

Universidade Federal de Minas Gerais  
Instituto de Ciências Exatas  
Departamento de Química

Giovanni Gontijo de Souza

Estudo da Incubação da Canforquinona e do  
Fujenal com Fungos como Modelo para  
Biotransformação de Terpenos

Belo Horizonte

2008

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

GIOVANNI GONTIJO DE SOUZA

ESTUDO DA INCUBAÇÃO DA CANFORQUINONA E DO FUJENAL COM FUNGOS  
COMO MODELO PARA BIOTRANSFORMAÇÃO DE TERPENOS

GIOVANNI GONTIJO DE SOUZA

**ESTUDO DA INCUBAÇÃO DA  
CANFORQUINONA E DO FUJENAL COM  
FUNGOS COMO MODELO PARA  
BIOTRANSFORMAÇÃO DE TERPENOS**

Dissertação apresentada ao Instituto de Ciências Exatas da Universidade Federal de Minas Gerais como parte dos requisitos necessários para obtenção do grau de Mestre em Química – Química Orgânica.

Orientadora: Professora Jacqueline Aparecida Takahashi

**Belo Horizonte**

**2008**

S729e Souza, Giovanni Gontijo de  
2008 Estudo da incubação da canforquinona e do fujenal  
D como modelo para biotransformação de terpenos./  
Giovanni Gontijo de Souza. 2008.

xvi, 139 p.: il.

Orientadora: Jacqueline Aparecida Takahashi.

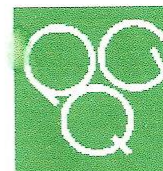
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de  
Minas Gerais. Departamento de Química.

1. Química Orgânica- Teses 2. Terpenos -  
Biotransformação - Teses I. Takahashi, Jacqueline  
Aparecida, Orientadora II. Título.

CDU:043



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA - ICEX  
31270-901 - BELO HORIZONTE - MG  
TEL.: 031 - 3409-5732  
FAX: 031 - 3409-5700  
E-MAIL: pgquimic@zeus.qui.ufmg.br



**"Estudo da Incubação da Canforquinona e do Fujenal com Fungos como  
Modelo para Biotransformação de Terpenos"**

**Giovanni Gontijo de Souza**

Dissertação aprovada pela banca examinadora constituída pelos Professores:

Profª. Dra. Jacqueline Aparecida Takahashi - Orientadora  
UFMG

Profª. Dra. Lucienir Pains Duarte  
UFMG

Prof. Dr. Fernando Carazza  
UFMG

Belo Horizonte, 20 de fevereiro de 2008.

**Estudo da incubação da canforquinona e do fujenal com  
fungos como modelo para biotransformação de terpenos**

**Giovanni Gontijo de Souza**

# AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por guiar a minha vida sempre com as melhores oportunidades e por iluminar sempre os meus caminhos, me dando a força necessária em qualquer situação, para vencer todos os obstáculos necessários ao meu crescimento.

Agradeço à minha família, essas pessoas que sem dúvida estão sempre perto de Deus, sem os quais eu nunca conseguiria vencer, pelo apoio, carinho e amor incondicionais, e por estarem sempre do meu lado, em todos os momentos.

Agradeço à minha Thays, pelo apoio, amizade, carinho e respeito irrestritos, e por me dar todo o amor que ela, meu anjo, possui. Agradeço também à sua família, pela amizade, respeito e confiança em mim e nos meus estudos.

Agradeço à professora Jacqueline, pela oportunidade, pelos ensinamentos, pela paciência e por confiar em meu trabalho.

Agradeço aos meus amigos e amigas, dentro e fora da faculdade, músicos, químicos, amigos de infância, amigos ao longo da vida, etc., por que os amigos são sempre insubstituíveis.



# SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS.....	v
LISTA DE FIGURAS.....	vi
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xii
RESUMO.....	xiii
ABSTRACT.....	xv
Capítulo 1 .....	17
1 INTRODUÇÃO .....	18
Capítulo 2 .....	46
2 OBJETIVOS .....	47
Capítulo 3 .....	48
3 PARTE EXPERIMENTAL.....	49
3.1 Equipamentos.....	49
3.2 Reagentes .....	51
3.3 Biotransformação da 1 <i>R</i> -(-)-canforquinona (44).....	51
3.3.1 Repique dos fungos.....	51
3.3.2 Cultivo dos fungos em meio líquido.....	52
3.3.3 Inoculação da 1 <i>R</i> -(-)-canforquinona.....	53
3.3.4 Extrações.....	54
3.4 Biotransformação do fujenal (94).....	54
3.4.1 Repique do fungo .....	54
3.4.2 Cultivo do fungo em meio líquido .....	55
3.4.3 Inoculação do fujenal.....	55
3.4.4 Extração .....	55
3.4.5 Fracionamento do material obtido na biotransformação do fujenal .....	56
Capítulo 4 .....	59
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	60
4.1 Análise cromatográfica e espectrométrica da Biotransformação da Canforquinona.....	60
4.1.1 Cromatogramas obtidos por cromatografia gasosa na biotransformação da canforquinona.....	61

4.1.2	Análise dos cromatogramas obtidos por cromatografia gasosa para a biotransformação da canforquinona .....	61
4.1.2.1	Análise dos cromatogramas obtidos na biotransformação da canforquinona por <i>Mucor plumbeus</i> .....	62
4.1.2.2	Análise dos cromatogramas obtidos na biotransformação da canforquinona por <i>Thamnostylum</i> sp. ....	63
4.1.2.3	Análise dos cromatogramas obtidos na biotransformação da canforquinona por <i>Lecanicillium muscarium</i> .....	64
4.1.2.4	Análise dos cromatogramas obtidos na biotransformação da canforquinona por <i>Syncephalastrum verruculosum</i> .....	65
4.1.3	Análise por CG-EM de amostras selecionadas da biotransformação da canforquinona.....	65
4.1.3.1	Cromatogramas e espectros de massas obtidos na biotransformação da canforquinona.....	66
4.1.3.2	Proposta de fragmentação da canforquinona no espectro de massas.....	70
4.1.3.3	Controle negativo .....	71
4.1.3.4	Meios de reação .....	73
4.2	Cálculos teóricos para a obtenção das populações dos possíveis produtos de redução da 1 <i>R</i> -(-)-canforquinona .....	77
4.3	Biotransformação do fujenal.....	81
4.3.1	Caracterização do fujenal e dos produtos da sua biotransformação por <i>Thamnostylum</i> sp. ....	82
4.3.1.1	Elucidação estrutural do fujenal.....	82
4.3.1.2	Tentativa de elucidação estrutural dos produtos da biotransformação do fujenal pelo fungo <i>Thamnostylum</i> sp. ....	92
Capítulo 5	.....	116
5	CONCLUSÕES .....	117
Capítulo 6	.....	118
6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	119
Anexo	- Cromatogramas obtidos por cromatografia gasosa na biotransformação da canforquinona.....	129

# LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Códigos dos substratos e produtos de redução mencionados neste trabalho.....	30
Tabela 2 - Produtos de redução e seus respectivos rendimentos obtidos a partir da biotransformação da canforquinona por vários organismos .....	30
Tabela 3 - Combinações e respectivas massas das frações obtidas da coluna cromatográfica do extrato obtido da biotransformação do fujenal por <i>Thamnostylum sp.</i> .....	56
Tabela 4 - Códigos das amostras dos experimentos de biotransformação da canforquinona.....	60
Tabela 5 - Quantidades percentuais dos monocetoálcoois obtidos como produtos da biotransformação da 1 <i>R</i> -(-)-canforquinona com diversos organismos .....	78
Tabela 6 - Energia livre de Gibbs relativa em fase gasosa ( $\Delta G$ ) e em solução ( $\Delta G_{sol}$ ), em Kcal.mol <sup>-1</sup> , e população da mistura dos quatro cetoálcoois, a T=298,15K e p=1atm. ....	80
Tabela 7 - Dados de RMN de <sup>1</sup> H e de <sup>13</sup> C encontrados para o fujenal em CDCl <sub>3</sub> . ....	83
Tabela 8 - Dados de RMN de <sup>1</sup> H e de <sup>13</sup> C encontrados para o produto F1 de biotransfomação do fujenal com o fungo <i>Thamnostylum sp.</i> em CDCl <sub>3</sub> .....	96
Tabela 9 - Dados de RMN de <sup>1</sup> H e de <sup>13</sup> C encontrados para o segundo produto de biotransfomação do fujenal com o fungo <i>Thamnostylum sp.</i> em CDCl <sub>3</sub> .....	110

# LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> – Esquema da conversão do (RS) borneol com o fungo <i>Nicotiana tabacum</i> .....	18
<b>Figura 2</b> – Esquema da reação de biotransformação da morfina ( <b>5</b> ) com o fungo <i>Cylindrocarpon didymum</i> .....	19
<b>Figura 3</b> – Esquema da síntese do Diltiazem ( <b>15</b> ), utilizando lipase de <i>Candida cylindracea</i> na etapa inicial, em uma resolução enantiomérica do material de partida.....	21
<b>Figura 4</b> – Esquema da síntese da L-Dopa ( <b>17</b> ) utilizando-se a enzima $\beta$ -tirosinase de <i>Erwinia herbicola</i> .....	22
<b>Figura 5</b> – Esquema da reação de biotransformação da R(-)-carvona ( <b>18</b> ) com o fungo <i>Trichosporum cutaneum</i> .....	23
<b>Figura 6</b> – Estruturas dos produtos da reação de biotransformação do esteviol ( <b>23</b> ) com os microrganismos <i>Bacillus megaterium</i> ( <b>24-28</b> ), <i>Mucor recurveratus</i> ( <b>24-28</b> ) e <i>Aspergillus niger</i> ( <b>24-28</b> ).....	24
<b>Figura 7</b> – Seqüência de hidroxilações a partir do intermediário <b>29</b> na biossíntese da afidicolina ( <b>32</b> ) determinada por Takahashi e colaboradores (1994).....	25
<b>Figura 8</b> – Estruturas dos produtos ( <b>34-37</b> ) obtidos a partir da biotransformação do caurano <b>33</b> pelo fungo <i>Lecanicillium muscarium</i> .....	26
<b>Figura 9</b> – Tipos e porcentagens de biocatalisadores utilizados para a biotransformação de terpenos em artigos publicados entre 1995 e 2005 [de Carvalho e da Fonseca, 2006].....	27
<b>Figura 10</b> – Estrutura dos produtos de redução obtidos a partir da (+)-canforquinona e da (-)-canforquinona.....	29
<b>Figura 11</b> - Estruturas dos produtos de biotransformação da ribenona ( <b>50</b> ) com o fungo <i>Mucor plumbeus</i> .....	32
<b>Figura 12</b> – Estruturas dos produtos de biotransformação do 11-hidroxi-1-oxo-4 $\alpha$ ,5 $\alpha$ ,7 $\beta$ ,10 $\beta$ -eremofilano ( <b>53</b> ) utilizando-se o fungo <i>Mucor plumbeus</i> .....	33
<b>Figura 13</b> – Esquema da biotransformação dos esteróides <b>56</b> , <b>59</b> e <b>61</b> com o fungo <i>Mucor plumbeus</i> .....	34

<b>Figura 14</b> – Esquema da reação de biotransformação do composto (63) levando ao CP – 336,156 (64) com o fungo <i>Thamnostylum piriforme</i> .....	36
<b>Figura 15</b> – Esquema da reação de biotransformação da progesterona (65) com o fungo <i>Thamnostylum piriforme</i> .....	36
<b>Figura 16</b> – Estruturas da reação de biotransformação do metalaxil (68) com o fungo <i>Syncephalastrum racemosum</i> .....	38
<b>Figura 17</b> – Estruturas dos diterpenos tri-epoxidados (73 e 74) isolados de <i>Tripterygium wilfordii</i> .....	39
<b>Figura 18</b> – Esquema da reação de biotransformação de 75 com o fungo <i>Syncephalastrum racemosum</i> .....	40
<b>Figura 19</b> – Esquema da reação de biotransformação do olivetol (80) com o fungo <i>Syncephalastrum racemosum</i> .....	41
<b>Figura 20</b> – Estrutura do 19-traquilobanoato de metila (84) utilizado no trabalho de Takahashi e colaboradores (2000).....	42
<b>Figura 21</b> – Esquema da reação de biotransformação do (1R,2S,5R)-(-)-mentol (85) com o fungo <i>Cephalosporium aphidicola</i> .....	42
<b>Figura 22</b> – Esquema da reação de biotransformação do diisoporano racêmico (92) com o fungo <i>Cephalosporium aphidicola</i> e <i>Neurospora crassa</i> .....	43
<b>Figura 23</b> – Estrutura do diterpeno fujenal (94).....	43
<b>Figura 24</b> – Biossíntese do fujenal (94).....	44
<b>Figura 25</b> – Esquemas das reações de biotransformação de ent-caurenos (101-105) com o fungo <i>Gibberella fujikuroi</i> .....	45
<b>Figura 26</b> – Porcentagens de canforquinona e dos produtos derivados da sua biotransformação com o fungo <i>Mucor plumbeus</i> .....	62
<b>Figura 27</b> – Porcentagens dos produtos derivados da biotransformação da canforquinona com o fungo <i>Thamnostylum sp.</i> .....	63
<b>Figura 28</b> – Porcentagens de canforquinona e dos produtos derivados da sua biotransformação com o fungo <i>Lecanicillium muscarium</i> .....	64
<b>Figura 29</b> – Porcentagens de canforquinona durante a sua biotransformação com o fungo <i>Syncephalastrum racemosum</i> .....	65
<b>Figura 30</b> – Espectro de massas da 1R-(-)-canforquinona .....	67
<b>Figura 31</b> – Espectro de massas da amostra obtida com 15 dias de reação da canforquinona com o fungo <i>Mucor plumbeus</i> (Q21).....	67

<b>Figura 32</b> – Espectro de massas da amostra obtida com 20 dias de reação da canforquinona com o fungo <i>Mucor plumbeus</i> (Q31).....	68
<b>Figura 33</b> – Espectro de massas da amostra obtida com 20 dias de reação da canforquinona com o fungo <i>Thamnostylum sp.</i> (Q13).....	68
<b>Figura 34</b> – Espectro de massas da amostra obtida com 15 dias de reação da canforquinona com o fungo <i>Lecanicillium muscarium</i> (Q28). ....	68
<b>Figura 35</b> – Espectro de massas da amostra obtida com 20 dias como controle negativo para a reação da canforquinona com o fungo <i>Lecanicillium muscarium</i> (Q37). ....	69
<b>Figura 36</b> – Estruturas propostas para a fragmentação da canforquinona .....	70
<b>Figura 37</b> – Comparação entre os cromatogramas das amostras Q17, Q31 e da canforquinona.....	71
<b>Figura 38</b> – Comparação entre os cromatogramas das amostras Q17, Q37 e da canforquinona.....	72
<b>Figura 39</b> – Comparação entre os cromatogramas das alíquotas Q1, Q31 e da canforquinona.....	74
<b>Figura 40</b> – Comparação entre os cromatogramas das amostras Q17, Q11, Q31 e da canforquinona.....	75
<b>Figura 41</b> - Comparação entre os cromatogramas das amostras Q1, Q11, Q21, Q31 e da canforquinona.....	76
<b>Figura 42</b> – Estruturas dos cetoálcoois possíveis de serem obtidos a partir da 1R(-)-canforquinona ( <b>44</b> ).....	77
<b>Figura 43</b> – Gráfico dos valores relativos das energias livres de Gibbs em fase gasosa e em solução aquosa obtidos pelos cálculos teóricos feitos com os quatro produtos, no nível MP2/6-31G(d,p). ....	80
<b>Figura 44</b> – Estrutura do caurenol ( <b>115</b> ) e da estigmastadienona ( <b>116</b> ).....	82
<b>Figura 45</b> – Algumas correlações do fujenal ( <b>94</b> ) nos mapas de contornos de HMBC..	84
<b>Figura 46</b> – Espectro de RMN de <sup>1</sup> H do fujenal ( <b>94</b> ) (CDCl <sub>3</sub> , 400 MHz) .....	85
<b>Figura 47</b> – Ampliação do espectro de RMN de <sup>1</sup> H do fujenal ( <b>94</b> ) na região entre δ 0,8 e 3,0 (CDCl <sub>3</sub> , 400 MHz) .....	86
<b>Figura 48</b> – Espectro de RMN de <sup>13</sup> C do fujenal ( <b>94</b> ) (CDCl <sub>3</sub> , 100 MHz).....	87
<b>Figura 49</b> – Ampliação do subespectro DEPT-135 do fujenal ( <b>94</b> ) (CDCl <sub>3</sub> , 400 MHz)...	

.....	88
<b>Figura 50</b> – Expansão do mapa de contornos HMBC do fujenal ( <b>94</b> ).....	89
<b>Figura 51</b> – Expansão do mapa de contornos HMBC do fujenal ( <b>94</b> ).....	90
<b>Figura 52</b> – Expansão do mapa de contornos HMBC do fujenal ( <b>94</b> ).....	91
<b>Figura 53</b> – Estrutura da molécula de glicose no produto F1 e respectivos deslocamentos químicos ( <b>118</b> ).....	93
<b>Figura 54</b> – Propostas estruturais para o produto F1 da biotransformação do fujenal por <i>Thamnostylum sp.</i> ....	94
<b>Figura 55</b> – Propostas estruturais para o produto F1 ( <b>121</b> e <b>122</b> ) da biotransformação do fujenal por <i>Thamnostylum sp.</i> .....	95
<b>Figura 56</b> – Espectro de RMN de $^1\text{H}$ do produto F1 ( <b>122</b> ) ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz).....	97
<b>Figura 57</b> – Ampliação do espectro de RMN de $^1\text{H}$ do produto F1 ( <b>122</b> ), na região entre $\delta$ 0,6 e 2,5 ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz) .....	98
<b>Figura 58</b> – Ampliação do espectro de RMN de $^1\text{H}$ do produto F1 ( <b>122</b> ), na região entre $\delta$ 2,6 e 5,5 ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz) .....	99
<b>Figura 59</b> – Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ do produto F1 ( <b>122</b> ) ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz) .....	100
.....	100
<b>Figura 60</b> – Ampliação do espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ do produto F1 ( <b>122</b> ), na região entre $\delta$ 14,0 e 56,0 ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz) .....	101
<b>Figura 61</b> – Subespectro DEPT-135 do produto F1 ( <b>122</b> ), na região entre $\delta$ 0,0 e 105,0 ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz).....	102
<b>Figura 62</b> – Mapa de contornos HMQC do produto F1 ( <b>122</b> ).....	103
<b>Figura 63</b> – Ampliação do mapa de contornos HMQC do produto F1 ( <b>122</b> ), na região entre $\delta$ 0,0 e 3,25 e $\delta$ 10 e 60 .....	104
<b>Figura 64</b> – Ampliação do mapa de contornos HMQC do produto F1 ( <b>122</b> ), na região entre $\delta$ 3,0 e 5,5 e $\delta$ 60 e 110. ....	105
<b>Figura 65</b> – Mapa de contornos HMBC do produto F1 ( <b>122</b> ).....	106
<b>Figura 66</b> – Ampliação do mapa de contornos HMBC do produto F1 ( <b>122</b> ), na região entre $\delta$ 1,0 e 3,5 e $\delta$ 125 e 180. ....	107
<b>Figura 67</b> – Ampliação do mapa de contornos HMBC do produto F1 ( <b>122</b> ), na região entre $\delta$ 1,0 e 6,0 e $\delta$ 50 e 80. ....	108
<b>Figura 68</b> – Ampliação do mapa de contornos HMBC do produto F1 ( <b>122</b> ), na região entre $\delta$ 0,5 e 5,5 e $\delta$ 15 e 50. ....	109

<b>Figura 69</b> – Espectro de RMN de $^1\text{H}$ do produto F2 ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz).....	112
<b>Figura 70</b> – Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ do produto F2 ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz).....	113
<b>Figura 71</b> – Ampliação do espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ do produto F2 ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz) . .....	114
<b>Figura 72</b> – Subespectro DEPT-135 do produto F2.....	115
<b>Figura 73</b> – Cromatograma da canforquinona obtido por CG.....	129
<b>Figura 74</b> – Cromatogramas das amostras Q1, Q11, Q21 e Q31, obtidos por CG, referentes aos experimentos de biotransformação da canforquinona com o fungo <i>Mucor plumbeus</i> . ....	130
<b>Figura 75</b> – Cromatogramas das amostras Q2, Q12 Q22 e Q32, obtidos por CG, referentes aos controles positivos dos experimentos com o fungo <i>Mucor plumbeus</i> .... .....	131
<b>Figura 76</b> – Cromatogramas das amostras Q3, Q13, Q23 e Q33, obtidos por CG, referentes aos experimentos de biotransformação da canforquinona com o fungo <i>Thamnostylum sp.</i> ....	132
<b>Figura 77</b> – Cromatogramas das amostras Q4, Q14, Q24 e Q34, obtidos por CG, referentes aos controles positivos dos experimentos com o fungo <i>Thamnostylum sp.</i> ... .....	133
<b>Figura 78</b> – Cromatogramas das amostras Q5, Q15, Q25 e Q35, obtidos por CG, referentes aos experimentos de biotransformação da canforquinona com o fungo <i>Syncephalastrum racemosum</i> . ....	134
<b>Figura 79</b> – Cromatogramas das amostras Q6, Q16, Q26 e Q36, obtidos por CG, referentes aos controles positivos dos experimentos com o fungo <i>Syncephalastrum racemosum</i> . ....	135
<b>Figura 80</b> – Cromatogramas das amostras Q7, Q17, Q27 e Q37, obtidos por CG, referentes aos controles negativos dos experimentos com os fungos <i>Mucor plumbeus</i> , <i>Thamnostylum sp.</i> e <i>Syncephalastrum racemosum</i> . ....	136
<b>Figura 81</b> – Cromatogramas das amostras Q8, Q18, Q28 e Q38, obtidos por CG, referentes aos experimentos de biotransformação da canforquinona com o fungo <i>Lecanicillium muscarium</i> . ....	137
<b>Figura 82</b> – Cromatogramas das amostras Q9, Q19, Q29 e Q39, obtidos por CG, referentes aos controles positivos dos experimentos com o fungo <i>Lecanicillium muscarium</i> . ....	138



**Figura 83** – Cromatogramas das amostras Q10, Q20, Q30 e Q40, obtidos por CG, referentes aos controlos negativos dos experimentos com o fungo *Lecanicillium muscarium*..... 139

# LISTA DE ABREVIATURAS

$\delta$	Deslocamento químico
CCD	Cromatografia em camada delgada
CG	Cromatografia gasosa
COSY	Correlation Spectroscopy
D	Dupleto
DEPT	Distortionless Enhancement by Polarization Transfer
EM	Espectrometria de massas
HMBC	Heteronuclear Multiple Quantum Coherence
J	Constante de acoplamento escalar
m	Multipeto
m/z	Relação massa/carga
MHz	Megahertz
q	Quarteto
s	Simpleto
t	Tripleto
qui	Quinteto
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
RMN de $^{13}\text{C}$	Ressonância Magnética Nuclear de carbono-13
RMN de $^1\text{H}$	Ressonância Magnética Nuclear de hidrogênio

# RESUMO

As reações de biotransformação são de grande aplicabilidade tanto na pesquisa básica quanto aplicada. Elas podem ser feitas usando-se células íntegras de microrganismos, plantas e animais ou com enzimas isoladas. Nesse trabalho, foram estudadas as biotransformações da canforquinona e do fujenal por fungos.

Inicialmente, foi feita uma triagem da biotransformação da canforquinona, um monoterpeneo bicíclico, com os fungos *Mucor plumbeus*, *Thamnostylum* sp., *Lecanicillium muscarium* e *Syncephalastrum racemosum*. As reações foram realizadas por diferentes períodos (5, 10, 15 e 20 dias) e as análises dos produtos foram feitas por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM).

Na reação com o fungo *Mucor plumbeus* foram detectados três produtos, além da recuperação de pequenas quantidades de canforquinona. Um dos produtos mostrou ser um monoceto-álcool, que foi detectado durante todo o período de reação. Para o fungo *Thamnostylum* sp. foram detectados dois produtos; um deles somente foi detectado com 10 dias de reação e, o outro, com 10, 15 e 20 dias.

Da reação envolvendo o fungo *Lecanicillium muscarium* foram detectados quatro produtos. A análise da alíquota retirada com 15 dias de reação mostrou, também, a presença de um monoceto-álcool. Com o fungo *Syncephalastrum racemosum* não foi detectada a formação de produtos.

Constatou-se, pela análise dos controles, a estabilidade da canforquinona nos meios utilizados e também que os produtos obtidos não são metabólitos fúngicos, mas correspondem à metabolização da canforquinona pelos mesmos.

Foi feito, paralelamente, um estudo teórico comparando-se os possíveis produtos obtidos na reação com os dados encontrados na literatura a respeito de produtos obtidos em biotransformações anteriores feitas com a canforquinona. Observou-se nesse estudo que, teoricamente, a substância (-)-3S-endo-hidroxiépicanfor seria a mais abundante em solução, concordando, na maioria dos casos, com os dados experimentais descritos na literatura.

Foi realizada a reação do diterpeno fujenal com o fungo *Thamnostylum sp.*, tendo sido isolados, por cromatografia em coluna de sílica gel, dois produtos de biotransformação. Porém, a análise dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$  não foi completamente conclusiva, não tendo sido possível realizar a elucidação estrutural completa dos mesmos, porém foram observadas evidências espectroscópicas de que um dos produtos consiste de um derivado glicosidado do fujenal.

