</sup> C-RMN para o guaiol por transformar. ....	<b>64</b>
<b>Figura 69</b> - TLC da goma resultante da biotransformação com <i>A. niger</i> da fermentação a 13 dias. À esquerda a referência (guaiol) e à direita do resultado da biotransformação...	<b>65</b>
<b>Figura 70</b> - Espectro de IV para o composto de biotransformação com <i>A. niger</i> . ....	<b>66</b>
<b>Figura 71</b> - Espectro de <sup>1</sup> H-RMN para o composto da biotransformação. ....	<b>66</b>
<b>Figura 72</b> - Espectro de <sup>13</sup> C-RMN para o composto da biotransformação.....	<b>67</b>
<b>Figura 73</b> - Estrutura proposta para o composto da biotransformação com <i>A. niger</i> . .....	<b>68</b>
<b>Figura 74</b> - À esquerda <i>Rhizopus stolonifer</i> e à direita <i>Aspergillus niger</i> , ambos em PDA.	<b>69</b>
<b>Figura 75</b> - Stock de inóculo de <i>A. niger</i> (Esquerda), e stock de inóculo de <i>R. stolonifer</i> (Direita), com 24 h de incubação. ....	<b>69</b>
<b>Figura 76</b> - Biomassa fúngica de <i>Rhizopus stolonifer</i> com 4 dias de incubação.....	<b>70</b>
<b>Figura 77</b> - Biomassa de <i>Aspergillus niger</i> com 4 dias de incubação. Erro! Marcador não definido.	
<b>Figura 78</b> - Biomassa do <i>Rhizopus stolonifer</i> , no final da biotransformação. ....	<b>71</b>
<b>Figura 79</b> - Biomassa de <i>Aspergillus niger</i> , no final da biotransformação. ....	<b>71</b>

# Lista de Tabelas

Tabela 1 - Algumas propriedades farmacológicas de mono-, sesqui-, e diterpenóides.....	5
Tabela 2 - Diferentes combinações entre as fontes de carbono e energia.....	9
Tabela 3 - Proposta para a composição de um meio para o isolamento e crescimento fúngico.....	16
Tabela 4 - Reino Fungi e tipo de reprodução nas várias divisões do mesmo.....	22
Tabela 5 - Classificação científica do <i>Rhizopus stolonifer</i> .....	25
Tabela 6 - Classificação científica do <i>Aspergillus niger</i> .....	26
Tabela 7 - Resumo de algumas biotransformações de sesquiterpenos realizadas pelo género <i>Rhizopus</i> .....	31
Tabela 8 - Resultado de algumas biotransformações realizadas pelo fungo do género <i>Aspergillus</i> . .....	33
Tabela 9 - Misturas de eluentes utilizadas para a purificação do guaiol. ....	40
Tabela 10 - Peso mais significativo removido da coluna cromatográfica para a purificação do guaiol.....	40
Tabela 11 - Dados de <sup>13</sup> C-RMN, para os compostos maioritários separados na coluna cromatográfica. ....	45
Tabela 12 - Dados de <sup>1</sup> H-RMN, para os compostos maioritários separados na coluna cromatográfica. ....	45
Tabela 13 - Diferentes polaridades utilizadas na realização da coluna cromatográfica do resultado da biotransformação.....	52
Tabela 14 - Sinais de <sup>13</sup> C-RMN para o composto da biotransformação com <i>R. stolonifer</i> . .	54
Tabela 15 - Dados de <sup>1</sup> H-RMN para o composto da biotransformação com <i>R. stolonifer</i> ...	54
Tabela 16 - Sinais de <sup>13</sup> C-RMN para o composto da biotransformação com <i>A. niger</i> . .....	67
Tabela 17 - Dados de <sup>1</sup> H-RMN para o composto da biotransformação com <i>A. niger</i> .....	67
Tabela 18 - Tabela resumo da biotransformação com os dois fungos.....	71
Tabela 19 - Fracções obtidas da coluna cromatográfica da mistura da biotransformação a 13 dias com <i>Rhizopus stolonifer</i> . ....	80
Tabela 20 - Fracções obtidas da coluna cromatográfica da mistura da biotransformação a 5 dias com <i>Rhizopus stolonifer</i> . ....	81
Tabela 21 - Fracções obtidas da coluna cromatográfica da biotransformação com <i>Aspergillus niger</i> durante 5 dias. ....	82
Tabela 22 - Fracções obtidas da coluna cromatográfica da biotransformação com <i>Aspergillus niger</i> durante 13 dias.....	82

# Lista de Acrónimos

<sup>13</sup>C-RMN - Ressonância magnética nuclear de carbono 13

<sup>1</sup>H-RMN - Ressonância magnética nuclear de próton

ATCC - American Type Culture Collection

CC - Coluna cromatográfica

CECT - Colección Española de Cultivos Tipo

DMAP - 3,3'-dimetilalilo

FPP - Pirofosfato de farnesilo

GC-MS - Cromatografia gasosa de massa

GFPP - pirofosfato de geranilfarnesilo

GGPP - Pirofosfato de geranilgeranilo

GPP - Pirofosfato de geranilo

IPP - pirofosfato de 3-isopentenilo

IV - Infravermelho

RMN - Ressonância magnética nuclear

*spp* - Espécie

TLC - Cromatografia em camada fina

# Índice

---

<b>1. Introdução</b>	<b>1</b>
<b>2. Introdução Teórica</b>	<b>3</b>
2.1 Produtos Naturais	3
2.1.1. Terpenos	4
2.1.2. <i>Bulnesia sarmientoi</i>	6
2.2 Microbiologia	8
2.2.1. Classificação de microrganismos	8
2.2.2. Nutrição	9
2.2.3. Meios de cultura	10
2.2.4. Crescimento Microbiano	11
2.2.5. Meio de crescimento para fungos	16
2.3 Fungos	17
2.3.1. Características gerais dos fungos	18
2.3.2. Nutrição e metabolismo	19
2.3.3. Reprodução	20
2.3.4. Taxonomia	22
2.3.5. <i>Rhizopus stolonifer</i>	23
2.3.6. <i>Aspergillus niger</i>	25
2.4 Biotransformações	27
2.4.1. Biotransformações de sesquiterpenos por <i>Rhizopus spp.</i>	30
2.4.2. Biotransformações por <i>Aspergillus spp.</i>	33
<b>3. Materiais e Métodos</b>	<b>35</b>
3.1 Equipamentos	35
3.2 Técnicas cromatográficas	36
3.2.1. Cromatografia em camada fina	36
3.2.2. Cromatografia em coluna	36
3.3 Biotransformações	36
3.3.1. Purificação do Guaiol	36
3.3.2. Stock - Recuperação de microrganismos - Culturas de trabalho	36
3.3.3. Meio de cultura e procedimento para a biotransformação	37
3.3.4. Extracção dos produtos da biotransformação	38
3.3.5. Separação dos componentes	38
3.3.6. Caracterização dos produtos	38
<b>4. Resultados e discussão</b>	<b>39</b>
4.1 Purificação do guaiol	39
4.2 Biotransformações	47
4.2.1. Biotransformação com <i>Rhizopus stolonifer</i>	47
4.2.2. Biotransformação com <i>Aspergillus niger</i>	61
4.2.3. Biotransformação com <i>R. stolonifer</i> vs Biotransformação com <i>A. niger</i>	69
<b>5. Considerações Finais</b>	<b>73</b>
Bibliografia	75
Apêndices	80

---

# 1. Introdução

A Química sempre influenciou os hábitos culturais das diversas sociedades, desde a antiguidade. Actualmente encontramos no nosso quotidiano muitos produtos que estão disponíveis comercialmente que são resultado da investigação em química orgânica e áreas afins, abrangendo desde detergentes, combustíveis, tintas, medicamentos, alimentos, bebidas, pesticidas, entre outros.

As plantas constituem uma fonte importante de substâncias biologicamente activas, muitas das quais podem servir de modelos para a síntese de um grande número de compostos, devido à sua diversidade estrutural e às suas propriedades físico-químicas e biológicas.

Os microrganismos possuem grande habilidade em alterar quimicamente alguns compostos orgânicos. Estas alterações químicas são denominadas de biotransformações e são de grande importância por serem quimio-, régio- e enantioselectivas, resolvendo muitos problemas sintéticos existentes na obtenção de compostos opticamente puros e permitindo assim direccionar o sistema da reacção para a obtenção de um produto definido.

As reacções de biotransformação são vistas como uma alternativa aos métodos químicos clássicos, na procura de modificações estruturais para a obtenção de moléculas com maior potencial biológico. O desenvolvimento recente e quase exponencial de trabalhos com culturas *in vitro* de fungos filamentosos deve-se ao seu grande potencial biotecnológico, facto já concretizado, inclusive industrialmente. Exemplo disso é a produção do ácido cítrico utilizando o fungo *Aspergillus niger*.

A selectividade e a suavidade das biotransformações podem fazer com que estes processos sejam melhores que as habituais transformações químicas, facto que as leva muitas vezes a serem escolhidas em vez das transformações químicas habituais.

Estes processos são usados para introduzir diferentes grupos funcionais em posições difíceis nos derivados terpénicos, como tal, os métodos químico - microbiológicos constituem uma via alternativa para a obtenção de novos compostos polioxigenados a partir de produtos naturais.

Neste contexto, o projecto seguidamente apresentado teve em vista a obtenção de novos compostos com potencial actividade biológica, através da transformação microbiológica de produtos naturais, nomeadamente a transformação de um composto terpénico com esqueleto de guaiano, o guaiol.

Como procedimento prévio, teve que ser purificada numa coluna cromatográfica a essência cristalizada da planta *Bulnesia sarmientoi*, a fim de obter o guaiol puro. Seguidamente realizou-se a biotransformação do mesmo, utilizando dois fungos, o *Rhizopus stolonifer* e o *Aspergillus niger*.

Efectuou-se a extracção e separação dos vários compostos resultantes da biotransformação. Estes foram caracterizados através das técnicas de infravermelho (IV),

ressonância magnética nuclear de carbono,  $^{13}\text{C}$ -RMN e de protão,  $^1\text{H}$ -RMN e através de cromatografia gasosa de massa (GC-MS).

Este trabalho encontra-se estruturado em 5 capítulos, sendo o primeiro, uma breve introdução ao trabalho desenvolvido.

No segundo capítulo encontram-se os fundamentos teóricos para a realização deste trabalho e está dividido em 4 partes. Na primeira fala-se um pouco sobre produtos naturais, dando mais relevância aos terpenos e sobre a *Bulnesia sarmientoi*. Depois na segunda parte encontra-se um breve resumo da microbiologia que sustenta a base deste trabalho, desde a classificação de microrganismos, até ao meio de crescimento para fungos. Na terceira parte evidenciam-se algumas características para os fungos, e centra-se especialmente nos fungos tratados neste trabalho. A última secção trata das biotransformações, falando primeiramente em geral, e depois especificam-se as biotransformações com os fungos utilizados dando alguns exemplos das mesmas.

Depois de escolhido o método a utilizar, cultivaram-se os fungos e inocularam-se para a biotransformação. Efectuaram-se as extracções e realizaram-se colunas cromatográficas para a separação dos compostos. O grau de separação dos produtos, bem como o grau de biotransformação foi seguido por cromatografia em camada fina (TLC). Os métodos adoptados podem ser vistos no terceiro capítulo onde está o procedimento experimental.

No quarto capítulo podem ver-se os resultados obtidos e a discussão desses e por fim, no último e quinto capítulo as conclusões tiradas sobre o trabalho realizado.

## 2. Revisão Bibliográfica

A biotransformação ou transformação microbiológica é considerada hoje em dia pelos químicos orgânicos como uma tecnologia economicamente competitiva na pesquisa de novas vias de produção de novos compostos químicos finos<sup>1</sup>, farmacêuticos e agroquímicos, a partir de produtos naturais activos e inactivos [Marquina *et al*, 2009; García - Granados *et al*, 2009]. Além disto, as biotransformações são atraentes abordagens para produzir uma diversidade estrutural nas bibliotecas químicas, as quais podem ser usadas para sintetizar compostos difíceis de obter por métodos químicos clássicos [García - Granados *et al*, 2009].

Como tal, seguidamente apresenta-se uma revisão bibliográfica sobre as biotransformações e os mecanismos que directa ou indirectamente as influenciam.

### 2.1. Produtos Naturais

Desde muito cedo e embora de forma rudimentar, a espécie humana utilizou os produtos naturais na caça, na alimentação, na medicina, etc. A curiosidade acerca das estruturas químicas dos produtos naturais é, no entanto, relativamente recente, e estudos sistemáticos feitos nesse sentido datam apenas da segunda metade do século XIX.

Quando as primeiras estruturas químicas dos produtos naturais começaram a emergir, a admiração causada nos químicos foi tal que perdura ainda nos nossos dias. A complexidade das estruturas químicas criadas pela Natureza, aliada à diversidade de estruturas encontradas, foi talvez o grande aguilhão que levou os químicos a procurar, num esforço unificador, explicar a origem e os mecanismos de formação dos produtos naturais [Lobo e Lourenço, 2007].

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.

A escolha do produto adequado para o processo em questão reside principalmente nos objectivos finais, se para aplicação industrial ou investigação, e do microrganismo a utilizar [Faustino, 2004].

---

<sup>1</sup>**Química fina** é a actividade de obtenção de compostos químicos que se caracteriza pela síntese e produção industrial de produtos químicos de altíssimo valor agregado em pequena quantidade. A química fina produz os chamados **produtos químicos finos**, que são substâncias químicas puras, simples, que são produzidas comercialmente com reacções químicas em aplicações altamente especializadas [[http://pt.wikipedia.org/wiki/Qu%C3%ADmica\\_fina](http://pt.wikipedia.org/wiki/Qu%C3%ADmica_fina) (consultado em 16 de Dezembro de 2010)].



### 2.1.1. Terpenos

Os terpenos ocorrem amplamente na Natureza, e representam a maior família de produtos naturais, compreendendo cerca de 30.000 estruturas definidas [García - Granados *et al*, 2003; Carvalho e Fonseca, 2006; Muffler *et al*, 2010; Krings e Berger, 2010]. São um grupo biologicamente versátil, formalmente derivado de um esqueleto de carbono, a partir de combinações de várias unidades de isopreno (2-metilbutadieno) (1 unidade de isopreno,  $C_5$  = 5 unidades de carbono) [Bakkali *et al*, 2008; Krings e Berger, 2010].

No entanto, o isopreno não está envolvido na biossíntese dos terpenóides (terpeno com um átomo de oxigénio), também designados de isoprenóides, os quais são formados a partir de duas unidades em  $C_5$ , o pirofosfato de 3,3'-dimetilalilo (DMAP) e o pirofosfato de 3-isopentenilo (IPP). Existem duas vias biossintéticas possíveis para a formação do DMAP e do IPP: a via do mevalonato, que envolve o ácido (3R)-mevalónico como intermediário, e a via do fosfato de deoxilulose, descoberta recentemente, e que se crê estar mais generalizada na Natureza que a via do mevalonato.

A condensação «cabeça-cauda» entre as unidades DMAP e IPP, catalisada pela enzima prenil-transferase, forma a cadeia de pirofosfato de geranilo (GPP), precursora dos monoterpenos. A condensação desta cadeia em  $C_{10}$  com novas unidades de IPP origina sucessivamente as cadeias de pirofosfato de farnesilo (FPP) ( $C_{15}$ ), pirofosfato de geranilgeranilo (GGPP) ( $C_{20}$ ) e pirofosfato de geranilfarnesilo (GFPP) ( $C_{25}$ ), precursoras dos sesquiterpenos, diterpenos e sesterterpenos, respectivamente. Por outro lado, a condensação de duas cadeias de FPP, e a de duas cadeias de pirofosfato GGPP, formam cadeias de 30 e 40 carbonos, precursoras dos triterpenos e dos tetraterpenos (carotenóides), respectivamente, como mostra a figura 1. A partir do GFPP por condensação de  $n$  moléculas do mesmo, dá-se a formação dos poli-isoprenóides naturais [Lobo e Lourenço, 2007].

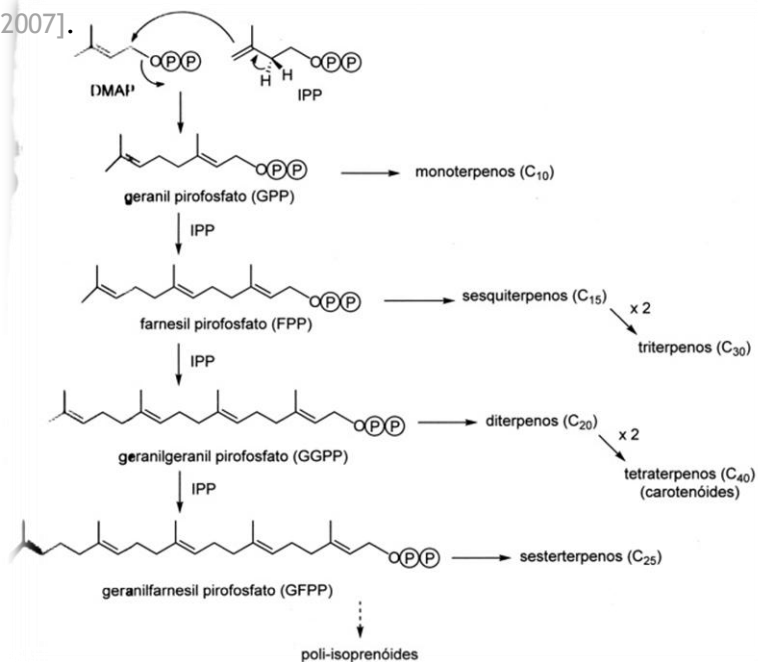


Figura 1 - Esquema da biossíntese de terpenos [adaptado de Lobo e Lourenço, 2007].

Até à data são conhecidos mais de 22000 terpenóides, o que faz destes o maior grupo de produtos naturais. São alvo de um crescente interesse comercial devido ao aumento da compreensão do seu papel na prevenção e terapia de muitas doenças, incluindo o cancro, a sua actividade como insecticidas naturais e agentes anti-microbianos, propriedades que podem ser úteis no armazenamento de produtos agrícolas (por exemplo, na inibição do aparecimento dos “grelhos” nas batatas), e como blocos de construção para a síntese de muitos compostos de alto valor agregado.

Nos mamíferos, os terpenos estão envolvidos na estabilização das membranas celulares, das vias metabólicas e como reguladores de reacções enzimáticas [Carvalho e Fonseca, 2006].

As plantas alimentares, como os frutos ou os vegetais, contêm vários tipos de terpenos que entram diariamente no nosso organismo em quantidades reduzidas. Portanto, a biotransformação de terpenóides é um campo importante da xenobioquímica<sup>2</sup> e da toxicologia.

Para mostrar a importância de mono-, sesqui-, e diterpenóides na natureza, foram seleccionadas algumas propriedades biológicas dos terpenóides, que estão sumariadas na tabela 1 [Ishida, 2005].

**Tabela 1** - Algumas propriedades farmacológicas de mono-, sesqui-, e diterpenóides [adaptado de Ishida, 2005].

Propriedade	Monoterpenóides	Sesquiterpenóides	Diterpenóides
Analéptica	+	+	-
Anti-helmíntica	+	+	-
Antibiótica	+	+	+
Anti-epiléptica	-	+	-
Anti-inflamatória	+	+	-
Anti-tumoral	+	+	+
Colerética	-	+	-
Hipotensiva	+	+	+
Organoléptica	+	+	+
Sedativa	+	+	-
Espasmolítica	+	+	-

Têm sido publicados estudos que referem a biotransformação de terpenos, usando enzimas, extractos celulares ou toda a célula bacteriana, cianobactérias, leveduras, microalgas, fungos e plantas [Carvalho e Fonseca, 2006].

<sup>2</sup> A xenobioquímica estuda a conversão metabólica de xenobióticos, especialmente de drogas e contaminantes ambientais. Explica as causas das consequências farmacológicas e toxicológicas da presença de xenobióticos no organismo vivo  
[[http://www.faf.cuni.cz/en/study/undergraduate/pharmacy/syllabus/kbv/pages/sylab\\_farm\\_xeno.aspx](http://www.faf.cuni.cz/en/study/undergraduate/pharmacy/syllabus/kbv/pages/sylab_farm_xeno.aspx) (consultado em 16 de Dezembro de 2010)].

### 2.1.2. *Bulnesia sarmientoi*

A *Bulnesia sarmientoi* Lorentz ex Griseb (Figura 2) é uma árvore da família das *Zygophyllaceae* e é uma planta endêmica da região do Chaco na Argentina e Paraguai. É conhecida como Palo Santo ou como Pau - Santo do Paraguai [Dellacassa *et al*, 2007].



Figura 2 - *Bulnesia sarmientoi* [adaptado de Dellacassa *et al*, 2007].

As aparas de madeira produzidas através do seu processamento são destiladas para preparar um óleo essencial conhecido como óleo de guaiaco, que é utilizado como um ingrediente em perfumes e em usos medicinais externos. Este óleo apresenta uma composição de grande complexidade, e é constituído por um número importante de sesquiterpenos estruturalmente semelhantes e com muitos isómeros. É tipicamente isento de monoterpenos e contém níveis elevados de dois álcoois sesquiterpênicos de esqueleto de guaieno: o guaiol (1) e o bulnesol (2), e em quantidade menor o hanamyol (3) que é um derivado da ciclização do epóxido do bulnesol (Figura 3) [Rodilla *et al*, 2010].

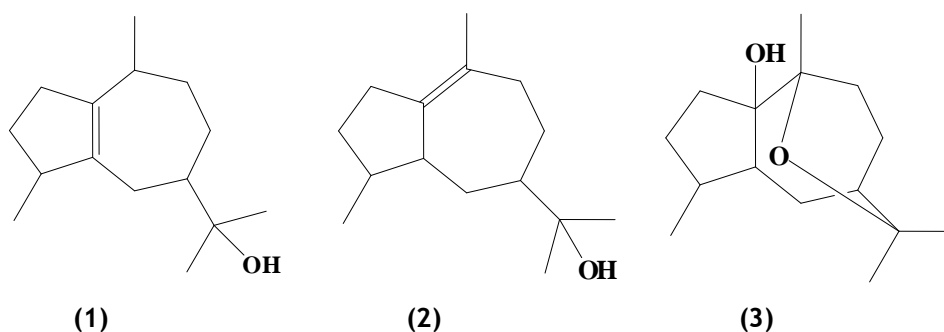


Figura 3- Compostos maioritários da *Bulnesia sarmientoi* [Rodilla *et al*, 2010].

O Guaiol<sup>3</sup>, C<sub>15</sub>H<sub>26</sub>O, um álcool sesquiterpênico, é um composto chave na biogénese de um grande número de produtos naturais de esqueleto guaiano. Os óleos essenciais de *Salvia*

<sup>3</sup> O guaiol foi o produto utilizado para realizar as biotransformações.

*lanigera* e *Helitta longifoliata*, que contém o guaiol como componente maioritário, possuem uma grande actividade antibacteriana [Choudhary *et al*, 2007].

Para a caracterização da actividade biológica do óleo essencial da *B. sarmientoi* e dos seus componentes principais, foram realizados diversos estudos por Dellacassa *et al* (2007), onde foram obtidos os resultados seguintes [Rodilla *et al*, 2010]:

- O óleo essencial apresentou uma actividade repelente importante sobre os pulgões, nomeadamente frente a duas espécies testadas (*Myzus persicae* e *Rhodalosiphum padi*).
- O óleo essencial e os seus componentes maioritários não apresentaram actividade *antifeedant* (anti-alimentar) ou tóxica frente às larvas de *Spodoptera littoralis*.
- O óleo essencial apresentou uma actividade anti-fúngica muito boa frente às três espécies de *Fusarium* testadas, sendo o *F. solani* e o *F. moniliforme* os mais sensíveis.
- O hanamyol apresenta também actividade anti-fúngica mas, a sua potência não explica a actividade do óleo essencial.
- Nem o óleo nem os seus componentes maioritários foram fitotóxicos face à *Lactuca sativa*.

Alguns derivados dos constituintes da *Bulnesia sarmientoi* possuem um grande valor agregado - por exemplo, o acetato de guaiol - e são usados como fixadores na produção de perfumes. Também podem ser utilizados na preparação de azulenos para a indústria da perfumaria [Dellacassa *et al*, 2007; Rodilla *et al*, 2010].

## 2.2. Microbiologia

A microbiologia dedica-se ao estudo dos microrganismos, isto é, ao mundo microscópico dos seres vivos. O seu nome tem origem em três vocábulos gregos, *mikros* (pequeno), *bios* (vida) e *logos* (ciência). Os microrganismos, vulgarmente designados por micróbios, apresentam a mais versátil e adaptável forma de vida no nosso planeta, e existem há pelo menos 3,5 milhões de anos na Terra [Pelczar *et al*, 1993; Paulino, 2003].

Os microrganismos são componentes indispensáveis do nosso ecossistema, na medida em que são os responsáveis pela realização dos ciclos de carbono, oxigénio, azoto e enxofre, que ocorrem nos sistemas aquáticos e terrestres. São também uma fonte rica de nutrientes, ao nível de todas as redes e cadeias alimentares e ecológicas [Paulino, 2003]. Além disto, estes também surgem como uma nova fonte de produtos e processos para benefício da sociedade. Por exemplo, o álcool produzido pela fermentação de cereais pode vir a ser uma nova fonte de combustível [Pelczar *et al*, 1993; Paulino, 2003].

### 2.2.1. Classificação de microrganismos

Um dos aspectos mais fascinantes e atractivos do mundo microbiano é a sua diversidade (Diagrama 1). Parece que a natureza experimentou praticamente todos os tipos de formas, tamanhos, fisiologias e estilos de vida [Prescott *et al*, 2008].

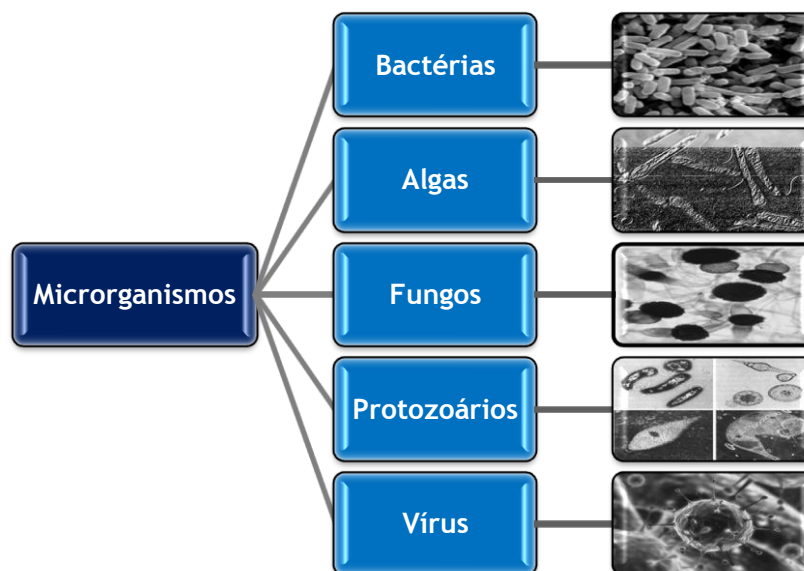


Diagrama 1 - Diversidade de microrganismos encontrados na Natureza [adaptado de Prescott *et al*, 2008].

Posteriormente, será efectuada uma análise detalhada dos fungos, pois foram estes os microrganismos utilizados para realizar a biotransformação.

### 2.2.2 - Nutrição

Muito do estudo da Microbiologia depende da “habilidade” para promover o crescimento e manutenção de microrganismos em laboratório, e isto só é possível se o meio de cultura adequado estiver disponível. Para obter sucesso na cultura de microrganismos é necessário o conhecimento das suas exigências nutricionais, para que os nutrientes sejam fornecidos de forma e proporção adequadas [Prescott *et al*, 2008].

Todos os microrganismos necessitam de uma variedade de elementos químicos como nutrientes, para o seu crescimento [Pelczar *et al*, 1993]. De todos os organismos vivos, os microrganismos são os mais versáteis e diversificados nas suas exigências nutricionais, e alguns são tão “exigentes” quanto o homem e outros animais [Prescott *et al*, 2008].

As células microbianas são estruturalmente complexas e executam numerosas funções. De forma a construírem novos componentes celulares e para realizarem as funções celulares, os organismos necessitam de matérias-primas ou nutrientes e de uma fonte de energia. Na tabela 2 encontra-se a classificação dos microrganismos quanto às suas necessidades nutricionais. Os nutrientes são substâncias usadas na biossíntese e na libertação de energia e portanto são essenciais para o crescimento microbiano [Pelczar *et al*, 1993; Prescott *et al*, 2008].

**Tabela 2** - Diferentes combinações entre as fontes de carbono e energia [adaptado de Prescott *et al*, 2008].

Categorias nutricionais: combinações entre as fontes de carbono e de energia			
Categorias	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 do 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.

A análise da composição de uma célula microbiana mostra que aproximadamente 95% do seu peso seco é composto por alguns elementos maioritários: carbono (C), oxigénio (O), hidrogénio (H), azoto (N), enxofre (S), fósforo (P), potássio (K), cálcio (Ca), magnésio (Mg) e ferro (Fe). Estes são chamados de macroatómos ou macronutrientes pois são necessários para os microrganismos em grandes quantidades.

Os primeiros seis (C, O, H, N, S e P) são componentes de carboidratos, lípidos, proteínas e ácidos nucleicos. Os restantes quatro macronutrientes existem na célula como cátions e desempenham diversas funções. Por exemplo, o potássio ( $K^+$ ) é necessário para a actividade de enzimas, incluindo as proteínas envolvidas na síntese de proteínas. O cálcio ( $Ca^{2+}$ ), para além de outras funções, contribui para a resistência dos endósporos das bactérias à temperatura. O magnésio ( $Mg^{2+}$ ) actua como cofactor para muitas enzimas, como complexo com ATP, e estabiliza ribossomas e membranas celulares. O ferro ( $Fe^{2+}$  e  $Fe^{3+}$ ) é parte integrante do citocromo de enzimas e é um cofactor para enzimas e transportador de electrões em proteínas.

Para além dos macronutrientes e da fonte de energia (luz, inorgânica ou orgânica), todos os microrganismos necessitam de vários nutrientes em quantidades pequenas. Estes são denominados de micronutrientes ou de elementos vestigiais. Os micronutrientes - manganês, zinco, cobalto, molibdénio, níquel e cobre - são requeridos pela maioria das células. Na Natureza, os micronutrientes são ubíquos e normalmente não limitam o crescimento. Estes normalmente são parte de enzimas e cofactores, e ajudam na catálise de reacções e na manutenção da estrutura da proteína [Prescott *et al*, 2008].

Basicamente, cada microrganismo utiliza os compostos presentes no seu habitat natural. Quando são removidos do seu meio ambiente e são cultivados em laboratório, os microbiologistas usam um meio que simule ou que eventualmente melhore as condições naturais [Pelczar *et al*, 1993; Prescott *et al*, 2008].

### 2.2.3. Meios de cultura

Um meio de cultura é uma preparação sólida ou líquida (Figura 4), usada para promover o crescimento, o transporte e o armazenamento de microrganismos. Para serem efectivos, os meios devem conter todos os nutrientes que os microrganismos necessitam para o crescimento.



Figura 4 - Meios de cultura sólidos e líquidos [adaptado de Prescott *et al*, 2008].

Para o isolamento e identificação de microrganismos, por exemplo, para análises a águas e alimentos, são essenciais meios de cultura específicos. Contudo, e como já foi referido

anteriormente, todos os microrganismos necessitam de fontes de energia, carbono, azoto, fósforo, enxofre e vários minerais, como tal, a composição precisa do meio vai depender das espécies que se quer cultivar, pois as necessidades nutricionais variam de espécie para espécie [Prescott *et al*, 2008].

As biotransformações são tradicionalmente realizadas em sistemas aquosos, pois normalmente os meios aquosos são compatíveis com as enzimas e com as células em crescimento. Infelizmente, os terpenos são pouco solúveis em água. Para contornar este problema é normalmente utilizada uma fase orgânica no meio reaccional aquoso. Estudos realizados por Carvalho e Fonseca (2006) revelam que o uso de uma fase orgânica aumenta as biotransformações microbianas e enzimáticas de terpenos, quando comparado com o uso de um meio aquoso puro.

Enquanto os sistemas de produção multifásicos têm vantagens, os solventes orgânicos podem inactivar enzimas e causar perda de viabilidade celular por interferir com a membrana celular. Além disso, a maioria dos terpenos possuem propriedades antimicrobianas e a diluição com solventes orgânicos possivelmente ajuda na redução da sua toxicidade relativamente aos microrganismos que são usados para a biotransformação [Carvalho e Fonseca, 2006].

#### 2.2.4. Crescimento microbiano

Para grande parte dos microrganismos, o crescimento processa-se por fissão binária e é definido por um aumento do número de células microbiológicas no interior de uma população, como mostra a figura 5 [Pelczar *et al*, 1993; Brock *et al*, 1994].

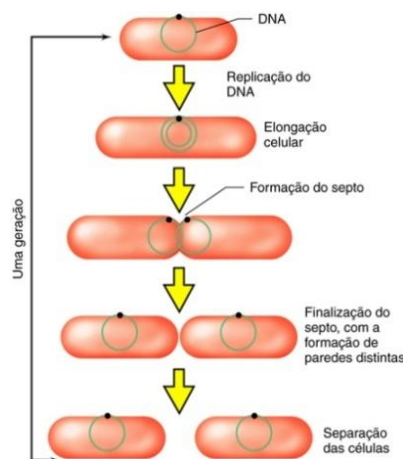
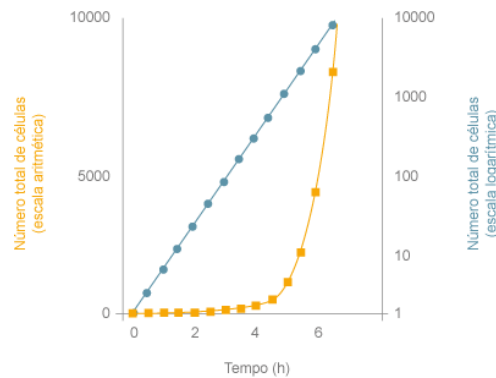


Figura 5 - Reprodução de uma célula procariótica por fissão binária [adaptado de Prescott *et al*, 2008].



O padrão típico de crescimento microbiano é exponencial, como se pode observar na figura 6.



**Figura 6** - Curva representativa do crescimento microbiano [adaptado de Pelczar *et al*, 1993].

Quanto à equação que traduz o crescimento microbiano para microrganismos filamentosos, como é o caso dos fungos, é conveniente aplicar-se uma equação mais geral, onde se considera a variação da massa ( $X$ ), em função do tempo ( $t$ ) como sendo proporcional a concentração de biomassa presente, como é mostrado pela equação 1 [Pelczar *et al*, 1993]:

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

O ambiente físico e químico tem uma grande influência sobre o crescimento celular. Através do conhecimento das influências ambientais sobre um determinado microrganismo pode-se controlar o seu crescimento e estudar as distribuições ecológicas das espécies. Os principais factores em causa são [Faustino, 2004]:

- **Temperatura**

Os microrganismos são normalmente poiquilotérmicos, ou seja, a sua temperatura reflecte a do seu meio ambiente.

A figura 7 mostra um exemplo da influência da temperatura no metabolismo microbiano, mais particularmente nas reacções enzimáticas. A sensibilidade de reacções enzimáticas é um dos principais factores influenciado pela temperatura de crescimento dos microrganismos. Quando a temperatura é baixa, um aumento da temperatura aumenta a taxa de crescimento uma vez que as reacções enzimáticas duplicam de velocidade por cada 10°C de aumento de temperatura. Assim, o metabolismo microbiano aumenta e o microrganismo cresce mais depressa. A partir de certa altura o aumento de temperatura diminui o crescimento e torna-se letal. Isto deve-se à desnaturação de enzimas e proteínas em geral. Adicionalmente, as membranas desintegram-se devido à fusão lipídica [Faustino, 2004; Tortora *et al*, 2000].

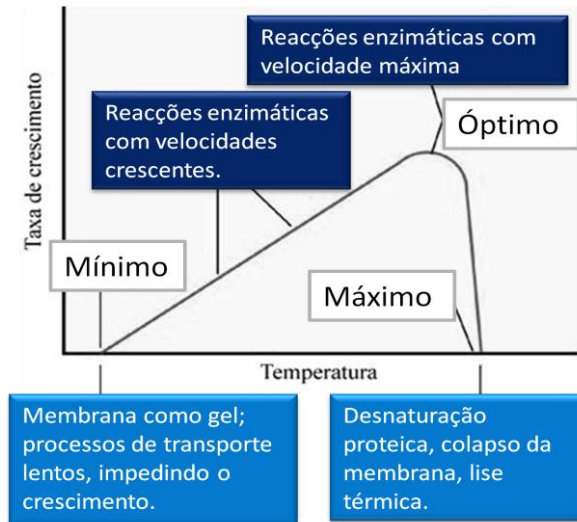


Figura 7 - Efeito da temperatura na velocidade de crescimento microbiano [adaptado de Clara, 2001].

Os microrganismos podem ser classificados segundo a sua gama óptima de temperatura, como se pode ver no diagrama 2:

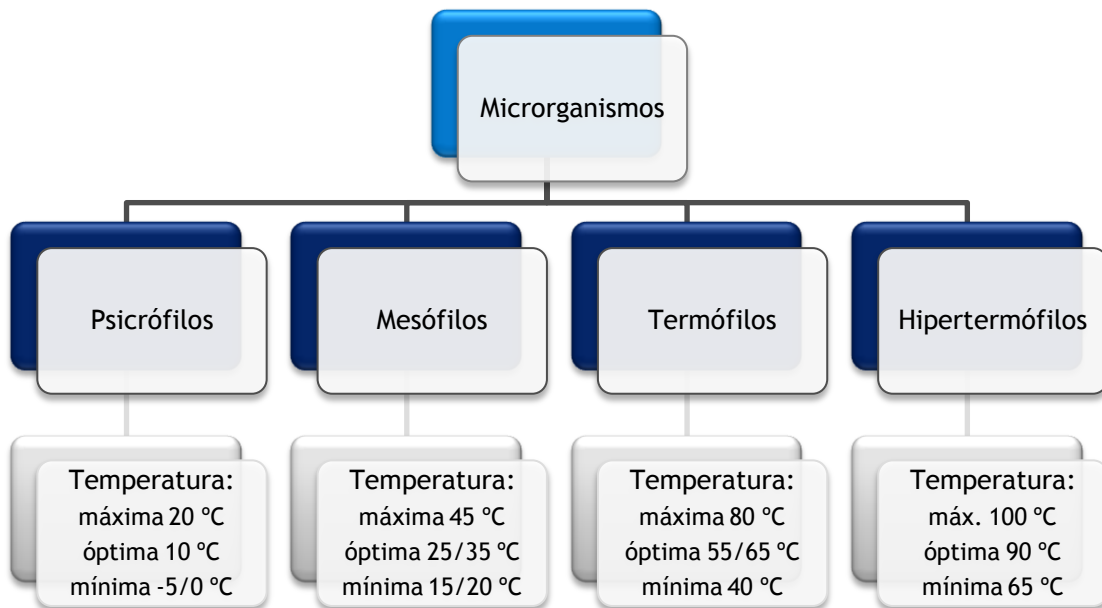


Diagrama 2 - Classificação dos microrganismos quanto à sua gama de temperatura óptima [adaptado de Prescott, 2008].

- **Oxigénio**

Também podemos classificar os microrganismos de acordo com a sua necessidade de oxigénio (Figura 8).



**Figura 8** - Oxigénio como factor condicionante do crescimento microbiano: Classificação dos microrganismos [adaptado de Prescott *et al*, 2008].

#### ▪ **Microrganismos Aeróbios**

Crescem na presença de oxigénio atmosférico (21% O<sub>2</sub>). Quase todos os organismos eucariotas são aeróbios. O O<sub>2</sub> é usado como aceitador final de electrões na cadeia transportadora de electrões durante a respiração aeróbia. O oxigénio é também usado na síntese de esteróides e ácidos gordos insaturados. Podem ser:

**Aeróbios estritos** - Só executam metabolismo oxidativo na presença de oxigénio que funciona como aceitador final de electrões na cadeia de transporte de electrões. Exemplos: *Aeromonas*, *Neisseria* e *Pseudomonas*.

**Microaerófilos** - são lesados pelo nível normal de oxigénio atmosférico requerendo apenas cerca de 2-10% de O<sub>2</sub> para crescer. Exemplos: *Helicobacter pylori* e *Campilobacter jejuni*.

#### ▪ **Microrganismos Anaeróbios**

Crescem na presença ou na ausência de oxigénio. Podem ser:

**Facultativos** - não requerem O<sub>2</sub> para crescer (mas crescem melhor na sua presença). Ex. Família *enterobacteriaceae*.

**Aerotolerantes** - crescem igualmente na presença ou ausência de oxigénio. Não usam o oxigénio, mas toleram-no. Ex. *Enterococcus faecalis*.

**Estritos** - Não crescem na presença de oxigénio. Exs: *Fusobacterium*, *Methanococcus*, *Clostridium*, *Pirococcus*.

Os microrganismos aerotolerantes e anaeróbios estritos obtêm energia somente pela fermentação ou respiração anaeróbia [Faustino, 2004; Tortora *et al*, 2000; Prescott *et al*, 2008].

- **pH**

Cada espécie tem um intervalo definido de pH para o seu crescimento e um pH ótimo de crescimento. A maioria dos fungos prefere meios ligeiramente ácidos, com valores de pH de 4 a 6. No entanto, os microrganismos possuem uma tolerância limite nos intervalos de pH. Variações intensas podem danificar os microrganismos alterando a membrana plasmática ou inibindo a actividade das enzimas e das proteínas transportadoras.

Apesar das variações de pH no habitat, o meio interno da maioria dos microrganismos está próximo de um pH neutro.

Pode-se classificar os microrganismos de acordo com o intervalo de pH a que estes crescem, sendo acidófilos (se o pH estiver entre 1 e 5,5), neutrófilos (se pH for entre 5,5 e 8) ou alcalófilos (se o valor de pH se encontrar entre 8 e 11,5), como se pode verificar na figura 9 [Pelczar *et al*, 1993; Faustino, 2004; Prescott *et al*, 2008].

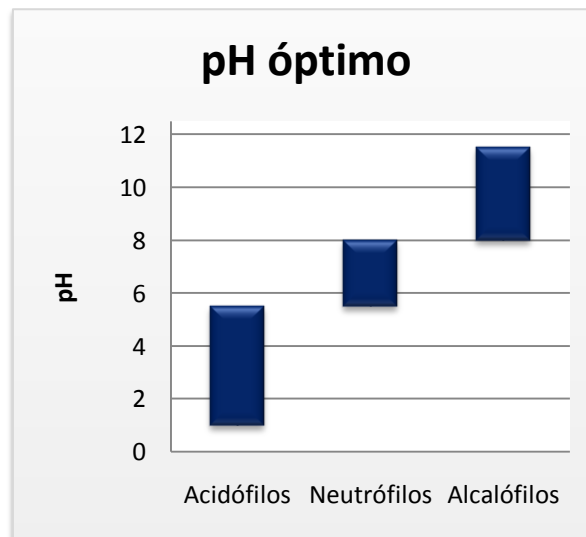


Figura 9 - Classificação de microrganismos quanto à gama de pH ótima [adaptado de Pelczar *et al*, 1993].

- **Esterilização**

As pessoas já utilizam há muito tempo métodos de desinfecção e esterilização, embora não se suspeitasse da existência de microrganismos. Por exemplo, os Egípcios utilizavam o fogo para esterilizar material infeccioso, e desinfectantes para embalsamar os corpos. Na actualidade, a capacidade de destruir microrganismos não tem menos importância: permite utilizar técnicas assépticas na investigação microbiológica, na conservação de alimentos e na prevenção de doenças.

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.

Costuma-se utilizar para esterilizar objectos o calor e outros agentes físicos, como o demonstra o uso da autoclave em todos os laboratórios de microbiologia. Os quatro agentes empregues com mais frequência como agentes físicos são: calor, filtração, radiação ultravioleta germicida (254 nm) e radiação ionizante [Clara, 2001].

### 2.2.5. Meio de crescimento para fungos

Como as bactérias, os fungos absorvem nutrientes e não os ingerem. A absorção é feita por enzimas segregadas para o meio ambiente, as quais quebram as moléculas orgânicas em moléculas mais pequenas que podem passar mais rapidamente para o interior da célula.

Todos os fungos são heterotróficos. No laboratório, muitos fungos podem crescer numa mistura simples de um açúcar com uma fonte de azoto inorgânica ou uma orgânica simples, e com alguns minerais. Alguns requerem também algumas vitaminas e outros podem crescer apenas num meio complexo que contenha uma grande variedade de compostos orgânicos promovidos pela peptona ou pelo extracto de carne.

Em geral, os meios para o crescimento fúngico possuem uma elevada concentração de açúcar (4%) e uma gama mais baixa de pH (3.8 a 5.6) do que para os meios para o crescimento bacteriano (normalmente, pH 6.5 a 7.5). Podemos verificar tal facto no nosso quotidiano, particularmente quando vemos que normalmente as bactérias contaminam o leite e as carnes, enquanto os fungos crescem em frutos citrinos e em produtos da panificação.

A tabela 3 mostra um meio quimicamente indefinido, proposto para o cultivo de fungos saprófitas, ou seja, os que vivem em matéria orgânica morta. É de notar a elevada concentração de glucose (4%) e o pH relativamente baixo (5.6). Esta combinação favorece o crescimento de fungos, e inibe o crescimento da maioria das bactérias [Pelczar *et al*, 1993].

**Tabela 3** - Proposta para a composição de um meio para o isolamento e crescimento fúngico [adaptado de Pelczar *et al*, 1993].

Ingrediente	Função	Quantidade
Peptona	Fonte de carbono, de azoto e de nutrientes.	10g
Glucose	Fonte de carbono e energia. Uma elevada concentração favorece o crescimento fúngico e inibe o crescimento bacteriano.	40g
Agár	Agente de solidificação.	15g
Água	Solvente.	1000mL
pH	Um pH baixo suprime o crescimento bacteriano e favorece o crescimento fúngico.	5.6

### 2.3. 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<sup>4</sup> que se observaram os primeiros fungos microscópicos.

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

Até aos dias de hoje, apenas foram descritas cerca de 100.000 espécies fúngicas [Lederberg, 2000; Ferreira e Sousa, 2000], mas estima-se que pode haver em todo mundo pelo menos 1,5 milhões de espécies. Embora amplamente citado, este último valor é uma hipótese baseada numa série de simples suposições e extrapolações, e deve ser encarada apenas como um palpite. É mais preciso dizer que o número total de espécies fúngicas é desconhecido, e que é provável que muitas espécies continuem a ser descobertas [Lederberg, 2000].

Os fungos desempenham um papel importante na vida do Homem, quer de uma maneira benéfica, quer de modo prejudicial [Pelczar *et al*, 1993; Lederberg, 2000; Ferreira e Sousa, 2000]. São dos principais microrganismos responsáveis pela decomposição da matéria orgânica, interferindo no ciclo do carbono, do azoto e de outros nutrientes, e também desempenham um papel importante na reciclagem dos nutrientes na biosfera [Lederberg, 2000; Ferreira e Sousa, 2000].

Na cultura popular, os fungos filamentosos têm uma grande reputação negativa, devido à forma como são vistos pelas pessoas, como por exemplo, os moldes verdes que crescem nos frutos (Figura 10) que estão armazenados durante muito tempo, a coloração negra nas cortinas das banheiras e os odores desagradáveis das caves húmidas e dos sótãos fechados. A juntar à sua má reputação, também temos os envenenamentos por cogumelos, o pé de atleta, entre outros [Pelczar *et al*, 1993; Lederberg, 2000].



Figura 10 - Bolor, coloração esverdeada, em laranjas [adaptado de Pelczar *et al*, 1993].

<sup>4</sup> Naturalista holandês nascido em 1632 e falecido em 1723. Realizou importantes descobertas no domínio da Biologia. Utilizando microscópios que ele próprio fabricava, observou glóbulos sanguíneos, bactérias, protozoários, etc. [Antonie van Leeuwenhoek. In Infopédia. Porto: Porto Editora, 2003-2010 (Consultado a 16 de Dezembro de 2010)].

Porém, na realidade, os fungos são também criaturas benignas [Pelczar *et al*, 1993; Lederberg, 2000]. São usados em numerosos processos industriais, como no fabrico de pão, de cervejas, de vinhos e de determinados tipos de queijos (Figura 11). Para o fabrico de alguns produtos é necessário recorrer ao metabolismo dos fungos. Como tal, são usados também na produção comercial de muitos ácidos orgânicos e de alguns fármacos, como a penicilina [Pelczar *et al*, 1993; Lederberg, 2000; Ferreira e Sousa, 2000].

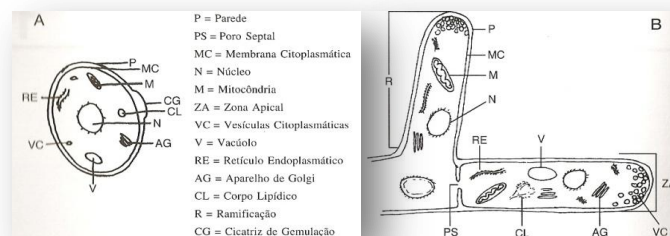


**Figura 11** - A negro vê-se o fungo utilizado para a produção de queijo [adaptado de Pelczar *et al*, 1993].

### 2.3.1. Características gerais dos fungos

Os fungos são organismos eucariotas, saprófitas, simbiotes ou parasitas<sup>5</sup>, desprovidos de clorofila e que se reproduzem por esporos [Lederberg, 2000; Ferreira e Sousa, 2000; Prescott *et al*, 2008]. Neles estão incluídos organismos de formas e dimensões muito variadas, conhecidos correntemente como leveduras, bolores, mofo, morrão e cogumelos. Possuem parede celular e podem ser tanto unicelulares como multicelulares. Alguns podem ter tamanho microscópico, enquanto outros podem ser muito maiores, tais como os cogumelos e os fungos que crescem nos troncos ou no solo húmido. Os fungos não ingerem o alimento, eles absorvem os nutrientes dissolvidos a partir do meio ambiente.

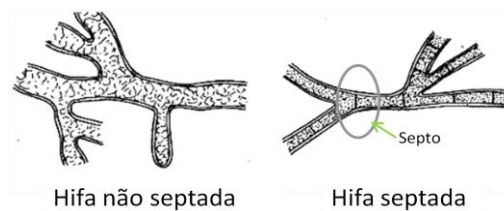
Dos fungos que são classificados como microrganismos, aqueles que são multicelulares e produzem filamentos (Figura 12.B), as suas estruturas microscópicas são frequentemente chamadas de moldes, enquanto as leveduras são os fungos unicelulares (Figura 12.A).



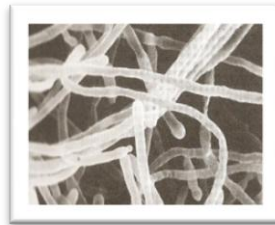
**Figura 12** - A) fungo unicelular; B) ultra - estrutura de um fungo filamentosso [adaptado de Ferreira e Sousa, 2000].

<sup>5</sup> Os termos saprófita, simbiote e parasita serão abordados no ponto 2.3.2..

Nos moldes, a forma das células é cilíndrica e possuem as extremidades unidas para formar filamentos denominados de hifas (Figura 13), as quais poderão vir formar esporos para a reprodução. Individualmente, as hifas têm um tamanho microscópico. Contudo, quando um grande número de hifas se acumula, por exemplo, num pedaço de pão, a massa de bolor chamada de micélio (Figura 14), é visível a olho nú [Pelczar *et al*, 1993; Lederberg, 2000; Ferreira e Sousa, 2000; Prescott *et al*, 2008].

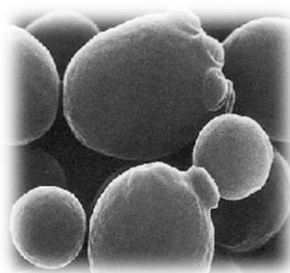


**Figura 13** - Hifas septadas e não septadas [adaptado de Ferreira e Sousa, 2000].



**Figura 14** - Micélio fúngico [adaptado de Ferreira e Sousa, 2000].

As leveduras unicelulares possuem diversas formas, como se pode ver através da figura 15 - esféricas a ovais, elipsoidais a filamentosas [Pelczar *et al*, 1993; Lederberg, 2000; Ferreira e Sousa, 2000; Prescott *et al*, 2008].



**Figura 15** - Diversas formas das leveduras [adaptado de Ferreira e Sousa, 2000].

### 2.3.2. 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, mas existem fungos, como é o caso de algumas leveduras, que são anaeróbios facultativos e como tal, podem obter a sua energia através de processos de fermentação.

A maioria dos fungos é saprófita, pois desenvolvem-se a partir de matéria orgânica morta ou à superfície de células vivas, como as plantas, sem lhes causarem danos. 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 e Sousa, 2000; Prescott *et al*, 2008].

### 2.3.3. Reprodução

Os fungos reproduzem-se através de esporos sexuais (reprodução sexuada) e assexuados (reprodução assexuada). A reprodução sexuada envolve a união de duas células ou de dois órgãos sexuais sexualmente compatíveis. Os fungos podem utilizar, simultaneamente, os dois modos de reprodução, ou um ou outro isoladamente.

Além destes tipos de reprodução, pode observar-se a chamada reprodução vegetativa, em que não são necessárias estruturas reprodutoras específicas. Uma pequena parte da hifa, em meio próprio, é capaz de dar origem a um novo micélio [Ferreira e Sousa, 2000; Prescott *et al*, 2008].

Na figura 16 apresenta-se um ciclo de vida generalizado para um fungo.

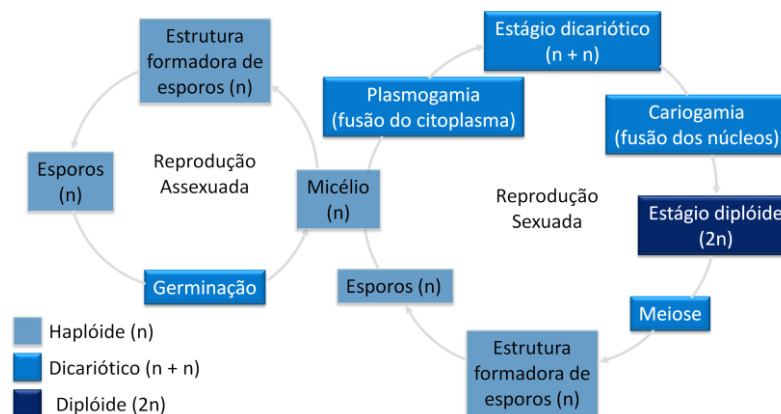


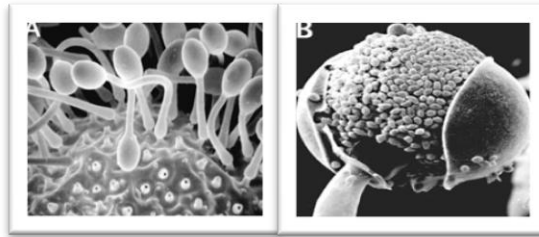
Figura 16 - Ciclo de vida generalizado de um fungo [adaptado de Prescott *et al*, 2008].