# ABSTRACT

Biotransformations are a useful tool of great applicability either in basic as in applied research. They can be accomplished by using whole cells of microorganisms, plant and animals or using enzymes isolated from them. In the present work, fungal biotransformations of camphorquinone and fujenal were studied.

Initially the biotransformation of camphorquinone, a bicyclic monoterpene, was screened using the fungal species *Mucor plumbeus*, *Thamnostylum sp.*, *Lecanicillium muscarium* e *Syncephalastrum racemosum*. Reactions were carried out by 5, 10, 15 and 20 days and the products were analyzed by gas chromatography coupled to mass spectroscopy (GCMS).

Three products were detected when *M. plumbeus* was used although small amounts of camphorquinone were detected in its unaltered form. One of the products showed to be a monoketo-alcohol that was detected all over the reaction period. Using *Thamnostylum sp.*, two products were detected; the first one only after 10 days of reaction and, the second one, after 10, 15 and 20 days of reaction.

From the experiment using *Lecanicillium muscarium* there were detected four products, one of them, observed after 15 days of reaction, showed to be a monoketo-alcohol. Using *Syncephalastrum racemosum* no products were detected.

Analysis of the controls indicated that camphorquinone is stable in the biotransformations conditions and therefore, detected products are not fungal metabolites but correspond to camphorquinone fungal metabolization.

A theoretical study was simultaneously conducted towards the most common monoketo-alcohols reported in the literature from camphorquinone biotransformation. It was observed that, in theory, (-)-3*S*-endo-hydroxyepicamfor should be the most abundant monoketo-alcohol present in solution, in agreement with the most common data found in the literature.

From the reaction of fujenal with the fungus *Thamnostylum sp.*, two biotransformation products were isolated by silica gel column chromatography. However, analysis of  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR spectra of such products was not completely

unambiguous. There were observed strong spectral evidences that one of the products is a fujenal glucoside.

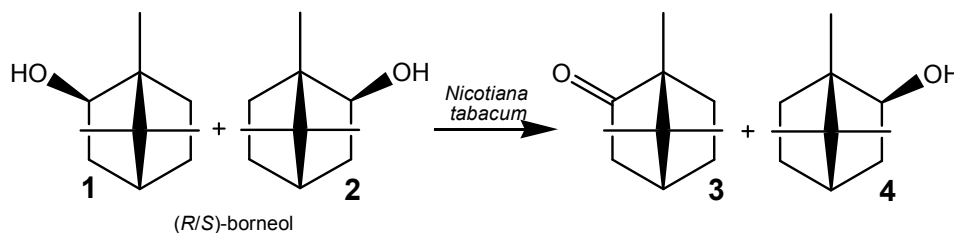
# Capítulo 1

## INTRODUÇÃO

# 1 INTRODUÇÃO

Biotransformações consistem em conversões químicas de uma substância (material de partida) em um produto, com o uso de células íntegras de plantas, microrganismos e animais, contendo a(s) enzima(s) necessária(s), ou através de enzimas isoladas [Leresche et al., 2006].

As reações envolvendo microrganismos são realizadas utilizando-se culturas puras do microrganismo desejado, cultivadas em meios de cultura específicos, contendo os nutrientes necessários para o crescimento dos mesmos. Já nas reações envolvendo plantas, utilizam-se culturas de células das mesmas, sendo mais afetadas por fatores como variação de pH e pressão osmótica das células [Giri et al., 2001]. As reações com células de plantas têm a vantagem de levar ao acúmulo de grandes quantidades do produto desejado, em ciclos de crescimento de normalmente, uma a duas semanas. Um exemplo desse tipo de reação é a oxidação seletiva de apenas um isômero do borneol racêmico (**1 e 2**), utilizando células de *Nicotiana tabacum* (**Figura 1**) [Ishihara et al., 2003].



**Figura 1** – Esquema da conversão do (R/S)-borneol com o fungo *Nicotiana tabacum*.

Como dito anteriormente, as biorreações também podem ser feitas usando-se enzimas. Estas obedecem a uma classificação criada pela União Internacional de Bioquímica, que as divide em seis classes principais, a saber: oxidoredutases, transferases, hidrolases, liases, isomerases e ligases [Loughlin, 2000].

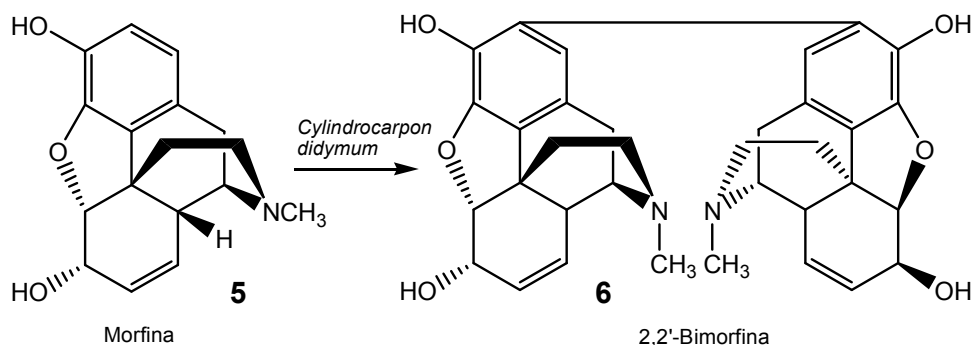
Diversos parâmetros precisam ser considerados para uma reação com o uso de enzimas isoladas, como o tipo de reação desejada, a solubilidade do



substrato, a atividade da enzima em questão e a ocorrência de reações paralelas. Muitas vezes, tem-se, ainda, a necessidade de se utilizar técnicas especiais de imobilização dessas enzimas devido à instabilidade destas, frente às condições operacionais empregadas, à necessidade econômica de reutilização das mesmas e à sua baixa tolerância diante de altas concentrações do substrato. A imobilização de enzimas pode ocorrer por ligação iônica, na qual o catalisador é preso a uma resina de troca iônica, por ligação covalente, na qual as ligações são mais fortes e podem causar perda da atividade enzimática e por dissolução em gel, na qual as enzimas estão dispersas em algum tipo de ágar. Essa última técnica tem o inconveniente da baixa resistência a altas temperaturas e a instabilidade mecânica [Faber, 1992]. Técnicas de imobilização também podem ser empregadas para células íntegras de microrganismos e de plantas.

Outra técnica utilizada para aumentar o desempenho de enzimas em reações de biotransformação é a adição de solventes orgânicos. Essa técnica pode contornar problemas como a baixa solubilidade do substrato em meio aquoso, contaminações microbianas, desativação da enzima por altas concentrações do substrato ou dos produtos, reações indesejadas e a dificuldade de se remover as enzimas do meio reacional [Faber, 1992].

Um exemplo de biotransformação usando enzimas consiste da dimerização da morfina (**5**) a 2,2'-bimorfina (**6**), efetuada por uma enzima isolada de *Cylindrocarpon didymum* (**Figura 2**). Essa enzima foi capaz de transformar também hidromorfona, a diidromorfina e a 6-acetilmorfina, mas não a codeína [Rathbone et al., 2002].

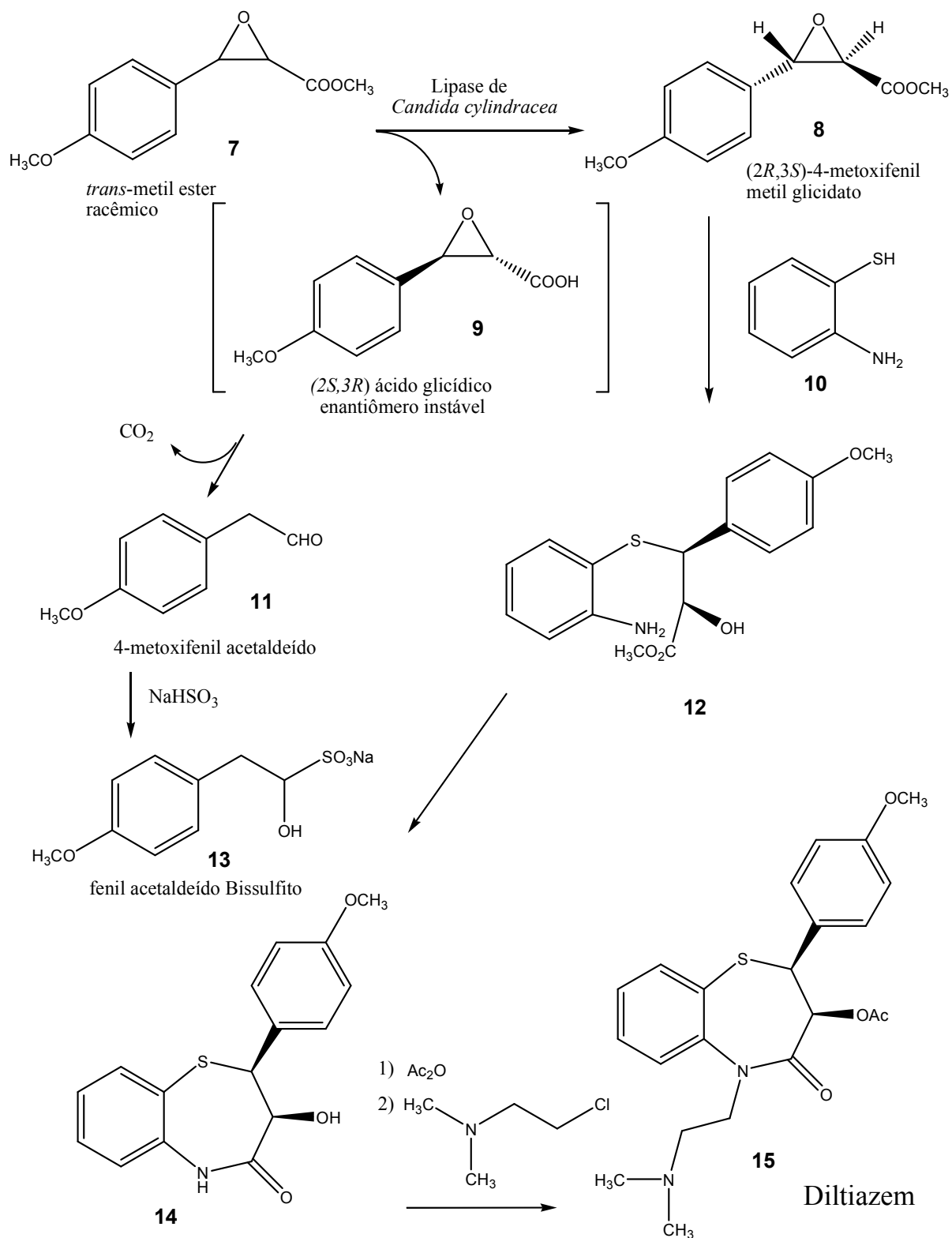


**Figura 2** – Esquema da reação de biotransformação da morfina (**5**) com o fungo *Cylindrocarpon didymum*.

As biotransformações podem ser feitas com substratos naturais ou sintéticos, sendo possível utilizar uma grande diversidade de substâncias como substratos das reações, como terpenos, esteróides e alcalóides, dentre outros. Estas podem ser utilizadas tanto para a obtenção de novos produtos como também de produtos conhecidos, de forma mais eficiente. Entre as vantagens dessas reações estão a possibilidade de obtenção de regio, estereo e enantiosseletividades, diferentes daquelas obtidas na síntese orgânica clássica, as condições brandas utilizadas nas mesmas, como pH em torno de 7 e temperatura ambiente, e a possibilidade de se funcionalizar posições de baixa reatividade nas moléculas usadas como substratos, em sítios que a aplicação da química convencional é difícil. No caso das reações envolvendo células íntegras de microrganismos, há ainda uma outra vantagem, que é o alto ganho de biomassa em tempo reduzido [Giri et al., 2001].

Um exemplo do uso da estereoespecificidade das reações de biotransformação está no seu emprego para resolução de enantiômeros. Esta técnica é muito utilizada na obtenção de substâncias como fármacos, agroquímicos e aditivos alimentares quirais que são considerados comercialmente puros apenas quando um dos enantiômeros está presente em excesso enantiomérico de, no mínimo, 98% [de carvalho e da Fonseca, 2006].

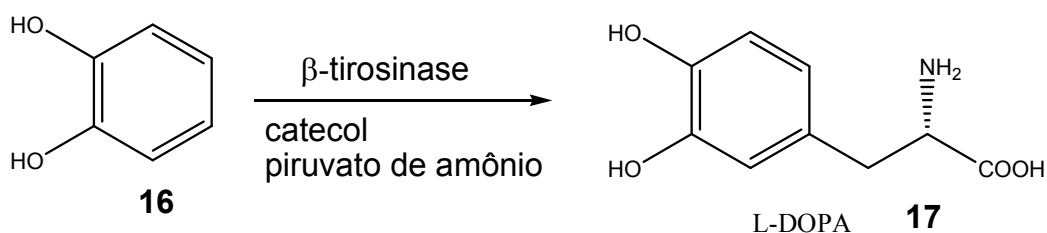
Esta abordagem tem sido usada para a síntese do Diltiazem (**15**), um fármaco bloqueador dos canais de cálcio e vasodilatador coronariano, produzido pela Tanabe no Japão e DSM Andeno na Holanda, que possuía, em 1997, produção anual de mais de 100 toneladas [Zaks et al., 1997]. Como apenas um dos enantiômeros do Diltiazem possui a atividade farmacológica de interesse, a etapa inicial da síntese quiral deste fármaco (**Figura 3**, pág. 21) consta de uma resolução enzimática realizada por uma lipase isolada de *Candida cylindracea*.



**Figura 3** – Esquema da síntese do Diltiazem (**15**), utilizando lipase de *Candida cylindracea* na etapa inicial, em uma resolução enantiomérica do material de partida.

Inicialmente, realiza-se a resolução do material de partida, o metil-3-(4-metoxifenil)oxirano-2-carboxilato (**7**), por lipase de *Candida cylindracea*, com a hidrólise do enantiômero indesejado. O produto hidrolisado é instável e descarboxila espontaneamente, resultando em dióxido de carbono e 4-metoxifenil acetaldeído (**11**). Esse aldeído formado rapidamente reduz a atividade da enzima e forma um material insolúvel que atrapalha o curso da reação. Esse problema é contornado processando-se a reação em fase aquosa na presença de bissulfito de sódio. Dessa forma, é formado o 1-hidroxi-2-(4-metoxifenil)etanosulfonato de sódio (**13**), que pode ser removido por filtração. O bissulfito também auxilia na manutenção do pH desejado para a reação enzimática. O enantiômero resolvido, (2*R*,3*S*)-4-metoxifenil metil glicidato (**8**), passa por uma condensação com 2-aminotiofenol (**12**), seguido pelo fechamento do anel tiazepínico. Posteriormente, ocorre a acetilação do grupo hidroxila e a alquilação do nitrogênio do anel, levando ao Diltiazem (**15**).

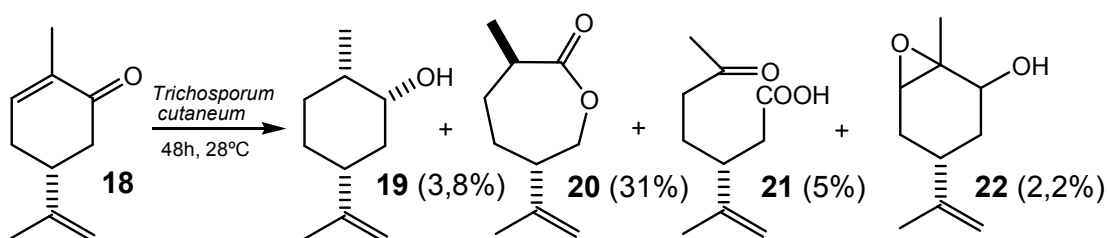
Outro exemplo da utilização de biotransformação para a obtenção de fármacos é na síntese da L-dopa (**17**) [Zaks et al., 1997], uma droga com atividade contra a Síndrome de Parkinson, produzida no Japão pela Ajinomoto. Utiliza-se, nesse processo, uma  $\beta$ -tirosinase de *Erwinia herbicola* (**Figura 4**). Nessa reação, o produto é obtido misturando-se piruvato de amônio a enzima citada, em um fermentador. De outra forma, as células podem ser coletadas e resuspendidas sendo, então adicionados o catecol e o piruvato de amônio.



**Figura 4** – Esquema da síntese da L-Dopa (**17**) utilizando-se a enzima  $\beta$ -tirosinase de *Erwinia herbicola*

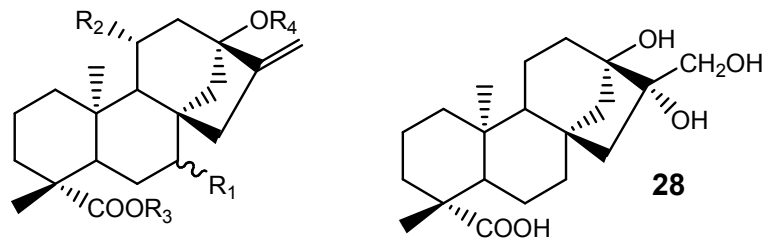
As biotransformações envolvendo células íntegras de microrganismos são realizadas em sistemas aquosos, já que esses são compatíveis com o crescimento das células. As reações de biotransformação com fungos são aliadas importantes da síntese orgânica, industrial ou acadêmica [Loughlin, 2000]. São utilizadas na agregação de valor a substâncias mais simples, como na síntese de fármacos como vitaminas, esteróides, alcalóides e antibióticos [Zaks et al., 1997]. A aplicação das biotransformações na química fina gera grande custo-benefício.

Um trabalho envolvendo agregação de valor a substâncias foi feito na biotransformação de alguns monoterpenos utilizados em fragrâncias [Pinheiro et al., 2007]. Buscou-se, nesse trabalho, a oxigenação de terpenos como *R*-(-)-carvona (**18**),  $\alpha$ -bisabolol e geraniol pelo *Trichosporum cutaneum*, pois monoterpenos oxigenados são responsáveis pelos odores mais agradáveis em misturas de fragrâncias. A **Figura 5** apresenta os produtos obtidos da biotransformação da *R*-(-)-carvona por *T. cutaneum*.



**Figura 5** – Esquema da reação de biotransformação da *R*-(-)-carvona (**18**) com o fungo *Trichosporum cutaneum*.

Biotransformações também foram utilizadas para o preparo de derivados do esteviol, uma substância capaz de reduzir os níveis de glicose no sangue. Nesse estudo, foram isolados os metabólitos **24-28**, como produtos da biotransformação do esteviol (**23**) com *Bacillus megaterium*, *Mucor recurveratus* e *Aspergillus niger*. Um destes metabólitos (**28**) mostrou-se mais ativo que o esteviol (**Figura 6**, pág. 24) [Yang et al., 2007].

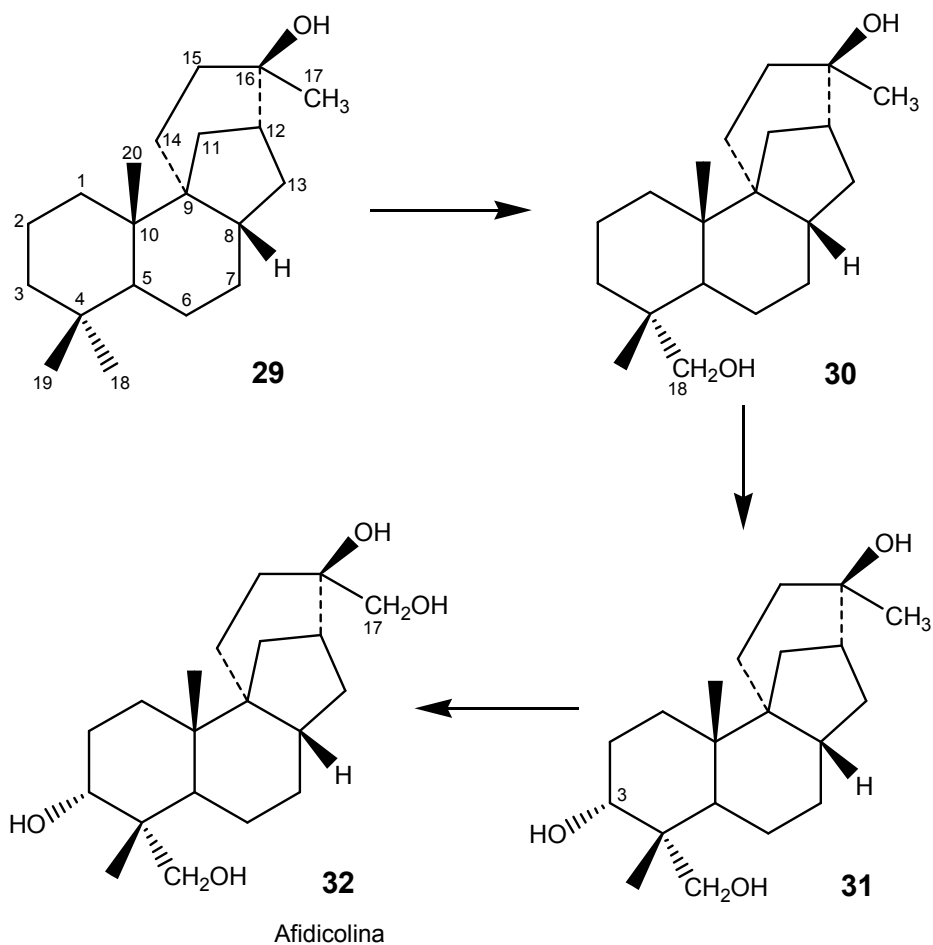


- 23:**  $R_1 = R_2 = R_3 = R_4 = H$   
**24:**  $R_1 = \beta\text{-OH}$ ,  $R_2 = R_3 = R_4 = H$   
**25:**  $R_1 = R_2 = R_4 = H$ ,  $R_3 = \text{Glc}$   
**26:**  $R_1 = =O$ ,  $R_2 = R_3 = R_4 = H$   
**27:**  $R_1 = \beta\text{-OH}$ ,  $R_2 = \text{OH}$ ,  $R_3 = R_4 = H$

**Figura 6** – Estruturas dos produtos da reação de biotransformação do esteviol (**23**) com os microrganismos *Bacillus megaterium* (**24-28**), *Mucor recurveratus* (**24-28**) e *Aspergillus niger* (**24-28**).

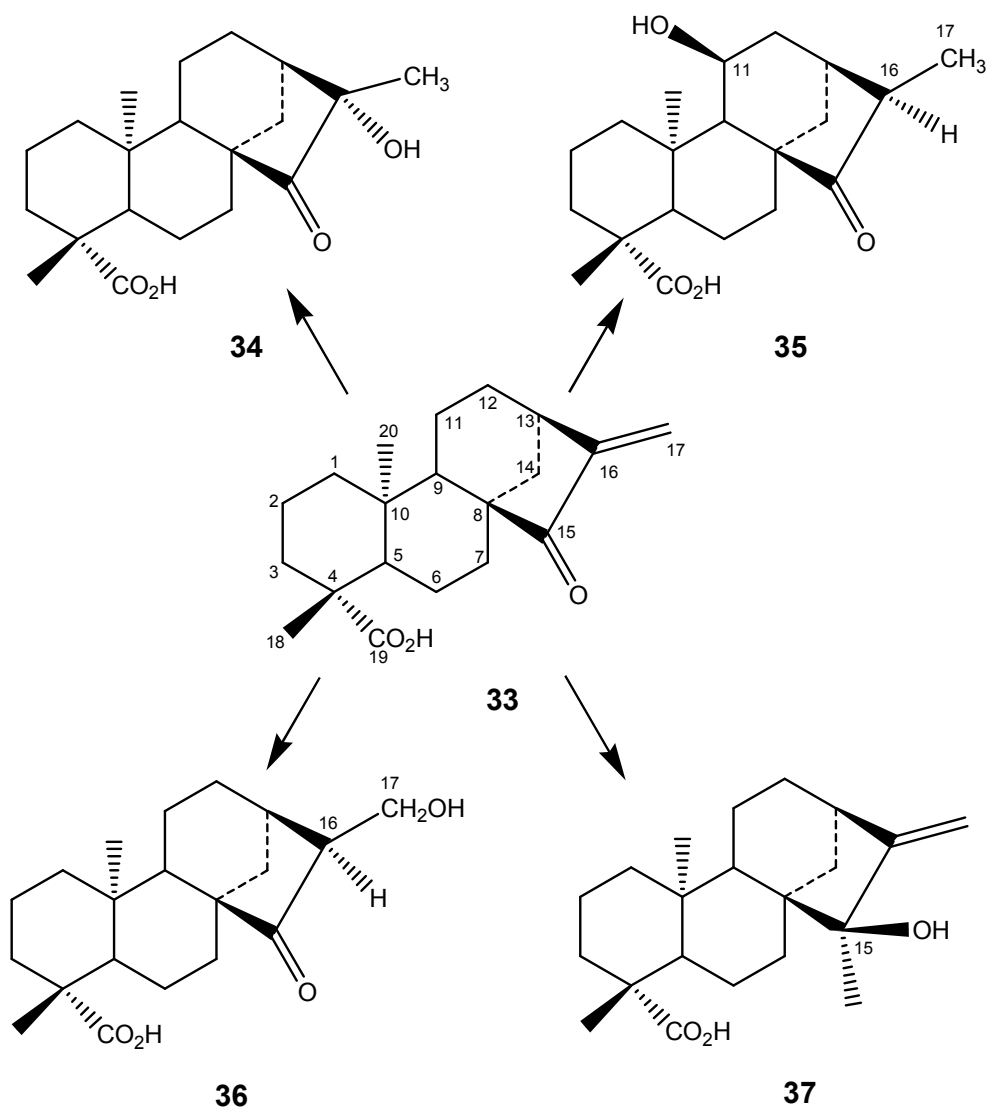
Biotransformações podem ser divididas em dois tipos, as biotransformações biossinteticamente dirigidas e as de xenobióticos. Nas reações biossinteticamente dirigidas, o substrato deve ser análogo a um intermediário de uma rota biossintética natural do microrganismo e a biotransformação obedece às regras naturais deste caminho biossintético [Hanson, 1992]. Já nas biotransformações de xenobióticos, o substrato é estranho ao microrganismo utilizado existindo uma baixa especificidade desse em relação ao substrato. No entanto, em geral observa-se uma seletividade predominante, característica de cada organismo.