- Reprodução Assexuada

Normalmente, a reprodução assexuada é a 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 [Ferreira e Sousa, 2000]:

- Dentro de estruturas unicelulares (esporângios) (Figura 17.A), dando origem a endósporos ou esporangiósoros (Figura 17.B). Estes esporangiósoros podem ser móveis ou imóveis. Os imóveis ou aplanósoros, 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 e Sousa, 2000];

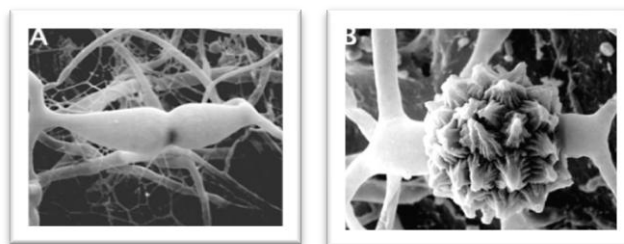


**Figura 17** - Reprodução Assexuada; (A) esporo de um esporângio de *Benjaminiella poitrassi*; (B) multiesporos num esporângio de *Gilbertella persicaria* a libertar esporangiósoros [http://tolweb.org/treehouses/?treehouse\_id=4817 (consultado em 11 de Dezembro de 2010)].

- Externamente, a partir do soma fúngico, dando origem a exósporos ou 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 conidiogéneas, que podem estar assentes em estruturas diferenciadas, designadas conidióforos [Ferreira e Sousa, 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 (Figura 18.A). A fusão dos dois núcleos, cariogamia, dá origem a um zigoto diplóide (zigosporângio ou zigósporo) (Figura 18.B). Este, mais cedo ou mais tarde, sofre uma meiose que, reduzindo o número de cromossomas, devolve carácter haplóide às quatro células formadas, as quais, posteriormente, podem sofrer uma ou mais mitoses [Ferreira e Sousa, 2000; Prescott *et al*, 2008].



**Figura 18** - Reprodução Sexual; (A) Fusão gametângial em *Mucor mucedo*; (B) Zigosporângio altamente ornamentado de *Mycotypha africana* [[http://tolweb.org/treehouses/?treehouse\\_id=4817](http://tolweb.org/treehouses/?treehouse_id=4817) (consultado em 11 de Dezembro de 2010)].

Os fungos que se reproduzem sexualmente são classificados nas divisões **Zigomicota**, **Ascomicota**<sup>6</sup> e **Basidiomicota**, consoante as estruturas reprodutoras a que dão origem. Os que só se reproduzem assexuadamente, ou melhor, aqueles em que apenas se conhece a reprodução assexuada pertencem à classe **Deuteromicetes** [Ferreira e Sousa, 2000].

#### 2.3.4. 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.

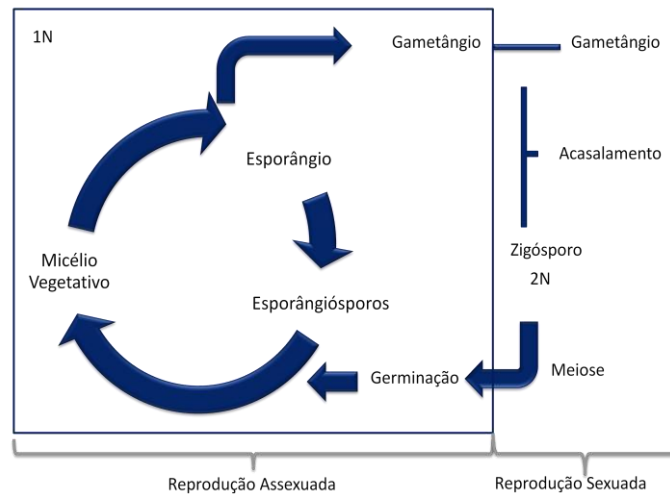
Na tabela 4 podem ver-se as várias divisões do Reino Fungi, bem como o seu modo de reprodução [Ferreira e Sousa, 2000].

**Tabela 4** - Reino Fungi e tipo de reprodução nas várias divisões do mesmo [adaptado de Ferreira e Sousa, 2000].

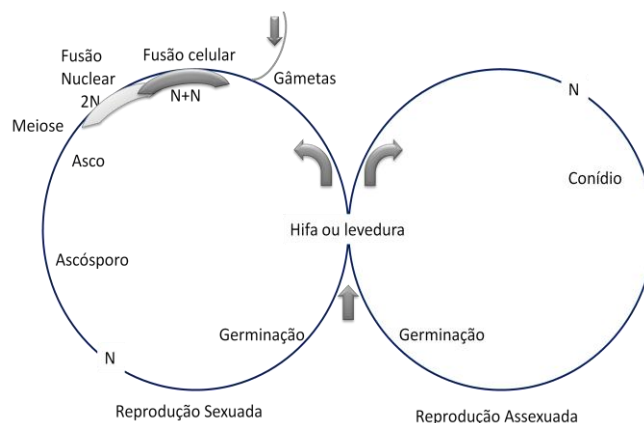
Reino	Divisão/Filo ( <i>Phylum</i> )	Reprodução	Fungos representativos
Fungos (Fungi)	Zigomicota	<ul style="list-style-type: none"> <li>Sexuada por zigósporos;</li> <li>Assexuada por esporângiósporos.</li> </ul>	<i>Rhizopus</i> , <i>Mucor</i> , <i>Cunhinghamella</i> .
	Ascomicota	<ul style="list-style-type: none"> <li>Sexuada por ascósporos;</li> <li>Assexuada por conídios.</li> </ul>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> , <i>Aspergillus</i> .
	Basidiomicota	<ul style="list-style-type: none"> <li>Sexuada por basidiósporos.</li> </ul>	Encontram-se na classe dos <i>Teliomycetes</i>
	Deuteromicota	<ul style="list-style-type: none"> <li>Assexuada por conídios.</li> </ul>	<i>Fusarium spp.</i>

Seguidamente, nas figuras 19 e 20 apresentam-se os ciclos de vida das divisões Zigomicota e Ascomicota, respectivamente.

<sup>6</sup> Os fungos utilizados na realização deste trabalho inserem-se nestes dois filios. Como tal, estes serão apresentados mais detalhadamente.



**Figura 19** - Ciclo de vida generalizado de um Zigomicota. A reprodução assexuada ocorre primeiramente por esporângiósporos, produzidos por mitose e divisão celular. A única fase diplóide (2N) no ciclo do zigósporo, é produzida a partir da conjugação de gametângios durante o ciclo sexual [adaptado de [http://tolweb.org/treehouses/?treehouse\\_id=4817](http://tolweb.org/treehouses/?treehouse_id=4817) (consultado em 30 de Novembro de 2010)].



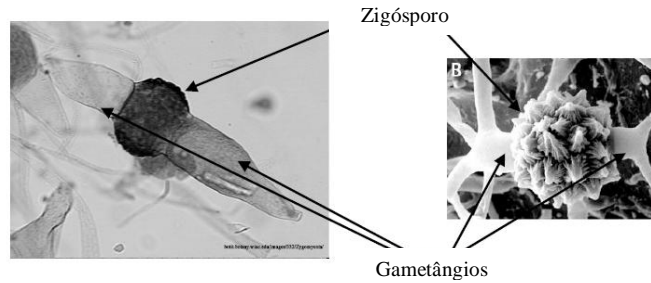
**Figura 20** - Ciclo de vida generalizado de um Ascomicota [adaptado de <http://tolweb.org/Ascomycota/20521> (consultado em 30 de Novembro de 2010)].

### 2.3.5. *Rhizopus stolonifer*

O *Rhizopus stolonifer*, como todos os fungos, desenvolve-se em habitats húmidos e escuros onde exista 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 produtos solúveis. É quimiorganoheterotrófico e emprega compostos orgânicos como fonte de carbono, electrões e energia [Prescott *et al*, 2008].

O glicogénio é o polissacárido de armazenamento primário. Como a maioria dos fungos, o *Rhizopus stolonifer* utiliza hidratos de carbono (glucose) e compostos azotados para sintetizar os seus próprios aminoácidos e proteínas. É considerado como membro da família Zigomicota (Figura 21), crescendo normalmente na superfície de alimentos

húmidos e ricos em hidratos de carbono, como por exemplo o pão (Figura 22), as frutas e as verduras. No caso do pão, as suas hifas cobrem rapidamente a sua superfície [Prescott *et al*, 2008].

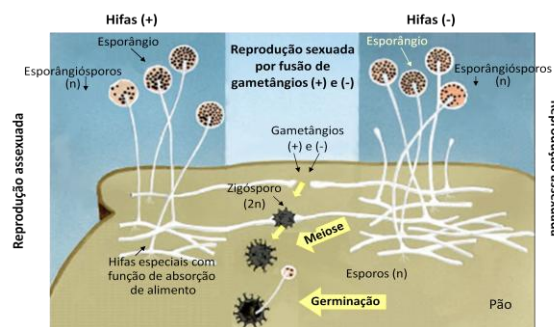


**Figura 21** - Zigósporo e gametângios de *Rhizopus stolonifer* [adaptado de [http://maliceneves.googlepages.com/Aula3\\_WEB.pdf](http://maliceneves.googlepages.com/Aula3_WEB.pdf) (consultado em 20 de Novembro de 2010)].



**Figura 22** - *Rhizopus stolonifer* no pão. São visíveis os esporângios, a negro, e as hifas a branco [http://ipt.olhares.com/data/big/209/2094448.jpg (consultado em 20 de Novembro de 2010)].

O género *Rhizopus* reproduz-se normalmente de forma assexuada, mas também pode realizar a reprodução sexuada (Figura 23) quando o alimento escasseia e quando as condições ambientais são desfavoráveis [Prescott *et al*, 2008].



**Figura 23** - Ciclo de vida do *Rhizopus stolonifer* [adaptado de <http://biosonialopes.editorasaraiva.com.br/sonialopes/site/apoioaoprofessor/aulasempowerpoint.cfm> (consultado em 24 de Outubro de 2010)].

Na tabela 5 encontra-se a classificação científica para o fungo *Rhizopus stolonifer*.

Tabela 5 - Classificação científica do *Rhizopus stolonifer* [Ferreira e Sousa, 2000].

Classificação Científica	
Reino	Fungi
Filo	Zigomicota
Género	<i>Rhizopus</i>
Espécie	<i>R. stolonifer</i>

### 2.3.6. *Aspergillus niger*

O fungo do género *Aspergillus* é encontrado em toda a parte do mundo, especialmente no Outono e Inverno no hemisfério Norte. Existem mais de 200 espécies encontradas na Natureza, e este foi catalogado pela primeira vez em 1729, pelo Padre italiano e biólogo Pietro Antonio Micheli <sup>7</sup>.

As espécies de *Aspergillus* são aeróbias e saprófitas, e são encontradas em ambientes ricos em oxigénio. O fungo *Aspergillus niger* é uma das espécies mais comuns do género *Aspergillus*. É ubíquo no solo, desempenhando um papel importante no ciclo global do carbono, e possui uma grande variedade de enzimas hidrolíticas e oxidativas, envolvidas na degradação da lignocelulose vegetal. É encontrado muitas vezes em ambientes interiores, sendo normalmente confundido com outro fungo, o *Stachybotrys*, pois ambos possuem colónias negras (Figura 24) [Baker, 2006].

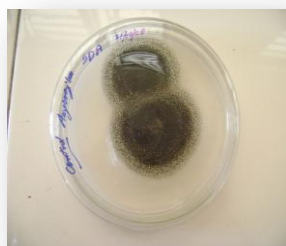


Figura 24 - *Aspergillus niger* em crescimento numa placa utilizando como meio de cultura Sabouraud Dextrose Agar [http://upload.wikimedia.org/wikipedia/en/7/72/Aspergillus\_niger\_on\_SDA.JPG Consultado em 24 de Novembro de 2010].

Este tem sido reconhecido como o causador de várias infecções oportunistas nos humanos [Baker, 2006]. Cerca de 16 a 20 espécies de *Aspergillus* podem infectar o Homem, sendo as mais comuns a *A. fumigatus*, a *A. flavus* e a *A. niger*. As manifestações clínicas, aspergiloses, causadas pelo *Aspergillus* são diversas, variando de reacções de hipersensibilidade (aspergilose alérgica) até infecções generalizadas com risco de vida

<sup>7</sup> [www.Aspergillus.org.UK/indexhome.htm?languages/english.php-main](http://www.Aspergillus.org.UK/indexhome.htm?languages/english.php-main) [consultado em 24 de Novembro de 2010].

(como infecções pulmonares e cerebrais). A sua severidade é determinada por vários factores, mas um dos mais importantes é o estado do sistema imunológico do indivíduo.

*A. niger* é um fungo filamentososo que pertence à família Ascomycota (tabela 6), e como tal tem como estruturas reprodutoras os ascos, como mostra a figura 25 [Baker, 2006].

Tabela 6 - Classificação científica do *Aspergillus niger* [adaptado de Ferreira e Sousa, 2000].

Classificação Científica	
Reino	Fungi
Filo	Ascomycota
Género	<i>Aspergillus</i>
Espécie	<i>A. niger</i>



Figura 25 - A negro evidencia-se o asco de *Aspergillus niger* [adaptado de [http://en.wikipedia.org/wiki/File:Aspergillus\\_nigar\\_Micrograph.jpg](http://en.wikipedia.org/wiki/File:Aspergillus_nigar_Micrograph.jpg) (consultado em 24 de Novembro de 2010)].

A variedade das suas enzimas é bastante importante na indústria biotecnológica [Baker, 2006]. O que nos últimos anos tem feito com que este seja utilizado com diversos fins industriais, entre os quais se salienta a produção de alimentos e a produção comercial de ácido cítrico [Baker, 2006; Karthikeyan e Sivakumar, 2010], glucónico e gálico<sup>7</sup>.

A produção de ácido cítrico pelo *A. niger* representa, na prática, o maior e mais eficiente bioprocesso [Baker, 2006; Karthikeyan e Sivakumar, 2010].

Com a produção de ácido cítrico a rondar anualmente cerca de 1 milhão de toneladas métricas, este processo serve como modelo para outros processos de fermentação com fungos filamentosos, onde vários produtos, tais como, os ácidos orgânicos e etanol, são produzidos a partir de biomassa renovável [Baker, 2006]. Os produtos obtidos através destes processos podem ser aperfeiçoados para serem utilizados como monómeros para plásticos, como solventes ou como combustíveis, diminuindo assim a dependência do petróleo, a fonte natural destes produtos<sup>8</sup>.

*A. niger* é também um importante modelo para muitas áreas da investigação incluindo o estudo da secreção de proteínas eucarióticas, o efeito de variados factores ambientais na supressão de enzimas, o estudo dos mecanismos moleculares críticos para os processos de fermentação em desenvolvimento e nos mecanismos envolvidos no controlo da morfologia fúngica [Baker, 2006].

<sup>8</sup> [genoma.jpi-psf.org/Aspnil/Aspnil.home.html](http://genoma.jpi-psf.org/Aspnil/Aspnil.home.html) [consultado em 24 de Novembro de 2010].



## 2.4. Biotransformações

O termo biotransformação utiliza-se para designar uma série de processos químicos, visando a transformação de uma molécula precursora, catalisada por enzimas existentes na funcionalidade de microrganismos, daí que estes processos também sejam designados comumente de bioconversão.

Através do estudo metabólico dos microrganismos, podem-se prever determinadas reacções, que induzem a modificação de uma certa molécula em estudo noutra diferente, nomeadamente a nível de grupos funcionais da mesma [Prescott *et al*, 2008].

A utilização de microrganismos para a biotransformação é preferencial, devido principalmente às quatro razões seguintes [Faber, 1997]:

### 1. 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 espécies de microrganismos diferenciadas, ou então, apenas uma etapa de fermentação com apenas um organismo contendo um sistema enzimático adequado. Os compostos sensíveis a ácidos, a bases ou a altas temperaturas, encontram nas biotransformações as condições perfeitas para a sua subsistência [Faber, 1997].

### 2. Especificidade do substrato

As enzimas apenas catalisam uma determinada etapa da reacção, como tal, não há problema em mudar um certo grupo químico de uma molécula noutra semelhante, que não seja o pretendido. Assim, na indústria utilizam-se os microrganismos para a realização de reacções difíceis de obter por outros métodos [Faber, 1997].

### 3. Estereoespecificidade

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

### 4. Regioespecificidade

As biotransformações só afectam 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, 1997].

A biotransformação é considerada hoje em dia, como uma rotina economicamente competitiva e ecológica, através da qual se procura obter produtos químicos,



farmacêuticos e agroquímicos novos e melhores [García - Granados *et al*, 2004, Marquina *et al*, 2009].

Os estudos efectuados mostram que as biotransformações são um método eficiente para reacções que envolvam a obtenção de compostos com interesse comercial. Muitas substâncias com diversas estruturas têm sido isoladas e identificadas, e muitas destas apresentam actividades biológicas impressionantes [Gale *et al*, 2007].

Os compostos obtidos por acção microbiana podem ser considerados “naturais”, facto que promove grande aceitação por parte do consumidor<sup>9</sup> [Carvalho e Fonseca, 2006; Krings e Berger, 2010], agregando desta forma, maior valor aos produtos que utilizam estes compostos produzidos biotecnologicamente [García - Granados *et al*, 1997; Ghomari *et al*, 2006].

Nos últimos anos, estes processos têm sido usados para introduzir diferentes grupos funcionais (por exemplo, hidroxilo), em posições difíceis nos derivados terpénicos [García - Granados *et al*, 1997; Ghomari *et al*, 2006]. Estes processos constituem fortes ferramentas sintéticas para introduzir funções químicas em sítios inacessíveis das moléculas, [García - Granados *et al*, 2009] e também podem melhorar propriedades já existentes, ou levar a novas actividades biológicas [Marquina *et al*, 2009]. Além disso, a hidroxilação microbiológica de terpenóides tem sido usada para a funcionalização selectiva de muitos destes compostos, e constitui uma alternativa importante aos métodos químicos, permitindo o acesso específico a posições remotas na molécula sob condições suaves de reacção [García - Granados *et al*, 2003].

De todas as transformações catalisadas pelos sistemas enzimáticos, a hidroxilação selectiva de átomos de carbono não activados é particularmente interessante, pois esta transformação é difícil de ser realizada pelos métodos químicos clássicos [García - Granados *et al*, 2004; Marquina *et al*, 2009]. Estas biohidroxilações têm sido desenvolvidas principalmente com esteróides e terpenóides, devido à exigência industrial dos produtos finais. Alguns problemas são relatados aquando da realização destas biotransformações, tais como, a aceitação do substrato, a possibilidade de ocorrerem reacções paralelas indesejáveis, a selectividade e a previsão da posição da hidroxilação [García - Granados *et al*, 2004]. Como tal, os métodos químico - microbiológicos, constituem uma via alternativa para a obtenção de novos compostos polioxigenados a partir de produtos naturais [García - Granados *et al*, 1997].

As principais vantagens das biohidroxilações são as suas condições relativamente suaves, a segurança ambiental e a selectividade especialmente elevada. Estas hidroxilações microbiológicas têm sido desenvolvidas maioritariamente nos campos dos esteróides e dos terpenóides, devido à procura industrial pelos seus produtos finais [García - Granados *et al*, 2009].

<sup>9</sup> De acordo com as normas Europeias 88/388/EWG de Junho de 1988, 91/71/EWG e 91/72/EWG de 16 de Janeiro de 1991, classificam-se como “produtos naturais”, os compostos obtidos por “adequados processos enzimáticos ou microbiológicos a partir de materiais de origem vegetal, animal ou microbiológica” [Daugusch *et al*, 2005; Krings *et al*, 2010].

As bioconversões podem ser efectuadas sinteticamente a nível industrial. A biotransformação tem sido bastante aplicada na indústria da fermentação, e muitos compostos com propriedades terapêuticas e/ou interesse industrial são obtidos por transformação microbiológica, sendo um exemplo disso a produção dos ácidos L - aspártico e L - maleico a partir do ácido fumárico [Lahlou *et al*, 2000; Haridy *et al*, 2006]. Além disto, os microrganismos e as suas enzimas estão aptos para a transformação de uma grande variedade de compostos orgânicos, tais como os terpenos, os alcalóides, os esteróides, os antibióticos e os aminoácidos [Lahlou *et al*, 2000; Prescott *et al*, 2008].

As biotransformações são normalmente realizadas utilizando o microrganismo na sua totalidade, ou, usando apenas as enzimas responsáveis pela hidroxilação fúngica, sendo mais utilizada a fermentação com a totalidade do microrganismo para realizar o processo [García - Granados *et al*, 2004]. O uso preferencial do microrganismo resulta maioritariamente do custo do isolamento da enzima, da purificação e da sua estabilização [He *et al*, 2010]. Contudo, a reprodutibilidade e o controlo das bioconversões com a totalidade do microrganismo é mais difícil de realizar do que quando são utilizados processos enzimáticos e também podem ocorrer reacções laterais [García - Granados *et al*, 2004; Carvalho e Fonseca, 2006].

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

- **Células colectadas**

Consiste no crescimento abundante de células num meio de cultura fertilizante e especialmente enriquecido (meio de cultura de crescimento), que depois são separadas e incorporadas num meio de cultura para a biotransformação, que contém os agentes precursores. A utilização de esporos microbianos ou de células vegetativas como biocatalisadores é um exemplo da utilização deste método [Faber, 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, 1997].

- **Células imobilizadas**

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

- **Enzimas purificadas**

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 quando se recorre a este método é que a enzima deve ser separada e purificada com relativa facilidade, ou deve-se encontrar disponível comercialmente [Faber, 1997].

- **Sistemas de multiconversão**

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

- **Sistemas de multifase**

Apenas se usa no caso dos produtos e/ou precursores serem insolúveis em água, mas lipofílicos. É recomendado que se trabalhe em duas fases, uma aquosa contendo os microrganismos ou a enzima, e uma com um solvente imiscível em água [Faber, 1997].

Uma das maiores dificuldades para a hidroxilação de um determinado substrato é encontrar o microrganismo apropriado. Para contornar este problema, uma das técnicas mais usadas é a realização de um rastreio com diferentes estirpes fúngicas [García - Granados *et al*, 2004; Ghomari *et al*, 2006; Krings e Berger, 2010].

#### 2.4.1. Biotransformações de sesquiterpenos por *Rhizopus spp.*

A importância da biotecnologia microbiana na produção de drogas esteróides e hormonas foi vista pela primeira vez em 1952, quando Murray e Peterson patentearam o processo da 11 $\alpha$ -hidroxilação da progesterona por uma espécie de *Rhizopus*. Desde então, as transformações microbianas têm dado ferramentas adequadas para as produções em larga escala de análogos de esteróides naturais ou modificados [García - Granados *et al*, 2003].

Actualmente, o género *Rhizopus* consiste em cerca de 13 espécies, e é normalmente classificado em três grupos: o grupo *stolonifer*, o *Rhizopus oryzae*, e o grupo *microsporus* [García - Granados *et al*, 2009]. O catálogo *American Type Culture Collection (ATCC) 2008* possui mais de 200 entradas listadas de estirpes de *Rhizopus spp* [Martin, 2010].

Este género tem sido amplamente utilizado na biotransformação de produtos naturais, incluindo os esteróides, os terpenóides, e outros compostos. As duas espécies mais usadas são o *Rhizopus oryzae* (ATCC 10404) - um telomorfo depositado como *Rhizopus stolonifer*, e por vezes descrito como *Rhizopus nigricans* - e *Rhizopus oryzae* (ATCC 11145), um telomorfo formalmente conhecido como *Rhizopus arrhizus* [Martin *et al*, 2008; García - Granados *et al*, 2009]. O *R. oryzae* (em particular, a estirpe ATCC 11145) é uma das estirpes mais utilizada para reacções de biotransformação [Martin *et al*, 2008; Martin, 2010]. O *R. oryzae* é conhecido pelo seu efeito em variados tipos de reacções, incluindo hidroxilações em carbonos centrais saturados e insaturados, epoxidações, reacções redox,

dealquilação heteroátomo, hidrólise de éster, oxidação de sulfito e reacções de conjugação e de biodegradação [Martin, 2010].

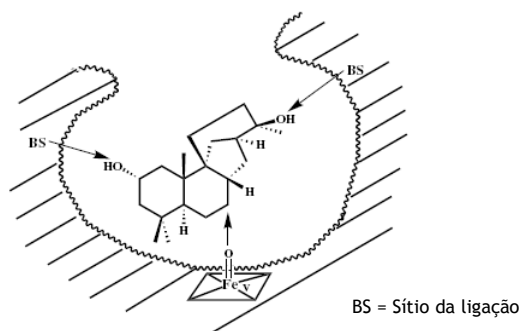
Os sesquiterpenóides exibem actividades biológicas variadas, entre as quais se destacam a analéptica, a anti-helmíntica, a anti-inflamatória, a anti-tumoral, hipotensiva, e a sedativa. A biotransformação de sesquiterpenóides é uma ferramenta importante na modificação estrutural destes compostos, especialmente para produtos naturais com estruturas complexas, devido às suas régio- e estero- selectividades significantes [Ishida, 2005; García - Granados *et al*, 2009; Martin, 2010].

Torna-se tedioso pesquisar na literatura todas as biotransformações, mesmo as dos esqueletos de sesquiterpenos mais comuns e dos seus sesquiterpenóides correspondentes, devido à vasta investigação neste campo, para aumentar a sua eficiência e para encontrar novos microrganismos viáveis [Al - Aboudi *et al*, 2008; Krings e Berger, 2010]. Como tal, na tabela 7 apresentam-se algumas biotransformações realizadas pelo género *Rhizopus*, evidenciando os produtos das mesmas.

**Tabela 7** - Resumo de algumas biotransformações de sesquiterpenos realizadas pelo género *Rhizopus*.

Composto	Tipo de reacção	Produto	Referência
(-)-drimenol	Hidroxilação	3 $\beta$ -hidroxidrimenol	Aranda <i>et al</i> , 1992
Acetato de Shiromool	Epoxidação	Derivado 1 $\beta$ ,10 $\alpha$ -epoxi	García - Granados <i>et al</i> , 1998
(s)-(+)-curcufenol	Glicosidação C-1	(s)-curcufenol-1- $\alpha$ -D-glucopyranosido	El-Sayed <i>et al</i> , 2002
Óxido de (-)-cariofileno	Hidroxilação	2 $\beta$ -hidroxi- <i>nor</i> -cariofilanona e um derivado 13-hidroxi	Choudary <i>et al</i> , 2006
(-)-guaiol	9 $\beta$ -hidroxilação, migração da ligação dupla.	1-guaieno-9 $\beta$ ,11-diol	Choudary <i>et al</i> , 2007

Acredita-se que o responsável pelas reacções ocorridas nas biotransformações com *Rhizopus spp.* é o sistema enzimático citocromo P450 do mesmo (Figura 26) [Winkelmann, 1992; Martin *et al*, 2004; Martin, 2010].

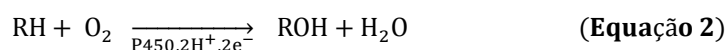


**Figura 26** - Possível relação tridimensional entre a ligação do substrato e o local da hidroxilação [Adaptado de Martin *et al*, 2004].

O Citocromo P450 é um nome genérico atribuído a uma superfamília de enzimas que catalisam o metabolismo oxidativo de uma grande variedade de substratos, incluindo agentes endógenos como esteróides, oxisteróides, ácidos biliares, ácidos gordos e outros. Estes estão presentes em toda a escala dos seres vivos. Muitas formas de citocromo P450 catalisam a biotransformação de uma vasta gama de agentes químicos ou xenobióticos, de entre os quais, fármacos de uso terapêutico, nutrientes, produtos naturais e da indústria química, poluentes ambientais, corantes, aditivos, conservantes, etc. [Ahmed *et al*, 1996; Makovec e Breskvar, 1998; Lamb *et al*, 2007 ; Quintas *et al*, 2008].

O citocromo P450 é uma hemoproteína enzimática que activa o oxigénio molecular, com um átomo de ferro ( $\text{Fe}^{3+}$ ) no núcleo, e funciona como enzima terminal das cadeias de oxidação - redução do sistema das monoxigenases. É a mais importante das enzimas responsáveis pela fase I da biotransformação [Lisowska *et al*, 2006; Quintas *et al*, 2008].

O estudo da estequiometria das reacções catalisadas pelos citocromos P450 demonstra que, por cada molécula de oxigénio ( $\text{O}_2$ ) que é activada pela enzima, apenas um dos átomos ( $1/2 \text{O}_2$ ) é introduzido no substrato, sendo o outro incorporado numa molécula de água, como apresentado pela equação 2 [Quintas *et al*, 2008]:



O citocromo P450 como mediador de passos de conversão é sugerido como sendo parte de muitos processos específicos de biotransformação fúngica. Muitos P450 em fungos filamentosos estão envolvidos em reacções de desintoxicação ou na síntese de metabolitos secundários complexos [Makovec e Breskvar, 2002].

A biotransformação processa-se em duas fases. Uma primeira fase não - sintética e uma segunda sintética.

Na primeira fase ocorrem reacções que modificam o substrato pela introdução ou remoção de radicais das suas estruturas. Podem ocorrer reacções de oxidação, de redução ou de hidrólise, sendo a mais importante a reacção de oxidação. A reacção de oxidação é catalisada principalmente pelo sistema P450 e processa-se pelo mecanismo de hidroxilação, ou seja, pela introdução de oxigénio activado no substrato.

Na segunda fase, ocorrem reacções de conjugação ou síntese, nas quais as moléculas de substrato são complexadas com outras moléculas, formando conjugados polares e hidrossolúveis, podendo ser bioactivos [Quintas *et al*, 2008].

A expressão do sistema do citocromo P450 pode ser induzida, por exemplo, por n-alcanos ou pelo benzoato [Lisowska *et al*, 2006]. O facto de muitos genes citocromo P450 poderem ser induzidos e/ou reprimidos por sinais químicos ambientais está directamente relacionado com uma das principais funções biológicas destas monoxigenases, que actuam como sistemas sensores de defesa, constituindo uma importante interface bioquímica dos organismos com o meio ambiente [Quintas *et al*, 2008].

### 2.4.2. Biotransformações por *Aspergillus spp.*

O desenvolvimento recente de trabalhos com culturas *in vitro* de células vegetais é quase exponencial e pode ser atribuído às inegáveis potencialidades existentes na biotecnologia, facto já concretizado, inclusive industrialmente. São inúmeros os processos químicos e aplicações latentes que estão por emergir, envolvendo a cultura de células e o seu uso na biotransformação [Carvalho e Fonseca, 2006].

O género *Aspergillus* é conhecido pela 11 $\alpha$ -hidroxilação de esteróides [Al-Aboudi *et al*, 2008]. As espécies *A. niger* e *A. cellulosa* são conhecidas pela sua capacidade de introduzir grupos funcionais oxigenados aos substratos de terpenos. *A. niger* tem sido explorado nas biotransformações de variados substratos incluindo esteróides, terpenos e alcalóides. Tem sido utilizado para reduzir cetonas aos seus álcoois correspondentes e heteroátomos oxidados. Contudo, verifica-se que são mais frequentes as reacções de hidroxilação dos terpenos e esteróides [Oliveira *et al*, 1999; Chen e Reese, 2002; Lamm *et al*, 2009].

Em trabalhos anteriores, foi verificado que a hidroxilação microbiológica e a oxidação seriam dependentes do sistema enzimático P450 do fungo [Martin *et al*, 2004], à semelhança do que já foi referido anteriormente para o fungo do género *Rhizopus*.

Na tabela 8 estão alguns exemplos de biotransformações efectuadas pelo fungo do género *Aspergillus*.

**Tabela 8** - Resultado de algumas biotransformações realizadas pelo fungo do género *Aspergillus*.

Composto	Tipo de reacção	Produto(s)	Referência
Dihidropinguisenol	Hidrogenação; Oxidação	- 10-oxo-lejeuneapinguisenol - lejeuneapinguisenol	Lahlou <i>et al</i> , 2000
Ácido kaurenóico	Dihidroxilações	Dois metabolitos: - Um com 20% de rendimento, com fórmula C <sub>20</sub> H <sub>30</sub> O <sub>4</sub> - Outro com 5,8% de rendimento, com fórmula C <sub>20</sub> H <sub>31</sub> O <sub>4</sub>	Marquina <i>et al</i> , 2009
Santonin	Hidroxilações	- 11 $\beta$ -hidroxisantonin - 14-hidroxisantonin - 3,6-dihidroxy-9-keto-9,10-seco-selina-1,3,5(10)-trien-12-oic acid-12,6-lactone	Lamm <i>et al</i> , 2009
(+)-isopinocamfeol e (-)-isopinocamfeol	Hidroxilações	(+)-5-; (+)-1-; (-)-5-; (-)-1-; (+)-2 $\alpha$ -hidroxiisopinocamfeol	Noma <i>et al</i> , 2010
Limoneno	Hidroxilação	4-terpineol	Krings e Berger, 2010

Em conclusão, pode-se afirmar que, nos últimos anos, os rendimentos obtidos nas biotransformações e o aumento das tecnologias de produção sugerem que será economicamente viável, no futuro, a produção de muitos compostos terpénicos à escala industrial [Carvalho e Fonseca, 2006].

## 3. Materiais e Métodos

### 3.1 - Equipamentos

**Esterilização:** Todo o material necessário para a realização dos procedimentos microbiológicos deste trabalho foi esterilizado num autoclave Raypa® - Steam Sterilizer, fornecida pela firma Mc Sovela. O material foi colocado na autoclave e foi esterilizado durante 30 minutos, a 121 °C e a uma pressão de 18 psi. O autoclave é calibrado mensalmente.

**Incubador Orbital:** A biotransformação foi realizada num incubador orbital - Rotabit®, fornecido pela firma JP Selecta.

**Cromatografia em Coluna (CC):** A cromatografia em coluna a pressão moderada foi realizada utilizando uma bomba Buchi® Pump controller C-610, e recolheram-se as fracções com um colector automático Buchi® fraction Colector C-660.

**Evaporador rotativo:** Evaporou-se o solvente das amostras num evaporador Buchi®, a pressão reduzida e a 40 °C.

**Espectros de infravermelho (IV):** realizaram-se num espectrofotómetro Genesis® II ATR. Colocaram-se as amostras sobre o diamante previamente limpo com isopropanol. Fez-se o espectro da amostra utilizando o software OMNIC. No final voltou-se a limpar o diamante.

**Espectros de ressonância magnética nuclear de protão (<sup>1</sup>H - RMN):** realizaram-se num espectrofotómetro Varian Genesis® II 200 (50,28 MHz). Os desvios químicos (δ) são expressos em partes por milhão (ppm) e as constantes de acoplamento (J) em Hz. As amostras foram dissolvidas em clorofórmio deuterado e depois analisadas.

**Espectros de ressonância magnética nuclear de carbono 13 (<sup>13</sup>C - RMN):** realizaram-se num espectrofotómetro Varian Genesis® II 200 (50,28 MHz). Os desvios químicos (δ) são expressos em partes por milhão (ppm). As amostras foram dissolvidas em clorofórmio deuterado e depois analisadas.

**Espectros de Massa (GC-MS):** foram realizados num espectrómetro de massa Simazu® QP 5000, associado a cromatógrafo de gases.



## 3.2 - Técnicas Cromatográficas

### 3.2.1. Cromatografia em Camada Fina

Esta técnica permitiu o estudo das polaridades e comparar com as fracções eluídas das colunas cromatográficas.

A cromatografia em camada fina (TLC) foi executada sobre placas de sílica gel de 0,2mm. Os cromatogramas revelaram-se por imersão das placas numa solução de ácido fosfomolibdico 5% (p/v) em etanol, sendo posteriormente colocadas na estufa a aproximadamente 120°C durante alguns minutos, a fim de se revelarem os produtos.

### 3.2.2. Cromatografia em Coluna a pressão moderada

Esta técnica é particularmente indicada para o fraccionamento rápido de misturas.

A cromatografia em coluna efectuou-se com a utilização de sílica gel flash de espessura de 0,04 - 0,06mm, como sólido absorvente. Como fase móvel utilizaram-se misturas de solventes de n-hexano e acetato de etilo em proporções de polaridades crescentes. No final utilizou-se metanol para a lavagem e remoção de qualquer composto que tenha ficado retido na coluna.

## 3.3 - Biotransformações

### 3.3.1. Purificação do guaiol

O guaiol puro foi obtido através da cristalização da essência natural da *Bulnesia sarmientoi*, sendo esta a seguir purificada numa coluna cromatográfica como o descrito no ponto 3.2.2., com a finalidade de se obter o produto puro.

Foram colocadas 10 g de essência na coluna cromatográfica a fim de se separarem os variados compostos.

### 3.3.2. Stock - Recuperação dos microrganismos - Culturas de trabalho

Quando se trabalha em biotransformações são muito importantes os microrganismos utilizados e respectiva viabilidade. O sucesso da reacção de bioconversão depende grandemente do microrganismo utilizado como biocatalisador.

Neste trabalho foram utilizados dois microrganismos (fungos), *Rhizopus stolonifer* CECT 2344 e *Aspergillus niger* CECT 2088.

Os microrganismos em estado liofilizado foram cuidadosamente retirados segundo as instruções do fornecedor. Inocularam-se os microrganismos, por estrias, no meio de cultura sólido da BIOMERIEUX®: SGC2 (Agar Sabouraud Gentamicina Cloranfenicol 2, meio selectivo que inibe o crescimento bacteriano), deixando-se em cultura durante 72h a 30°C (Cultura primária). Seguidamente, retirou-se uma pequena amostra do fungo da cultura primária e voltou-se a inocular (método de estrias) o microrganismo numa placa de petri contendo o mesmo meio de cultura (Cultura secundária) e nas mesmas condições, sendo esta a cultura de trabalho.

### 3.3.3. Meio de cultura e procedimento para a biotransformação

É necessário que este meio possua uma fonte de carbono e de azoto para que o microrganismo se possa desenvolver.

O meio de cultura utilizado apresenta a seguinte constituição, para 1L de meio:

- Glucose 20,0 g;
- Peptona 5,0 g;
- Hidrogenofosfato de potássio 5,0 g;
- Água 1 L.

Distribuiu-se o meio de cultura em 9 erlenmeyers (contendo aproximadamente 100 mL de meio) e esterilizou-se no autoclave.

Após o arrefecimento do meio, procedeu-se ao inóculo do fungo, proveniente da cultura secundária/ trabalho, com uma ansa estéril para um dos erlenmeyers. Para efectuar o inóculo passou-se com a ansa na placa de petri contendo o fungo, recolhendo-se uma pequena parte, e inoculou-se no meio previamente esterilizado. Posteriormente colocou-se este inóculo no incubador orbital a uma temperatura média de 30 °C durante 24 h, com uma agitação de 180 rpm.

Após este período de incubação, pipetaram-se 10 mL do meio deste frasco para os restantes 8 erlenmeyers com o meio estéril. Colocaram-se no incubador orbital à mesma temperatura e agitação, durante 4 dias. Ao fim deste tempo, adicionou-se o produto a biotransformar. Este produto foi inoculado numa proporção de 25 mg/ 100 mL de meio de cultura.

Foram testados diferentes tempos de incubação para a biotransformação (5 e 13 dias).

Este procedimento foi seguido por TLC a fim de se verificar a extensão da biotransformação.

Este método foi executado para os dois fungos.

### 3.3.4. Extracção dos produtos de biotransformação

Depois do tempo de incubação pretendido ser alcançado, filtrou-se a biomassa a vácuo e lavaram-se as células com acetato de etilo.

Colocou-se a biomassa num erlenmeyer com o mesmo solvente e utilizaram-se os ultrasounds durante 10 minutos para extrair eventuais produtos que se encontram no interior das células. Filtrou-se, e lavou-se novamente a biomassa com acetato de etilo (aproximadamente 500 mL). Juntou-se o filtrado das células com o filtrado obtido inicialmente.

A extracção realizou-se numa ampola de decantação. Efectuou-se a lavagem da fase aquosa (3 x 500 mL) com acetato de etilo.

Finalizada a extracção, deixou-se a fase orgânica a secar com sulfato de sódio anidro para eliminar eventuais resíduos de água, durante aproximadamente 12 h.

Filtrou-se a fase orgânica com um filtro de pregas e transferiu-se o conteúdo orgânico para um balão de 250 mL.

Por fim, evaporou-se o solvente num evaporador rotativo de baixa pressão, a cerca de 220 mbar, à temperatura de aproximadamente 40 °C.

### 3.3.5. Separação dos componentes

Realizou-se uma cromatografia em coluna (conforme descrito no ponto 3.2.2.) para a separação dos compostos de biotransformação. Para avaliar o grau de separação dos componentes realizaram-se cromatografias de camada fina, cujo eluente foi uma solução de n-hexano e acetato de etilo com diferentes polaridades.

### 3.3.6. Caracterização dos produtos

Os diversos compostos existentes nos produtos foram caracterizados por técnicas de espectroscopia de infravermelho (IV), por cromatografia de massa gasosa (CG-MS), por ressonância magnética nuclear de protão ( $^1\text{H-RMN}$ ) e de carbono 13 ( $^{13}\text{C-RMN}$ ).

## 4. Resultados e Discussão

### 4.1. Purificação do Guaiol

O substrato utilizado para a biotransformação, foi o guaiol (Figura 27).

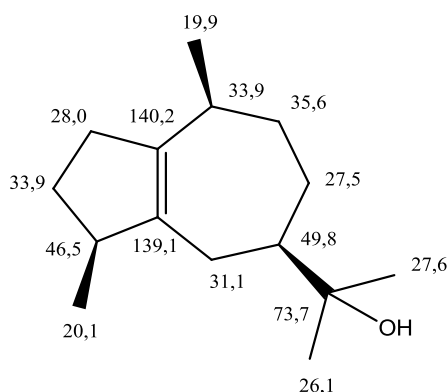


Figura 27 - Estrutura do guaiol com dados de  $^{13}\text{C}$ -RMN.

Através do processamento da madeira da árvore *Bulnesia sarmientoi* obtém-se uma essência bruta, que depois de cristalizada resulta numa mistura de compostos.

Como a essência cristalizada é maioritariamente constituída pelo guaiol (Figura 27), o bulnesol, o hanamyol e em menor quantia o  $\alpha$ -bulneseno (Figura 28), foi necessário efectuar a separação dos mesmos.

Esta purificação foi realizada numa coluna cromatográfica.

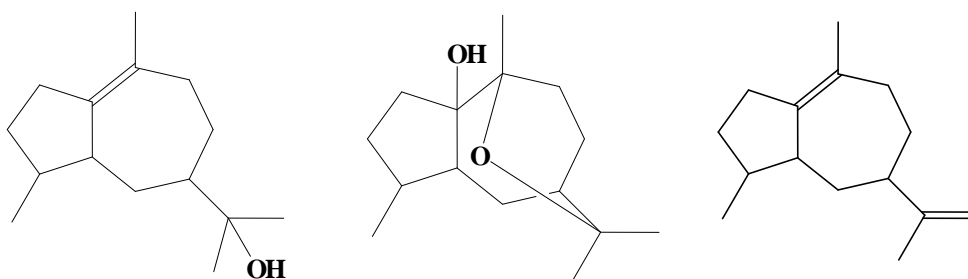


Figura 28 - Bulnesol à esquerda, ao centro o hanamyol e à direita o  $\alpha$ -bulneseno.

O guaiol e o bulnesol são dois isómeros, e como tal, torna-se extremamente complicado separar estes dois compostos, pois a sua polaridade é muito semelhante.

Realizaram-se diversas colunas cromatográficas para apurar qual a melhor mistura de eluentes para a separação dos variados compostos contidos na essência.

Na tabela 9 apresentam-se os resultados para a mistura de eluentes, para 10 g de essência colocada na coluna, que conseguiu separar com melhor rendimento os compostos.

Tabela 9 - Misturas de eluentes utilizadas para a purificação do guaiol.

Eluente	Proporção	Volume / mL
Hexano	100	500
Hexano:Acetato de Etilo	95:5	500
Hexano:Acetato de Etilo	85:15	2000
Hexano:Acetato de Etilo	80:20	2000
Hexano:Acetato de Etilo	70:30	500
Acetato de Etilo	100	500
Metanol	100	200

Controlou-se por TLC o grau de separação dos compostos, e juntaram-se os que se apresentavam com igual  $R_f$ <sup>10</sup>. De seguida, evaporou-se o solvente e controlou-se o peso das fracções obtidas.

A tabela 10 mostra o peso para as fracções mais significativas.

Tabela 10 - Peso mais significativo removido da coluna cromatográfica para a purificação do guaiol.

Fracções	Polaridade (n-hexano:acetato de etilo)	Massa de produto (g)	Aspecto
1 - 5	100:0	0,179	Óleo incolor e viscoso
17 - 19	85:15	5,816	Agulhas cristalinas
23 - 24	85:15	0,652	Óleo de cor amarela translúcida e um pouco viscoso
27 - 30	85:15	0,122	Pequenos cristais brancos

Realizaram-se as análises espectroscópicas dos compostos obtidos, e obtiveram-se os espectros apresentados a seguir.

Nas figuras 29 a 31, apresentam-se respectivamente os espectros de IV para o guaiol, bulnesol e hanamyol.

<sup>10</sup> A capacidade de retenção de um componente pela fase estacionária permite a sua separação dos outros componentes em virtude das diferentes velocidades de movimento na fase móvel. Quando a fase móvel é um líquido, podemos exprimir esta capacidade de retenção por um factor de retenção, o  $R_f$ . O  $R_f$  é uma característica do soluto, facto que permite muitas vezes a identificação dos compostos.

$R_f$  = distância percorrida pelo soluto/distância percorrida pelo eluente

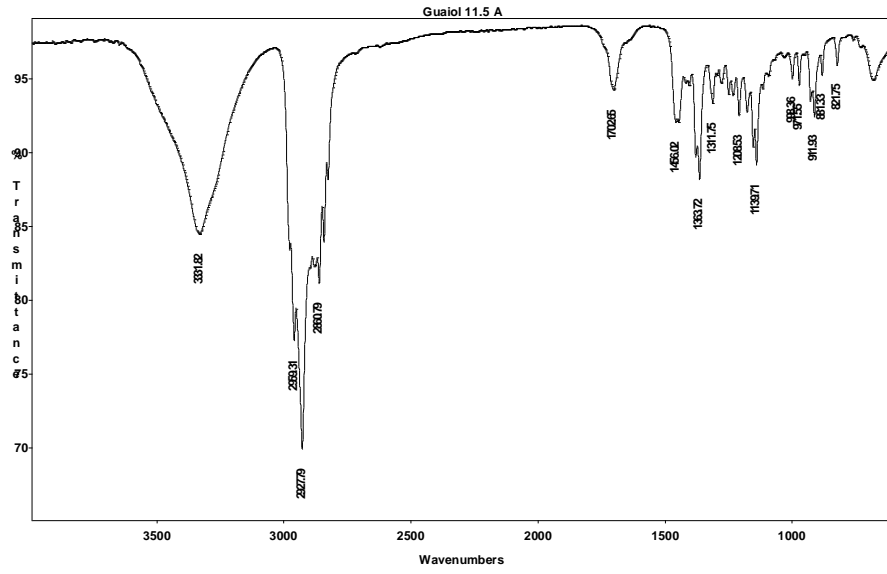


Figura 29 - Espectro de IV para o guaiol.

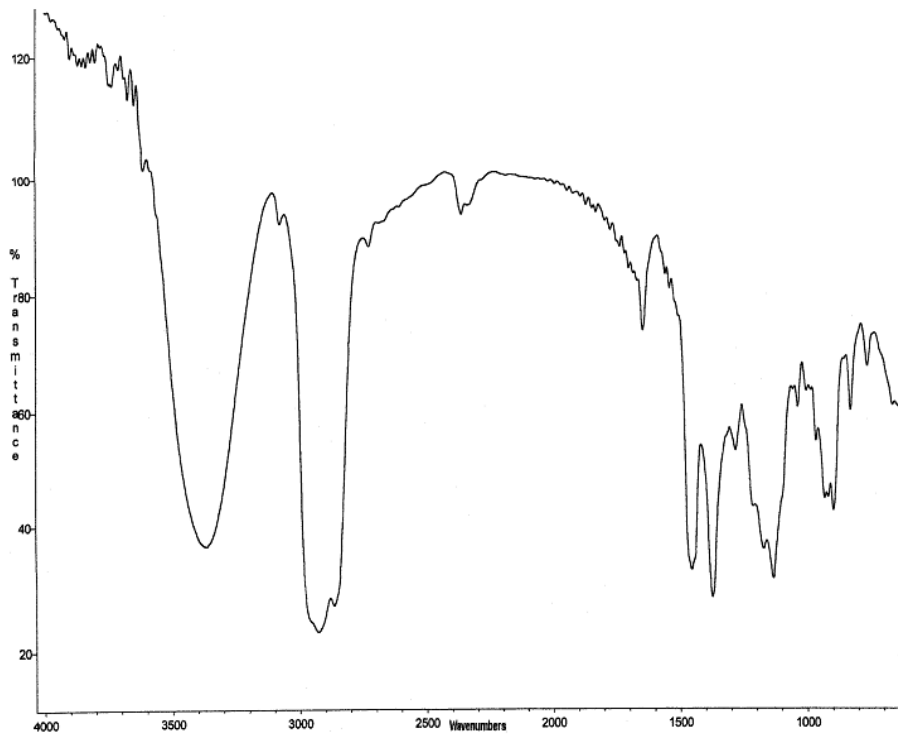


Figura 30 - Espectro de IV para o bulnesol.

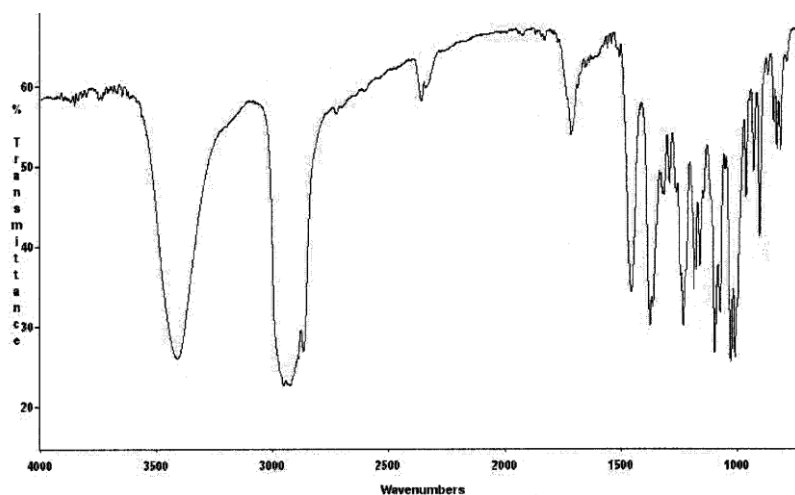


Figura 31 - Espectro de IV para o hanamyol.

Ao analisarmos os espectros de IV para estes três compostos, verificamos a presença de uma banda característica semelhante aos três, por volta dos  $3400\text{ cm}^{-1}$ . Esta é a banda representativa do grupo hidroxilo.

Para o guaiol e para o bulnesol, é visível a cerca de  $1600\text{ cm}^{-1}$  a banda característica para a ligação dupla tetrassubstituída.

No espectro de IV para o hanamyol, aparecem as bandas características do grupo epóxido entre  $1000$  e  $1100\text{ cm}^{-1}$ .

Nas figuras 32 à 37, mostram-se os espectros de  $^1\text{H-RMN}$  e de  $^{13}\text{C-RMN}$ <sup>11</sup>, para o bulnesol,  $\alpha$ -bulneseno e para o hanamyol, respectivamente.

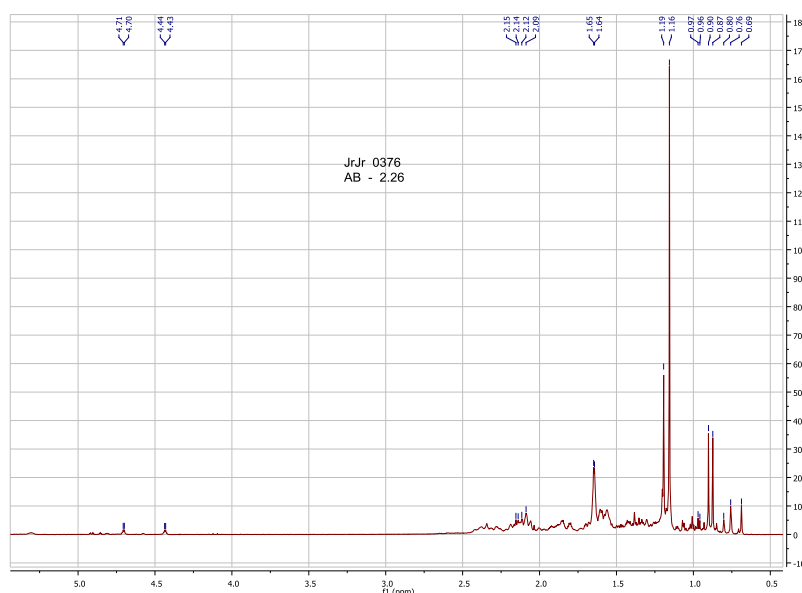


Figura 32 - Espectro de  $^1\text{H-RMN}$  para o bulnesol.

<sup>11</sup> Os espectros para o guaiol serão apresentados mais à frente. Aqui apenas se mostram os dados de  $^{13}\text{C-RMN}$  e de  $^1\text{H-RMN}$ .

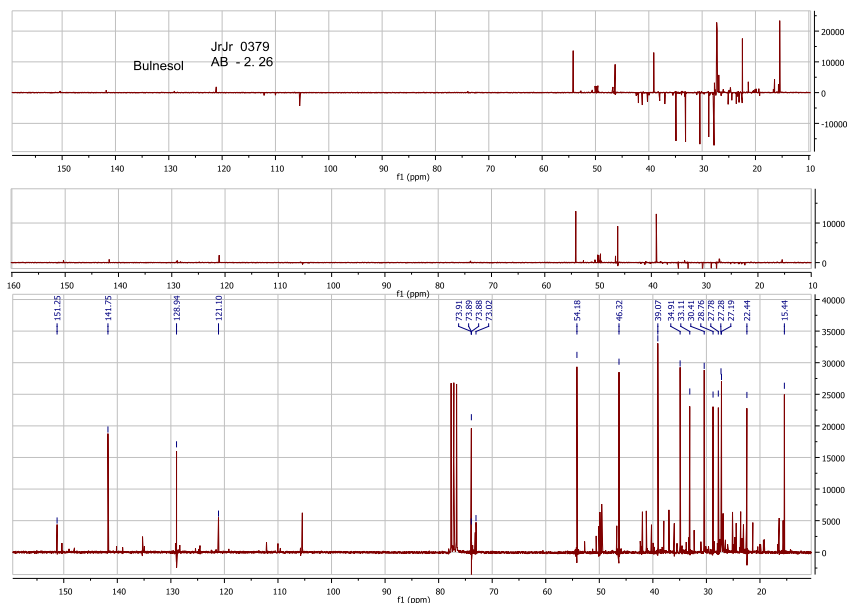


Figura 33 - Espectro de  $^{13}\text{C}$ -RMN para o bulnesol.