Um exemplo de reações biossinteticamente dirigidas foi descrito por Takahashi e colaboradores (1994). Neste trabalho, estudou-se a seqüência de hidroxilações do esqueleto da afidicolina (um agente antitumoral) durante a sua biossíntese pelo fungo *Lecanicillium muscarium* (anteriormente conhecido como *Cephalosporium aphidicola* [Zare et al., 2004]). Nesse trabalho, fez-se uso de afidicolanos similares aos presentes na rota natural da biossíntese da afidicolina, deuterados em posições estratégicas, tendo-se determinado que as hidroxilações ocorrem em C-16 (**29**), C18 (**30**), C-3 (**31**), sendo a última hidroxilação em C-17 (**32**) (**Figura 7**, pág.25).



**Figura 7** – Seqüência de hidroxilações a partir do intermediário **29** na biossintese da afidicolina (**32**) determinada por Takahashi e colaboradores (1994).

Um exemplo de reações de biotransformação de xenobióticos, realizado pelo mesmo grupo [Takahashi, 1994], consistiu da biotransformação do caurano **33** (ácido *ent*-15-oxo-caur-16-en-19-óico) pelo fungo *Lecanicillium muscarium*, resultando nos produtos (**34-37**) apresentados na **Figura 8**, pág. 26. Entre estes, o produto **35**, hidroxilado em C-11, exemplifica o grande potencial de fungos para a funcionalização de carbonos não ativados.

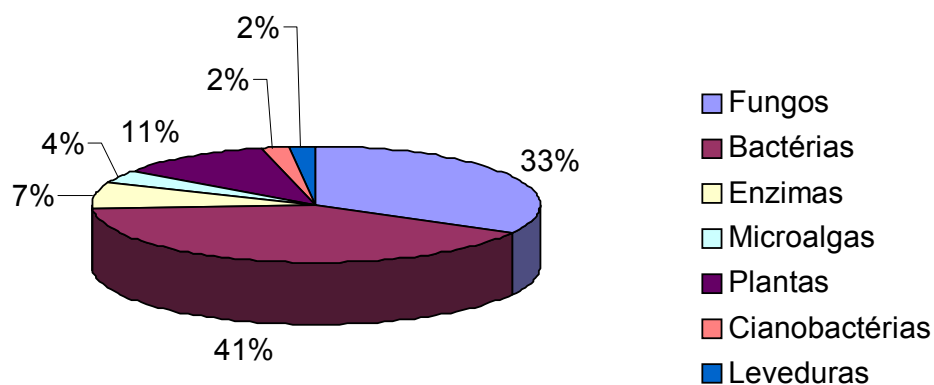


**Figura 8** – Estruturas dos produtos (**34-37**) obtidos a partir da biotransformação do caurano **33** pelo fungo *Lecanicillium muscarium*.

Os exemplos anteriores corroboram que uma classe de substâncias muito abundante na natureza e muito explorada em reações de biotransformação, é a classe dos terpenos. Até o ano 2005, mais de 22.000 terpenos já eram conhecidos, sendo esta a maior classe de produtos naturais existente [de Carvalho e da Fonseca, 2006]. As atividades relacionadas aos terpenos são variadas, como antifúngicos e atratores de polinizadores (monoterpenos em plantas). Eles são também largamente utilizados como



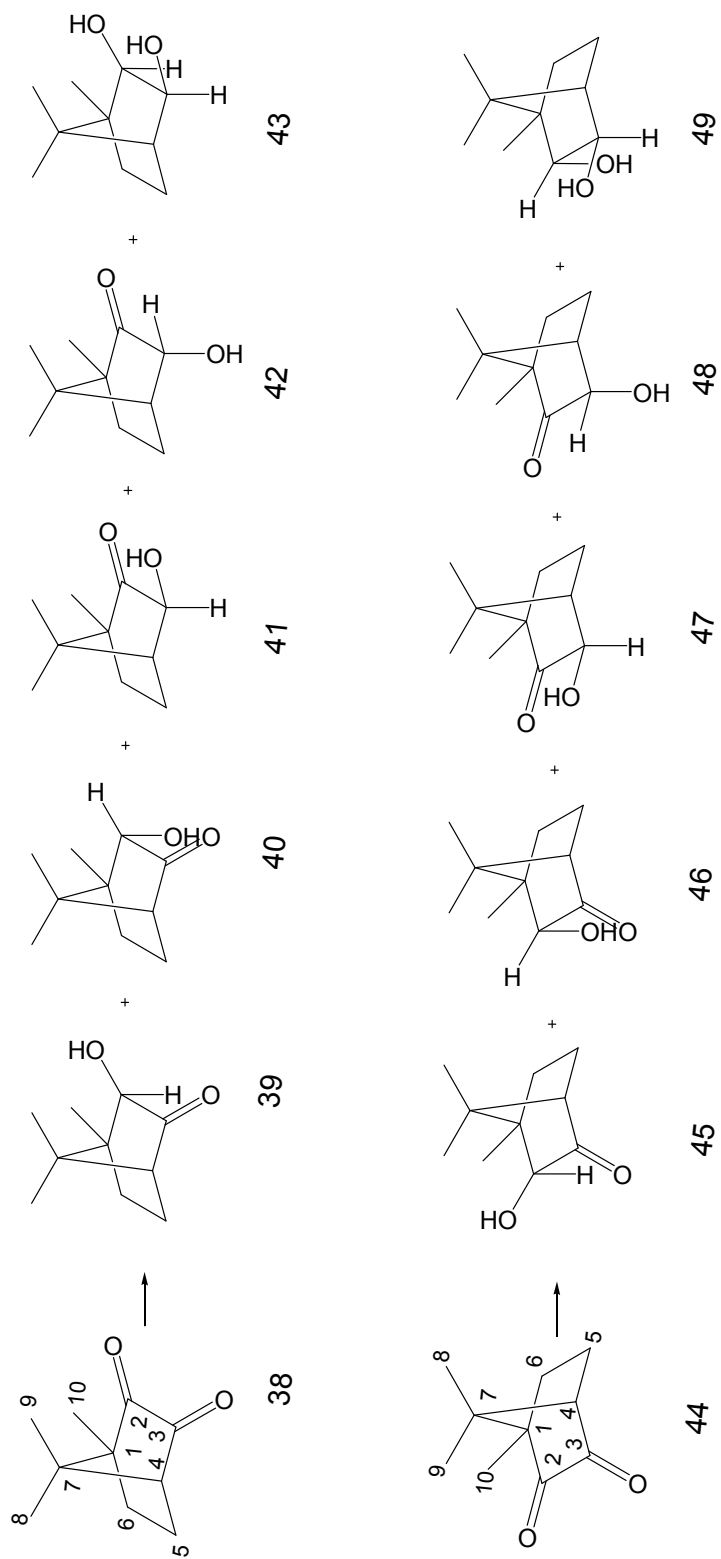
fragrâncias, residindo aí um grande interesse na pesquisa de biotransformações dessas substâncias, obtendo-se produtos em condições brandas. Há estudos publicados sobre biotransformações de terpenos utilizando enzimas e células íntegras de bactérias, cianobactérias, leveduras, microalgas, fungos e plantas. Entretanto, a maior parte dos trabalhos publicados se refere a fungos e bactérias, como ilustrado no gráfico a seguir (**Figura 9**) [de Carvalho e da Fonseca, 2006].



**Figura 9** – Tipos e porcentagens de biocatalisadores utilizados para a biotransformação de terpenos em artigos publicados entre 1995 e 2005 [de Carvalho e da Fonseca, 2006]

Os terpenos são pouco solúveis em água e a adição de solventes orgânicos ao meio de reação aquoso aumenta o rendimento das biotransformações microbianas e enzimáticas. Sistemas multifásicos possuem vantagens no rendimento das biotransformações de terpenos, mas sistemas puramente orgânicos podem causar perda da viabilidade das células, interferindo em sua membrana celular e desativando a enzima utilizada. Alguns terpenos são microbicidas e a sua dissolução em um solvente orgânico pode minimizar esse efeito sobre as células que estão sendo utilizadas na biotransformação. Em grande parte das vezes, as reações de biotransformação de terpenos são feitas em frascos sob agitação (aproximadamente 48% dos artigos sobre biotransformações envolvendo terpenos), mas as reações podem ser feitas também em placas de Petri (meio sólido), biorreatores ou em micro-escala.

Um exemplo de um monoterpene bicíclico, bastante utilizado em reações de biotransformação com microrganismos e plantas, é a canforquinona, uma molécula que contém duas carbonilas pró-quirais reativas, que levam a uma gama de produtos de redução diferentes, como ilustrado na **Figura 10**, pág. 29. Chênevert e Thiboutot (1988) relataram uma redução regiosseletiva, mas não enantiosseletiva, da (+)-canforquinona (**38**) e da (-)-canforquinona (**44**) utilizando fermento de pão (*S. cerevisiae*). O rendimento foi de 61% para (-)-3*S*-*exo*-hidroxiepicanfor (**41**), 36% para (+)-3*R*-*endo*-hidroxiepicanfor (**42**) e 3% de (+)-2*R*-*exo*-hidroxiepicanfor (**39**) a partir de **38**. Em outra reação, desta vez partindo-se de uma mistura de ( $\pm$ ) canforquinona e utilizando-se *Acinetobacter* sp. obtiveram-se 44% de (+)-3*R*-*exo*-hidroxiepicanfor (**47**) e 41% de (+)-2*R*-*exo*-hidroxiepicanfor (**39**). Utilizando-se *Pseudomonas* sp. Obtiveram-se 31% de **47** e 69% de **39** [Rebolledo et al., 1991].



**Figura 10** – Estrutura dos produtos de redução obtidos a partir da (+)-canforquinona e da (-)-canforquinona

Em um trabalho envolvendo cinco espécies de fungos, *Aspergillus niger*, *Fusarium solani*, *Glomerella cingulata*, *Mucor mucedo* e *Rhizoctonia solani*, formaram-se seis cetos-álcoois diferentes, três a partir da (+)-canforquinona (**38**) e três a partir da (-)-canforquinona (**44**), como mostra a **Tabela 2** [Miyazawa e colaboradores, 1995]. Outro trabalho de biotransformação da canforquinona pelo fungo *Glomerella cingulata*, gerou, além de uma mistura diastereoisomérica de oito cetos-álcoois, dois dióis, o **43**, que foi transformado via os cetos-álcoois **39** e/ou **41**, e o **49**, transformado via **46** e/ou **47**. Algumas reações apresentaram alta estereo e enantioseletividade (**Tabela 2**) [Miyazawa e colaboradores, 1997]. A mistura diastereoisomérica de (±)-canforquinona foi utilizada também para reações de biotransformação envolvendo culturas de células de plantas [Chai et al., 2001]. Na reação de **38** com *N. tabacum*, o substrato foi reduzido seletivamente em três cetos-álcoois, sendo que a reação com **44** forneceu quatro cetos-álcoois diastereoisoméricos (**Tabela 2**). A reação envolvendo *C. roseus* forneceu os mesmos produtos da anterior, mudando-se apenas as proporções dos produtos (**Tabela 2**).

**Tabela 1** – Códigos dos substratos e produtos de redução mencionados neste trabalho

Código	substância	Código	Substância
38	(+)-canforquinona	44	(-)-canforquinona
39	(+)-2 <i>R</i> -exo-hidroxiépicanfor	45	(-)-2 <i>S</i> -exo-hidroxiépicanfor
40	(-)-2 <i>S</i> -endo-hidroxiépicanfor	46	(+)-2 <i>R</i> -endo-hidroxiépicanfor
41	(-)-3 <i>S</i> -exo-hidroxiépicanfor	47	(+)-3 <i>R</i> -exo-hidroxiépicanfor
42	(+)-3 <i>R</i> -endo-hidroxiépicanfor	48	(-)-3 <i>S</i> -endo-hidroxiépicanfor
43	(+)-2-exo-3-exo-canfano-2,3-diol	49	(+)-2-endo-3-exo-canfano-2,3-diol

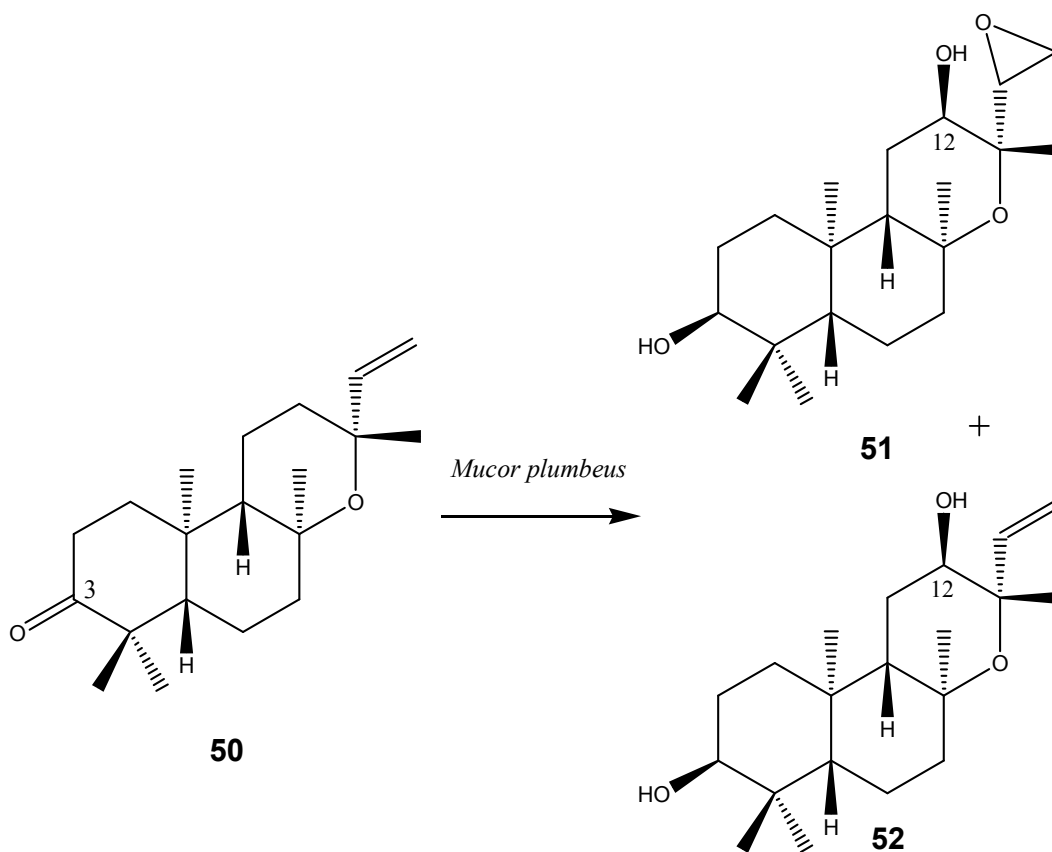
**Tabela 2** – Produtos de redução e seus respectivos rendimentos obtidos a partir da biotransformação da canforquinona por vários organismos

Organismo utilizado	Substrato	Produto (%)	Ref.
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	(±)-canforquinona (38 e 44)	39 (61), 41 (36), 42 (3)	14
<i>Acinetobacter sp.</i>	(±)-canforquinona (38 e 44)	47 (44), 39 (41)	15

<i>Pseudomonas sp.</i>	(±)-canforquinona (38 e 44)	47 (31), 39 (69)	15
<i>Aspergillus niger</i>	(+)-canforquinona (38)	39 (51), 41 (13), 42 (33)	16
<i>Aspergillus niger</i>	(-)-canforquinona (44)	45 (3), 46 (80), 47 (12), 48 (3)	16
<i>Fusarium solani</i>	(+)-canforquinona (38)	39 (28), 41 (35), 42 (34)	16
<i>Fusarium solani</i>	(-)-canforquinona (44)	45 (8), 46 (26), 47 (57), 48 (7)	16
<i>Glomerella cingulata</i>	(+)-canforquinona (38)	39 (7), 41 (70), 42 (22)	16
<i>Glomerella cingulata</i>	(-)-canforquinona (44)	45 (17), 46 (24), 47 (51), 48 (6)	16
<i>Mucor mucedo</i>	(+)-canforquinona (38)	39 (14), 41 (71), 42 (14)	16
<i>Mucor mucedo</i>	(-)-canforquinona (44)	45 (2), 46 (30), 47 (22), 48 (43)	16
<i>Rhizoctonia solani</i>	(+)-canforquinona (38)	39 (8), 41 (37), 42 (53)	16
<i>Rhizoctonia solani</i>	(-)-canforquinona (44)	45 (2), 46 (33), 47 (40), 48 (24)	16
<i>Glomerella cingulata</i>	(+)-canforquinona (38)	39, 40, 41, 42, 43 (10)	17
<i>Glomerella cingulata</i>	(-)-canforquinona (44)	45, 46, 47, 48, 49 (20)	17
<i>Catharanthus roseus</i>	(+)-canforquinona (38)	39 (5), 40 (25), 41 (29), 42 (41)	18
<i>Catharanthus roseus</i>	(-)-canforquinona (44)	45 (11), 47 (66), 48 (23)	18
<i>Nicotiana tabacum</i>	(+)-canforquinona (38)	39 (49), 40 (8), 41 (37), 42 (6)	18
<i>Nicotiana tabacum</i>	(-)-canforquinona (44)	45 (37), 47 (57), 48 (6)	18

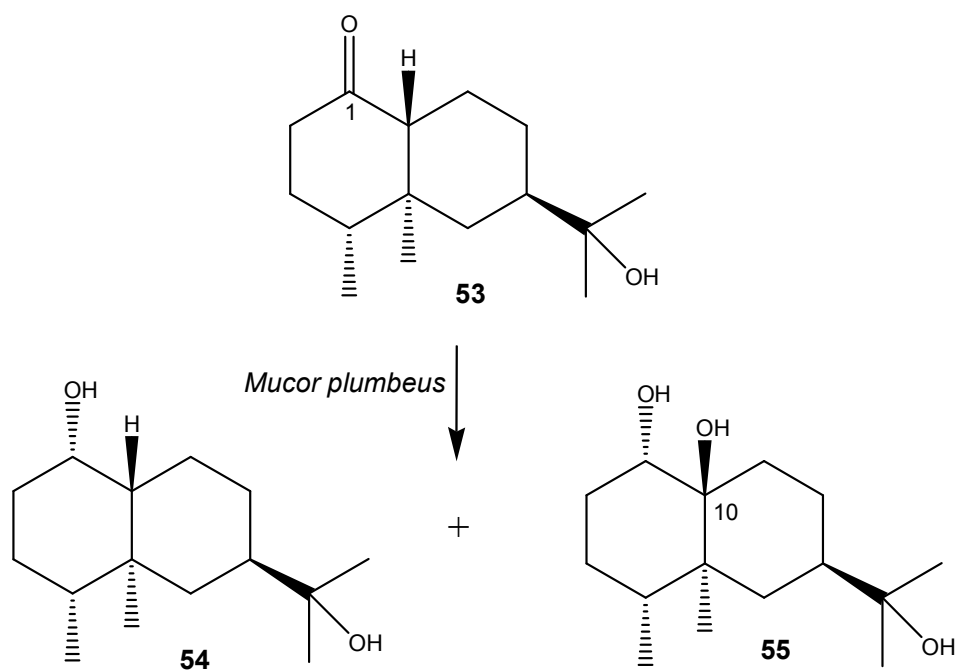
Se há motivação para o uso de terpenos como substratos para biotransformações, o mesmo pode ser dito acerca dos microrganismos. Um microrganismo pode ser utilizado porque apresentou atividade anteriormente sobre outros substratos ou pode ser usado, pela primeira vez, almejando-se diferentes atividades metabólicas sobre um dado substrato ou maior rendimento de uma dada reação. Dentre os fungos filamentosos, uma espécie bastante utilizada em biotransformações é o *Mucor plumbeus*, conhecido também como *Mucor spinosus* [Schipper, 1976] que, dentre outras capacidades, atua na redução de carbonilas [He et al., 2006]. A reação da

ribenona (**50**) com *M. plumbeus* levou a dois produtos (**51** e **52**), que apresentaram uma redução enantiospecífica da carbonila presente no carbono 3, na posição  $\beta$ , além das demais modificações estruturais apresentadas (**Figura 11**). Este resultado foi obtido anteriormente com os microrganismos *Curvularia lunata* e *Gibberella fujikuroi*, enquanto que a redução com boroidreto forneceu apenas o isômero C3 $\alpha$  [Fraga et al., 2001].



**Figura 11** – Estruturas dos produtos de biotransformação da ribenona (**50**) com o fungo *Mucor plumbeus*.

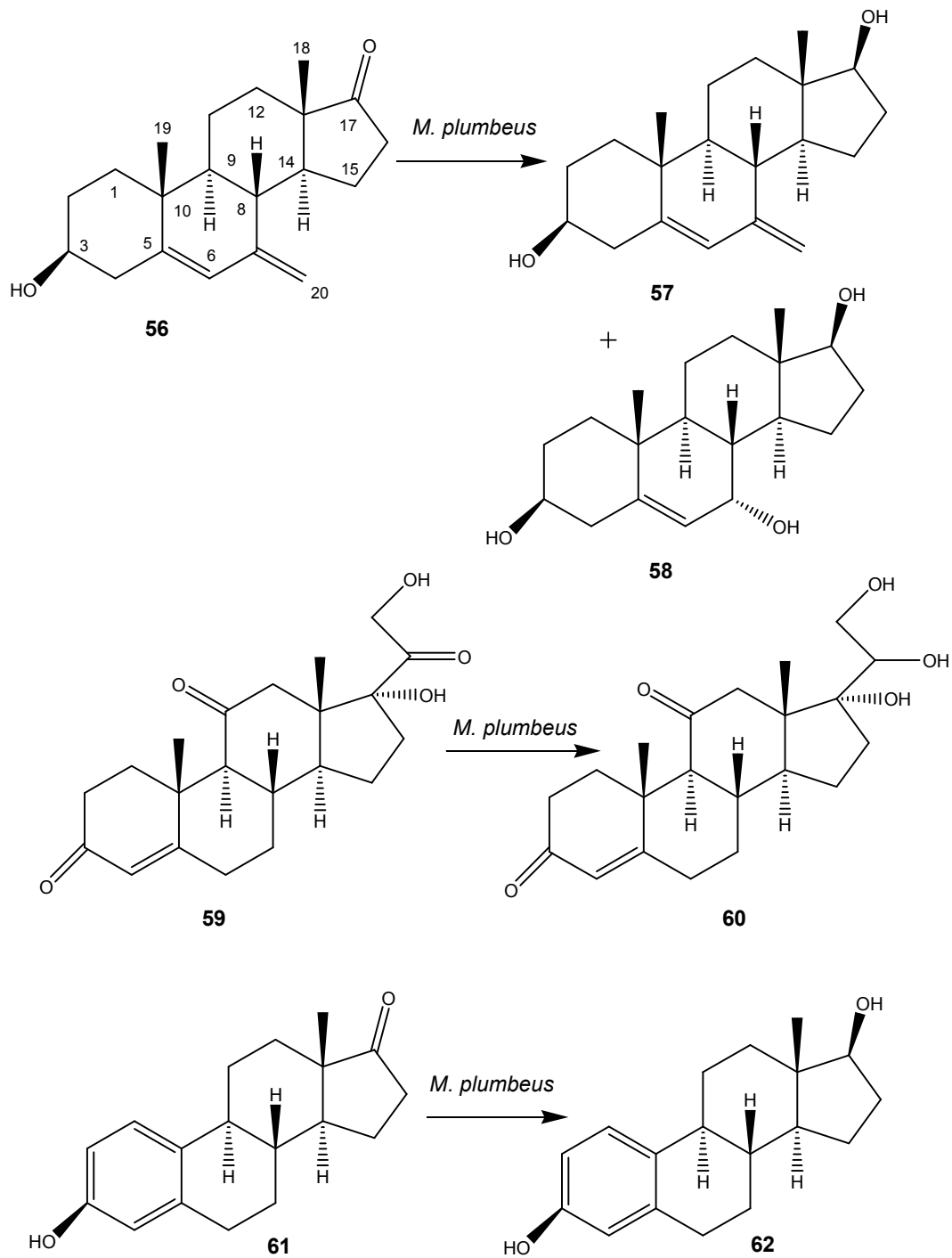
Em outro experimento, o sesquiterpeno 11-hidroxi-1-oxo-4 $\alpha$ ,5 $\alpha$ -,7 $\beta$ ,10 $\beta$ -eremofilano (**53**) foi incubado com o fungo *Mucor plumbeus*, resultando na redução da carbonila em C1 em dois produtos (**54** e **55**) (**Figura 12**, pág.33). O segundo produto (**55**) também apresentou uma nova hidroxilação em C-10 [Arantes et al., 1999].



**Figura 12** – Estruturas dos produtos de biotransformação do 11-hidroxi-1-oxo-4 $\alpha$ ,5 $\alpha$ ,7 $\beta$ ,10 $\beta$ -eremofilano (**53**) utilizando-se o fungo *Mucor plumbeus*.