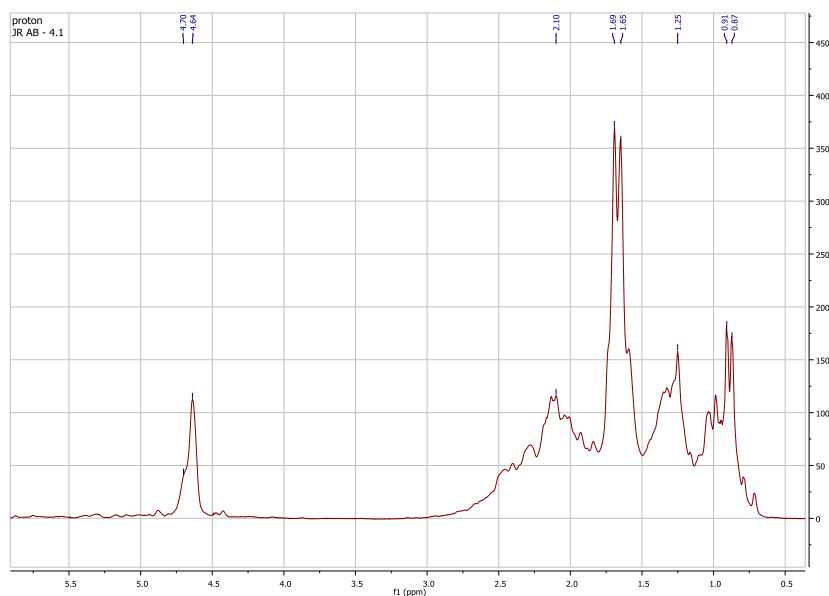


Figura 34 - Espectro de  $^1\text{H}$ -RMN para o  $\alpha$ -bulneseno.



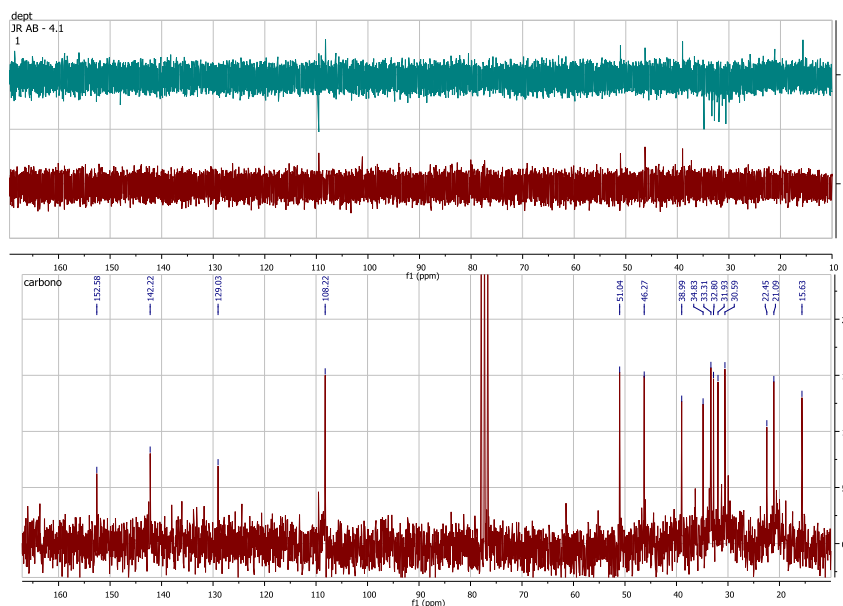


Figura 35 - Espectro de  $^{13}\text{C}$ -RMN para o  $\alpha$ -bulneseno.

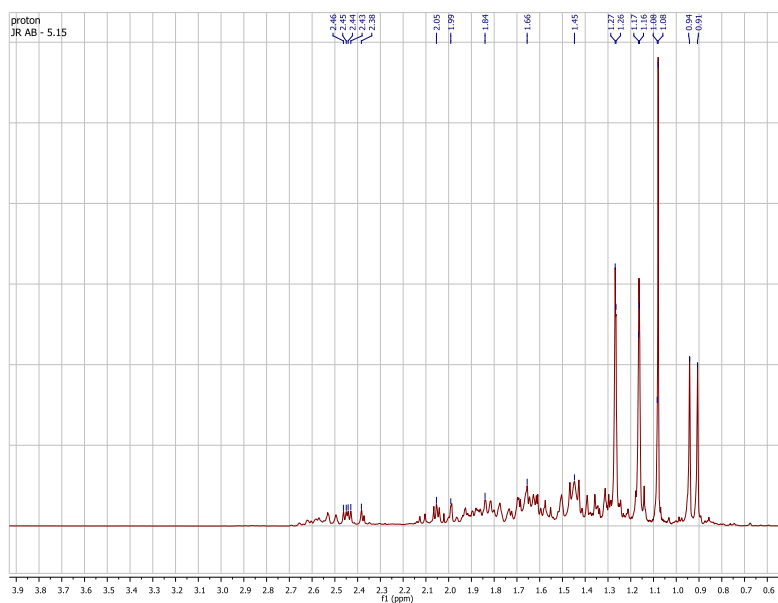


Figura 36 - Espectro de  $^1\text{H}$ -RMN para o hanamyol.

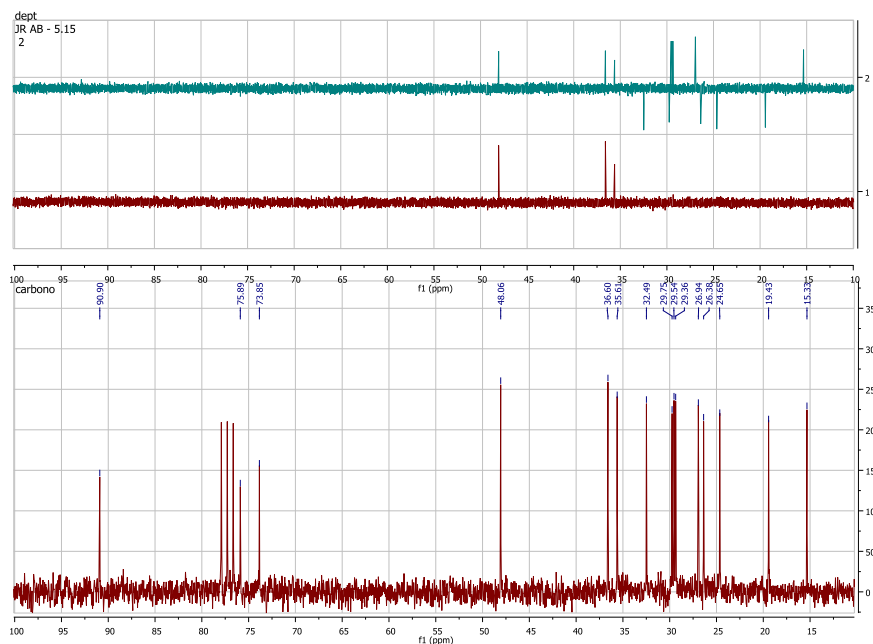


Figura 37 - Espectro de <sup>13</sup>C-RMN para o hanamyol.

Nas tabelas 11 e 12 estão presentes os dados de <sup>13</sup>C-RMN e de <sup>1</sup>H-RMN para os compostos maioritários separados na coluna cromatográfica.

Tabela 11 - Dados de <sup>13</sup>C-RMN, para os compostos maioritários separados na coluna cromatográfica.

C	α-guaiol		bulnesol		hanamyol <sup>12</sup>		α-bulneseno	
	δ (ppm)	Tipo C	δ (ppm)	Tipo C	δ (ppm)	Tipo C	δ (ppm)	Tipo C
1	140,2	C	141,8	C	90,9	C	152,6	C
2	28,0	CH <sub>2</sub>	28,8	CH <sub>2</sub>	32,5	CH <sub>2</sub>	31,9	CH <sub>2</sub>
3	33,9	CH <sub>2</sub>	27,8	CH <sub>2</sub>	29,8	CH <sub>2</sub>	30,6	CH <sub>2</sub>
4	46,5	CH	39,1	CH	35,6	CH	39,0	CH
5	139,1	C	46,3	CH	48,1	CH	46,3	CH
6	31,1	CH <sub>2</sub>	30,4	CH <sub>2</sub>	24,7	CH <sub>2</sub>	32,8	CH <sub>2</sub>
7	49,8	CH	54,2	CH	36,6	CH	51,0	CH
8	27,5	CH <sub>2</sub>	33,1	CH <sub>2</sub>	19,4	CH <sub>2</sub>	33,3	CH <sub>2</sub>
9	35,6	CH <sub>2</sub>	34,9	CH <sub>2</sub>	26,4	CH <sub>2</sub>	34,8	CH <sub>2</sub>
10	33,9	CH	128,9	C	75,9	C	142,0	C
11	73,7	C	121,0	C	73,9	C	129,0	C
12	26,1	CH <sub>3</sub>	27,2	CH <sub>3</sub>	29,4	CH <sub>3</sub>	22,5	CH <sub>3</sub>
13	27,6	CH <sub>3</sub>	27,3	CH <sub>3</sub>	29,5	CH <sub>3</sub>	108,2	CH <sub>2</sub>
14	20,1	CH <sub>3</sub>	22,4	CH <sub>3</sub>	26,9	CH <sub>3</sub>	21,1	CH <sub>3</sub>
15	19,9	CH <sub>3</sub>	15,4	CH <sub>3</sub>	15,3	CH <sub>3</sub>	15,6	CH <sub>3</sub>

Tabela 12 - Dados de <sup>1</sup>H-RMN, para os compostos maioritários separados na coluna cromatográfica.

H	α-guaiol	bulnesol	hanamyol <sup>12</sup>	α-bulneseno
12	1,15; 3H; s	1,16; 3H; s	1,27; 3H; s	1,69; 3H; s
13	1,18; 3H; s	1,19; 3H; s	1,17; 3H; s	4,64; 2H; sl
14	0,99; 3H; d (J=8,0 Hz)	0,97; 3H; d (J= 2,0 Hz)	0,94; 3H; d (J= 7,0 Hz)	0,89; 3H; d (J= 8,0 Hz)
15	0,95; 3H; d (J= 8,0 Hz)	1,64; 3H; s	1,08; 3H; s	1,65; 3H; s

<sup>12</sup> Dados concordantes com Rodilla *et al* (2010).

Ao analisar os dados de  $^{13}\text{C}$ -RMN, verifica-se que para todos os compostos, as moléculas apresentam 15 átomos de carbono, o que confirma que são sesquiterpenos. Verifica-se também que todos possuem 3 átomos de carbono quaternários.

Tanto o guaiol, como o bulnesol e o hanamyol possuem 4 sinais relativos a átomos de carbono terciários, 5 sinais relativos a átomos de carbono secundários e 3 sinais relativos a 3 átomos de carbono primários. Quanto ao  $\alpha$ -bulneseno, este possui 3 sinais correspondentes a átomos de carbono primários, 3 relativos a átomos de carbono terciários e 6 relativos a átomos de carbono secundários.

Quando analisamos os dados de  $^1\text{H}$ -RMN para os três primeiros compostos, vemos a presença de 2 singletos correspondentes protões dos grupos metilo das posições 12 e 13, respectivamente. Para o  $\alpha$ -bulneseno, na posição 13 possui um singlete largo, devido à presença da ligação dupla.

O guaiol nas posições 14 e 15 possui dois dubletos ao passo que os restantes compostos possuem um dublete e um singlete, respectivamente, que correspondem aos grupos metilo dessas mesmas ligações.

Os rendimentos obtidos com esta coluna cromatográfica foram aproximadamente de, 2% de  $\alpha$ -bulneseno, 50% de guaiol praticamente puro, 7% de bulnesol e 1% de hanamyol.

O  $\alpha$ -bulneseno apresenta-se como um óleo incolor e viscoso, correspondendo às primeiras fracções que saem da coluna com o hexano como eluente.

O guaiol é o segundo composto com peso relevante a ser libertado. Depois de evaporado o solvente o guaiol tem o aspecto de agulhas translúcidas com um cheiro bastante característico. Este é removido com uma polaridade de 85:15 em hexano e acetato de etilo.

Quanto ao bulnesol, é um óleo com uma coloração amarelada e translúcida e um pouco viscoso. A maioria do bulnesol sai em mistura com o restante guaiol. Como o bulnesol e o guaiol são isómeros, formam-se muito facilmente ligações por pontes de hidrogénio entre eles, o que pode dificultar a sua separação. O bulnesol que se obtém praticamente puro é removido com uma polaridade igual à do guaiol.

O hanamyol é o último composto relevante a sair da coluna. São pequenos cristais e que também possuem um cheiro bastante característico. Este composto sai com uma polaridade de 85:15 em hexano e acetato de etilo.

## 4.2. Biotransformação<sup>13</sup>

Incubou-se o guaiol de acordo com o procedimento já descrito, com dois fungos, o *Rhizopus stolonifer* e o *Aspergillus niger*.

A proporção de guaiol a incubar foi de 25mg/100mL de meio de cultura, pois como o guaiol é um antifúngico potente, e de acordo com Choudhary *et al* (2007), esta será a proporção indicada para não inibir/suprimir a actuação do fungo.

O fungo actua de forma a tornar o produto menos prejudicial para ele, ou seja, as biotransformações são um mecanismo de defesa do microrganismo. Este vai induzir alterações na molécula que podem passar pela introdução de grupos oxigenados na mesma.

No final da biotransformação e após a extracção e evaporação do solvente, obteve-se uma goma de maior ou menor massa e de cor mais clara ou mais escura, consoante o tempo de incubação e o fungo utilizado.

### 4.2.1. Biotransformação com *Rhizopus stolonifer*

No diagrama 3 pode ver-se um esquema geral dos resultados obtidos após a biotransformação e a extracção dos produtos.

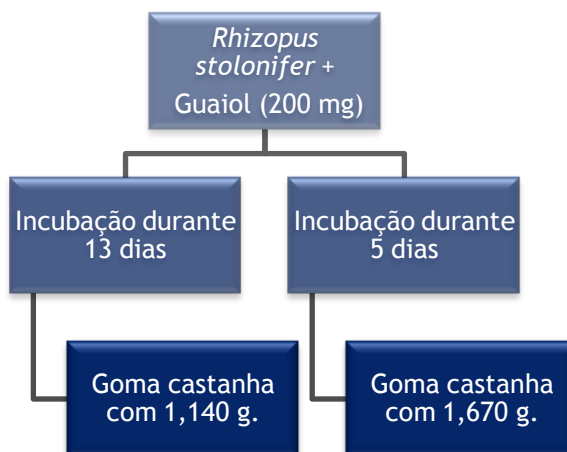


Diagrama 3 - Resultados da biotransformação com *R. stolonifer* após a extracção dos produtos.

Foram realizadas as colunas cromatográficas dos respectivos produtos obtidos, e controlou-se por cromatografia em camada fina o grau de separação dos componentes. Posteriormente juntaram-se as fracções que apresentavam igual grau de separação, ou seja, igual  $R_f$ .

Depois da evaporação do eluente e do controlo do peso, obtiveram-se os seguintes resultados:

<sup>13</sup> Os apêndices A e B contêm as tabelas e os espectros, respectivamente, relativos às massas e aos espectros dos produtos separados das colunas cromatográficas para as biotransformações realizadas.

- **Biotransformação a 13 dias**

Efectuou-se o inóculo do fungo no meio sólido e deixou-se a maturar durante 72 h (Figura 38).



Figura 38 - 2ª cultura de *Rhizopus stolonifer* em SGC 2.

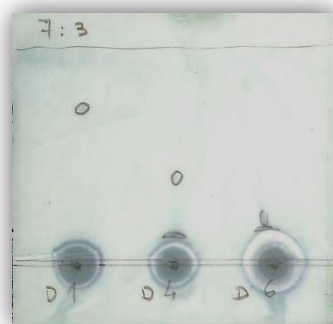
Este procedimento foi realizado com o intuito de se poder activar o sistema enzimático do fungo, fazendo com que este adquira uma certa estabilidade para que quando entre em contacto com o meio líquido não se corra o risco de se perder o microrganismo.

Na figura 39, mostram-se os 8 erlenmeyers no incubador orbital durante a biotransformação.



Figura 39 - Erlenmeyers com meio de cultura e o fungo no incubador orbital.

A biotransformação foi seguida por TLC de forma a ser verificado o grau de degradação do guaiol, como mostra a figura 40.



**Figura 40** - Cromatografia em camada fina da biotransformação ao longo do tempo. À esquerda para o 1º dia<sup>14</sup>, ao centro para o 4º dia e à direita para o 6º dia.

Retiraram-se amostras ao longo do tempo, ao 1º, ao 4º e ao 6º dia e fez-se a cromatografia em camada fina.

Ao analisar-se a TLC verifica-se que ao dia 4 já não é visível a presença de guaiol, aparecendo uma mancha com polaridade mais baixa, ou seja com menor  $R_f$ . O que sugeriu que este ou já tinha sido metabolizado em produto, ou então que estaria a ser metabolizado pelo sistema enzimático do fungo e a mancha de polaridade mais baixa seria um produto intermediário.

Ao dia 6 verificou-se que o produto que apareceu ao dia 4 já não estava presente, aparecendo um com polaridade ainda mais baixa, e mais uma vez, não se verificou a presença de guaiol.

Finalizados os 13 dias de fermentação (Figura 41), procedeu-se à extracção dos produtos.



**Figura 41** - Biomassa (esferas) do *R. stolonifer* no meio de cultura, antes da extracção.

Filtrada a biomassa (Figura 42), realizou-se uma extracção líquido - líquido numa ampola de decantação como mostra a figura 43.

<sup>14</sup> Entenda-se por dia 1, o dia em que se adicionou o guaiol ao meio.



Figura 42 - Biomassa do *Rhizopus stolonifer* durante a filtração a vácuo.



Figura 43 - Extração líquido - líquido. São visíveis a fase aquosa a castanho e a fase orgânica incolor.

Depois de realizada a extração (figura 44), evaporou-se o solvente e obteve-se a goma castanha, como se pode ver na figura 45, com uma massa de 1,140 g.



Figura 44 - Fase orgânica à esquerda e à direita encontra-se a fase aquosa, resultado da extração líquido - líquido.

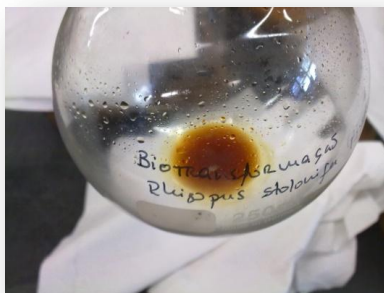


Figura 45 - Resultado da biotransformação com *Rhizopus stolonifer*.

Realizou-se uma TLC desta goma, e comparou-se com o produto colocado inicialmente para a biotransformação (Figura 46).

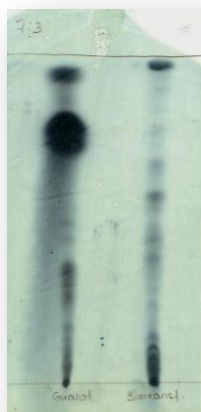


Figura 46 - Cromatografia em camada fina do resultado da biotransformação (à direita) comparado com o guaiol (mancha maior e mais escura, à esquerda).

Verifica-se através da TLC, que praticamente todo o guaiol foi metabolizado, não sendo visível a sua mancha característica, facto que já tinha sido visualizado na TLC realizada ao dia 6 da biotransformação.

Seguidamente foi realizada a separação dos vários componentes utilizando as seguintes polaridades<sup>15</sup> mostradas na tabela 13.

<sup>15</sup> Para todas as colunas cromatográficas realizadas com produtos da biotransformação, foram utilizadas estas polaridades.



Tabela 13 - Diferentes polaridades utilizadas na realização da coluna cromatográfica do resultado da biotransformação.

Eluente	Proporção	Volume / mL
Hexano	-	200
Hexano:Acetato de etilo	98:2	200
Hexano:Acetato de etilo	90:10	300
Hexano:Acetato de etilo	85:15	200
Hexano:Acetato de etilo	80:20	300
Hexano:Acetato de etilo	70:30	200
Hexano:Acetato de etilo	60:40	200
Hexano:Acetato de etilo	50:50	200
Acetato de etilo	-	200
Acetato de etilo:Metanol	90:10	200
Metanol	-	200

Seguiu-se o grau de separação dos compostos por TLC e juntaram-se as fracções que apresentavam igual  $R_f$ .

Depois de evaporar o eluente, obtiveram-se diversas fracções nas quais se verificou que o peso maioritário se concentrou no final da coluna.

Realizaram-se as análises espectroscópicas das fracções mais significativas e verificou-se que nas primeiras fracções saíram principalmente ácidos gordos (Figura 47) e no final da mesma, onde saiu o resto do meio de cultura presente na fase orgânica (Figura 48).

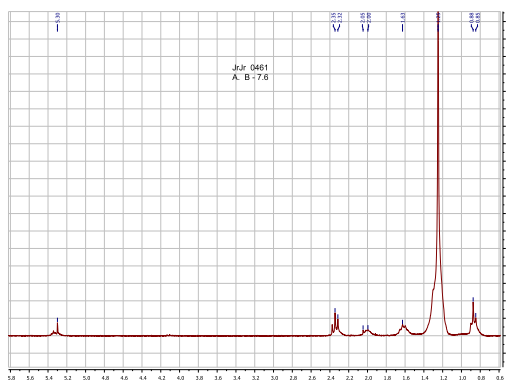


Figura 47 - Espectro da fracção 7.6, onde se apresenta um ácido gordo.

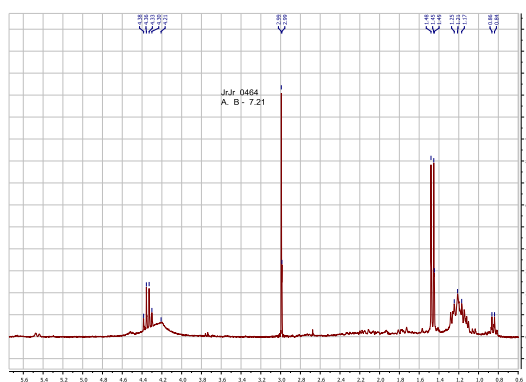


Figura 48 - Espectro duma fracção final da coluna. Verifica-se a presença do meio de cultura.

Apenas foi obtido um produto da biotransformação, com uma massa de 6 mg (rendimento de 3 % em relação à quantidade de guaiol incubada inicialmente). Possivelmente, devido a um tempo de incubação elevado, o fungo metabolizou o produto de biotransformação. Como tal, julgou-se que deveria ter sido parada ao dia 4, quando se verificou por camada fina o desaparecimento do guaiol e o aparecimento do produto.

O produto da biotransformação saiu da coluna quando se passava uma mistura de hexano e acetato de etilo numa proporção de 60:40. Depois de evaporado o solvente, o produto apresentou-se como cristais tipo agulha e incolores.

Realizaram-se os espectros de  $^{13}\text{C}$ -RMN e de  $^1\text{H}$ -RMN para este produto, que se apresentam a seguir nas figuras 49 e 50.

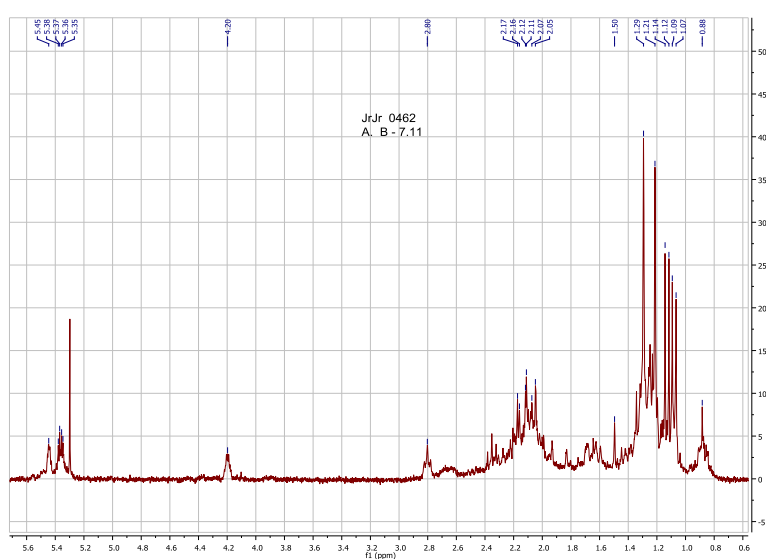


Figura 49 - Espectro de  $^1\text{H}$ -RMN para o produto da biotransformação.

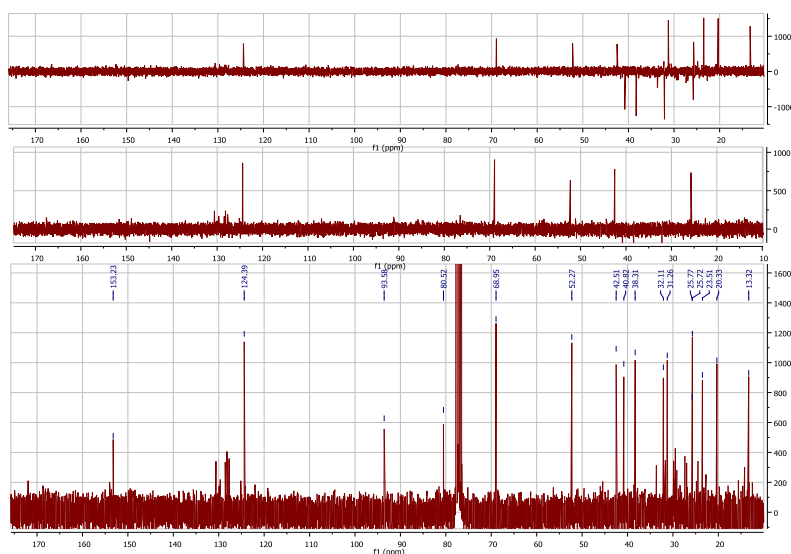


Figura 50 - Espectro de  $^{13}\text{C}$ -RMN para o produto da biotransformação.

Na tabela 14 e 15, respectivamente, estão sumariados os dados de  $^{13}\text{C}$ -RMN e de  $^1\text{H}$ -RMN para o resultado da biotransformação.

Tabela 14 - Sinais de  $^{13}\text{C}$ -RMN para o composto da biotransformação com *R. stolonifer*.

Composto da Biotransformação		
C	$\delta$ (ppm)	Tipo C
1	153,2	C
2	124,4	CH
3	38,3	CH <sub>2</sub>
4	42,5	CH
5	93,6	C
6	25,8	CH <sub>2</sub>
7	52,3	CH
8	32,1	CH <sub>2</sub>
9	68,9	CH
10	42,5	CH
11	80,5	C
12	31,3	CH <sub>3</sub>
13	23,5	CH <sub>3</sub>
14	13,3	CH <sub>3</sub>
15	20,3	CH <sub>3</sub>

Tabela 15 - Dados de  $^1\text{H}$ -RMN para o composto da biotransformação com *R. stolonifer*.

H	Composto da Biotransformação
2	5,36; 1H; m
9	4,20; 1H; m
12	1,21; 3H; s
13	1,29; 3H; s
14	1,13; 3H; d (J= 4 Hz)
15	1,08; 3H; d (J= 4 Hz)

Ao analisarmos os dados de  $^{13}\text{C}$ -RMN verifica-se que este composto possui 3 átomos de carbono quaternários, 5 átomos de carbono terciários, 3 átomos de carbono secundários e 4 átomos de carbono primários.

Relativamente aos dados de  $^1\text{H}$ -RMN, este composto possui 2 singletos que correspondem aos prótons das posições 12 e 13, e possui dois dubletos correspondentes aos prótons das posições 14 e 15. Todos eles são relativos a prótons de grupos metilo. Possui ainda dois multipletos que correspondem às posições 2 e 9, relativos aos sinais para a ligação dupla e para a ligação do grupo OH, respectivamente.

Também foi realizado um espectro de massa, por cromatografia gasosa de massa, para o produto obtido, o qual se apresenta na figura 51.

RODILLA2.D16 \* AB7-11  
 MaxE2 SumE4  
 RI 16599 10214

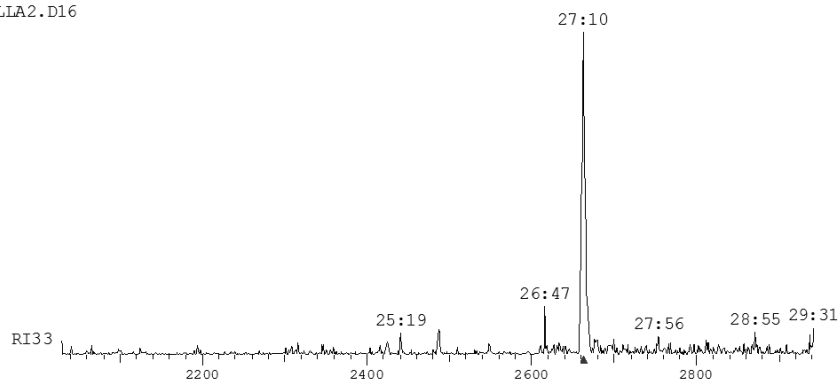
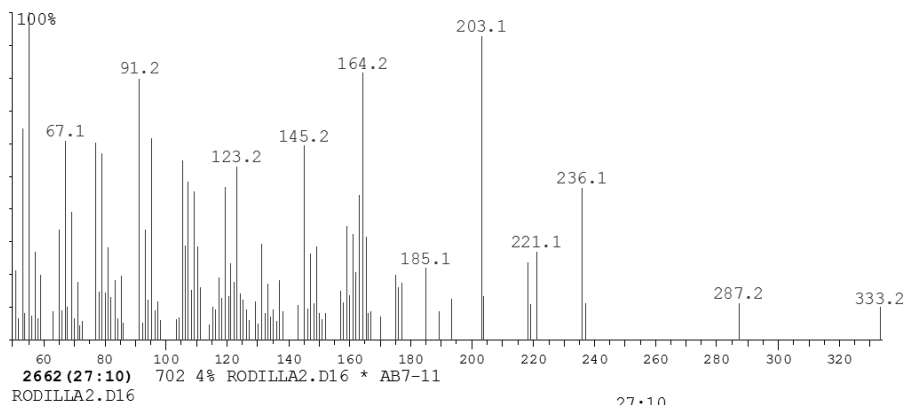
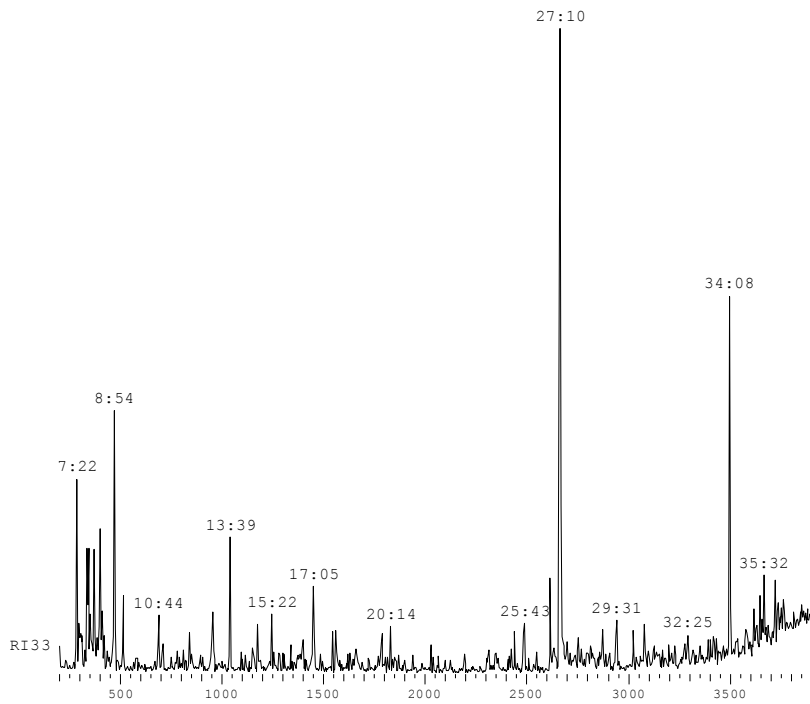


Figura 51 - Espectro de massa do produto de biotransformação com *Rhizopus stolonifer*.

Pela análise do espectro de massa, verificamos que o composto possui a massa de 236,1 g/mol, que corresponde a um tempo de retenção de 27:10. O composto inicial, o guaiol

( $C_{15}H_{24}O$ ), possui uma massa de 220,1 g/mol, o que indica que o produto obtido deve possuir mais um grupo oxigenado.

Como tal, a fórmula do composto obtido será  $C_{15}H_{24}O_2$ , o que está coincidente com a massa de 236,1 g/mol.

Por fim realizou-se um espectro de infravermelho da amostra (Figura 52).

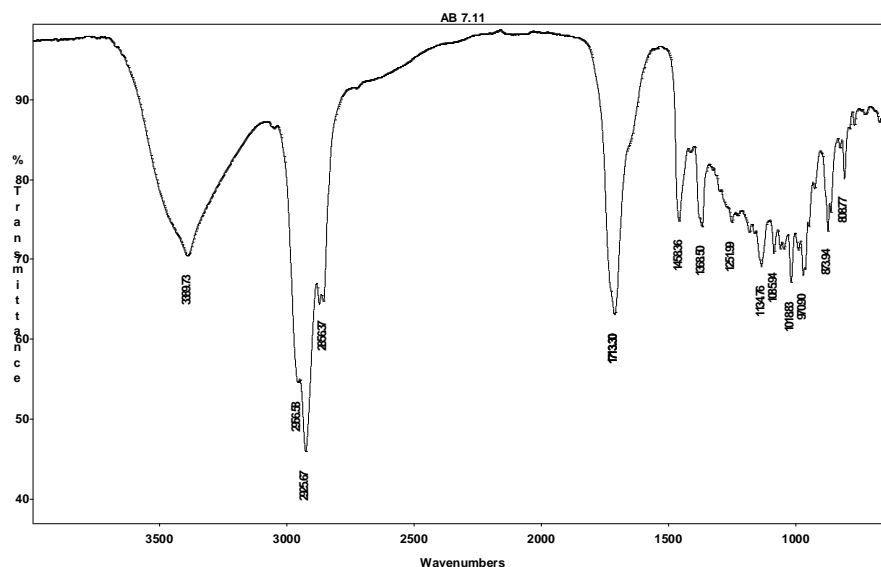


Figura 52 - Espectro de IV para o produto da biotransformação.

Através da análise do espectro de infravermelho, verifica-se a presença da banda relativa ao grupo hidroxilo, que aparece por volta dos  $3400\text{ cm}^{-1}$ . Neste caso, esta banda está mais afunilada o que sugere a presença de um grupo OH secundário ou terciário.

Aparecem também as bandas relativas a um grupo epóxido a um comprimento de onda entre  $1000$  e  $1100\text{ cm}^{-1}$ . A banda que reflecte a presença de uma ligação dupla não está muito visível pois aparece como uma inflexão por volta dos  $1600\text{ cm}^{-1}$ .

Entre  $1000$  e  $1150\text{ cm}^{-1}$  aparecem as bandas relativas às ligações C-O.

Pelas análises espectroscópicas chegou-se a uma proposta de estrutura para este composto (Figura 53), a sua nomenclatura é, 9-hidroxi-5,11-epoxiguaien-1-eno.

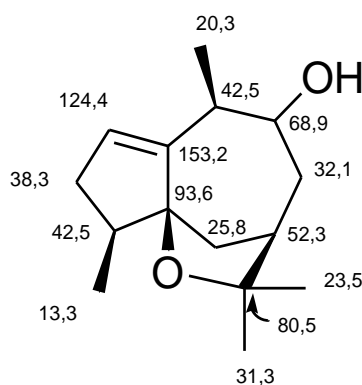


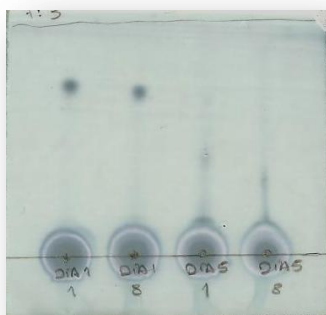
Figura 53 - Estrutura proposta para o composto obtido, com indicação dos desvios químicos (ppm) relativos aos carbonos.

Ao analisarem-se as transformações efectuadas pelo fungo verifica-se que este diminuiu o carácter antifúngico da molécula por eliminação do grupo OH na posição 11, formando um éter cíclico na posição 5 e hidroxilou na posição 9. A ligação dupla deslocou-se da posição 1-5 para a posição 1-2.

- **Biotransformação a 5 dias**

No final da biotransformação durante 13 dias, chegou-se à conclusão que talvez se deveria ter parado a mesma ao 4º dia para evitar uma degradação do produto, pois a massa do mesmo era muito baixa. Como tal, resolveu-se fazer um novo ensaio apenas com 5 dias de fermentação.

Controlou-se a degradação do guaiol por TLC (Figura 54), retirando a amostra de dois erlenmeyers diferentes (1 e 8), ao dia 1 e ao dia 5.



**Figura 54** - Cromatografia em camada fina da biotransformação com 5 dias de fermentação.

Através da camada fina verificou-se que o guaiol realmente ao 5º dia já tinha sido metabolizado nos produtos, desaparecendo a sua mancha característica e aparecendo uma de polaridade inferior.

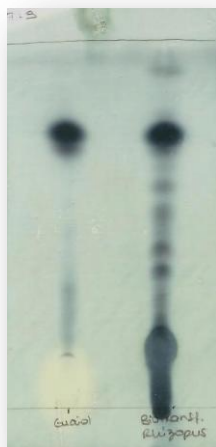
Parou-se a biotransformação, efectuou-se a extracção e no final obteve-se novamente uma goma castanha (Figura 55) com uma massa de 1,670 g.



**Figura 55** - Resultado da biotransformação com *Rhizopus stolonifer* com 5 dias de fermentação.

Ao ser realizado o TLC desta goma (Figura 56), verificou-se que o guaiol continuava presente, ao contrário do que mostrava o TLC realizado ao longo da fermentação.

O guaiol apesar de não estar presente no meio de cultura, como mostrava o TLC antes de se ter parado a biotransformação, não quer dizer que já estivesse metabolizado em produto. Este poderia estar no interior das células, o que com o passo da desintegração celular, fez-se com que o mesmo fosse libertado para o meio exterior.



**Figura 56** - Resultado da biotransformação com 5 dias de fermentação.

Ainda assim foi realizada a coluna cromatográfica (Figura 57), pois, apesar do guaiol ainda estar presente, nada indicava que não pudessem existir produtos da biotransformação.



**Figura 57** - Coluna cromatográfica do resultado da fermentação a 5 dias.

Novamente, as fracções com peso mais significativo diziam respeito ao meio de cultura presente na fase orgânica, e as restantes diziam respeito ao guaiol por transformar (cerca de 50 mg) (Figura 58 e 59).

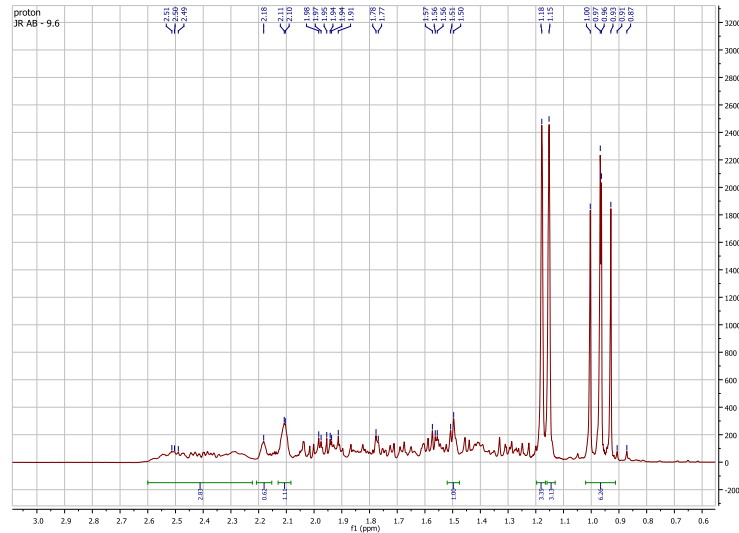


Figura 58 - Espectro de <sup>1</sup>H-RMN para o guaiol que ficou por transformar.

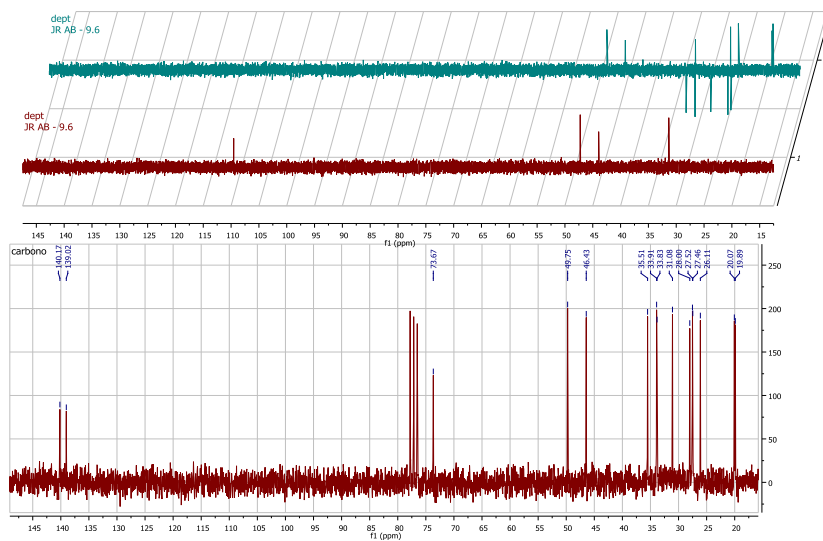


Figura 59 - Espectro de <sup>13</sup>C-RMN para o guaiol que ficou por transformar.

Como tal, conclui-se que a transformação com 5 dias de incubação não será efectiva, pelo menos para as condições de fermentação escolhidas.



- Comparação com os estudos realizados por Choudhary *et al* (2007)

Choudhary *et al* (2007)<sup>16</sup> realizou a biotransformação do guaiol com o fungo *Rhizopus stolonifer*, a qual resultou num único produto de biotransformação.

Incubou 600 mg de guaiol numa proporção de 20 mg/ 100 mL de meio de cultura, utilizando 30 erlenmeyers. O tempo de incubação foi de 12 dias.

Depois da extracção e da evaporação do solvente, obteve uma goma castanha com um peso de 1,1 g. Facto que está concordante com os resultados obtidos neste trabalho.

O produto apresentava-se como um sólido amorfo de fórmula  $C_{15}H_{26}O_2$ , sendo esta confirmada pelas análises espectroscópicas de IV,  $^1H$ -RMN e de  $^{13}C$ -RMN e por espectrometria de massa. A estrutura deste composto pode ser observada na figura 60, e a sua nomenclatura é, 1-guaieno-9 $\beta$ ,11-diol.

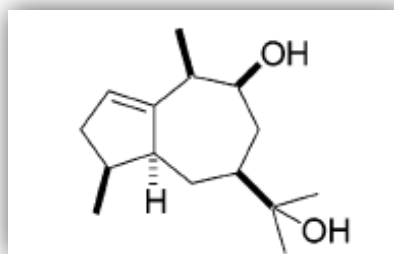


Figura 60 - Composto obtido por Choudhary *et al* (2007) pela biotransformação do guaiol com *Rhizopus stolonifer*.

Neste caso o fungo diminuiu o carácter antifúngico do guaiol pela introdução de um grupo hidroxilo na posição 9. A ligação dupla deslocou-se da posição 1-5 para a posição 1-2.

Neste projecto de investigação para além destas mesmas alterações, o fungo formou um éter na posição 5 e eliminou o grupo hidroxilo da posição 11. Isto pode dever-se a um tempo de incubação mais elevado, ou possivelmente às características da fermentação serem diferentes.

O rendimento de biotransformação foi ligeiramente inferior (aproximadamente 1,67 %) quando comparado com os resultados obtidos neste trabalho, que foram de aproximadamente 3 %, em relação ao guaiol colocado inicialmente para biotransformar.

<sup>16</sup> É o único trabalho publicado referente à biotransformação do guaiol.

#### 4.2.2. Biotransformação com *Aspergillus niger*

No diagrama 4 pode ver-se um esquema geral dos resultados obtidos após a biotransformação e a extracção dos produtos.

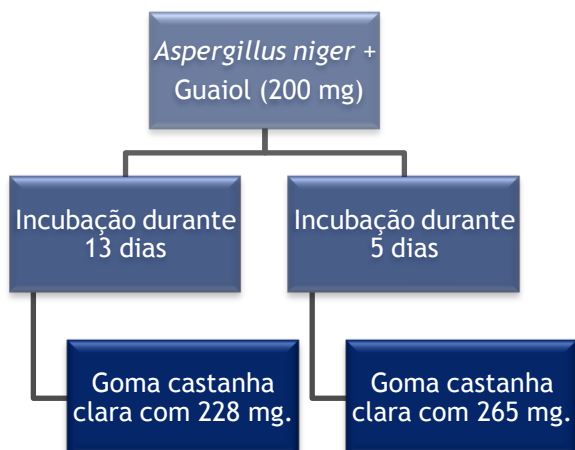


Diagrama 4 - Resultados da biotransformação com *A. niger* após a extracção dos produtos.

Realizaram-se as colunas cromatográficas dos respectivos produtos obtidos, e controlou-se por cromatografia em camada fina o grau de separação dos componentes. De seguida juntaram-se as fracções que apresentavam igual grau de separação, ou seja, igual  $R_f$ . Depois da evaporação do eluente e do controlo do peso, obtiveram-se os seguintes resultados:

- **Biotransformação a 5 dias**

Em primeiro lugar foi testado um tempo de incubação de 5 dias.

Efectuou-se o inóculo do *A. niger* no meio sólido SGC 2 (Cultura secundária) e deixou-se a maturar durante 72 h (Figura 61).

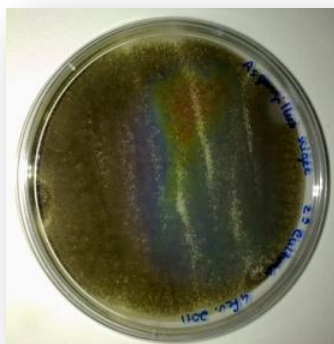


Figura 61 - *Aspergillus niger* em SGC 2. Cultura com 72 h de maturação.

Na figura 62 mostra-se o inóculo de *A. niger*, com 24 h de maturação no meio líquido, antes de serem pipetados os 10 mL para os restantes erlenmeyers.

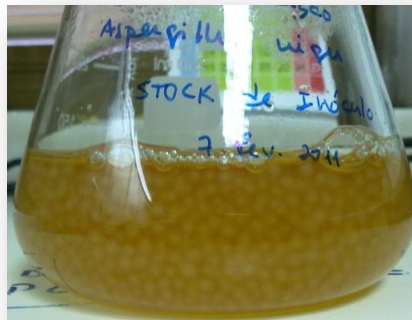


Figura 62 - Inóculo de *Aspergillus niger* com 24 h de maturação no meio líquido.

Seguiu-se o grau de degradação do produto por cromatografia em camada fina, como mostra a figura 63.

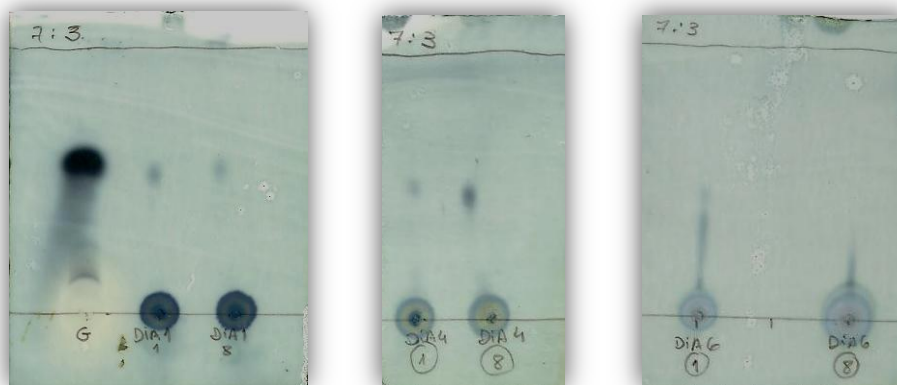


Figura 63 - Cromatografia em camada fina para a biotransformação com *A. niger* com um tempo de incubação de 5 dias<sup>17</sup>.

Retiraram-se amostras de 2 erlenmeyers diferentes e verificou-se que ao 4º dia ainda estava presente o guaiacol no meio exterior.

Parou-se a biotransformação ao 5º dia (Figura 64), apesar de possivelmente ainda estar presente guaiacol por transformar.

<sup>17</sup> Por lapso escreveu-se na TLC dia 6, mas corresponde ao dia 5 de biotransformação.

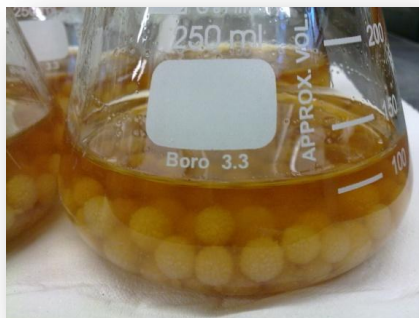


Figura 64 - Biomassa do *Aspergillus niger* no final da biotransformação.

Efectuou-se a extracção e obteve-se uma goma castanha clara (Figura 65), com uma massa de 265 mg.



Figura 65 - Produto final da biotransformação com *A. niger* após a extracção e evaporação do solvente.

Realizou-se a TLC desta goma (Figura 66) e verificou-se que ainda estava presente grande quantidade de guaiol, o que não indicava (mais uma vez) que não pudessem existir produtos da biotransformação, como tal realizou-se a coluna cromatográfica para este produto.

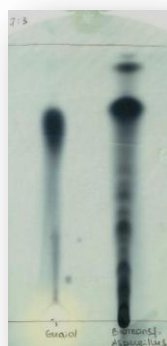


Figura 66 - TLC para a biotransformação do guaiol com *A. niger*.

Depois de se controlar por TLC as fracções obtidas da coluna cromatográfica, juntaram-se as que apresentavam igual  $R_f$ , evaporou-se o eluente e controlou-se o peso das mesmas. Tal como para o fungo *R. stolonifer*, o peso concentrou-se no final da coluna, correspondendo ao meio de cultura, e o guaiol por transformar (Figura 67 e 68) foi a fracção que apresentou maior peso (aproximadamente 40 mg).

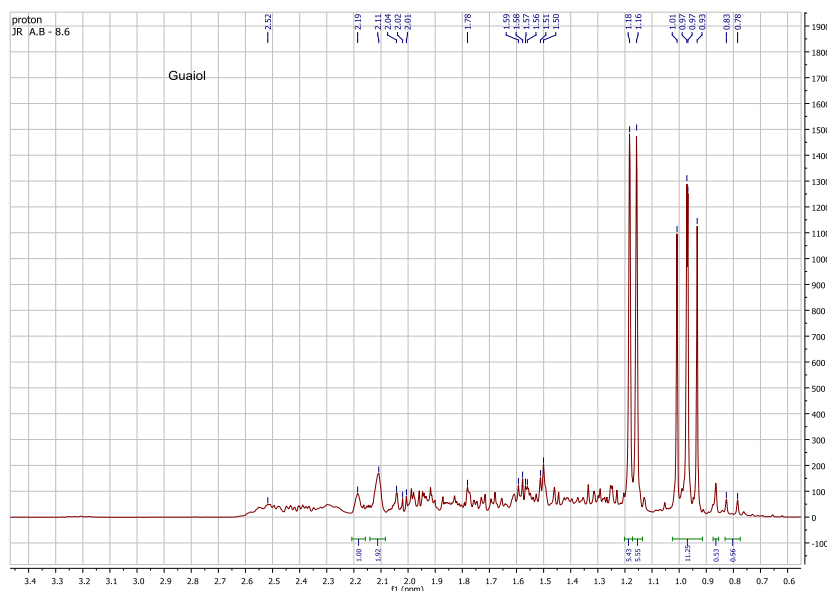


Figura 67 - Espectro de  $^1\text{H-NMR}$  para o guaiol por transformar.

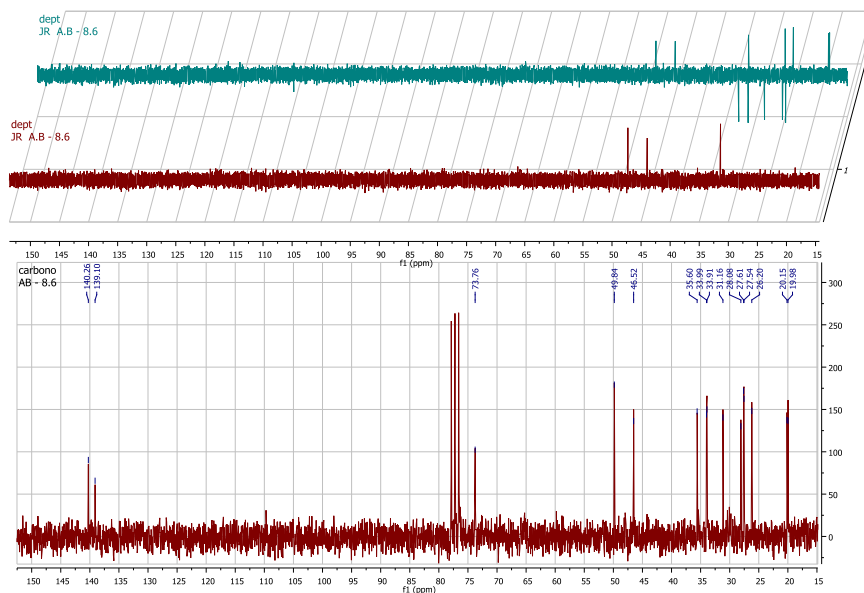


Figura 68 - Espectro de  $^{13}\text{C-NMR}$  para o guaiol por transformar.

As restantes fracções apresentavam peso insignificante (entre 0 e 2 mg), o que não permitiu a realização de análises espectroscópicas.

Tendo em conta a massa de guaiol recuperada, não se pode afirmar que a biotransformação não foi efectiva, nem que não estavam presentes produtos da biotransformação.

- **Biotransformação a 13 dias**

Depois de todo o procedimento já descrito anteriormente, obteve-se novamente uma goma castanha clara com um peso de 228 mg.

Realizada a TLC para esta goma (Figura 69), verificou-se que ainda permanecia guaiol por transformar.



**Figura 69** - TLC da goma resultante da biotransformação com *A. niger* da fermentação a 13 dias. À esquerda a referência (guaiol) e à direita do resultado da biotransformação.

Novamente, e como já tinha acontecido para os restantes ensaios, após a realização da coluna cromatográfica, verificou-se que a maioria do peso se concentrava no final da coluna.

Neste ensaio, foram recuperadas 136 mg de guaiol, o que poderia indicar que a biotransformação não teria sido efectiva pois as restantes fracções não apresentavam peso significativo (0 a 2 mg, aproximadamente).

À excepção de uma fracção que apresentou uma massa de 12,5 mg. Esta fracção foi removida da coluna com uma polaridade de 90:10 em Acetato de etilo e Metanol.

Realizaram-se as análises espectroscópicas para esta fracção, tendo resultado os espectros que seguidamente se apresentam.

Na figura 70 apresenta-se o espectro de infravermelho para o novo composto.