As reduções de carbonilas pelo fungo *Mucor plumbeus* não são restritas a terpenos. Em um trabalho com os fungos *Whetzelinia sclerotiorum*, *Phanerochaete chrysosporium* e *Mucor plumbeus*, visando a hidroxilação de uma série de esteróides (**56**, **59** e **61**), obtiveram-se quatro produtos (**57**, **58**, **60** e **62**) que, além de outras modificações, apresentaram a redução da carbonila com este último fungo, como pode ser visto na **Figura 13**, pág.34 [Lamm et al., 2007].

Outros exemplos de biotransformação com o fungo *Mucor plumbeus* podem ser encontrados na literatura [Alarcón et al., 2007; Fraga et al., 1996; 1998; 2003; 2004; Boaventura et al., 1995; Tian et al., 2005; Ye et al., 2005; Zhang et al., 2007].



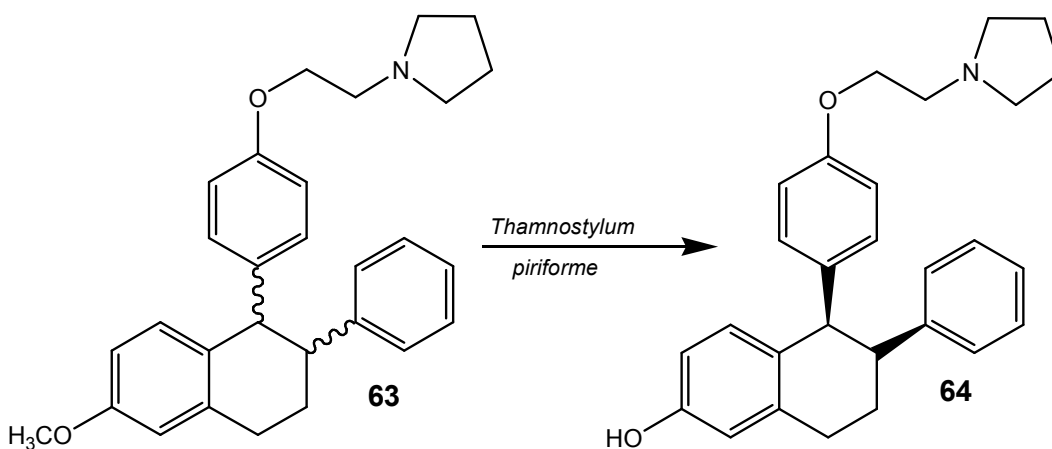
**Figura 13** – Esquema da biotransformação dos esteróides **56**, **59** e **61** com o fungo *Mucor plumbeus*



Outro gênero de microrganismo importante em reações de biotransformação é o *Thamnostylum*, também chamado *Thamnidium* [Delgado et al., 2005]. São encontrados na literatura exemplos diversificados de reações com fungos desse gênero, principalmente das espécies *T. piriforme* e *T. elegans*.

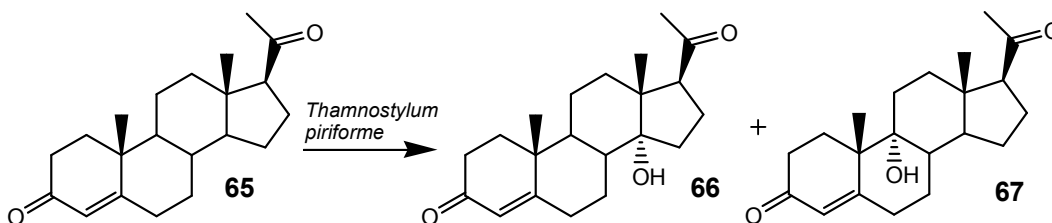
Um processo fermentativo com grande potencial de aplicação industrial é a reação feita por *T. elegans* de fermentação de polpa de maçã em fase sólida, com o objetivo de se produzir o ácido  $\gamma$ -linoléico. Esta espécie foi selecionada a partir de uma triagem inicial, devido aos bons resultados obtidos na primeira fase dos experimentos [Stredansky et al., 2000].

Outro trabalho de grande relevância e aplicabilidade foi a O-desmetilação diasterosseletiva do intermediário **63** na síntese do composto CP – 336,156 (**64**) (agonista do estrogênio no combate à osteoporose) (**Figura 14**, pág.36). O uso de microrganismos eliminou a etapa da síntese na qual era produzido o brometo de metila, um gás difícil e caro de se armazenar. Os microrganismos utilizados no experimento foram *Cunninghamella echinulata*, *Monosporium olivaceum* e *Thamnostylum piriforme*, sendo que apenas os dois últimos apresentaram diastereosseletividade [Truesdell, 2001].



**Figura 14** – Esquema da reação de biotransformação do composto (**63**) levando ao CP – 336,156 (**64**) com o fungo *Thamnostylum piriforme*.

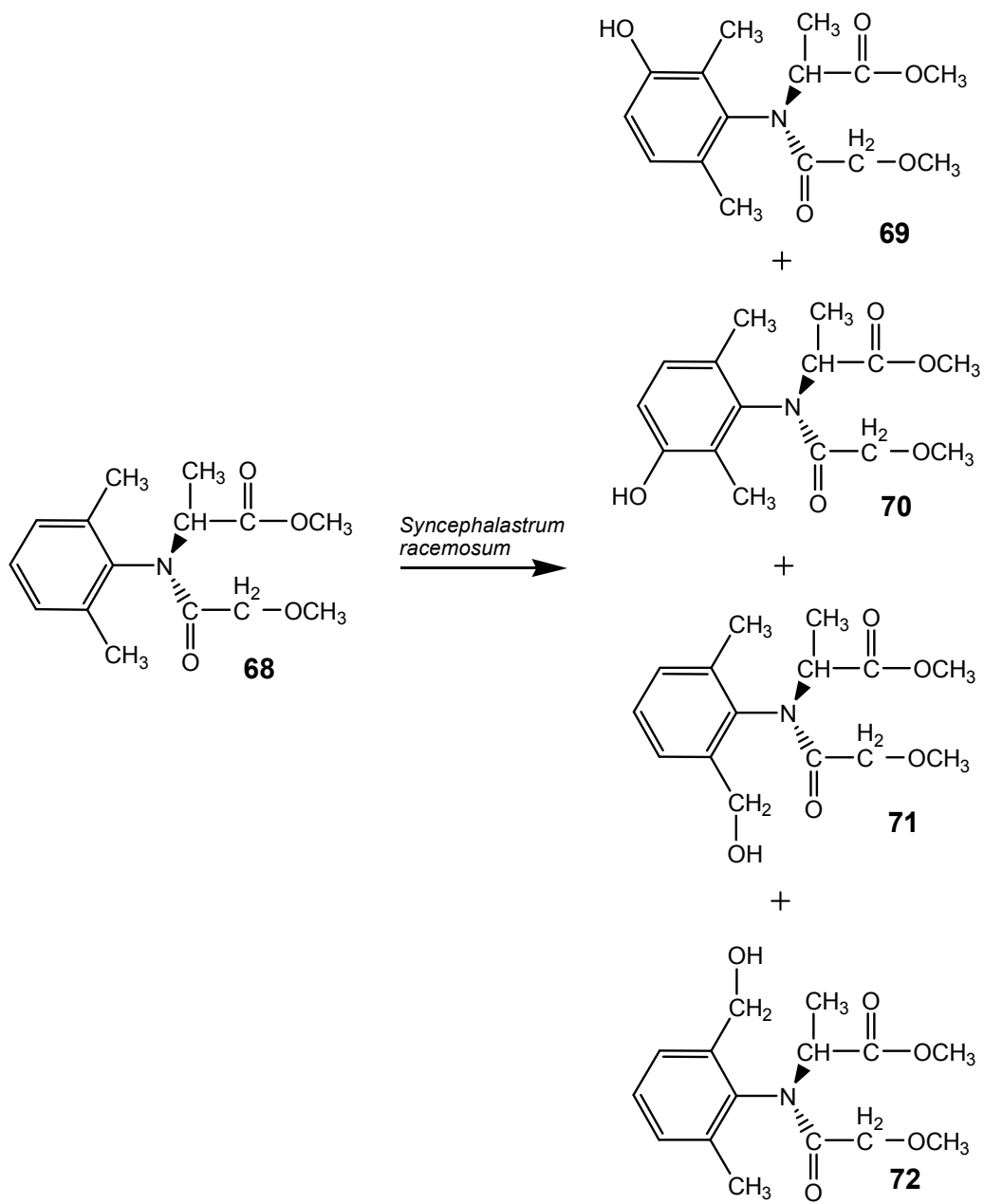
Hu e colaboradores, objetivando a hidroxilação de esteróides, como a progesterona e a testosterona, usaram *Thamnostylum piriforme* (**Figura 15**), que apresentou ótimos resultados para a hidroxilação em C-14 $\alpha$  da progesterona (**65**). No mesmo trabalho, o fungo *Mucor griseocyanus*, mostrou-se mais seletivo para a hidroxilação na posição C14 $\alpha$  da androstenediona e da testosterona [Hu et al., 1995].



**Figura 15** – Esquema da reação de biotransformação da progesterona (**65**) com o fungo *Thamnostylum piriforme*.

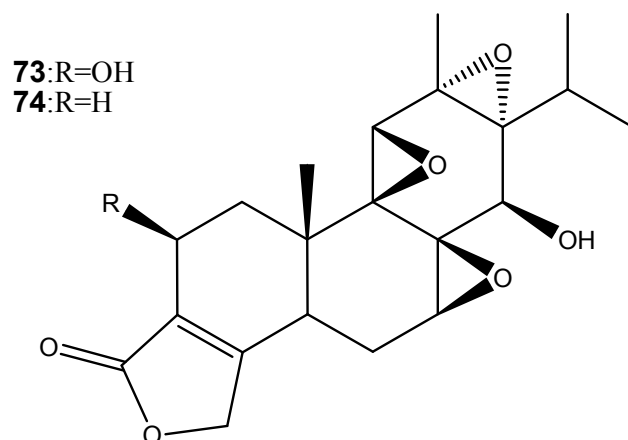
São encontrados ainda, na literatura, outros estudos envolvendo esse gênero de fungo, como a resolução cinética de álcoois secundários, utilizando-se fermentação em fase sólida [Nagy et al., 2006], a biotransformação do Trimegestone<sup>®</sup>, um fármaco que vem sendo desenvolvido para mimetizar a progesterona - sendo também regulador da absorção de cálcio e atuando no tratamento da osteoporose - [Lacroix et al., 1999] e a transformação do rapamicina por *Thamnidium elegans* visando à obtenção de uma substância com atividade imunossupressora, já que foi descoberta esse tipo de atividade biológica em um macrolídeo com estrutura similar à rapamicina [Kuhnt et al., 1997].

No trabalho anterior [Kuhnt et al, 1997], outro fungo, o *Syncephalastrum racemosum*, mostrou-se capaz de transformar a rapamicina em outros três metabólitos. Esse fungo foi também utilizado na biotransformação do fungicida metalaxil (**68**), obtendo-se quatro produtos nessa reação (**69-72**) (**Figura 16**, pág.38). Nesse estudo, além de se determinar a habilidade de fungos de solo em metabolizar o metalaxil, isolar e caracterizar os metabólitos obtidos, também se avaliou o efeito da concentração do fungicida sobre a atividade do fungo. Observou-se que, para concentrações acima de 100 µg/mL, o microrganismo não consegue metabolizar o substrato, não interferindo, porém, no crescimento do fungo [Zheng et al., 1989].

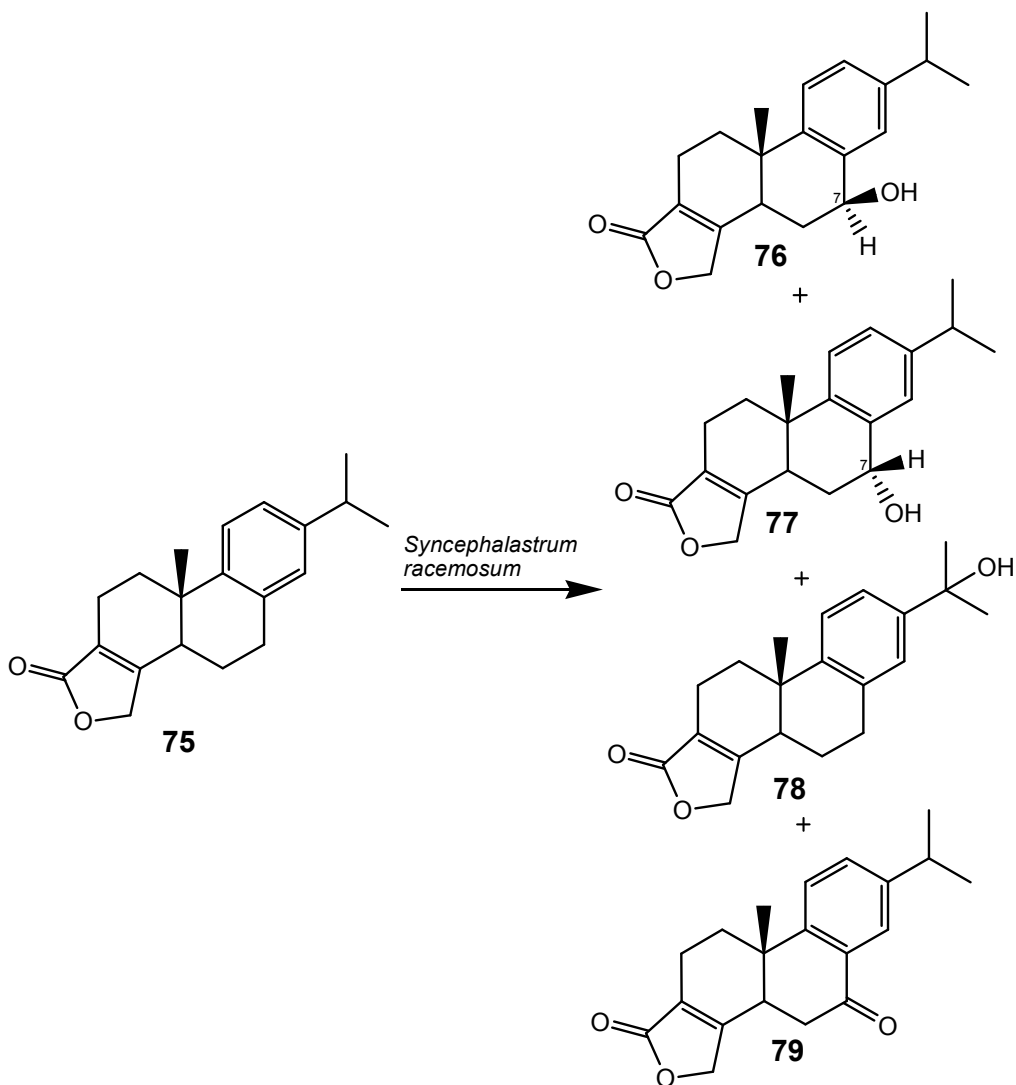


**Figura 16** – Estruturas da reação de biotransformação do metalaxil (**68**) com o fungo *Syncephalastrum racemosum*.

Em um trabalho realizado com diterpenos, foi feita a reação de biotransformação de uma lactona análoga (**75**) a dois diterpenos tri-epoxidados (**73** e **74**), isolados da *Tripterygium wilfordii* (**Figura 17**) com o fungo *Syncephalastrum racemosum*. Essas substâncias apresentaram atividade antileucêmica e antiinflamatória. Por ser difícil a síntese de derivados modificados em determinadas posições nessas moléculas, buscou-se com o uso de microrganismos, a obtenção de substâncias similares estruturalmente, com boa atividade biológica. Foram obtidos quatro produtos nessa reação (**Figura 18**, pág.40), sendo três hidroxilados e um com inserção de uma carbonila [Milanova et al., 1993].



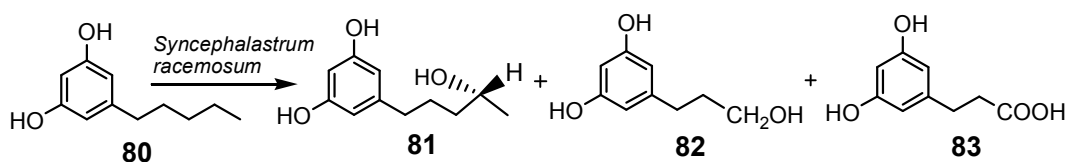
**Figura 17** – Estruturas dos diterpenos tri-epoxidados (**73** e **74**) isolados de *Tripterygium wilfordii*.



**Figura 18** – Esquema da reação de biotransformação de **75** com o fungo *Syncephalastrum racemosum*.

Baseando-se em uma triagem inicial feita com vários fungos e bactérias, o fungo *Syncephalastrum racemosum* foi escolhido para a biotransformação do olivetol (**80**), uma substância que possui uma cadeia lateral n-pentila, comum a muitos canabinóides de ocorrência natural. Alguns canabinóides possuem atividade farmacológica potencial, como atividade antidepressiva, anticonvulsante, broncodilatadora e redutora da pressão intra-ocular. Estudos de biotransformação de substâncias dessa classe visavam à obtenção

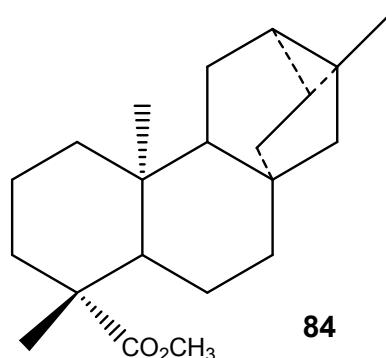
de novas moléculas difíceis de obter por vias sintéticas normais. O olivetol foi usado como um modelo potencial para se entender a degradação da cadeia lateral dos canabinóides. Nessa reação, foram obtidos três produtos (**81-83**), como indicado na **Figura 19** [McClanahan et al., 1984].



**Figura 19** – Esquema da reação de biotransformação do olivetol (**80**) com o fungo *Syncephalastrum racemosum*.

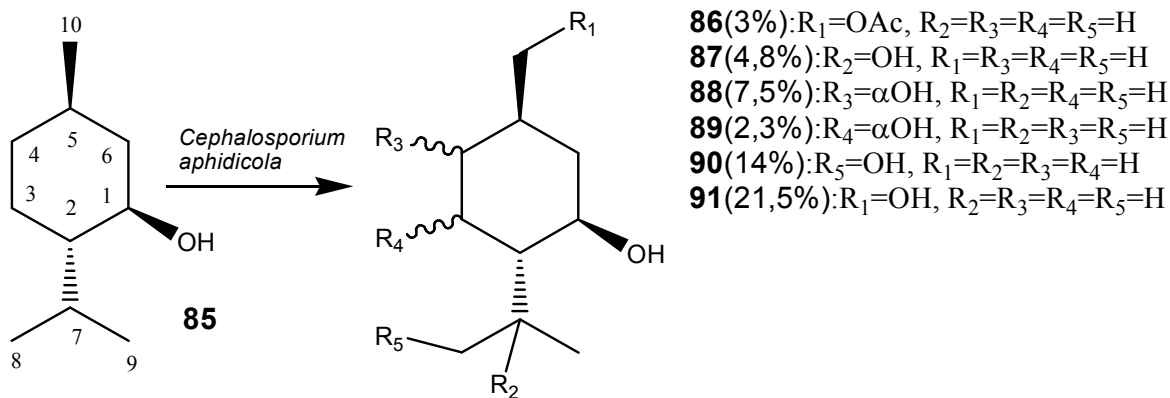
Dois outros trabalhos encontrados na literatura utilizaram epóxido hidrolases de *Syncephalastrum racemosum* com o intuito de se encontrar novos biocatalisadores com potencial para resoluções cinéticas. Os estudos envolveram estirenos para-substituídos sendo, um dos substituintes, um grupo epóxido [Moussou et al., 1998], ou alquil e aril epóxidos [Moussou et al., 1998].

Transformações envolvendo microrganismos são frequentemente realizadas com o fungo *Cephalosporium aphidicola*, também chamado *Lecanicillium muscarium*. Em um trabalho de otimização das condições de biotransformação de diterpenos envolvendo esse microrganismo, estudou-se a transformação de um terpeno da classe dos traquilobanos (**84**) (**Figura 20**, pág.42) variando-se a quantidade de substrato inoculado, o tempo de reação, o solvente utilizado na extração dos metabólitos e também aquele que deve ser usado para a adição do substrato ao meio de cultura. Observou-se, nesse estudo, que, para condições ótimas, o substrato (15-30 mg por 100 mL de meio), deve ser dissolvido em etanol antes da dissolução e a extração deve ser feita com acetato de etila, utilizando-se a fase aquosa e o micélio, após 6 dias de reação [Takahashi et al., 2000].



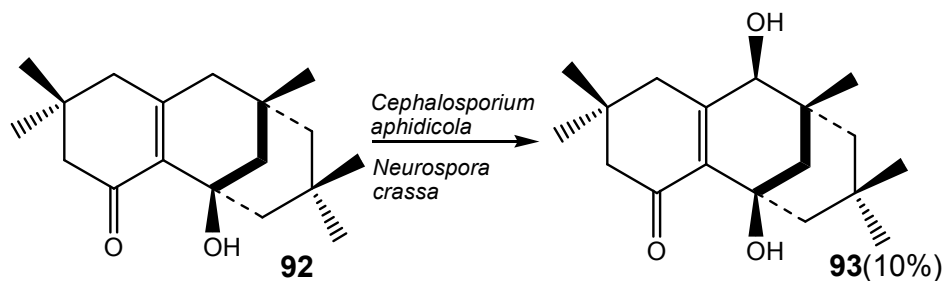
**Figura 20** – Estrutura do 19-traquilobanoato de metila (**84**) utilizado no trabalho de Takahashi e colaboradores (2000).

Outro terpeno utilizado em reações de biotransformação com esse fungo foi o (1*R*,2*S*,5*R*)-(-)-mentol (**85**), um monoterpene com características anestésicas, desinfetantes e fotoprotetoras (**Figura 21**). Nesse trabalho, foram obtidos seis produtos (**86-91**), sendo quatro novos e dois já conhecidos [Attur-Rahman et al., 1998]. Em outro estudo com *C. aphidicola* e *Neurospora crassa*, foi realizada a transformação do diosporano racêmico (**92**) (**Figura 22**, pág.43), uma substância com atividade antifúngica contra *Aspergillus niger* (fungo que causa um bolor negro em certos tipos de frutas e vegetais, como amendoim, uva e tomates). Nesse trabalho foi obtido o mesmo produto nas duas reações, (**93**) [Kiran et al., 2005].



**Figura 21** – Esquema da reação de biotransformação do (1*R*,2*S*,5*R*)-(-)-mentol (**85**) com o fungo *Cephalosporium aphidicola*.

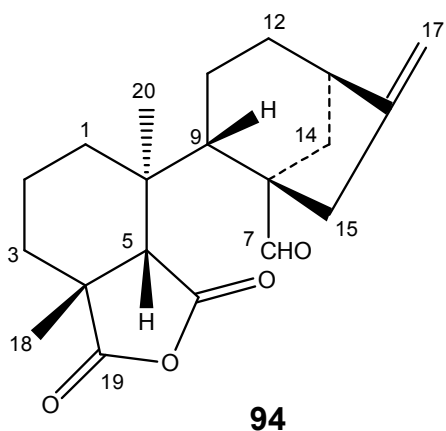




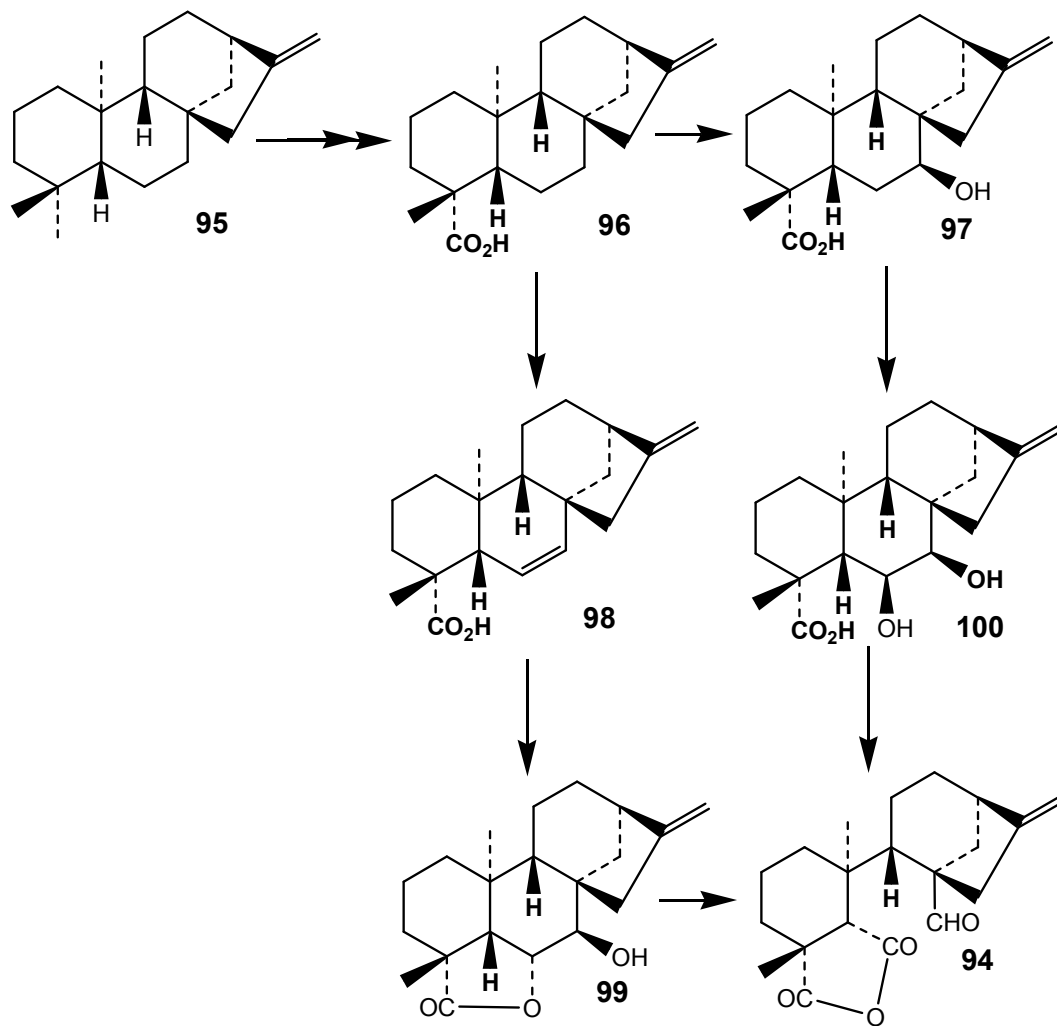
**Figura 22** – Esquema da reação de biotransformação do diisoporano racêmico (**92**) com o fungo *Cephalosporium aphidicola* e *Neurospora crassa*.