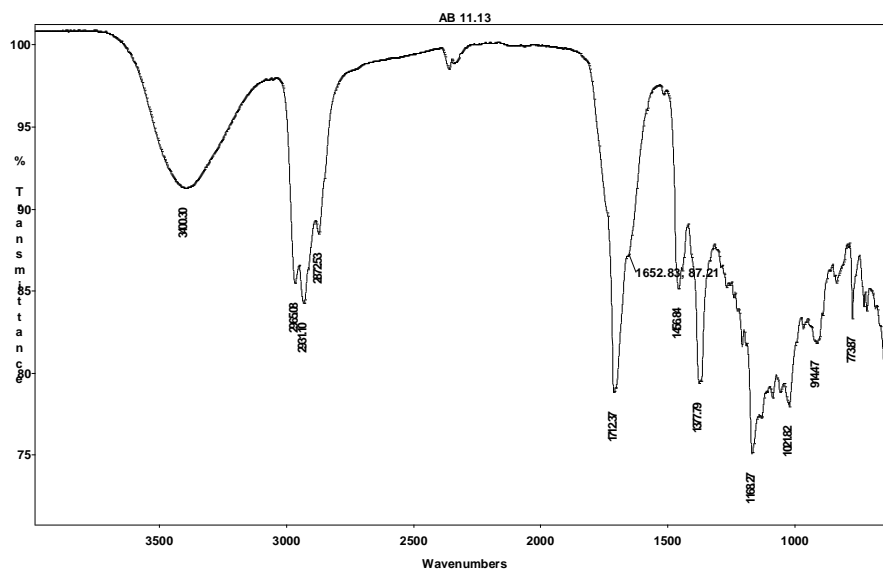


Figura 70 - Espectro de IV para o composto de biotransformação com *A. niger*.

São visíveis a banda característica para o grupo OH a cerca de  $3400\text{ cm}^{-1}$ , sendo esta bastante alargada o que sugere que o composto apresenta mais do que um grupo OH. Depois a  $1650\text{ cm}^{-1}$  aparece o sinal relativo à ligação dupla do produto. Tal como para o composto obtido com o *R. stolonifer* este sinal aparece como uma inflexão, não sendo muito visível.

Por volta de  $1160\text{ cm}^{-1}$  aparece a banda relativa às ligações C-O.

Nas figuras 71 e 72 estão os espectros de  $^1\text{H}$ -RMN e de  $^{13}\text{C}$ -RMN para o produto da biotransformação.

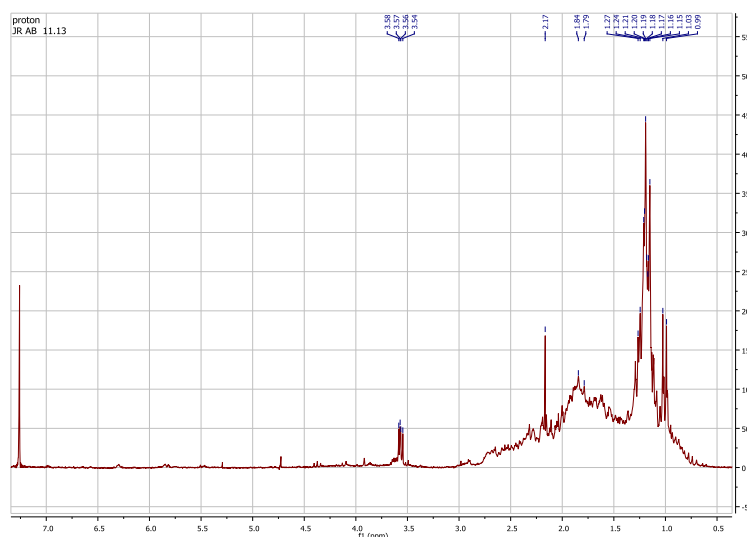


Figura 71 - Espectro de  $^1\text{H}$ -RMN para o composto da biotransformação.

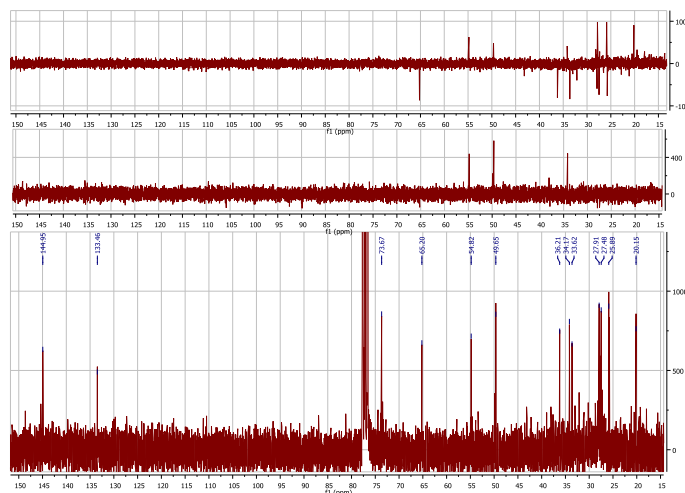


Figura 72 - Espectro de <sup>13</sup>C-RMN para o composto da biotransformação.

Seguidamente apresentam-se as tabelas com os dados de <sup>13</sup>C-RMN e de <sup>1</sup>H-RMN para o produto da biotransformação com *A. niger* (Tabelas 16 e 17, respectivamente).

Tabela 16 - Sinais de <sup>13</sup>C-RMN para o composto da biotransformação com *A. niger*.

Composto da Biotransformação		
C	δ (ppm)	Tipo C
1	149,9	C
2	27,5	CH <sub>2</sub>
3	33,6	CH <sub>2</sub>
4	34,2	CH
5	133,5	C
6	27,9	CH <sub>2</sub>
7	54,8	CH
8	25,7	CH <sub>2</sub>
9	36,2	CH <sub>2</sub>
10	49,6	CH
11	73,7	C
12	25,9	CH <sub>3</sub>
13	27,9	CH <sub>3</sub>
14	20,1	CH <sub>3</sub>
15	65,2	CH <sub>2</sub>

Tabela 17 - Dados de <sup>1</sup>H-RMN para o composto da biotransformação com *A. niger*.

H	Composto da Biotransformação
12	1,20; 3H; s
13	1,19; 3H; s
14	1,00; 3H; d (J= 7,2 Hz)
15	3,56; 2H; dd (J <sub>1</sub> =3,2 Hz; J <sub>2</sub> =4,5 Hz)



Ao analisarmos os dados de  $^{13}\text{C}$ -RMN verifica-se que este composto possui 3 átomos de carbono quaternários, 3 átomos de carbono terciários, 6 átomos de carbono secundários e 3 átomos de carbono primários.

Relativamente aos dados de  $^1\text{H}$ -RMN, este composto possui 2 singletos que correspondem aos prótons das posições 12 e 13, correspondentes a grupos metilo. Na posição 14 este apresenta um dubleto correspondente a um grupo metilo, ao passo que na posição 15 apresenta um duplo dupleto, devido à presença do grupo hidroxilo nesta mesma posição.

Depois de analisados os espectros e por comparação com os dados espectroscópicos para o guaiol, chegou-se à conclusão que o composto apenas possui uma alteração significativa no desvio químico relativo ao átomo de carbono da ligação 15. Como tal, chegou-se à conclusão que a estrutura do composto poderá ser a apresentada na figura 73.

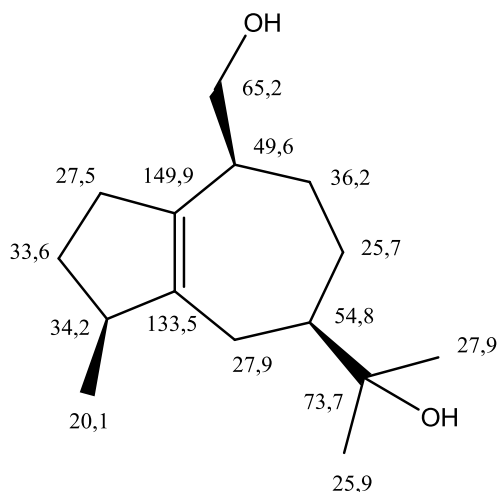


Figura 73 - Estrutura proposta para o composto da biotransformação com *A. niger*.

Verifica-se que o sistema enzimático do fungo apenas hidroxilou o guaiol na posição 15 da molécula.

Este produto foi obtido com 6,25 % de rendimento em relação à massa de guaiol adicionada inicialmente (200 mg) e possui a fórmula química,  $\text{C}_{15}\text{H}_{26}\text{O}_2$ . Este produto apresenta-se como pequenos grãos brancos.

A sua nomenclatura é, 11,15-dihidroxi-guaien-1(5)-eno ou tendo em conta a estrutura do guaiol, 15-hidroxi-guaiol.

#### 4.2.3. Biotransformação com *R. stolonifer* vs Biotransformação com *A. niger*

Como já foi referido anteriormente, foram efectuados ensaios de biotransformação com dois fungos, o *Rhizopus stolonifer* e o *Aspergillus niger*.

As diferenças entre os dois começam logo quando se faz o inóculo na placa de meio sólido, como mostra a figura 74.

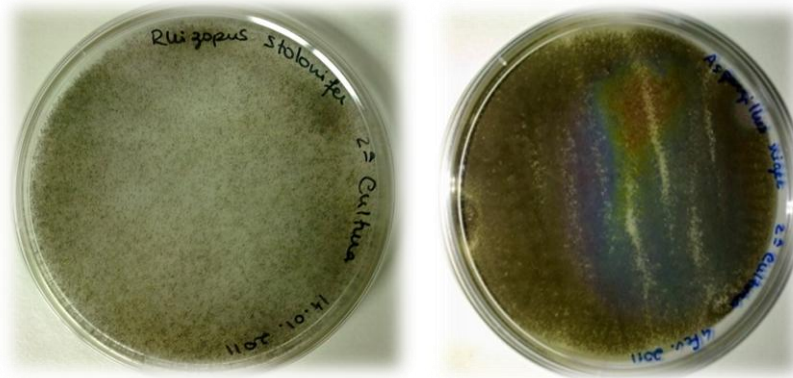


Figura 74 - À esquerda *Rhizopus stolonifer* e à direita *Aspergillus niger*, ambos em PDA.

O *R. stolonifer* cresce em meio sólido como uma penugem branca onde mais tarde aparecem pequenos pontos negros que dizem respeito aos esporos fúngicos.

O *A. niger* cresce em meio sólido com colónias bastante negras e bastante menos volumosas que as colónias formadas pelo *R. stolonifer*, que por vezes as suas hifas cobrem a tampa superior da caixa de petri.

Estas diferenças aparecem porque os fungos pertencem a divisões diferentes, sendo que o *R. stolonifer* pertence à divisão Zigomicota e o *A. niger* à divisão Ascomicota.

Quando se procede ao inóculo dos fungos no meio líquido, passadas 24 h de incubação, a 30 °C e com uma agitação de 180 rpm, verifica-se que o *R. stolonifer* apresenta-se como um algodão estando completamente agregado, ao passo que o *A. niger* mostra-se como umas pequenas esferas em grande quantidade, como mostra a figura 75.

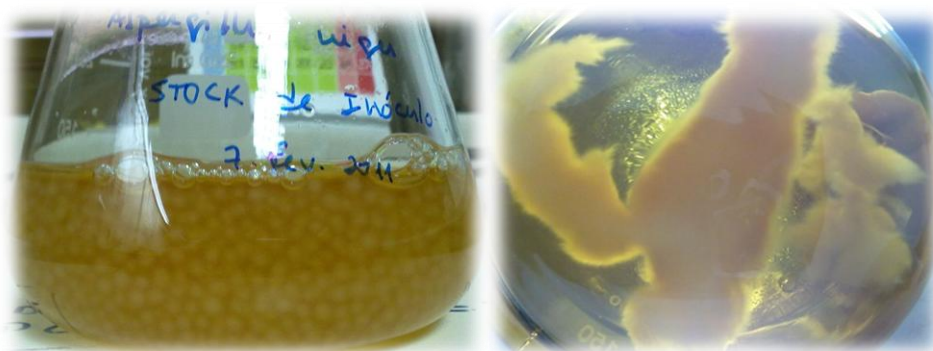


Figura 75 - Stock de inóculo de *A. niger* (Esquerda), e stock de inóculo de *R. stolonifer* (Direita), com 24 h de incubação.

Ao se pipetarem os 10 mL para os restantes erlenmeyers e antes de ser adicionado o guaiol (4 dias de incubação), a biomassa fúngica apresentava um aspecto completamente diferente.

O *R. stolonifer* agregou-se em esferas perfeitas, de tamanho não uniforme (Figura 76), ao passo que o *A. niger* apesar de também estar agregado em esferas de tamanho praticamente uniforme, verificou-se que não são esferas perfeitas pois possuíam pequenas saliências à superfície (Figura 77).



Figura 76 - Biomassa fúngica de *Rhizopus stolonifer* com 4 dias de incubação.



Figura 77 - Biomassa de *Aspergillus niger* com 4 dias de incubação.

No final da biotransformação verificou-se que houve uma contracção da biomassa fúngica, ou seja, para o *R. stolonifer*, as esferas que eram de forma regular, desagregaram-se em pequenos filamentos de forma mais oval (Figura 78).



Figura 78 - Biomassa do *Rhizopus stolonifer*, no final da biotransformação.

No caso do *A. niger*, as pequenas saliências que eram visíveis, contraíram ficando a parecer pequenos círculos na superfície das esferas maiores, como se pode observar na figura 79.



Figura 79 - Biomassa de *Aspergillus niger*, no final da biotransformação.

Esta contracção da biomassa pode acontecer devido ao envelhecimento do fungo ou pode ser por causa do guaiol ser um antifúngico e ao ser adicionado ao meio vai fazer com que o fungo accione os seus mecanismos de protecção e como tal vai acontecer a biotransformação.

Na tabela 18, mostram-se as principais diferenças obtidas no final da biotransformação com os dois fungos.

Tabela 18 - Tabela resumo da biotransformação com os dois fungos.

Fungo	Tempo de fermentação	Massa de produto obtido (mg)	Guaiol transformado <sup>a</sup> (%)
<i>A. niger</i>	5 dias	-	80
	13 dias	12,5	32
<i>R. stolonifer</i>	5 dias	-	75
	13 dias	6	100

<sup>a</sup> em relação ao peso de guaiol recuperado, por transformar, da coluna cromatográfica com o guaiol adicionado inicialmente (200 mg).

Comparando as biotransformações com os dois fungos, pode-se concluir que para o *R. stolonifer*, existe uma maior produção de compostos relativos ao metabolismo celular (ácidos gordos e meio de cultura), obtendo-se no final da extração as gomas com peso muito superior quando comparado com o peso obtido para os produtos de *A. niger*.

Chegou-se também à conclusão que 5 dias de fermentação não são efectivos para ambos os fungos, tendo em conta as condições experimentais escolhidas, o que não quer dizer que com outras condições estes fungos não consigam biotransformar o guaiol com mais eficácia. Isto não indica que não possam ter existido produtos de transformação, o seu peso é que foi extremamente baixo e não possibilitou a sua análise espectroscópica. Outra explicação é que o produto, pelo menos para o *R. stolonifer*, poderia estar acoplado aos ácidos gordos que são produzidos pelo metabolismo celular e não se conseguiu separar através da coluna cromatográfica.

Analisando as massas do produto de biotransformação, nota-se que para o fungo *A. niger*, esta é praticamente o dobro. O curioso é que para este fungo e para 13 dias de ensaio, ainda foi recuperado cerca 136 mg de guaiol. O que sugere que este fungo será muito mais selectivo, não utilizando o guaiol para o seu metabolismo. Ao passo que para o *R. stolonifer*, com o mesmo tempo de incubação não se recuperou guaiol por transformar, ou pelo menos com peso significativo para que pudesse ser caracterizado. O que indica que o *R. stolonifer* para além de o biotransformar ainda o utiliza para o seu metabolismo.

Os produtos foram obtidos com 3 % de rendimento para o *R. stolonifer*, e de 6,25 % para o *A. niger* em relação à massa de guaiol adicionada inicialmente (200 mg).

## 5. Considerações Finais

Devido à vasta variedade de microrganismos, e aos numerosos compostos que são susceptíveis de serem transformados, a investigação na área das biotransformações certamente está longe de ser concluída.

Com este projecto de investigação pretendeu-se biotransformar o guaiol, testando dois fungos, o *Aspergillus niger* e o *Rhizopus stolonifer*.

Anteriormente já tinha sido testada esta biotransformação com os mesmos microrganismos, mas utilizando uma mistura de guaiol e bulnesol, não se tendo chegado a resultados consistentes. Como tal, neste trabalho alterou-se o procedimento experimental de forma a serem conseguidos outros resultados.

Neste trabalho teve que ser realizada a purificação da essência da planta *Bulnesia sarmientoi* para se obter o guaiol puro. Para isto realizaram-se diversas colunas cromatográficas com a finalidade de se verificar a mistura de eluentes que melhor separava o guaiol dos restantes compostos da planta. O guaiol puro foi obtido com um rendimento de aproximadamente 50 % para a coluna mais eficaz.

Decidiu-se optar pelo mesmo método para a biotransformação com os dois fungos pois assim seria mais fácil conseguirem-se comparar os resultados finais, sendo o número de variáveis menor e obtendo-se por conseguinte maior consistência nos mesmos.

Inicialmente, pensou-se em começar com um período de incubação de 13 dias. Depois de se analisarem os resultados chegou-se à conclusão que este tempo poderia ser excessivo pois a massa de produto obtida era muito baixa e o fungo poderia estar a metabolizar o produto da biotransformação. Como tal, e por análise das TLC realizadas (onde se verificou o aparecimento de um produto e o desaparecimento aparente do guaiol) optou-se por se escolher um tempo de incubação de 5 dias.

Depois de efectuadas as extracções dos produtos, de serem realizadas as colunas cromatográficas e de se fazerem as análises dos compostos obtidos, verificou-se que para ambos os fungos o peso se concentrava em fracções correspondentes a ácidos gordos, em meio de cultura e em produto por transformar. É importante realçar que para o fungo *R. stolonifer* as fracções correspondentes ao metabolismo celular possuem bastante mais massa que para o *A. niger*. Isto pode estar relacionado com o metabolismo próprio de cada fungo.

No final do tempo de incubação de 5 dias chegou-se à conclusão que este tempo afinal seria muito curto, pois para os dois fungos, o guaiol saiu sem ser transformado e não se verificou o aparecimento de nenhum produto de transformação. Ou ainda não existiam produtos da transformação ou então estes ainda possuíam uma massa relativamente pequena que não era susceptível de ser analisada.

Quando se incubaram os fungos durante 13 dias já se conseguiram obter produtos de transformação passíveis de serem caracterizados por análises espectroscópicas.

Para o fungo *R. stolonifer* obteve-se um produto com 6 mg, de fórmula química  $C_{15}H_{24}O_2$  e com 3 % de rendimento. Através das análises espectroscópicas, chegou-se à conclusão que o fungo modificou o guaiol fazendo uma eliminação do grupo OH da posição 11, formando um éter cíclico na posição 5 da molécula. Hidroxilou na posição 9, e a ligação dupla passou da posição 1-5 para a posição 1-2. O nome deste produto é, 9-hidroxi-5,11-epoxiguaien-1-eno. Em trabalhos realizados por Choudhary *et al* (2007) utilizando também o *R. stolonifer* para a transformação do guaiol mas com condições experimentais diferentes, este obteve também um produto de transformação com 10 mg (com rendimento de 1,67 %), o 1-guaiene-9 $\beta$ ,11-diol. O fungo neste caso hidroxilou na posição 9 e a ligação dupla passou da posição 1-5 para a posição 1-2 da molécula. Comparando os dois resultados, verifica-se que a biotransformação realizada neste trabalho foi mais efectiva.

Quando se incubou o guaiol com o *A. niger* conseguiu-se obter um composto com uma massa de 12,5 mg, de fórmula  $C_{15}H_{26}O_2$  e com um rendimento de 6,25 %. Nesta biotransformação, o fungo apenas hidroxilou a molécula de guaiol na posição 15. O nome do composto obtido é, 11,15-dihidroxiguaien-1(5)-eno. Estes resultados sugerem que a biotransformação com *A. niger* do guaiol é mais selectiva do que quando comparada com a realizada pelo *R. stolonifer*.

Em conclusão, um período de 5 dias de fermentação não será efectivo para a biotransformação do guaiol nas condições experimentais escolhidas. Pois, ou os fungos ainda não conseguiram transformar o guaiol ou os produtos da transformação para este tempo de incubação ainda não possuem massa suficiente para serem caracterizados.

Para 13 dias de transformação obtiveram-se dois produtos, um para cada fungo, e verificou-se que o *A. niger* é mais selectivo na biotransformação do guaiol não o utilizando para o seu metabolismo, ao contrário do verificado para o *R. stolonifer*, pois a percentagem de guaiol recuperada nas biotransformações com o *A. niger* foi superior, o que nos leva a esta conclusão.

Na tabela seguinte está um resumo das biotransformações realizadas neste trabalho.

	5 dias de Biotransformação		13 dias de Biotransformação	
	<i>Rhizopus stolonifer</i>	<i>Aspergillus niger</i>	<i>Rhizopus stolonifer</i>	<i>Aspergillus niger</i>
Mistura depois da extracção (g)	1,670	0,265	1,140	0,228
Produto da Biotransformação (mg)	Não se verificou	Não se verificou	6 (fórmula $C_{15}H_{24}O_2$ )	12,5 (fórmula $C_{15}H_{26}O_2$ )

### Projectos Futuros

É importante continuar com este trabalho para posteriormente se poder testar a actividade dos produtos obtidos.

Penso que também seria interessante testar novos meios de cultura de forma a activar o sistema enzimático dos microrganismos.

Também seria curioso testar outros microrganismos para a biotransformação do guaiol.



## Bibliografia

Ahmed, F.; Williams, R. A. D.; Smith, K. E.; Microbial transformations of steroids-X. Cytochromes P450 11 $\alpha$ -hydroxylase and C17-C20 lyase and a 1-ene dehydrogenase. Transform steroids in *Nectria haematococca*; *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* **58** (1996) 337 - 349.

Al - Aboudi, A.; Mohammad, M. Y. ; Musharraf, S. G.; Choudhary, M. I.; Atta - ur - Rahman; Microbial transformation of testosterone by *Rhizopus stolonifer* and *Fusarium lini*; *Natural Products Research* **22** (2008) 1498 - 1509.

Aranda, G.; Facon, I.; Lallemand, J. Y.; Leclaire, M.; Azerad, R.; Cortes, M.; Lopez, J.; Ramirez, A.; Microbiological hydroxylation in the drimane series; *Tetrahedron Letters* **33** (1992) 7845 - 7848.

Baker, S.; *Aspergillus niger* genomics: Past, present and into the future; *Medical Mycology* **44** (2006) S17 - S21.

Bakkali, F.; Averbeck, S.; Averbeck, D.; Idaomar, M.; Biological effects of essencial oils - A review; *Food and Chemical Toxicology* **46** (2008) 446 - 475.

Brock, T. D.; Michael, M.T.; Martinko, J. M.; Parker, J.; Biology of microorganisms 7<sup>th</sup> edition; *Prentice Hall Internacional* (1994).

Carvalho, C. C. C. R.; Fonseca, M. M. R.; Biotransformations of terpenes; *Biotechnology Advances* **24** (2006) 134 - 142.

Chen, A. R. M.; Reese, P. B.; Biotransformation of terpenes from *Stemodia maritima* by *Aspergillus niger* ATCC 9142; *Phytochemistry* **59** (2002) 57 - 62.

Chen, L.; Qiu, F.; Qu, G. ; Yao, X. ; Microbial transformation of neoandrographolide by *Aspergillus niger* (AS 3.739); *Journal of Asian Natural Products Research* **9** (2007) 463 - 469.

Choudhary, M. I.; Siddiqui, Z. A.; Nawaz, S. A.; Atta-ur-Rahman; Microbial transformation and butyrylcholinesterase innibitory activity of (-)-caryophyllene oxide and its derivatives; *Journal of Natural Products* **69** (2006) 1429 - 1434.



Choudhary, M. I.; Batool, I.; Atif, M.; Hussain, S.; Atta-ur-Rahman; Microbial transformation of (-)-guaiol and antibacterial activity of its transformed products; *Journal of Natural Products* **70** (2007) 849 - 852.

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

Dellacassa, E.; Martínez, N.; Davyt, D.; Castilla, L.; González-Colonea, A.; Giménez, C.; Cabrera, R.; Silva, L.; Rodilla, J. M.; Óleo essencial de Guaiaco: composição e bioactividade; IV Simpósio Brasileiro de óleos essenciais, Fortaleza - Brasil (2007).

El-Sayed, K. A.; Yousaf, M.; Hamann, M. T.; Avery, M. A.; Kelly, M.; Wipf, P.; Microbial and chemical transformation studies of the bioactive marine sesquiterpenes (s)-(+)-curcuphenol and curcudiol isolated from a Deep Reef collection of the Jamaican Sponge *Didiscus Oxeata*; *Journal of Natural Products* **65** (2002) 1547 - 1553.

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

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

Ferreira, W.; Sousa, J. C.; *Microbiologia Vol.2; Lidel* (2000).

Gale, G. A.; Kirtikara, K.; Pittiyakhajonwut, P.; Sivichai, S.; Thebtaranonth, Y.; Thongpanchang, C.; Vichai, V.; In search of cyclooxygenase inhibitors, anti-mycobacterium tuberculosis and ant-malarial drugs from Thai flora and microbes; *Pharmacology & Therapeutics* **115** (2007) 307 - 351.

García - Granados, A.; Fernández, A.; Gutiérrez, M. C.; Martínez, A.; Quirós, R.; Rivas, F.; Arias, J. M.; Biotransformation of ent-6a-acetoxy- and ent-6-ketomanoyl oxides with *Rhizopus nigricans* and *Curvularia lunata* cultures; *Phytochemistry* **45** (1997) 283 - 291.

García - Granados, A.; Gutiérrez, M. C.; Martínez, A.; Rivas, F.; Arias, J. M.; Biotransformation of Shiromool derivatives by *Rhizopus nigricans* cultures: Chemical-microbiological synthesis of michelenolide analogs; *Tetrahedron* **54** (1998) 3311 - 3320.

García - Granados, A.; Gutiérrez, M. C.; Rivas, F.; Improved microbial hydroxylation of sesquiterpenoids: semisynthesis, structural determination and biotransformation studies of cyclic sulfite eudesmane derivatives; *Organic Biomolecular Chemistry* **1** (2003) 2314 - 2320.

García - Granados, A.; Fernández, A.; Gutiérrez, M. C.; Martínez, A.; Quirós, R.; Rivas, F.; Arias, J. M.; Biotransformation of ent-13-epi-manoyl oxides difunctionalized at C-3 and C-12 by filamentous fungi; *Phytochemistry* **65** (2004) 107 - 115.

García - Granados, A.; Rivas, F.; Martínez, A.; Parra, A.: Biotransformations of Sesquiterpenoids by *Rhizopus* Species; *Current Organic Chemistry* **13** (2009) 1182 - 1193.

Ghoumari, H.; Benajiba, M.; García - Granados, A.; Fernández, A.; Martínez, A.; Rivas, F.; Arias, J. M.; Biotransformations of ent-18-acetoxy-6-ketomanoyl oxides epímeros at C-13 with filamentous fungi; *Phytochemistry* **67** (2006) 2294 - 2302.

Haridy, M. S. A.; Ahmed, A. A.; Doe, M.; Microbial transformation of two labdane diterpenos, the main constituents of *Madia species*, by two fungi; *Phytochemistry* **67** (2006) 1455 - 1459.

Hashimoto, T.; Noma, Y.; Asakawa, Y.; Biotransformation of terpenoids from the crude drugs and animal origin by microorganisms; *Heterocycles* **54** (2001) 529 - 559.

He, X.; Zeng, X.; Hu, H.; Wu, Y.; Cytotoxic biotransformed products from andrographolide by *Rhizopus stolonifer* ATCC 12939; *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **62** (2010) 242 - 247.

Ishida, T.; Biotransformation of Terpenoids by Mammals, Microorganisms, and Plant - Cultured Cells; *Chemistry and Biodiversity* **2** (2005) 569 - 590.

Karthikayan, A.; Sivakumar, N.; Citric Acid production by koji fermentation using banana peel as a novel substrate; *Bioresource Technology* **101** (2010) 5552 - 5556.

Krings, U.; Berger, R.; Terpene Bioconversion - How does its future look?; *Natural Product Communications* **5** (2010) 1507 - 1522.

Lahou, E.; Noma, Y.; Hashimoto, T.; Asakawa, Y.; Microbial transformation of dehydropinguisenol by *Aspergillus* sp.; *Phytochemistry* **54** (2000) 455 - 460.

Lamb, D. C.; Waterman, M. R.; Kelly, S. L.; Guengerich, F. P.; Cytochrome P450 and drug discovery; *Current Opinion in Biotechnology* **18** (2007) 504 - 512.

Lamm, A. S.; Chen, A. R. M.; Reynolds, W. F.; Reese, P. B.; Fungal hydroxylation of (-)-santonin and its analogues; *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **59** (2009) 292 - 296.

Lederberg, J.; Encyclopedia of Microbiology, Vol.2 - Edition-in-chief, The Rockefeller University New-York; *Academic Press* (2000).

Lisowska, K.; Szemraj, J.; Różalska, S.; Długoński, J.; The expression of cytochrome P-450 and cytochrome P-450 reductase genes in the simultaneous transformation of corticosteroids and phenanthrene by *Cunninghamella elegans*; *FEMS Microbiology Letters* **261** (2006) 175 - 180.

Lobo, A. M.; Lourenço, A. M.; Biossíntese de produtos naturais; *Ensino da Ciência e da Tecnologia*; Lisboa (2007).

Makovec, T.; Breskvar, K.; Purification and characterization of NADPH - Cytochrome P450 reductase from filamentous fungus *Rhizopus nigricans*; *Archives of Biochemistry and Biophysics* **357** (1998) 310 - 316.

Makovec, T.; Breskvar, K.; Catalytic and immunochemical properties of NADPH - Cytochrome P450 reductase from fungus *Rhizopus nigricans*; *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology* **82** (2002) 89 - 96.

Marquina, S.; Parra, J. L.; Gonzáles, M.; Zamilpa, A.; Escalante, J.; Trejo - Hernández, M. R.; Álvarez, L.; Hydroxylation of the diterpenes ent-kaur-16-en-19-oic and ent-beyer-15-en-19-oic acids by the fungus *Aspergillus niger*; *Phytochemistry* **70** (2009) 2017 - 2022.

Martin, G. D. A.; Reynolds, W. F.; Reese, P. B.; Investigation of the importance of the C-2 and C-13 oxygen functions in the transformation of stemodin analogues by *Rhizopus oryzae* ATCC 11145; *Phytochemistry* **65** (2004) 2211 - 2217.

Martin, G. D. A.; Durrant, M. C.; Reese, P. B.; A predictive cytochrome P450 Monooxygenase functional model for generic hydroxylation by *Rhizopus oryzae* ATCC 11145; *Journal of Theoretical and Computational Chemistry* **7** (2008) 421 - 433.

Martin, G. D. A.; Biotransformation reactions by *Rhizopus spp.*; *Current Organic Chemistry* **14** (2010) 1 - 14.

Muffler, K.; Leipold, D.; Scheller, M.; Hass, C.; Steingroewer, J.; Bley, T.; Neuhaus, H. E.; Mirata, M. A.; Schrader, J.; Ulber, R.; Biotransformation of triterpenes; *Process Biochemistry* **46** (2011) 1 - 15.

Noma, Y.; Hashimoto, T.; Uehara, S.; Asakawa, Y.; Microbial transformation of isopinocampheol and caryophyllene oxide; *Flavour and Fragrance Journal* **25** (2010) 161 - 170.

Oliveira, B. H.; Santos, M. C.; Leal, P. C.; Biotransformation of the diterpenoid isosteviol by *Aspergillus niger*, *Penicillium chrysogenum* and *Rhizopus arrhizus*; *Phytochemistry* **51** (1999) 737 - 741.

Paulino, C.; Biotransformações em Produtos Naturais; *Projecto de Licenciatura em Química Industrial - Departamento de Química da Universidade da Beira Interior* (2003).

Pelczar, M. J.; Cham, E. C. S.; Krieg, N. R.; Microbiology: concepts and application; *Mc-Graw Hill* (1993).

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

Quintas, A.; Freire, A. P.; Halpern, M. J.; Bioquímica - Organização Molecular da Vida; *Lidel* (2008).

Rodilla, J. M.; Silva, L. A.; Martínez, N.; Lorenzo, D.; Davyt, D.; Castillo, L.; Giménez, C.; Cabrera, R.; González - Coloma, A.; Zrostliková, J.; Dellacassa, E.; Advances in the identification and agrochemical importance of sesquiterpenoids from *Bulnesia sarmientoi* essential oil; *Industrial Crops and Products* **33** (2011) 497 - 503.

Tortora, G. J.; Funke, C. L.; Casf, C. L.; Microbiologia 6<sup>a</sup> edição; *Artmed* (2000).

Winkelmann, G.; Microbial degradation of Natural Products; *VCH Publishers* (1992).

## Apêndice A

Tabelas com massas das variadas fracções obtidas das colunas cromatográficas das misturas das biotransformações com os dois fungos

Tabela 19 - Fracções obtidas da coluna cromatográfica da mistura da biotransformação a 13 dias com *Rhizopus stolonifer*.

Balão	Fracções	Eluente	Massa produto (mg)
1	1-14	Hex; Hex:AcOEt 98:2	6,1
2	15-17	Hex:AcOEt 90:10	54,4
3	18-21	Hex:AcOEt 85:15	3,5
4	22-26	Hex:AcOEt 85:15/80:20	3,3
5	27	Hex:AcOEt 80:20	4
6	28	Hex:AcOEt 80:20	5,6
7	29-32	Hex:AcOEt 80:20	48
8	33-34	Hex:AcOEt 80:20/ 70:30	21,1
9	35-40	Hex:AcOEt 70:30	23
10	41-44	Hex:AcOEt 70:30/ 60:40	5,8
11	45-49	Hex:AcOEt 60:40	6
12	50-53	Hex:AcOEt 60:40/ 50:50	4
13	54-55	Hex:AcOEt 50:50	2,7
14	56-59	Hex:AcOEt 50:50	3
15	60-65	AcOEt	7
16	66-68	AcOEt	5,5
17	69	AcOEt	8
18	70-72	AcOEt:MeOH 90:10	311
19	73-75	AcOE:MeOH 90:10	104
20	76-77	AcOEt:MeOH 90:10	19
21	78-81	AcOEt:MeOH 90:10	22
22	82-85	MeOH	63
23	86-88	MeOH	18
24	89	MeOH	110
25	90	MeOH	99,1
26	91-110	MeOH	360

**Tabela 20** - Fracções obtidas da coluna cromatográfica da mistura da biotransformação a 5 dias com *Rhizopus stolonifer*.

Balão	Fracções	Eluente	Massa produto (mg)
1	1-28	Hex; Hex:AcOEt 98:2/90:10	3
2	29-33	Hex:AcOEt 85:15	4
3	34-37	Hex:AcOEt 80:20	1,3
4	38-40	Hex:AcOEt 80:20	0
5	41	Hex:AcOEt 80:20	2
6	42-49	Hex:AcOEt 80:20	49,7
7	50-52	Hex:AcOEt 70:30	1,7
8	53-58	Hex:AcOEt 70:30	3
9	59-65	Hex:AcOEt 60:40	3,4
10	66	Hex:AcOEt 60:40	1,4
11	67-71	Hex:AcOEt 60:40/ 50:50	4
12	72-74	Hex:AcOEt 50:50	3
13	75-82	Hex:AcOEt 50:50/ AcOEt	8
14	83-87	AcOEt	4
15	88-90	AcOEt	2,6
16	91-96	AcOEt	5,4
17	97-99	AcOEt:MeOH 90:10	6
18	100-101	AcOEt:MeOH 90:10	154
19	102-105	AcOEt:MeOH 90:10	973
20	106-108	AcOEt:MeOH 90:10	181
21	109-111	AcOEt:MeOH 90:10	39
22	112-114	MeOH	21
23	115-119	MeOH	51
24	120-123	MeOH	19
25	124-125	MeOH	111
26	126-132	MeOH	145

Tabela 21 - Fracções obtidas da coluna cromatográfica da biotransformação com *Aspergillus niger* durante 5 dias.

Balão	Fracções	Eluente	Massa produto (mg)
1	1-27	Hex; Hex:AcOEt 98:2/90:10	5
2	28-31	Hex:AcOEt 85:15	2
3	32-34	Hex:AcOEt 80:20	0
4	35-39	Hex:AcOEt 80:20	1
5	40	Hex:AcOEt 80:20	0
6	41-46	Hex:AcOEt 80:20	37
7	47-50	Hex:AcOEt 80:20	1,6
8	51-53	Hex:AcOEt 70:30	1
9	54-55	Hex:AcOEt 70:30	0
10	56-59	Hex:AcOEt 70:30/60:40	0
11	60-63	Hex:AcOEt 60:40	0
12	64-65	Hex:AcOEt 60:40	1
13	66-71	Hex:AcOEt 60:40/ 50:50	2
14	72-75	Hex:AcOEt 50:50	1
15	76-79	Hex:AcOEt 50:50	6,7
16	80-81	AcOEt	2
17	82-84	AcOEt	2,9
18	85-91	AcOEt	3
19	92-95	AcOEt:MeOH 90:10	5
20	96-98	AcOEt:MeOH 90:10	5
21	99-100	AcOEt:MeOH 90:10	3
22	101-104	AcOEt:MeOH 90:10	3,3
23	105-108	MeOH	8,9
24	109	MeOH	3,6
25	110-114	MeOH	12,2
26	115-118	MeOH	4,6
27	119-122	MeOH	77
28	122-130	MeOH	81

Tabela 22 - Fracções obtidas da coluna cromatográfica da biotransformação com *Aspergillus niger* durante 13 dias.

Balão	Fracções	Eluente	Massa produto (mg)
1	1-31	Hex; Hex:AcOEt 98:2/90:10	4
2	32-37	Hex:AcOEt 85:15	5
3	38-40	Hex:AcOEt 85:15	0
4	41-45	Hex:AcOEt 85:15/ 80:20	0
5	46-49	Hex:AcOEt 80:20	83
6	50-56	Hex:AcOEt 80:20	53
7	57-60	Hex:AcOEt 80:20/ 70:30	0
8	61-74	Hex:AcOEt 70:30/ 60:40	3
9	75-89	Hex:AcOEt 60:40/ 50:50	3
10	90-93	Hex:AcOEt 50:50	2
11	94-98	AcOEt	1,5
12	99-103	AcOEt	1,5
13	104-118	AcOEt/ AcOEt:MeOH 90:10	12,5
14	119-121	MeOH	1
15	122-123	MeOH	3,8
16	124-127	MeOH	4,4
17	128	MeOH	37
18	129-136	MeOH	54

# Apêndice B

## Espectros de <sup>13</sup>C-RMN e de <sup>1</sup>H-RMN para as amostras resultantes das Biotransformações

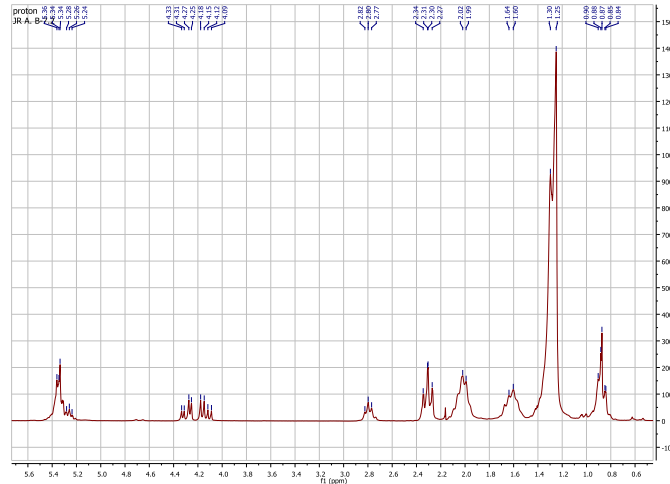


Ilustração 1 - Espectro de <sup>1</sup>H-RMN da amostra 7.2, resultante da biotransformação com *R. stolonifer* durante 13 dias.

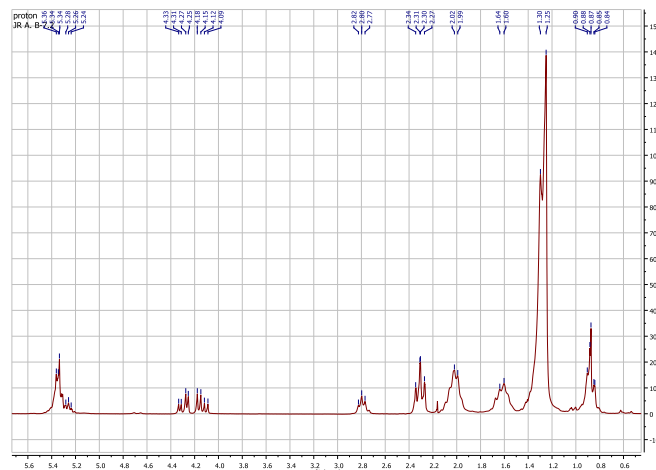


Ilustração 2 - Espectro de <sup>1</sup>H-RMN da amostra 7.7, resultante da biotransformação com *R. stolonifer* durante 13 dias.

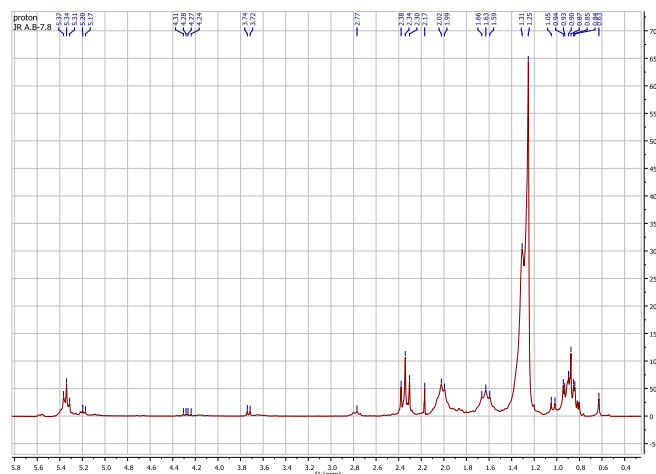


Ilustração 3 - Espectro de <sup>1</sup>H-RMN da amostra 7.8, resultante da biotransformação com *R. stolonifer* durante 13 dias.



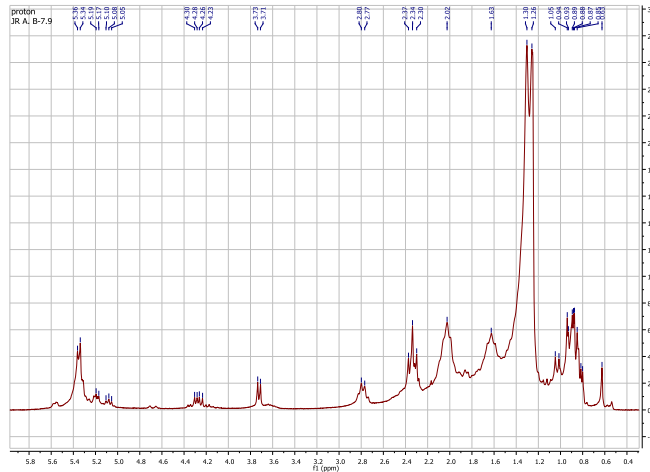


Ilustração 4 - Espectro de  $^1\text{H}$ -RMN da amostra 7.9, resultante da biotransformação com *R. stolonifer* durante 13 dias.

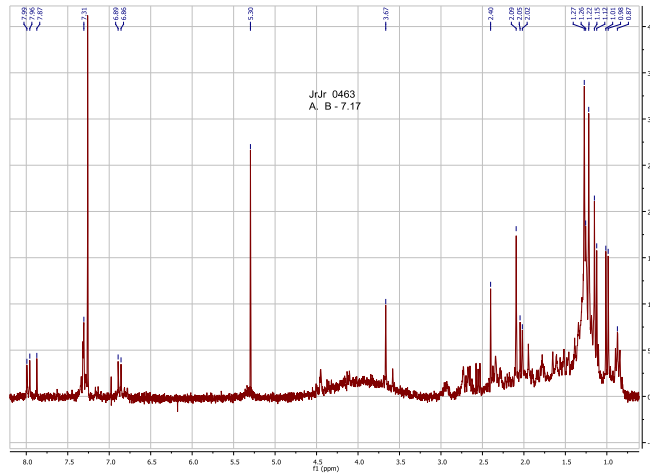


Ilustração 5 - Espectro de  $^1\text{H}$ -RMN da amostra 7.17, resultante da biotransformação com *R. stolonifer* durante 13 dias.

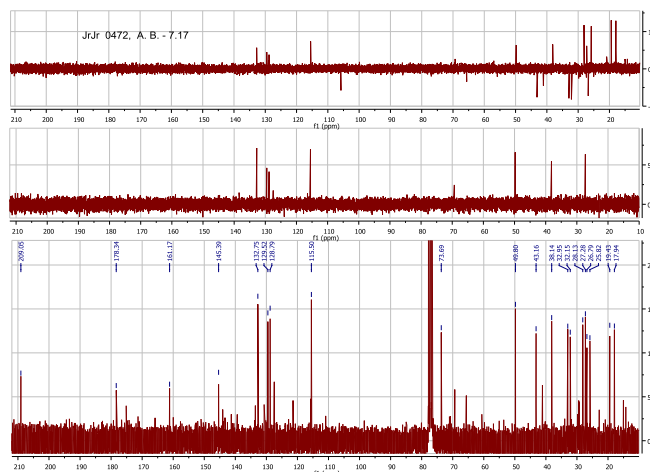


Ilustração 6 - Espectro de  $^{13}\text{C}$ -RMN da amostra 7.17, resultante da biotransformação com *R. stolonifer* durante 13 dias.

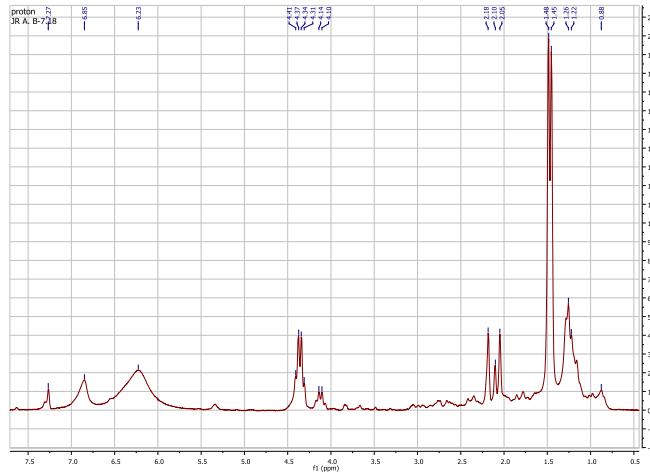


Ilustração 7 - Espectro de  $^1\text{H}$ -RMN da amostra 7.18, resultante da biotransformação com *R. stolonifer* durante 13 dias.

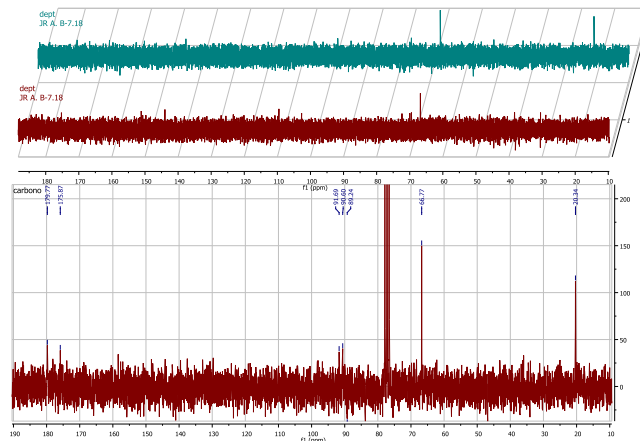


Ilustração 8 - Espectro de  $^{13}\text{C}$ -RMN da amostra 7.18, resultante da biotransformação com *R. stolonifer* durante 13 dias.

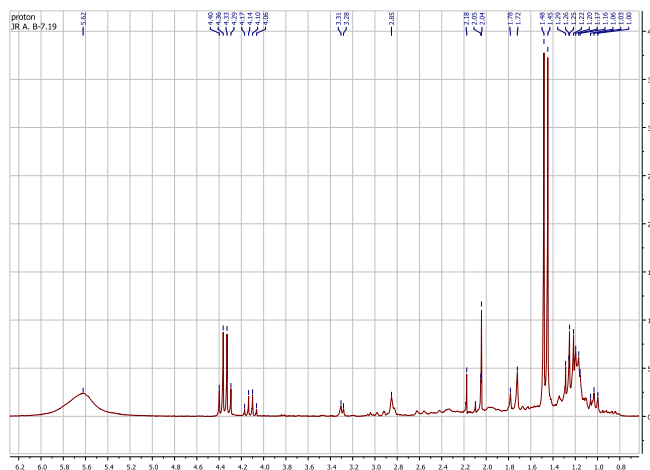


Ilustração 9 - Espectro de  $^1\text{H}$ -RMN da amostra 7.19, resultante da biotransformação com *R. stolonifer* durante 13 dias.

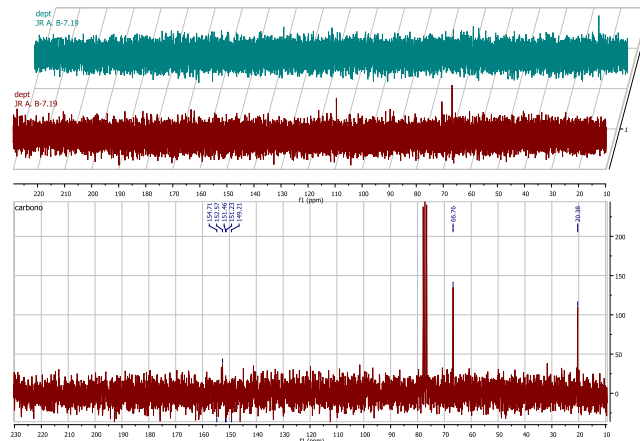


Ilustração 10 - Espectro de  $^{13}\text{C}$ -RMN da amostra 7.19, resultante da biotransformação com *R. stolonifer* durante 13 dias.

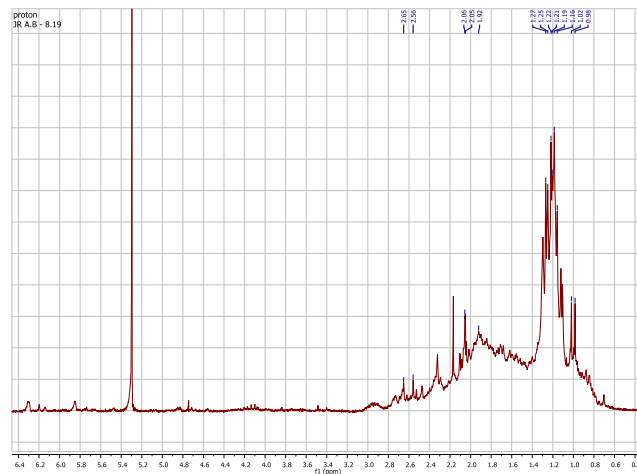


Ilustração 11 - Espectro de  $^1\text{H}$ -RMN da amostra 8.19, resultante da biotransformação com *R. stolonifer* durante 5 dias.

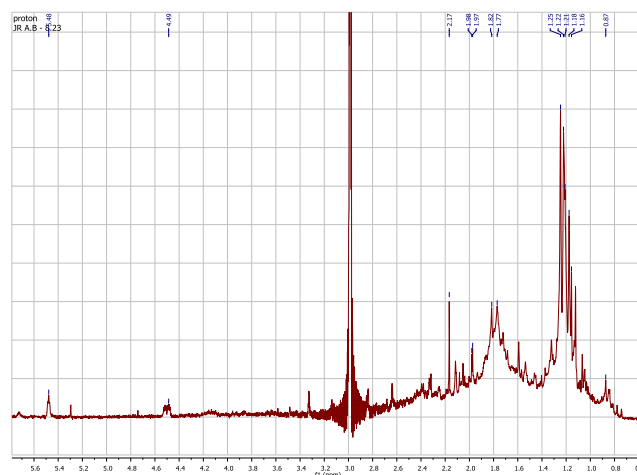


Ilustração 12 - Espectro de  $^1\text{H}$ -RMN da amostra 8.23, resultante da biotransformação com *R. stolonifer* durante 5 dias.

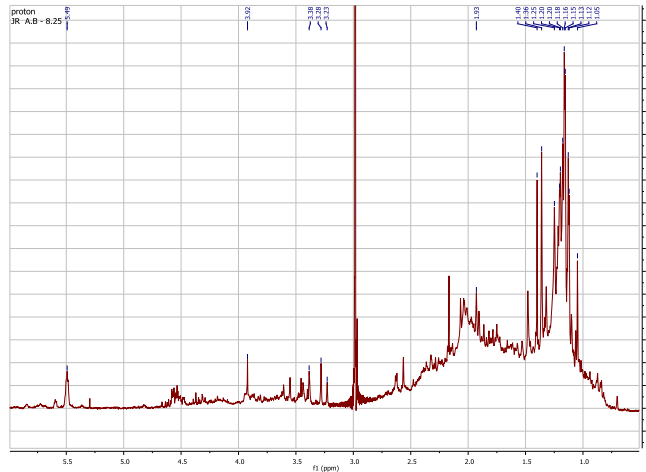


Ilustração 13 - Espectro de  $^1\text{H}$ -RMN da amostra 8.25, resultante da biotransformação com *R. stolonifer* durante 5 dias.

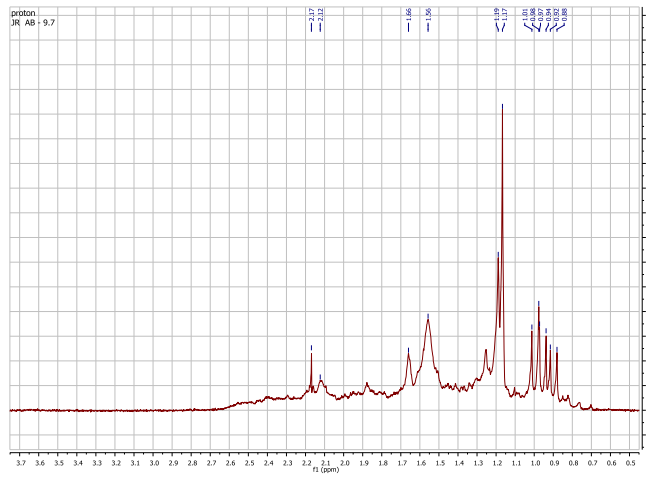


Ilustração 14 - Espectro de  $^1\text{H}$ -RMN da amostra 9.7, resultante da biotransformação com *A. niger* durante 5 dias.

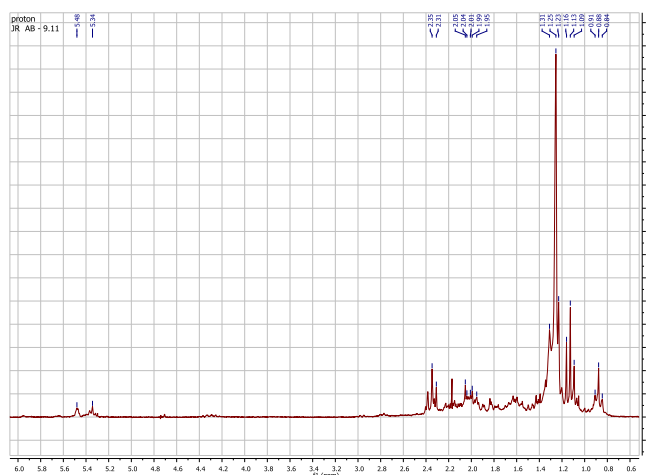


Ilustração 15 - Espectro de  $^1\text{H}$ -RMN da amostra 9.11, resultante da biotransformação com *A. niger* durante 5 dias.