O fungo *Cephalosporium aphidicola* foi utilizado em uma série de outras reações envolvendo monoterpenos [Farooq et al., 1995], sesquiterpenos [Gand et al., 1995], diterpenos [Hanson et al., 1995; 1996; Oliveira et al., 1995, Ackland et al., 1988] e também alguns esteróides [Hanson et al., 1996; 1998; Bensasson et al., 1999].

O fujenal (**94**, **Figura 23**), substrato utilizado em uma reação de biotransformação nesse trabalho, é um diterpeno que pode ser obtido de filtrados do fungo *Gibberella fujikuroi* [Cavell e MacMillan, 1967.; Baynham et al., 1987]. Na biossíntese normal do fujenal (**Figura 24**, pág.44) ele é formado através do diol **100**, embora possa vir também do caurenolídeo **99** [Hanson, 1992].

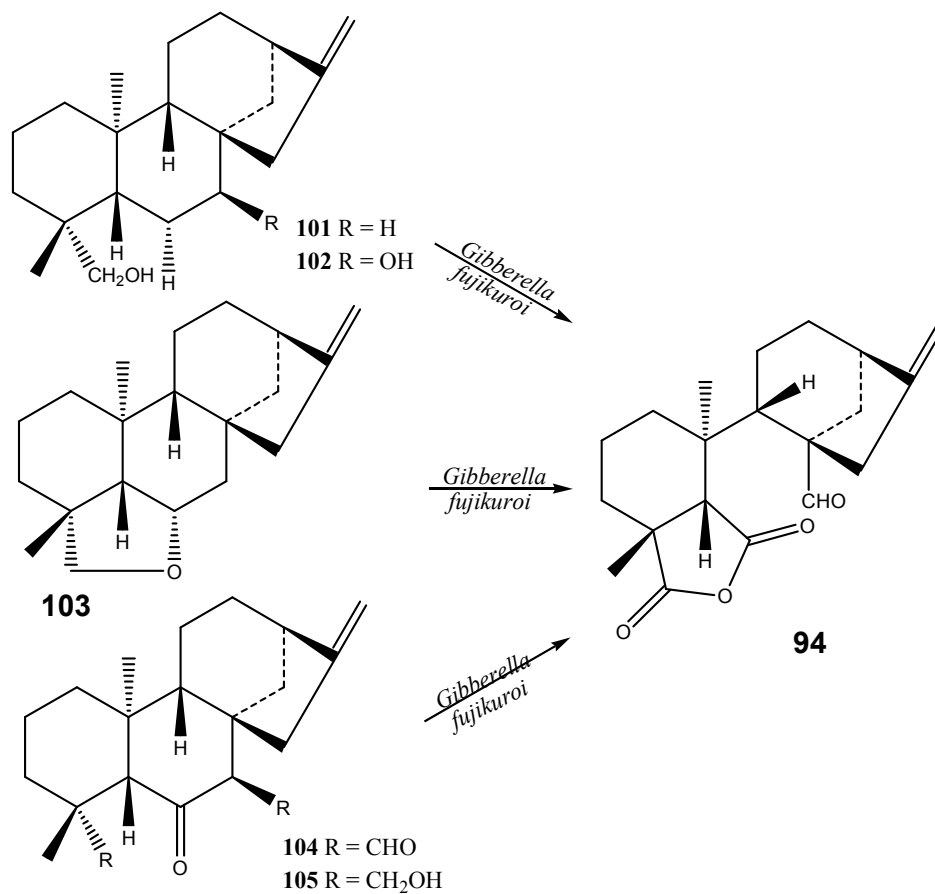


**Figura 23** – Estrutura do diterpeno fujenal (**94**)



**Figura 24** – Biossíntese do fujenal (**94**)

Em um estudo visando observar a influência da oxigenação da posição 6 em biotransformações de *ent*-caurenos, a incubação das substâncias **101-105** com o fungo *Gibberella fujikuroi* forneceu o fujenal como produto das reações em todos os casos (**Figura 25**, pág.45) [Alan et al., 1991]. A presença de três carbonilas em ambientes estereoelêtronicos diferentes no fujenal, motivou também sua utilização como substrato de várias transformações por vias sintéticas [Galt et al., 1965; Hanson et al., 1968; 1981;1982].



**Figura 25** – Esquemas das reações de biotransformação de *ent*-caurenos (**101-105**) com o fungo *Gibberella fujikuroi*.

# Capítulo 2

## OBJETIVOS

## 2 OBJETIVOS

Os objetivos do presente trabalho consistiram de:

Realizar uma triagem inicial comparativa da redução da canforquinona com os fungos *Mucor plumbeus*, *Thamnostylum sp.*, *Lecanicillium muscarium* e *Syncephalastrum racemosum*.

Estudar, mais detalhadamente, o curso da redução da canforquinona com o fungo que se mostrar, na triagem inicial, mais promissor para a redução da canforquinona.

Realizar a biotransformação do fujenal, purificar e identificar os produtos obtidos.

# Capítulo 3

## PARTE EXPERIMENTAL

## 3 PARTE EXPERIMENTAL

### 3.1 Equipamentos

Para a pesagem de substratos e frações foi utilizada uma balança analítica da marca QUIMIS, modelo Q-ILA2104, 210g/0,1mg.

A pesagem dos reagentes para os meios de cultura foi feita em uma balança da marca Digimed KN1000C, classe de exatidão II, série 04G6.

A esterilização dos meios de cultura foi feita em uma autoclave vertical da marca FANEN, modelo 415/3, série J03610.

Os procedimentos feitos em ambiente estéril foram realizados em uma capela de fluxo laminar da marca VECO, modelo JLF 912, série FL 5799.

A inoculação da 1R - (-) – canforquinona e do fujenal foram feitas com uma pipeta automática Finnpipette Colour 4027, Lab systems, série E19971.

A agitação dos meios de cultura durante o período das biotransformações foi feita em uma incubadora com agitação da marca TECNAL, modelo TE-421, à temperatura ambiente.

A concentração dos extratos e frações de coluna foi feita em evaporadores rotatórios das marcas Büchi Waterbath, modelo B – 480 e Fisaton modelo 802, série 531782.

A dissolução das amostras para a obtenção dos cromatogramas foi feita com uma pipeta de capacidade de 10 $\mu$ L – ICELL, modelo p – 213.

Os cromatogramas foram obtidos em um equipamento modelo VARIAN 3380 com detector de ionização de chama. O modo de injeção usado foi o modo split 1/100. O gás de arraste usado foi hidrogênio a um fluxo de 1,0mL/min. A coluna utilizada foi uma coluna capilar de sílica fundida de fase estacionária

polidimetilsiloxano (SE30; 30m x 0,25 mm, 0,25  $\mu$ m). A temperatura de injeção e detecção foram de 300 °C. A temperatura inicial foi de 100 °C e foi aumentada a uma taxa de aquecimento de 10 °C/min até 300 °C. Para cada amostra foi injetada uma alíquota de 2 $\mu$ L. As áreas e os tempos de retenção foram obtidos por meio da estação de tratamento PC/Chrom+, versão 4.2.0 (DQ-ICEx-UFMG).

As análises das amostras das biotransformações da canforquinona foram realizadas em um equipamento de CG/EM, modelo GC-17A/GCMSQP5050 da Shimadzu, utilizando uma coluna capilar de sílica fundida de fase estacionária 5% fenil metilsiloxano, 95% dimetilsiloxano (HP5; 25m x 0,20mm x 0,33 $\mu$ m). Uma alíquota de 1 $\mu$ L das amostras foi injetada no modo split (1:10) utilizando hélio como gás de arraste, a um fluxo de 0,6 mL/min. A temperatura do injetor foi de 230 °C e, a do detector, de 250 °C. As análises foram realizadas a uma temperatura de inicial de 50°C que foi mantida constante por 4 min. Em seguida, a temperatura foi aumentada a uma taxa de aquecimento de 10°C/min até 240°C. A temperatura final foi mantida por 4 min (LEC-DQ-ICEx-UFMG).

Os espectros de massas foram obtidos por impacto eletrônico (IE) utilizando o modo scan, tendo como analisador de massas um quadrupolo. O potencial de ionização da fonte foi de 70 eV. A aquisição dos dados foi realizada utilizando-se o software Chemstation. A identificação dos compostos foi realizada utilizando-se a biblioteca WILEY135 (LEC-DQ-ICEx-UFMG).

As análises por cromatografia em coluna foram feitas utilizando-se sílica 70 a 230 mesh (Merck, Lote 107734) e sílica 230-400 mesh (Sigma, Lote 10k3497).

A cromatografia em camada delgada foi feita utilizando-se sílica 60 G (Vetec, Lote 0507764). Foi utilizado, como revelador, uma solução de metanol:água:ácido sulfúrico concentrado nas proporções de 45:45:10, na qual, para cada 100 mL de solução, foi adicionado 1mg de vanilina.



Os espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$ , subespectros DEPT 135 e mapas de contornos (COSY, HMBC e HMQC) foram obtidos em espectrômetros Bruker modelos DX-200 (200 MHz) e DRX 400 (400 MHz) linha AVANCE (Departamento de Química, ICEX, UFMG). A referência interna foi feita utilizando-se tetrametilsilano (TMS) e o solvente deuterado usado foi clorofórmio ( $\text{CDCl}_3$ ) da marca Aldrich Chemical Company .

## 3.2 Reagentes

Os reagentes utilizados foram:

Ágar batata dextrosado (Biobrás S.A., Lote 1191737<sup>A</sup>), álcool etílico comercial (92,8/NPM, Minasúcar S/A, Lote 18), cloreto de potássio P.A. – ACS (Synth, lote 26546), D - glicose anidra P.A. – ACS (Synth, Lote 47038), diclorometano P.A. – ACS (CAQ – Casa da Química, Lote 06020259), extrato de levedura (Biobrás Diagnósticos, Lote 757/06), fosfato monobásico de potássio (ECIBRA, Lote 15956), glicina (Synth, Lote 27358), metanol P.A. (CRQ – Cromato Produtos Químicos LTDA, Lote 2229.12/05), padrão de 1*R*-(-)-canforquinona 99% (Aldrich Chem. Co., 14903HU), peptona bacteriológica (biobrás Diagnósticos, Lote 757/06), sulfato monoidratado de manganês (Synth, Lote 32095), solução de elementos traço: molibdato de amônio P.A. (VETEC, Lote 980629), nitrato de cobalto II P. A. (VETEC, Lote 961092), sulfato de cobre P. A. – ACS (Synth, Lote 50367), sulfato ferroso P. A. – ACS (Synth, Lote 28136), sulfato de zinco P. A. – ACS (Synth, Lote 28316), Corn Steep Liquor (Sigma, Lote 57H0651), fosfato dibásico de potássio (Synth, Lote 512772), Sulfato de magnésio heptahidratado (Vetec, Lote 951240), Sulfato de ferro heptahidratado (Synth, 28136).

## 3.3 Biotransformação da 1*R*-(-)-canforquinona (44)

### 3.3.1 Repique dos fungos

Os fungos escolhidos para o processo de biotransformação da canforquinona foram *Mucor plumbeus*, *Thamnostylum sp.*, *Lecanicillium*

*muscarium* e *Syncephalastrum racemosum*. A partir de culturas pré-existentes no laboratório, foi feita uma transferência desses fungos para meio PDA (ágar batata dextrosado).

Preparo do meio:

O ágar batata, após ser dissolvido na água (39 g/L), foi vertido em tubos de ensaio, que foram tampados com rolhas de gaze e algodão e esterilizados em autoclave a aproximadamente 120 °C de temperatura e 1 atm de pressão. Após o endurecimento do ágar, a transferência dos fungos foi feita dentro de uma capela de fluxo laminar, previamente esterilizada com uma solução etanol/água 70%v/v. Para o manuseio dos fungos foi utilizada uma alça de platina também esterilizada na solução anterior. A mesma, após ser flambada exaustivamente com a chama do Bico de Bunsen, foi passada sobre a superfície de uma cultura de um dos microrganismos em questão, coletando-se, assim, várias células do mesmo. Essas células foram posteriormente inoculadas nos tubos contendo o ágar batata esterilizado, em movimentos de zigue-zague da alça de platina sobre a superfície do ágar estéril. Este procedimento foi feito para cada um dos quatro fungos utilizados no experimento.

### 3.3.2 Cultivo dos fungos em meio líquido

Após o crescimento dos fungos, tendo-se verificado a uniformidade e a pureza da cultura, estes foram transferidos para um dos dois meios de cultura líquidos descritos abaixo, de acordo com cada espécie de fungo.

*Lecanicillium muscarium*:

Glicose	100,00g/L
Fosfato monobásico de potássio	5,00g/L
Sulfato monidratado de manganês	2,00g/L
Cloreto de potássio	1,00g/L

Glicina	2,00g/L
Solução de elementos traço [Hanson et al., 1992]	2,00mL/L

*Mucor plumbeus*, *Thamnostylum sp.* e *Syncephalastrum racemosum*:

Glicose	1g/L
Extrato de levedura	0,5g/L
Peptona bacteriológica	0,5g/L

A inoculação dos meios contidos nos erlenmeyers com os fungos foi feita em uma capela de fluxo laminar, previamente esterilizada com uma solução de etanol/água 70%v/v, pela transferência de uma pequena alíquota de células contidas no interior do tubo com a cultura fúngica. Inicialmente, apenas um erlenmeyer foi inoculado com cada um dos microrganismos. Após a constatação do bom crescimento desses, uma pequena alíquota do meio líquido foi transferida para os outros frascos. Assim, cada fungo foi inoculado em cinco erlenmeyers contendo 200 mL do meio líquido adequado à sua espécie.

O processo de esterilização e flambagem da alça de platina, bem como a inoculação do meio de cultura, foram feitos separadamente para cada fungo, com o objetivo de garantir a presença de uma única espécie fúngica em cada erlenmeyer.

Os meios de cultura líquidos apresentados acima foram utilizados para a realização da biotransformação da 1*R*-(-)-canforquinona.

### 3.3.3 Inoculação da 1*R*-(-)-canforquinona

Após a constatação do bom crescimento dos fungos nos erlenmeyers, com adequado ganho de biomassa e sem contaminações por outros microrganismos, foram adicionados 3 mg da 1*R*-(-)-canforquinona por frasco, solubilizados em diclorometano. Um frasco de cada espécie, foi utilizado como controle negativo (ou seja, continha meio e fungo, sem adição de canforquinona). Além desses, outros dois frascos, cada um contendo um dos

meios de cultura descritos no item 3.3.2, foram utilizados como controles positivos, nos quais foram inoculados 3 mg de 1*R*-(-)-canforquinona, mas, nestes, os fungos não foram inoculados, com o intuito de se verificar a estabilidade da substância em questão na presença do meio utilizado. Durante todo o processo, os erlenmeyers foram mantidos sob agitação.

### **3.3.4 Extrações**

Nos experimentos com a canforquinona, as extrações dos meios de cultura foram feitas nos períodos de 5, 10, 15 e 20 dias, sendo extraído um erlenmeyer de cada espécie de fungo em cada um dos prazos citados. O solvente utilizado nas extrações foi o diclorometano, sendo o processo repetido três vezes consecutivas para cada frasco.

Nessa etapa do trabalho, todo o conteúdo do erlenmeyer foi filtrado e transferido para um funil de separação de 1L, sendo adicionado em seguida uma alíquota de 30 mL de diclorometano. Após agitação branda, a fase orgânica foi separada da fase aquosa por diferença de densidade. Esta primeira fase, mais densa, foi transferida do funil de separação para um balão de fundo redondo de 500 mL. Após a execução desse processo por mais duas vezes, a fase orgânica obtida foi concentrada a 40°C em um rotavapor e transferida para um vidro de penicilina tarado.

Para os controles, a única diferença no modo de extração foi a utilização de alíquotas de 20 mL do meio e do solvente. As alíquotas foram retiradas dentro de uma capela de fluxo laminar esterilizada e próximo ao bico de Bünsen.

## **3.4 Biotransformação do fujenal (94)**

### **3.4.1 Repique do fungo**

O procedimento utilizado para o repique do fungo *Thamnostylum sp.* foi o mesmo procedimento do item 3.3.1.

### 3.4.2 Cultivo do fungo em meio líquido

Inicialmente, o fungo em questão foi transferido com o auxílio de uma alça de platina do tubo onde estava armazenado em meio sólido para um erlenmeyer de 500 mL, contendo 100 mL do meio de cultura utilizado na biotransformação (BT).

Após 3 dias, o fungo apresentou ganho de biomassa adequado e, garantindo-se a sua não contaminação com outros microrganismos, o mesmo foi transferido para um erlenmeyer de 6L, contendo 2,5 L do meio de cultura BT.

Meio de cultura BT (Hu, et al., 1995)

Glicose	30g/L
Corn Steep Liquor (caldo de milho)	10g/L
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	1g/L
$\text{K}_2\text{HPO}_4$	2g/L
$\text{NaNO}_3$	2g/L
KCl	0,5g/L
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,5g/L
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,02g/L

### 3.4.3 Inoculação do fujenal

Após 3 dias foram inoculados 400 mg do substrato, dissolvidos em 40 mL de diclorometano, utilizando-se uma micropipeta automática, no erlenmeyer com o fungo já crescido no meio utilizado na reação.

### 3.4.4 Extração

Sendo decorridos 10 dias de reação, foi feita uma extração do meio de cultura utilizando-se acetato de etila como solvente, a exemplo do item 3.3.4. A diferença é que a extração feita na biotransformação do fujenal utilizou todo o

meio de reação, e não pequenas alíquotas como na biotransformação da canforquinona.

### 3.4.5 Fracionamento do material obtido na biotransformação do fujenal

As dimensões da coluna utilizada eram 5,7 cm de diâmetro e 22,0 cm de comprimento. Foram utilizados 181,24 g de sílica nesse processo. Obtiveram-se 117 frações, eluídas com misturas de hexano, acetato de etila e metanol, de forma a se aumentar sempre a polaridade do solvente. As frações foram analisadas através de cromatografia em camada delgada, sendo combinadas levando-se em conta a sua semelhança por CCD. A **Tabela 3** apresenta as frações agrupadas, com as suas respectivas massas.

**Tabela 3** – Combinações e respectivas massas das frações obtidas da coluna cromatográfica do extrato obtido da biotransformação do fujenal por *Thamnostylum sp.*

Frações	Massa (mg)
1-4	21,8
5-10	21,8
11-14	13,0
15	4,5
16	3,6
17	3,7
18	1,8
19	1,2
20	0,8
21-31 (exceto a fração 27)	12,3
27	3,2
32-37	39,2
38-39	5,5
44-66	30,9
67-69	7,5
70	294,3

71-75	202,3
76-86	14,3
87-93	10,4
94	3,9
95	5,8
96	4,5
97	2,6
98	1,6
99	1,9
100	5,9
101	10,3
102	5,4
103	4,0
104	2,9
105	9,8
106-108	58,4
109	159,8
110-114	432,1
115-116	133,4
117	62,4

Dentre as frações obtidas na coluna anterior, a fração 27 apresentou uma mancha única, tendo sido enviada para análise por RMN. A fração combinada 32-37 foi recromatografada em coluna de sílica gel com o intuito de se isolar uma substância com Rf próximo ao do fujenal. Foram obtidas 25 frações, utilizando-se hexano, acetato de etila e metanol como solventes. Não foi possível isolar a substância em questão.

A fração combinada 44-60 também foi submetida a análise por CCD e cromatografia em coluna. Foram obtidas 27 frações. As dimensões da coluna foram 2 cm de diâmetro e 15 cm de comprimento, sendo utilizadas 26,82 g de sílica 230-400 mesh. A coluna foi eluída isocraticamente usando-se uma mistura de 20% de acetato de etila em hexano, já que, analisando-se a fração 44-60 por CCD com essa polaridade, foi obtido um Rf de 0,34, ideal para a

utilização da cromatografia em coluna “flash” [Still et al., 1978]. O produto obtido, com 1,5 mg, veio da combinação das frações 16-21 dessa última coluna.



# Capítulo 4

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A **Tabela 4** mostra os códigos utilizados para as amostras durante todo o experimento de biotransformação da canforquinona.

**Tabela 4** – Códigos das amostras dos experimentos de biotransformação da canforquinona

<b>Fungo</b>	<b>5 dias</b>	<b>10 dias</b>	<b>15 dias</b>	<b>20 dias</b>
<i>Mucor plumbeus</i>	Q1	Q11	Q21	Q31
<i>Mucor plumbeus</i> controle negativo	Q2	Q12	Q22	Q32
<i>Thamnostylum sp.</i>	Q3	Q13	Q23	Q33
<i>Thamnostylum sp.</i> controle negativo	Q4	Q14	Q24	Q34
<i>Syncephalastrum racemosum</i>	Q5	Q15	Q25	Q35
<i>Syncephalastrum racemosum</i> controle negativo	Q6	Q16	Q26	Q36
<i>Mucor plumbeus</i> , <i>Thamnostylum sp.</i> e <i>Syncephalastrum racemosum</i> controle positivo	Q7	Q17	Q27	Q37
<i>Lecanicillium muscarium</i>	Q8	Q18	Q28	Q38
<i>Lecanicillium muscarium</i> controle negativo	Q9	Q19	Q29	Q39
<i>Lecanicillium muscarium</i> controle positivo	Q10	Q20	Q30	Q40

### 4.1 Análise cromatográfica e espectrométrica da Biotransformação da Canforquinona

A análise das amostras obtidas pelo processo de extração descrito no item 3.3.4 foi feita, inicialmente, através de cromatografia gasosa. Para tal, foram utilizadas soluções (1% m/v) em frascos Eppendorf, sendo diclorometano o solvente. Posteriormente, a confirmação dos resultados foi realizada usando cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas.

#### **4.1.1 Cromatogramas obtidos por cromatografia gasosa na biotransformação da canforquinona**

Os cromatogramas obtidos para a canforquinona e para as alíquotas dos experimentos realizados estão apresentados no anexo (pág.129).

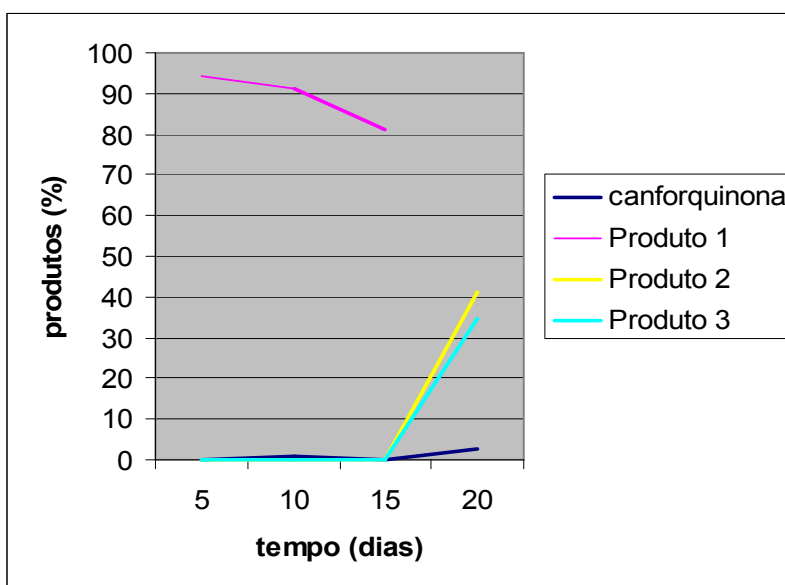
#### **4.1.2 Análise dos cromatogramas obtidos por cromatografia gasosa para a biotransformação da canforquinona**

A partir da análise dos cromatogramas obtidos foram construídos gráficos para cada uma das reações, com o intuito de verificar a metabolização da canforquinona pelos fungos e a sua conseqüente transformação estrutural pelos mesmos.

Para tanto, o controle negativo (meio + fungo) foi utilizado como branco das outras amostras, subtraindo-se, dos dados obtidos nos cromatogramas dos frascos de reação, os picos referentes ao meio de cultura ou aos metabólitos naturais do fungo no meio em que ele foi cultivado. Dessa forma, obteve-se uma monitoração da canforquinona e dos seus derivados, ao longo dos vinte dias de reação.

Os gráficos obtidos por esse processo estão dispostos a seguir. O tempo de retenção encontrado para o padrão de 1*R*-(-)-canforquinona (**44**) por CG, utilizado para comparação durante a construção dos gráficos, foi de 3,058 minutos.

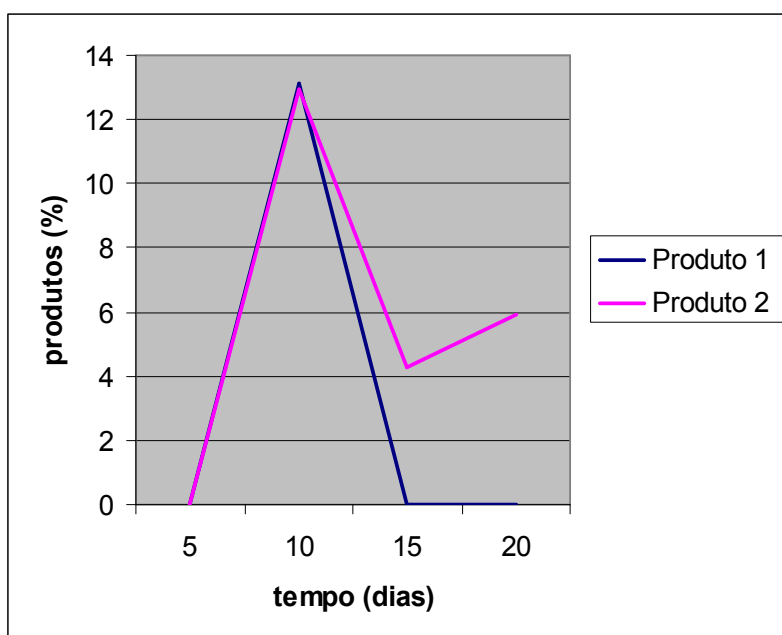
#### 4.1.2.1 Análise dos cromatogramas obtidos na biotransformação da canforquinona por *Mucor plumbeus*



**Figura 26** – Porcentagens de canforquinona e dos produtos derivados da sua biotransformação com o fungo *Mucor plumbeus*

De acordo com a **Figura 26**, observou-se que a canforquinona foi recuperada em quantidade reduzida na reação de biotransformação desta substância com o fungo *Mucor plumbeus*. Notou-se também que os produtos 1, 2 e 3 mostraram rendimentos altos, com taxa máxima de reação de 5 dias, para o produto 1, e 20 dias para os produtos 2 e 3. Observa-se também que, para o produto 1, após um valor percentual inicial alto (94,15%), houve um decréscimo nos valores seguintes. Uma hipótese para explicar o fato seria que, inicialmente a canforquinona tenha sido metabolizada nos produtos 1, 2 e 3 e, posteriormente, o produto 1 tivesse sido parcialmente convertido nos produtos 2 e 3.

#### 4.1.2.2 Análise dos cromatogramas obtidos na biotransformação da canforquinona por *Thamnostylum sp.*

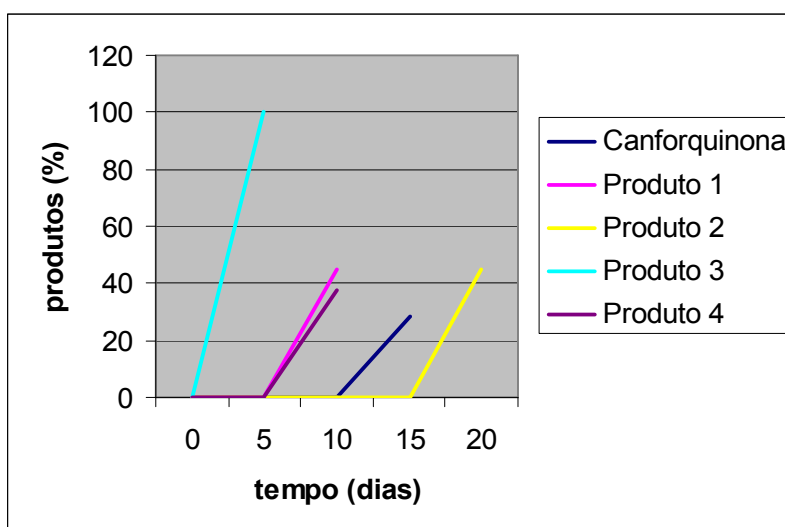


**Figura 27** – Porcentagens dos produtos derivados da biotransformação da canforquinona com o fungo *Thamnostylum sp.*

A reação de biotransformação envolvendo o fungo *Thamnostylum sp.* apresentou 2 produtos (**Figura 27**), sendo que, no caso do produto 1, o derivado foi observado apenas com 10 dias de incubação, não sendo detectado antes ou após esse prazo. Esse fato poderia dever-se a uma grande instabilidade do produto formado, que poderia ter se degradado antes da análise com 15 dias de reação.

O segundo produto, por sua vez, foi detectado com 10, 15 e 20 dias, porém de forma irregular, com um decréscimo inicial de 12,93% para 4,27% e um aumento posterior para 5,91%. Inicialmente, pode ter ocorrido uma metabolização do produto 2, diminuindo a sua concentração no meio de reação. Após essa reação, o fungo voltou a metabolizar o substrato de partida, a canforquinona, convertendo-o novamente no produto 2, aumentando a sua concentração naquele meio de 4,27% para 5,91% [Pedras et al., 2000].

#### 4.1.2.3 Análise dos cromatogramas obtidos na biotransformação da canforquinona por *Lecanicillium muscarium*

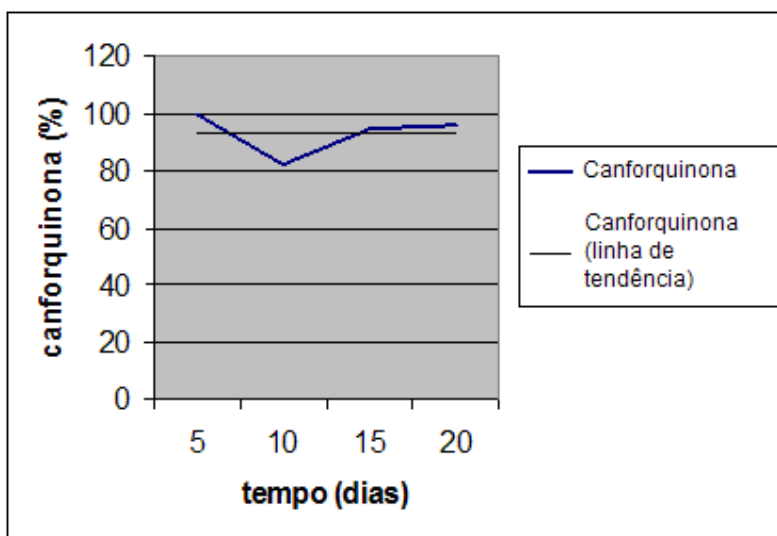


**Figura 28** – Porcentagens de canforquinona e dos produtos derivados da sua biotransformação com o fungo *Lecanicillium muscarium*

Para o fungo *Lecanicillium muscarium*, o perfil dos cromatogramas também se mostrou bastante irregular, tanto com relação aos tempos (número de dias) em que os produtos foram detectados, quanto em relação às quantidades percentuais dos mesmos. Em quase todos os casos, o derivado da canforquinona foi detectado apenas uma vez (exceto no caso do produto 3, detectado com 5 e 20 dias, porém em quantidades muito diferentes). No caso desse produto (em quantidade inicial de 100%), tendo sido a detecção inicial feita em 5 dias, o mesmo pode ter sido metabolizado nos outros produtos, observados apenas com 10 ou 20 dias. Observou-se também a presença da canforquinona com 15 dias de reação (**Figura 28**).

Realizou-se a análise de uma amostra da reação envolvendo o fungo em questão (alíquota recolhida com 15 dias de reação) por CG-EM para a identificação do produto majoritário da reação. Por essa análise, descrita no item 4.1.3, observou-se a presença de um pico com  $m/z$  168, sugerindo a presença de um produto de redução de uma das carbonilas da canforquinona.

#### 4.1.2.4 Análise dos cromatogramas obtidos na biotransformação da canforquinona por *Syncephalastrum verruculosum*



**Figura 29** - Porcentagens de canforquinona durante a sua biotransformação com o fungo *Syncephalastrum racemosum*

A análise do gráfico acima mostrou que não ocorreu a biotransformação da canforquinona pelo fungo *Syncephalastrum racemosum*, sendo esta recuperada em todos os dias de reação, como evidenciado pelo seu tempo de retenção (3,183 minutos).

A linha de tendência (**Figura 29**) mostrou um pequeno decréscimo da canforquinona ao longo do período de reação. Esse decréscimo pode ser devido à volatilização da canforquinona.

#### 4.1.3 Análise por CG-EM de amostras selecionadas da biotransformação da canforquinona

Como pode ser observado no item 4.1.1, para algumas amostras os cromatogramas obtidos foram inconclusivos em relação à reação de biotransformação da canforquinona. Com o intuito de se comprovar algumas hipóteses obtidas na análise dos primeiros cromatogramas, foi feita uma segunda análise, em CG-EM, de amostras selecionadas. As amostras

selecionadas foram aquelas para as quais se obteve resultado mais promissor em relação à obtenção de produtos de biotransformação, após a análise por CG, e também aquelas que apresentaram poucos ou nenhum pico na primeira análise por CG, tornando inconclusivos os experimentos. Foi necessário, então, obter-se novos cromatogramas, desta vez tentando-se também a obtenção de espectros de massa, com o objetivo de se confirmar ou não a existência de derivados da canforquinona.

A polaridade das colunas utilizadas na análise por CG e CG-EM é parecida, sendo a primeira composta de polimetilsiloxano e, a segunda, de polimetilsiloxano 95% e fenilsiloxano 5%. A diferença encontrada no tempo de retenção da canforquinona e dos seus derivados para as duas análises não se originou da composição da coluna, mas das condições utilizadas durante a análise das amostras. Na análise feita em CG-EM, o controle de temperatura usado foi diferente e a vazão de gás foi menor em relação àquela utilizada para a análise por CG, para possibilitar que a amostra ficasse por tempo suficiente na fonte de ionização, onde ocorre a colisão com o feixe de elétrons.

Observou-se, também, uma inversão na ordem de saída dos produtos em relação à canforquinona. Na análise por CG, o tempo de retenção dos produtos foi maior que o da canforquinona, sendo encontrado o inverso por CG-EM. A inversão ocorrida vem do fato de que, sendo inerte o gás utilizado no experimento, a única interação existente é entre o analito e o material que compõe a coluna. Nas colunas de menor polaridade, como a utilizada neste experimento, as substâncias são separadas por ordem de pressão de vapor, ou seja, aquela que tiver menor pressão de vapor eluiria da coluna primeiro. No caso da canforquinona e do seu derivado mono-hidroxilado, as substâncias são muito parecidas, o que faz com que a substância mais polar (o ceto-álcool), por interagir menos com a coluna, seja detectada primeiro na análise [Turner e Acosta, 2000].

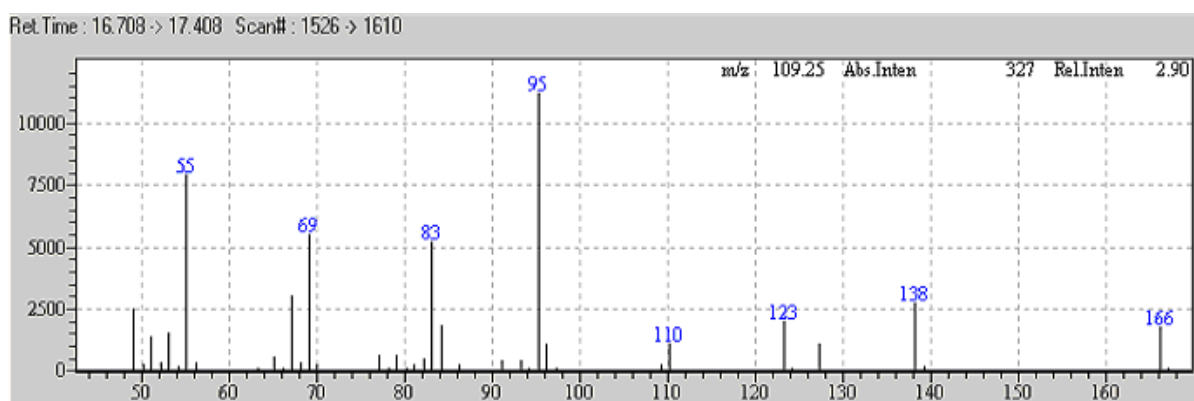
#### **4.1.3.1 Cromatogramas e espectros de massas obtidos na biotransformação da canforquinona**

Não foi possível a obtenção dos espectros de massas de algumas amostras devido à baixa quantidade de íons gerada após a separação da

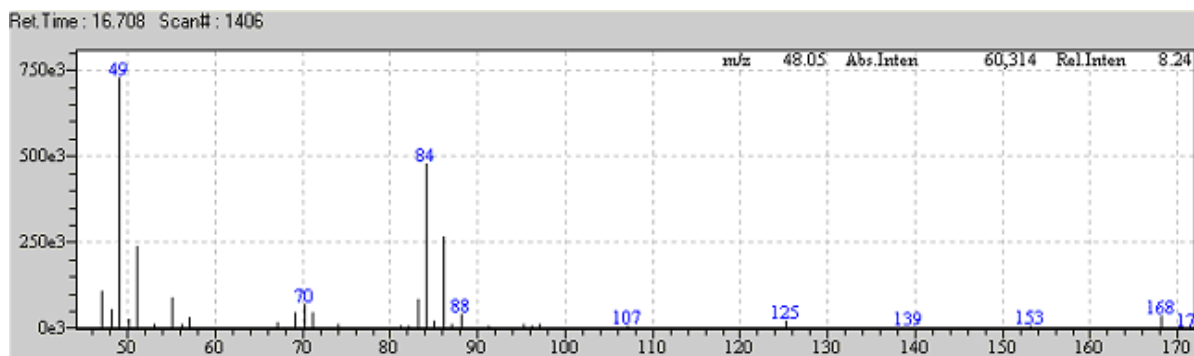


amostra no cromatógrafo. Nesses casos, a conclusão a respeito da obtenção de um produto de biotransformação, ou da recuperação da canforquinona, foi feita através de comparações com cromatogramas de amostras que apresentaram espectros de massas conclusivos a respeito da reação ocorrida. Os gráficos dessas comparações, bem como a sua análise, estão apresentados nos itens 4.1.3.3 e 4.1.3.4.

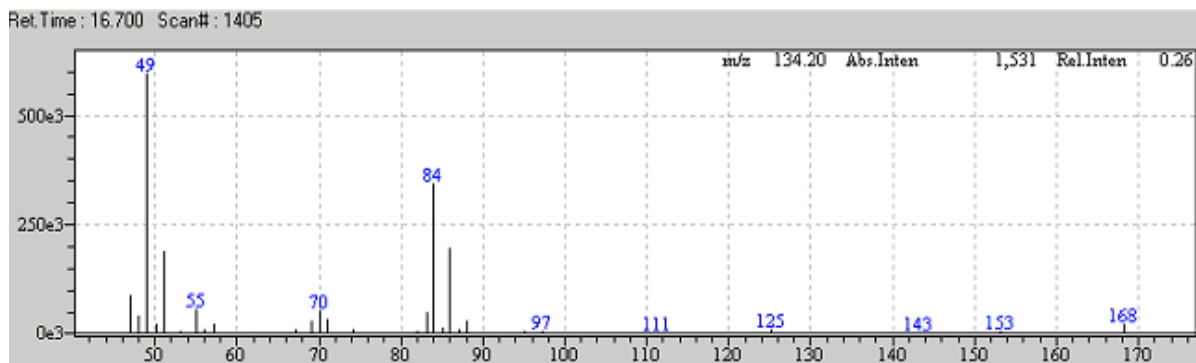
As figuras a seguir apresentam os espectros de massas obtidos para os experimentos realizados com os fungos *Mucor plumbeus*, *Thamnostylum sp.*, *Lecanicillium muscarium* para a biotransformação da canforquinona (**Figuras 30-35**, pág.67-69).



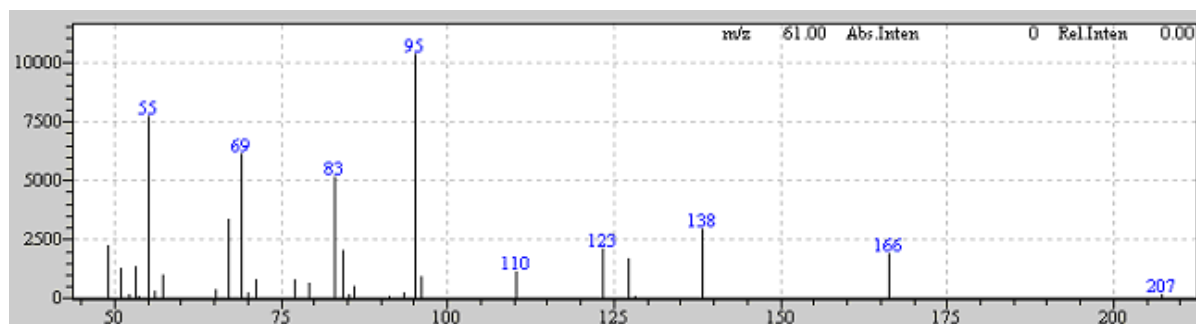
**Figura 30** – Espectro de massas da 1R-(-)-canforquinona



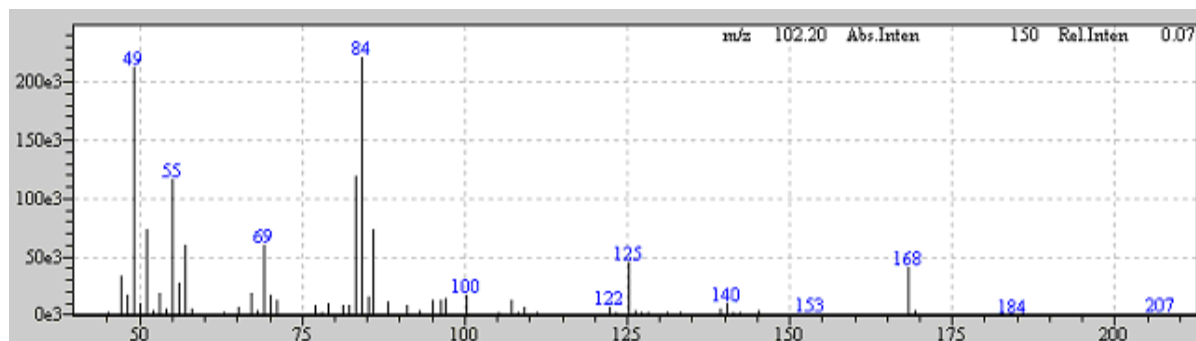
**Figura 31** – Espectro de massas da amostra obtida com 15 dias de reação da canforquinona com o fungo *Mucor plumbeus* (Q21)



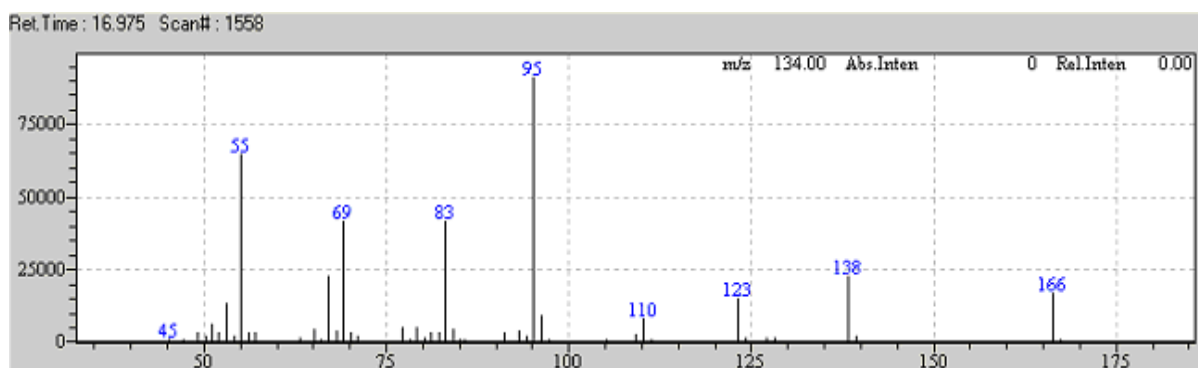
**Figura 32** – Espectro de massas da amostra obtida com 20 dias de reação da canforquinona com o fungo *Mucor plumbeus* (Q31)



**Figura 33** – Espectro de massas da amostra obtida com 20 dias de reação da canforquinona com o fungo *Thamnostylum sp.* (Q13)



**Figura 34** – Espectro de massas da amostra obtida com 15 dias de reação da canforquinona com o fungo *Lecanicillium muscarium* (Q28).



**Figura 35** – Espectro de massas da amostra obtida com 20 dias como controle positivo para a reação da canforquinona com o fungo *Lecanicillium muscarium* (Q37).

### 4.1.3.2 Proposta de fragmentação da canforquinona no espectro de massas

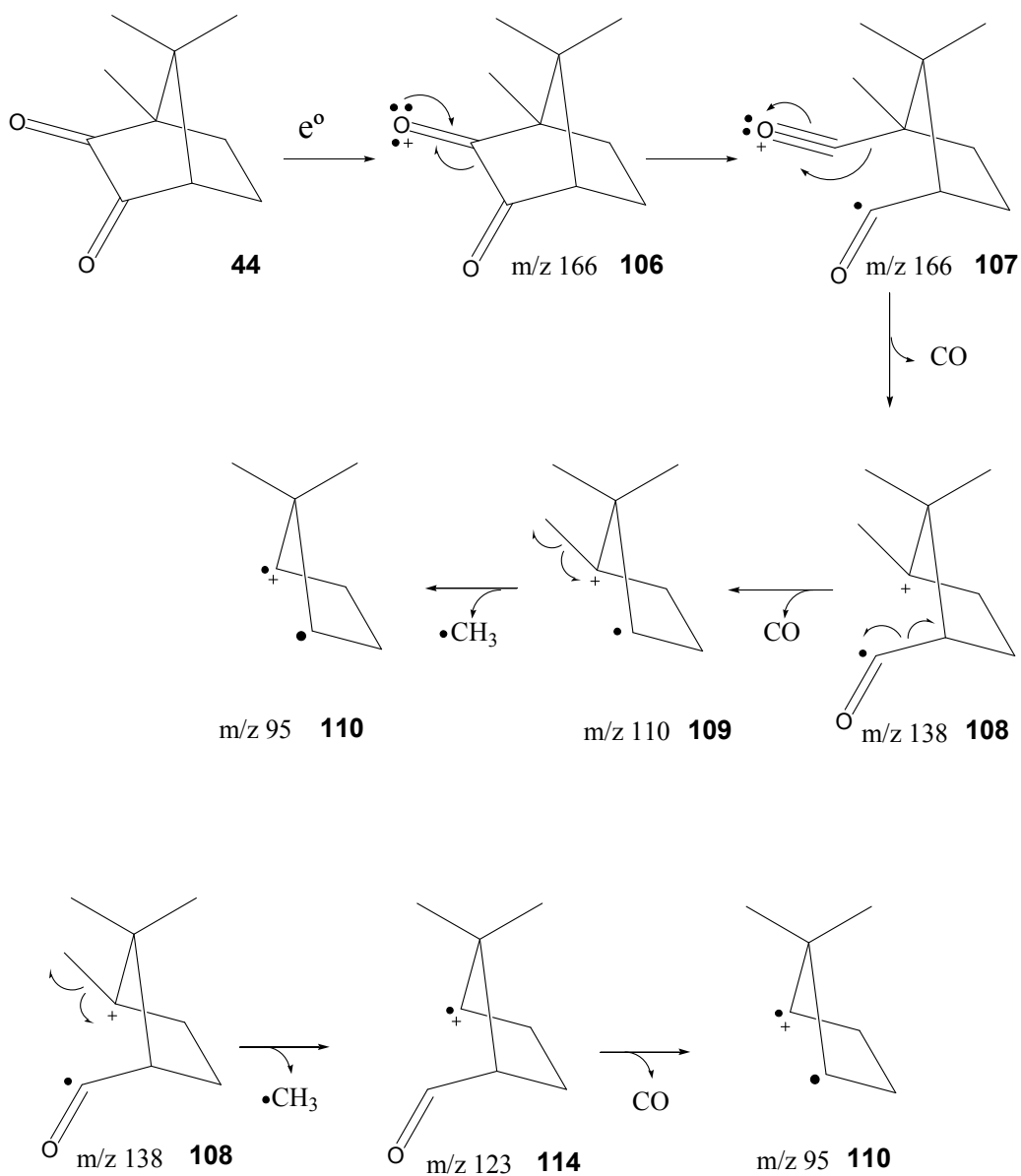


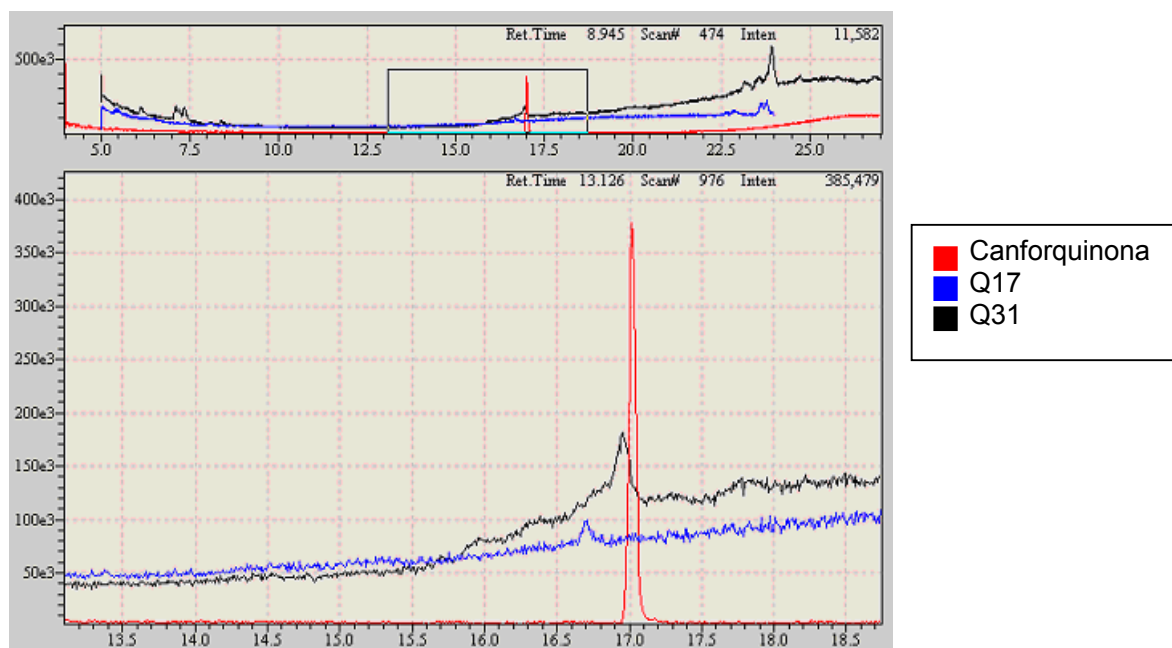
Figura 36 – Estruturas propostas para a fragmentação da canforquinona

Uma proposta para a fragmentação da molécula de canforquinona na espectrometria de massas encontra-se na **Figura 36**, pág.70.

#### 4.1.3.3 Controle negativo

Para os controles positivos (meios + canforquinona, sem fungo), foram feitas análises de CG-EM para as alíquotas obtidas em 5, 10, 15 e 20 dias para ambos os meios de cultura utilizados no experimento.

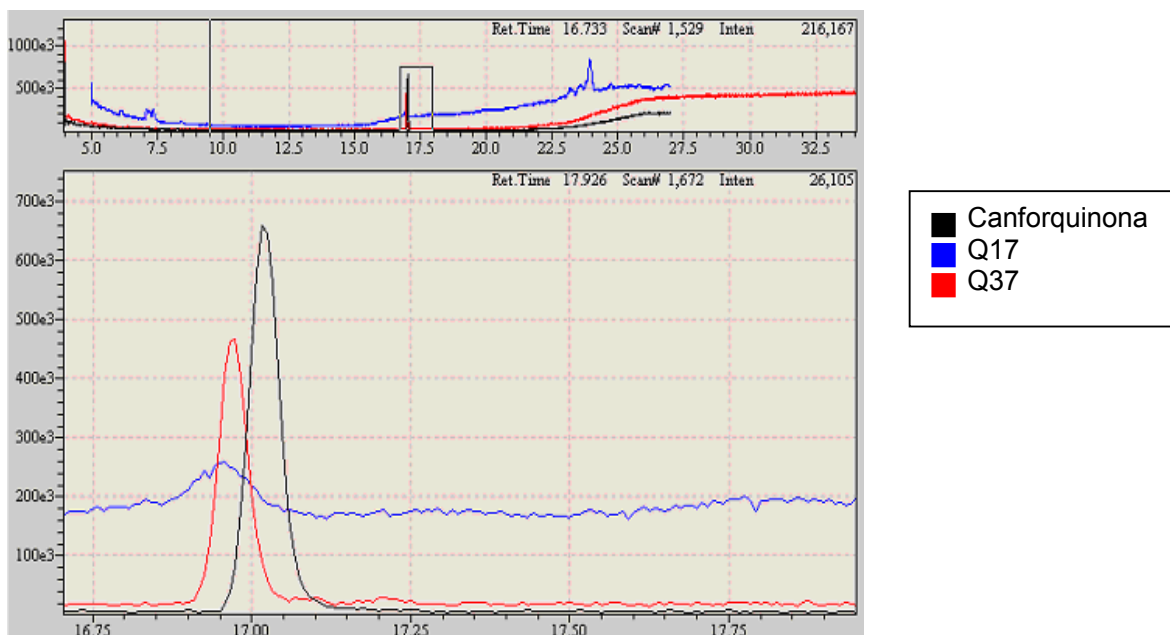
Observando-se o espectro de massas da alíquota Q37 do controle (**Figura 35**, pág.69), retirada após 20 dias de reação, conjuntamente ao cromatograma das amostras Q17, Q37 e do padrão de canforquinona (**Figura 38**, pág.72), pode-se concluir que a canforquinona permaneceu intacta neste meio mesmo após este tempo, pois notou-se a presença de um pico com tempo de retenção 16,975 minutos, valor observado para a canforquinona padrão. O espectro de massas obtido a partir do pico com tempo de retenção 16,975 minutos apresentou um pico com  $m/z$  166, massa correspondente à da canforquinona. A presença de picos com  $m/z$  168 ou 170, correspondentes à redução de uma ou de ambas carbonilas da canforquinona não foi observada.



**Figura 37** – Comparação entre os cromatogramas das amostras Q17, Q31 e da canforquinona

A **Figura 37**, pág.71, apresenta a superposição entre os cromatogramas da canforquinona e da amostra do controle Q17, onde se pode observar tempos de retenção idênticos. Para efeito de comparação, está representado também o cromatograma da amostra da amostra Q31, cujo pico apresentou um espectro de massas com  $m/z$  168.

Outro gráfico, apresentado a seguir (**Figura 38**), mostra a superposição dos cromatogramas dos controles Q17, Q37 e da canforquinona, mostrando que o substrato de partida da reação mostrou-se estável no meio em questão.



**Figura 38** – Comparação entre os cromatogramas das amostras Q17, Q37 e da canforquinona

A detecção da canforquinona somente em alguns dos cromatogramas pode ser devida a alguma deficiência no processo de extração, à pequena quantidade utilizada em cada alíquota (20 mL), ou até mesmo à evaporação da mesma, devido à sua alta volatilidade.

#### 4.1.3.4 Meios de reação

Para o fungo *Mucor plumbeus*, foram analisadas as amostras Q1, Q11, Q21 e Q31, correspondentes a 5, 10, 15 e 20 dias de reação, respectivamente. Os espectros de massas dos picos próximos ao tempo de retenção da canforquinona apresentaram picos com  $m/z$  168 em todas as amostras, mostrando que esse fungo provocou a redução de uma das carbonilas da canforquinona, o que foi detectado em todo o processo de reação.

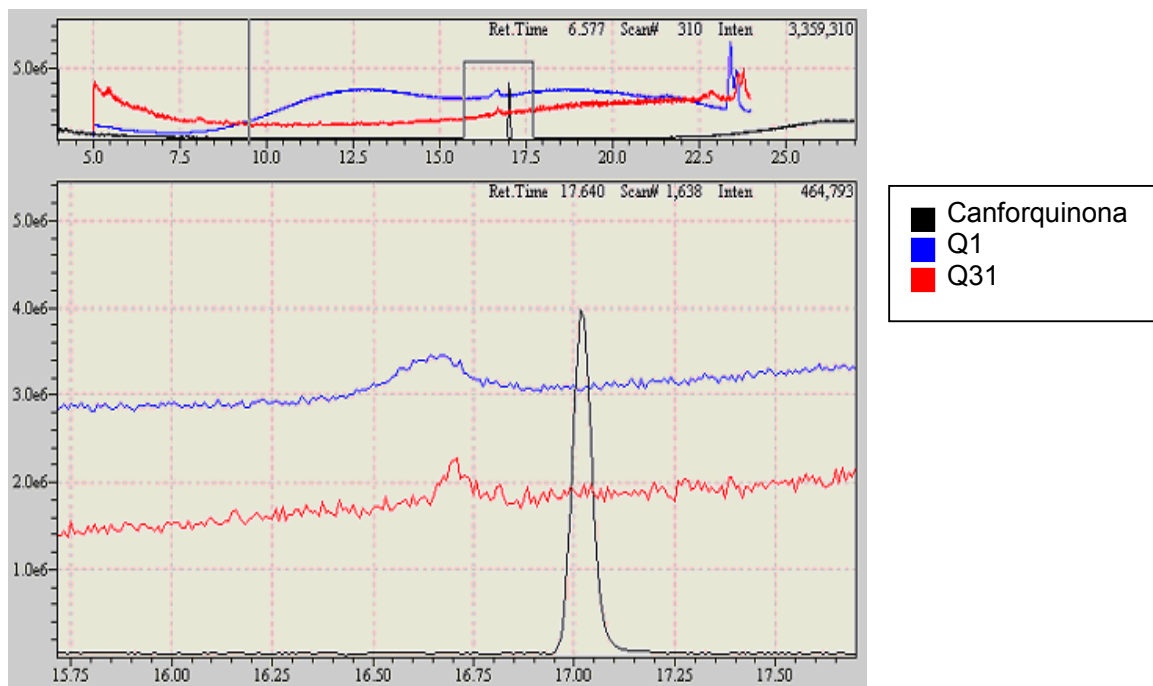
O fungo *Mucor plumbeus* foi escolhido para análise de todo o processo por ter apresentado resultados mais congruentes durante a análise dos primeiros experimentos (item 4.1) com relação à formação de produtos de biotransformação da canforquinona. Isto permitiu que fosse monitorado todo o curso desta reação, durante os 20 dias de incubação do fungo com o substrato, sendo então comprovada a redução de uma das carbonilas do mesmo por espectrometria de massas.

Para as amostras Q1 e Q11, como não foi possível obter os respectivos espectro de massas do pico de interesse, a análise foi feita por comparação dos cromatogramas destas amostras com aqueles da canforquinona ( $m/z$  166) e das alíquotas Q31 ( $m/z$  168) e Q17 ( $m/z$  166). O resultado, como mostrado nas **Figuras 39**, pág.74 e **40**, pág.75, a seguir, indicou que as amostras Q1 e Q11 possuíam picos com mesmo tempo de retenção que a amostra Q31, que apresenta espectro de massas com  $m/z$  168, referente à presença de um produto de redução da canforquinona

Na **Figura 39**, a comparação foi feita entre as amostras Q1 e Q31, que apresentaram tempo de retenção em 16,70 min e que geraram um pico em  $m/z$  168 no espectro de massas, e a canforquinona, com  $m/z$  166 no espectro de massas. Pode-se observar que o perfil dos cromatogramas Q1 e Q31 são semelhantes entre si e diferentes do da canforquinona, indicando serem ambos referentes a um derivado mono-hidroxilado da canforquinona.

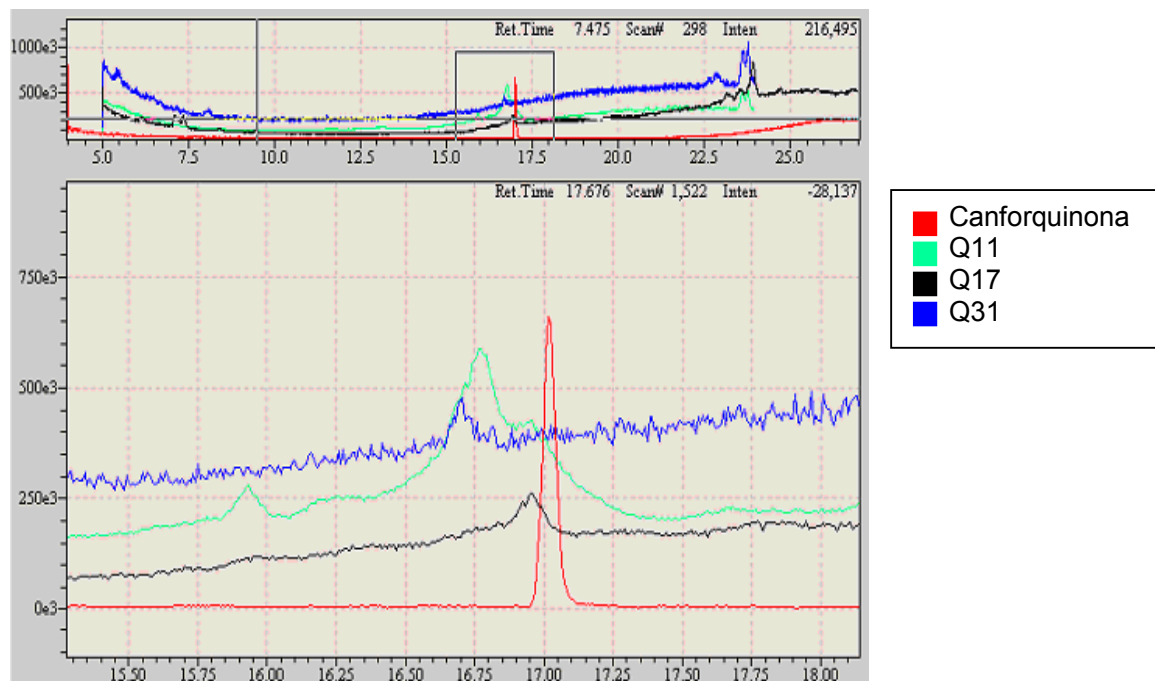
Na **Figura 40**, a análise foi feita comparando-se as amostras Q11, Q31 ( $m/z$  168), Q17 ( $m/z$  166) com a canforquinona ( $m/z$  166). O cromatograma de Q11 apresentou dois picos ( $t_R=16,75$  e  $16,95$  min). O maior sobrepôs ao pico correspondente à amostra Q31 ( $m/z$  168). O outro pico se superpôs aos picos

correspondentes às amostras Q17 e padrão (m/z 166), indicando tratar-se de uma mistura entre a canforquinona e um derivado mono-hidroxilado desta.



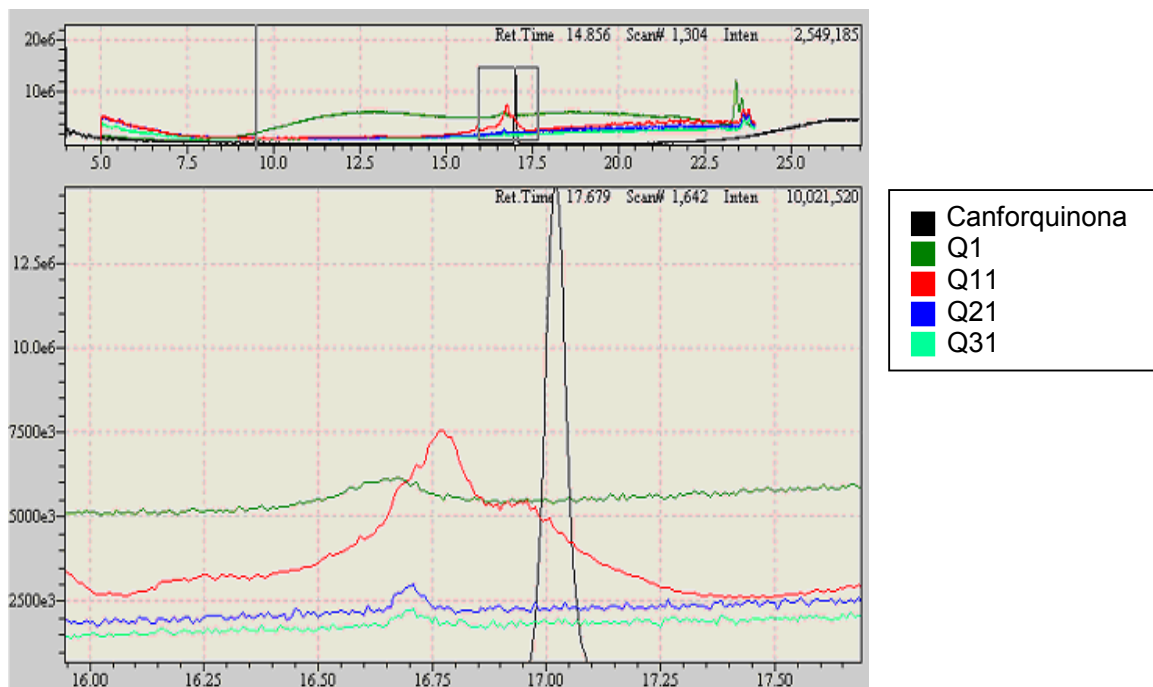
**Figura 39** – Comparação entre os cromatogramas das alíquotas Q1, Q31 e da canforquinona





**Figura 40** – Comparação entre os cromatogramas das amostras Q17, Q11, Q31 e da canforquinona

A **Figura 41**, pág.76, mostra o perfil do experimento como um todo, comparando os cromatogramas obtidos ao longo do experimento com relação ao fungo *Mucor plumbeus*. Essa figura mostra a superposição dos picos das amostras Q1 ( $t_R=16,65$  min), Q11 ( $t_R=16,75$  min), Q21 ( $t_R=16,70$  min) e Q31 ( $t_R=16,70$  min). Observou-se, também, que esses picos não se sobrepõem ao pico correspondente ao padrão ( $t_R=17,00$  min). Notou-se que os picos correspondentes às primeiras quatro amostras (à exceção de um dos picos da amostra Q11) se sobrepõem, todos correspondendo a um produto de redução de uma das carbonilas da canforquinona. O pico da amostra Q11 com  $t_R$  16,95 min sobrepõe-se ao pico da canforquinona, evidenciando a recuperação de parte do substrato inicial da reação.

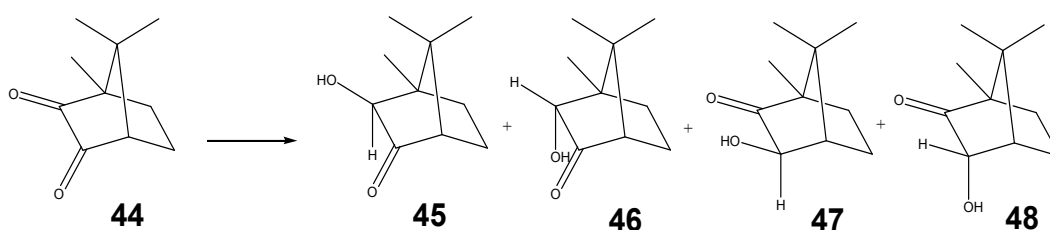


**Figura 41** – Comparação entre os cromatogramas das amostras Q1, Q11, Q21, Q31 e da canforquinona

Foram ainda analisadas duas outras amostras, Q13 e Q28. A amostra Q13, referente a 10 dias de reação do fungo *Thamnostylum sp.*, apresentou um pico com  $m/z$  166, indicando a recuperação da canforquinona. No caso da amostra Q28, referente a 15 dias de reação do fungo *Lecanicillium muscarium*, foi observado um pico em  $m/z$  168, evidenciando a presença de um produto de redução da canforquinona. Entretanto, a falta de dados não possibilitou o monitoramento desse produto nos outros dias de reação com o fungo *Lecanicillium muscarium*.

## 4.2 Cálculos teóricos para a obtenção das populações dos possíveis produtos de redução da 1*R*-(-)-canforquinona.

A partir dos dados obtidos por CG e CG-EM, para a reação da 1*R*-(-)-canforquinona com os fungos *Mucor plumbeus*, *Thamnostylum sp.*, *Lecanicillium muscarium* e *Syncephalastrum racemosum*, constatou-se que houve a redução dessa molécula, o substrato de partida, que foi transformado em um ou mais cetoálcoois pelos três primeiros microrganismos citados, de acordo com a **Figura 42**.



**Figura 42** – Estruturas dos cetoálcoois possíveis de serem obtidos a partir da 1*R*-(-)-canforquinona (44).

Analisando dados da literatura sobre a reação de biotransformação da canforquinona com outros organismos, notou-se que há certa preponderância de um dos produtos (48) em relação aos demais, como pode ser observado na **Tabela 5**, pág.78. Foi realizado um estudo teórico com o objetivo de se entender esse fato. O objetivo desse estudo foi verificar a estabilidade relativa desses produtos em solução e, dessa forma, determinar teoricamente as porcentagens relativas desses produtos na reação.

Para a realização dos cálculos, levou-se em conta o fato de que não havia como calcular a variação da energia global para a reação, já que não se tinha informações a respeito de quais reagentes, além da canforquinona, que participavam da reação, pois a(s) enzima(s) que os microrganismos utilizam nesse processo não são conhecidas. Apesar disso, a estabilidade dos produtos poderia ser avaliada tendo em vista que a mistura dos cetoálcoois foi obtida a partir dos mesmos reagentes. Dessa forma, a energia livre de Gibbs relativa, determinada a partir da estrutura mais estável em fase gasosa, poderia ser empregada na determinação da população teórica das espécies.

**Tabela 5** - Quantidades percentuais dos monocetoálcoois obtidos como produtos da biotransformação da 1*R*-(-)-canforquinona com diversos organismos

<b>Organismo</b>	<b>45</b>	<b>46</b>	<b>47</b>	<b>48</b>	<b>Referência</b>
<i>M. plumbeus</i>	21	28	0	51	68
<i>A. niger</i>	80	3	3	12	16
<i>F. solani</i>	26	7	8	57	16
<i>G. cingulata</i>	24	6	17	51	16
<i>M. mucedo</i>	30	43	2	22	16
<i>R. solani</i>	33	24	2	40	16

Este estudo foi realizado pelo Dr. Cléber Paulo Andrada Anconi, sob a orientação dos professores Wagner Batista de Almeida (UFMG) e Hélio Ferreira dos Santos (UFJF). As estruturas dos quatro cetoálcoois foram otimizadas sem qualquer restrição de geometria ou simetria, usando Post-HF Møller-Plesset *second order perturbation theory* (MP2) [Szabo et al., 1996]. Para todas as estruturas, em otimizações e cálculos de freqüências harmônicas, o conjunto de funções de base de Pople 6-31G(d,p) [Ditchfield et al., 1971] foi utilizado.

Após o cálculo de freqüências harmônicas, todas as estruturas investigadas foram caracterizadas como mínimo na Superfície de Energia Potencial (PES) no nível de teoria utilizado (todas as freqüências calculadas são reais).

Teoricamente, os valores relativos da energia livre de Gibbs ( $\Delta G$ ) são determinados através da soma dos valores relativos de energia eletrônica-nuclear ( $\Delta E_{\text{ele-nuc}}$ ), resultantes da resolução da equação de Schrödinger independente do tempo, para uma molécula isolada no vácuo perfeito, à correção térmica à energia livre de Gibbs ( $\Delta G_T$ ), grandeza dependente da temperatura e da pressão.

A correção térmica à energia livre de Gibbs ( $G_T$ ), de cada estrutura analisada, foi obtida em cálculos quânticos de freqüências harmônicas, por

intermédio das equações da termodinâmica estatística [Mcquarrie et al., 1973], nas quais são empregadas as aproximações da partícula na caixa, rotor rígido e oscilador harmônico na obtenção das funções de partição translacional, rotacional e vibracional. A partir das funções de partição, as quantidades termodinâmicas (entalpia, entropia e energia livre de Gibbs) são determinadas.

Com o objetivo de se obter dados termodinâmicos mais realistas, o efeito do solvente foi adicionado utilizando-se o modelo *Polarizable Continuum Model* (PCM) [Cossi et al., 1996; Barone et al., 1997], sendo os cálculos de energia, nos quais o efeito do solvente foi considerado, efetuados empregando-se as estruturas otimizadas previamente, no nível de teoria MP2/6-31G(d,p), em fase gasosa. Assim, a energia livre de Gibbs relativa em solução ( $\Delta G_{sol}$ ) foi calculada como a soma da energia livre de Gibbs relativa ( $\Delta G$ ) e a energia de solvatação relativa, em água ( $\epsilon = 78,39$ ) foi determinada empregando como referência o mínimo global em fase gasosa. Todos os cálculos foram feitos no Laboratório de Química Computacional e Modelagem Molecular (LQC-MM), Departamento de Química, ICEx, UFMG, usando o pacote de programas de mecânica quântica *Gaussian Program 2003* [Frisch et al., 2003].

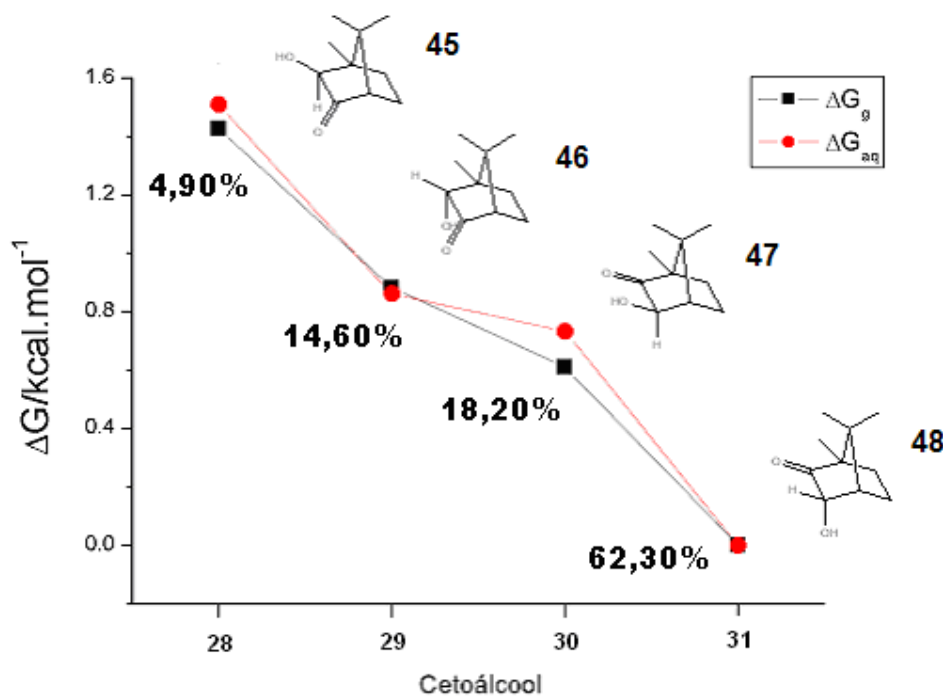
A **Tabela 6**, pág.80, mostra a energia livre de Gibbs relativa em fase gasosa e em solução, utilizando a água como solvente e a população relativa da mistura dos quatro cetoálcoois. Os valores das energias livres de Gibbs relativas foram calculados tendo a molécula **48** como referência, justificando o valor zero disposto na **Tabela 6**. Esse produto mostrou ser o mais estável, a  $T=298,15K$  e  $p=1,0atm$ . Observa-se, pela **Tabela 6**, que as energias livres de Gibbs relativas obtidas para os produtos em fase gasosa e em solução não apresentaram diferenças significativas. Isso ocorreu devido às pequenas diferenças nas energias de solvatação calculadas para os mesmos. Observou-se também, de acordo com as energias livres de Gibbs relativas em solução, que provavelmente existirá uma mistura dos quatro cetoálcoois à temperatura ambiente, em solução aquosa, com forte preponderância para o produto representado por **48**.

**Tabela 6** - Energia livre de Gibbs relativa em fase gasosa ( $\Delta G$ ) e em solução ( $\Delta G_{sol}$ ), em  $\text{Kcal.mol}^{-1}$ , e população da mistura dos quatro cetoálcoois, a  $T=298,15\text{K}$  e  $p=1\text{atm}$ .

Produto	$\Delta G$	$\Delta G_{sol}$	População* (%)
45	1,43	1,51	4,90
46	0,88	0,86	14,60
47	0,61	0,73	18,20
48	0,00	0,00	62,30

\*Determinado em solução (água) empregando o nível de teoria MP2/6-31G(d,p). O efeito do solvente foi adicionado utilizando-se o modelo *Polarizable Continuum Model* (PCM).

O gráfico a seguir (**Figura 43**), mostra as diferenças relativas na energia livre de Gibbs dos produtos em fase gasosa e em solução aquosa, assim como a população teórica desses produtos, determinada a  $T=298,15\text{K}$  e  $p=1,0\text{atm}$ .

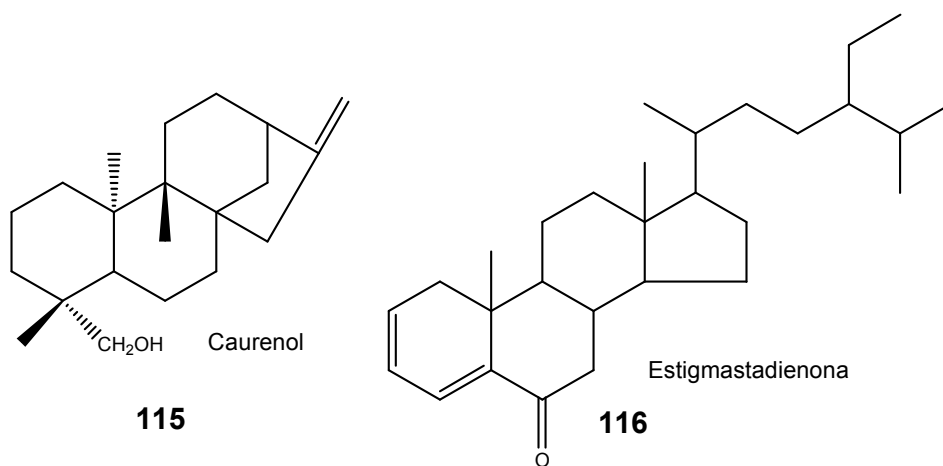


**Figura 43** – Gráfico dos valores relativos das energias livres de Gibbs em fase gasosa e em solução aquosa obtidos pelos cálculos teóricos feitos com os quatro produtos, no nível MP2/6-31G(d,p).

Como resultado deste estudo, observou-se coerência entre o produto principal da reação com vários fungos relatado na literatura com aquele que apresenta maior população teórica, embora os quatro cetoálcoois possíveis de serem formados possuam valores relativos de energias livres de Gibbs próximas. Entretanto, a literatura relata que alguns organismos, como o *A. niger* [Miyazawa et al., 1995], são capazes de fornecer, como produto principal, o cetoálcool **45** que, teoricamente, além de ter a maior energia livre de Gibbs, também é aquele que teria menor população teórica. Isto mostra o potencial do uso de fungos em síntese orgânica, já que é possível obter produtos majoritários diferentes usando microrganismos diferentes. Mesmo considerando-se o mesmo gênero, *Mucor*, os produtos majoritários fornecidos por duas espécies diferentes (*M. mucedo* e *M. plumbeus*) são diferentes.

### 4.3 Biotransformação do fujenal

Após se estudar a biotransformação da canforquinona com os fungos *Mucor plumbeus*, *Syncephalastrum racemosum*, *Lecanicillium muscarium* e *Thamnostylum sp.*, tentou-se fazer a biotransformação de outras moléculas utilizando-se dois desses microrganismos. Inicialmente, tentou-se fazer a biotransformação do caurenol (**115**) [Raldugin et al., 1976] e da estigmastadienona (**116**) [Turner, 1991] (**Figura 44**, pág.82) com o fungo *Mucor plumbeus*, com o qual foram obtidos os resultados mais promissores na reação com a canforquinona. Não sendo obtidos produtos de biotransformação com esse fungo, fez-se a biotransformação do fujenal (**94**, **Figura 23**, página 43), um diterpeno, com o fungo *Thamnostylum sp.*.



**Figura 44** – Estrutura do caurenol (**115**) e da estigmastadienona (**116**)

Obtiveram-se 3,65 g de extrato, que foi posteriormente submetido a cromatografia em camada delgada e em coluna de sílica gel.

Em uma primeira análise do extrato por cromatografia em camada delgada, utilizando-se o fujenal como padrão, observou-se apenas uma mancha fraca com tR igual ao do fujenal presente na placa. Apesar de não terem sido visualizadas manchas nítidas referentes a produtos, o extrato foi submetido à cromatografia em sílica gel.

#### 4.3.1 Caracterização do fujenal e dos produtos da sua biotransformação por *Thamnostylum* sp.

As análises foram feitas utilizando-se os espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$ , subespectro DEPT-135 e os mapas de contornos de HMQC e HMBC.

##### 4.3.1.1 Elucidação estrutural do fujenal

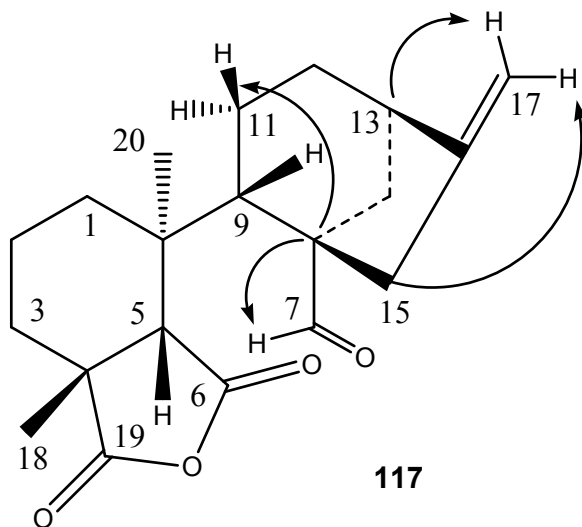
Por ser uma molécula conhecida a algum tempo [Avent et al., 1985], o fujenal já apresenta seus dados de RMN de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$  atribuídos na literatura [Avent et al., 1985]. Dessa forma, foi feita uma comparação dos dados obtidos com os dados já registrados anteriormente (**Tabela 7**, pág.83, **Figuras 46-52**, pág.85-91).



**Tabela 7** – Dados de RMN de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$  encontrados para o fujenal em  $\text{CDCl}_3$ 

Carbono	Dados da literatura (Avent et al., 1985)		Fujenal	
	$\delta_{\text{C}}$ (100 MHz)	$\delta_{\text{H}}$ (400 MHz)	$\delta_{\text{C}}$ (100 MHz)	$\delta_{\text{H}}$ (400 MHz)
1	33,30	1,80 e 1,60	33,29	1,82 (m) e 1,64 (m)
2	17,86	1,60 e 1,40	17,82	1,63 (m) e 1,36 (m)
3	28,83	2,35 e 1,21	28,89	2,34 (d) <i>J</i> 2,35 Hz e 1,22 (m)
4	44,60	-	44,58	-
5	56,25	2,61	56,22	2,61 (s)
6	172,42	-	172,58	-
7	203,74	9,70	203,97	9,70 (s)
8	58,98	-	58,97	-
9	46,49	2,67	46,32	2,68 (m)
10	41,91	-	41,89	-
11	19,62	1,92 e 1,70	19,61	1,93 (m) e 1,70 (m)
12	32,06	2,00 e 1,50	31,93	2,00 e 1,50 (m)
13	44,00	2,85	43,92	2,85
14	32,44	1,70 e 1,60	32,40	1,70 (m) e 1,61(m)
15	42,84	2,46 e 2,20	42,75	2,22 (d) <i>J</i> 2,20 Hz e 2,45 (d) <i>J</i> 2,47 Hz
16	150,97	-	150,87	-
17	105,07	4,96 e 4,83	105,15	4,92 (s) e 4,83 (s)
18	29,81	1,37	29,90	1,37 (s)
19	175,89	-	175,76	-
20	22,68	0,87	22,65	0,87 (s)

Algumas correlações importantes também puderam ser vistas nas expansões dos mapas de contornos HMBC (**Figuras 50-52**, pág.89-91), entre C-8 e H-7 ( $^2J$ ), C-8 e H-11 ( $^3J$ ), C-15 e H-17 ( $^3J$ ) e entre C-13 e H-17 ( $^3J$ ) (**Figura 45**).



**Figura 45** – Algumas correlações do fujenal (**94**) observadas nos mapas de contornos de HMBC.

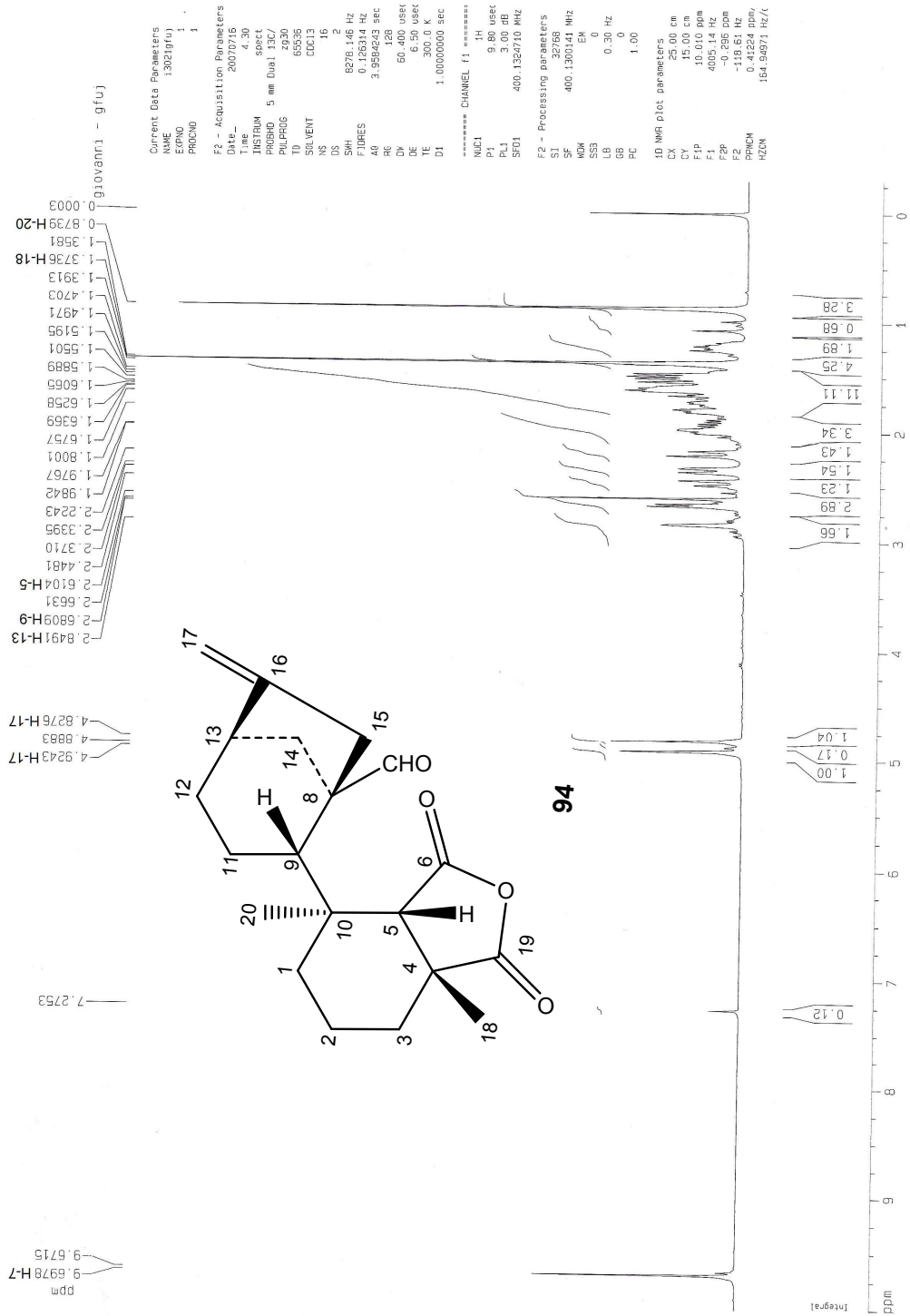
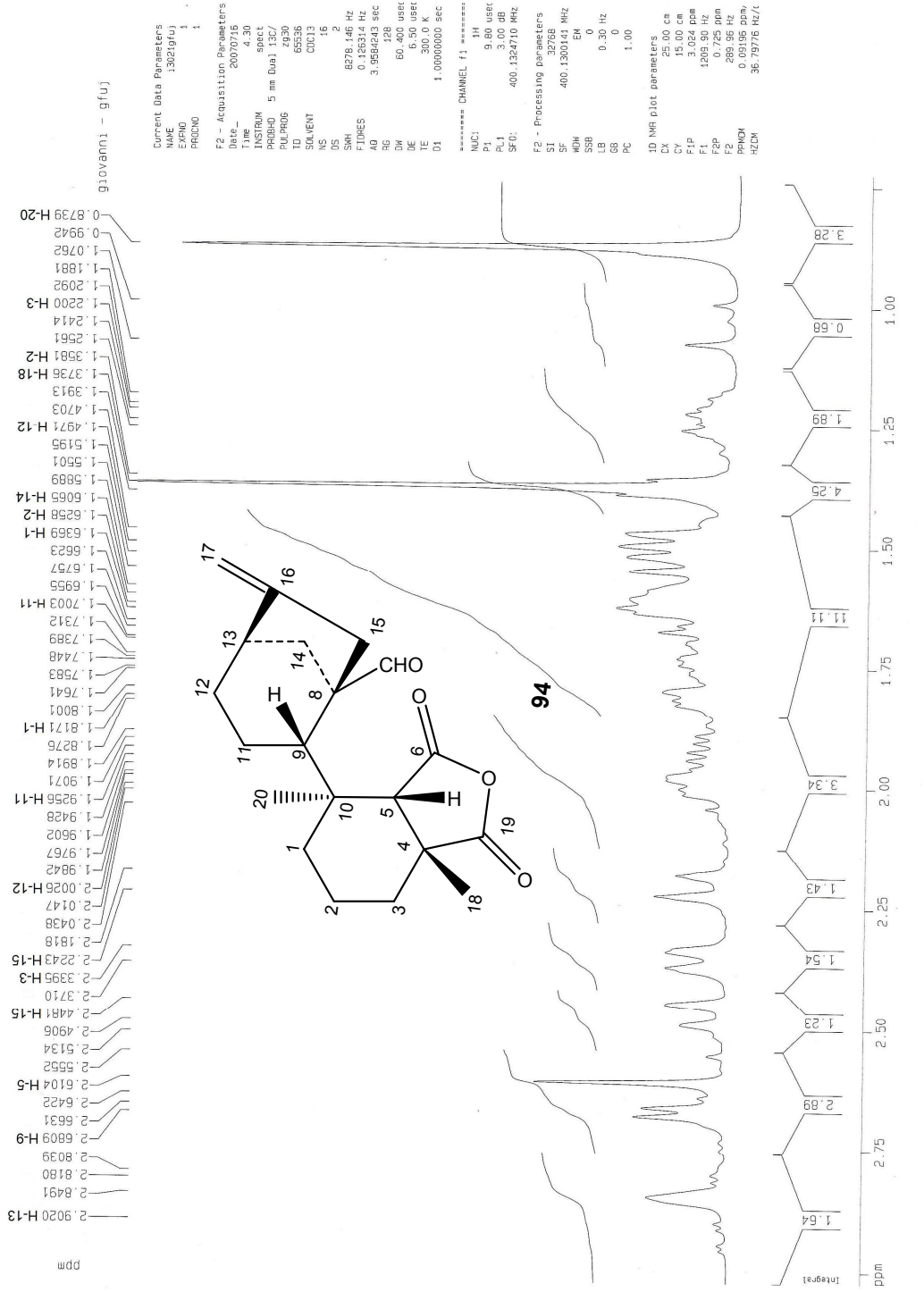
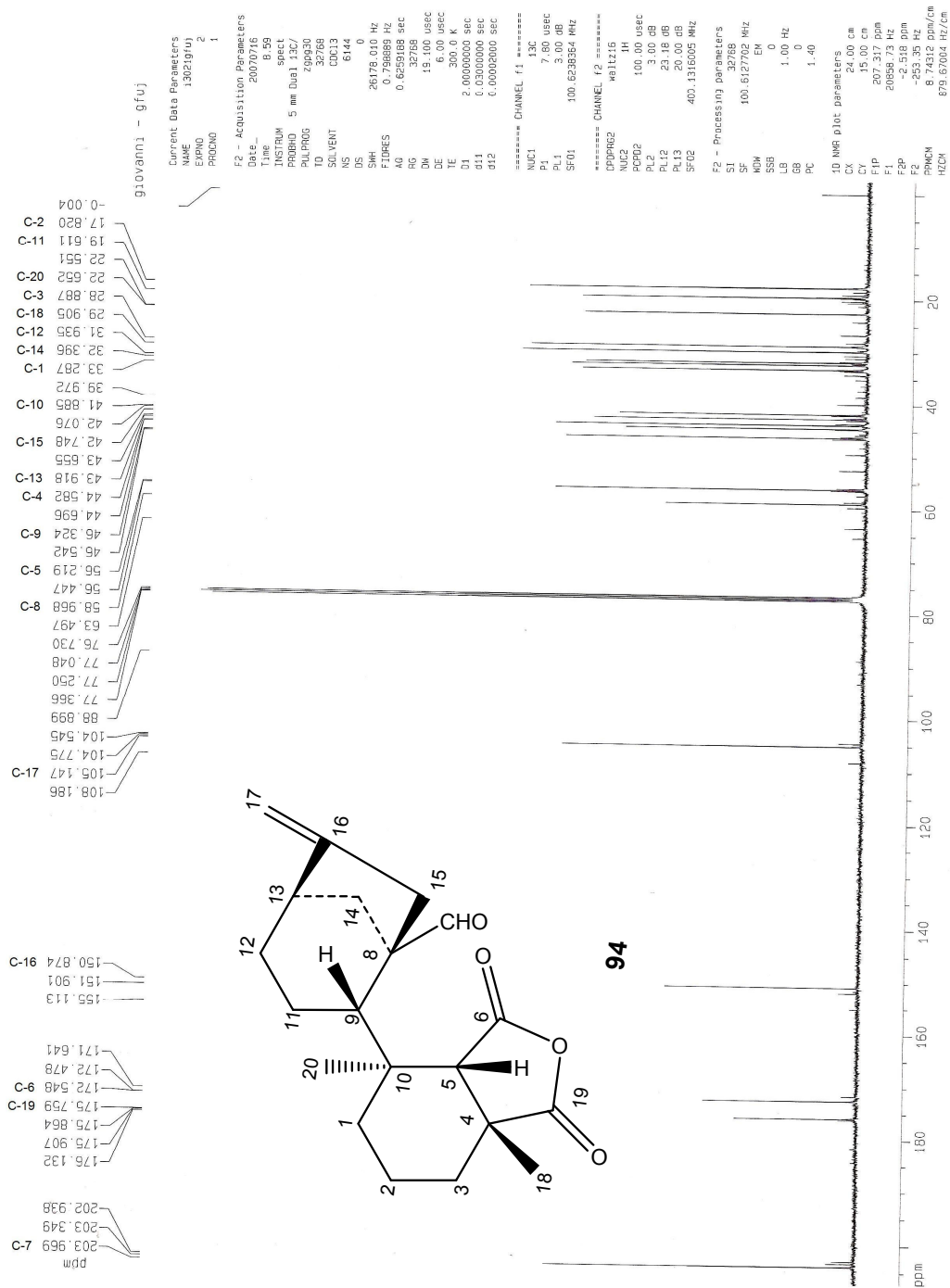


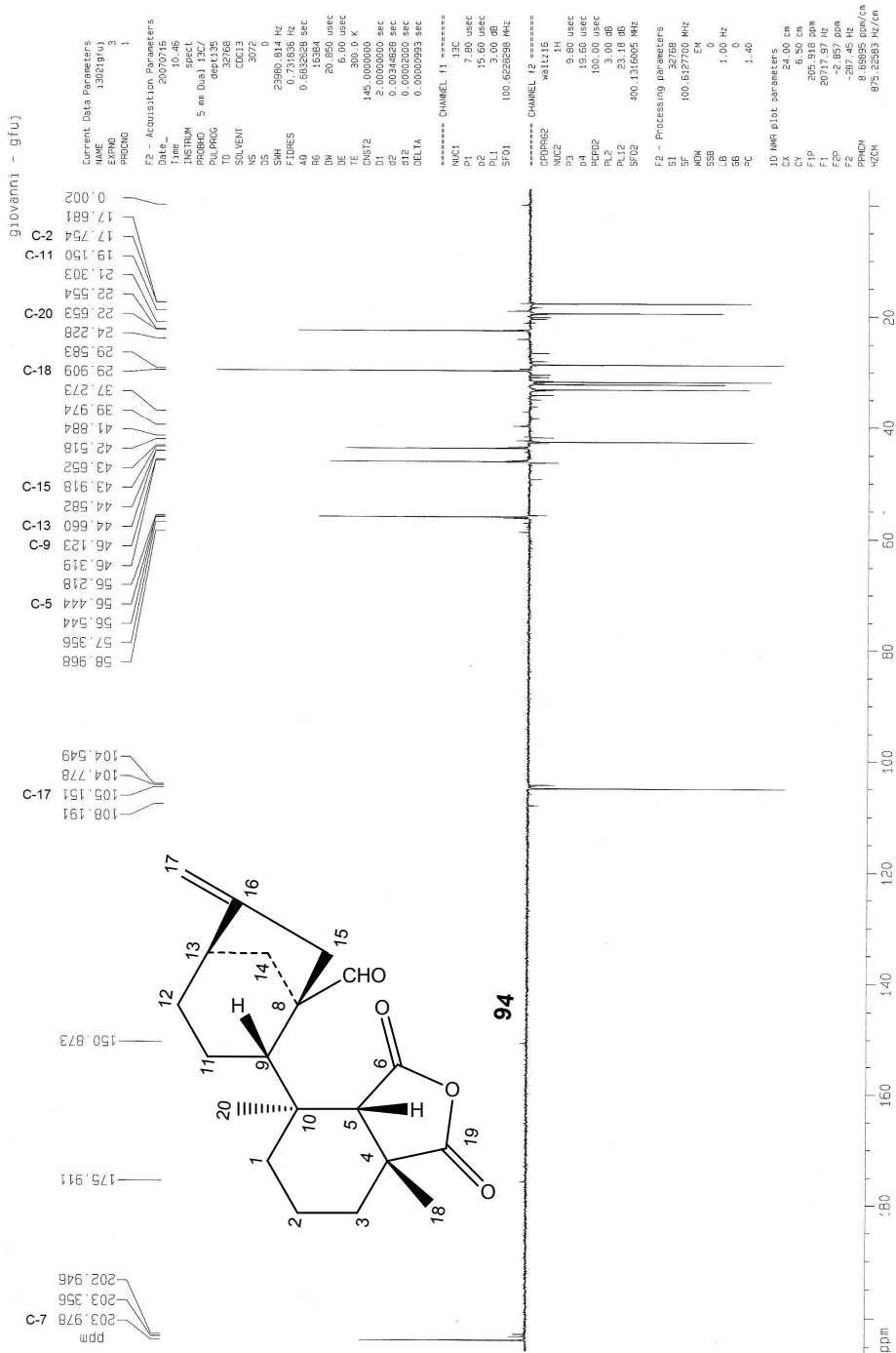
Figura 46— Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do fujenal (**94**) ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)



**Figura 47** – Ampliação do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do fujenal (**94**) na região entre  $\delta$  0,8 e 3,0 (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz)



**Figura 48 – Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  do fujenal (94) ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz)**



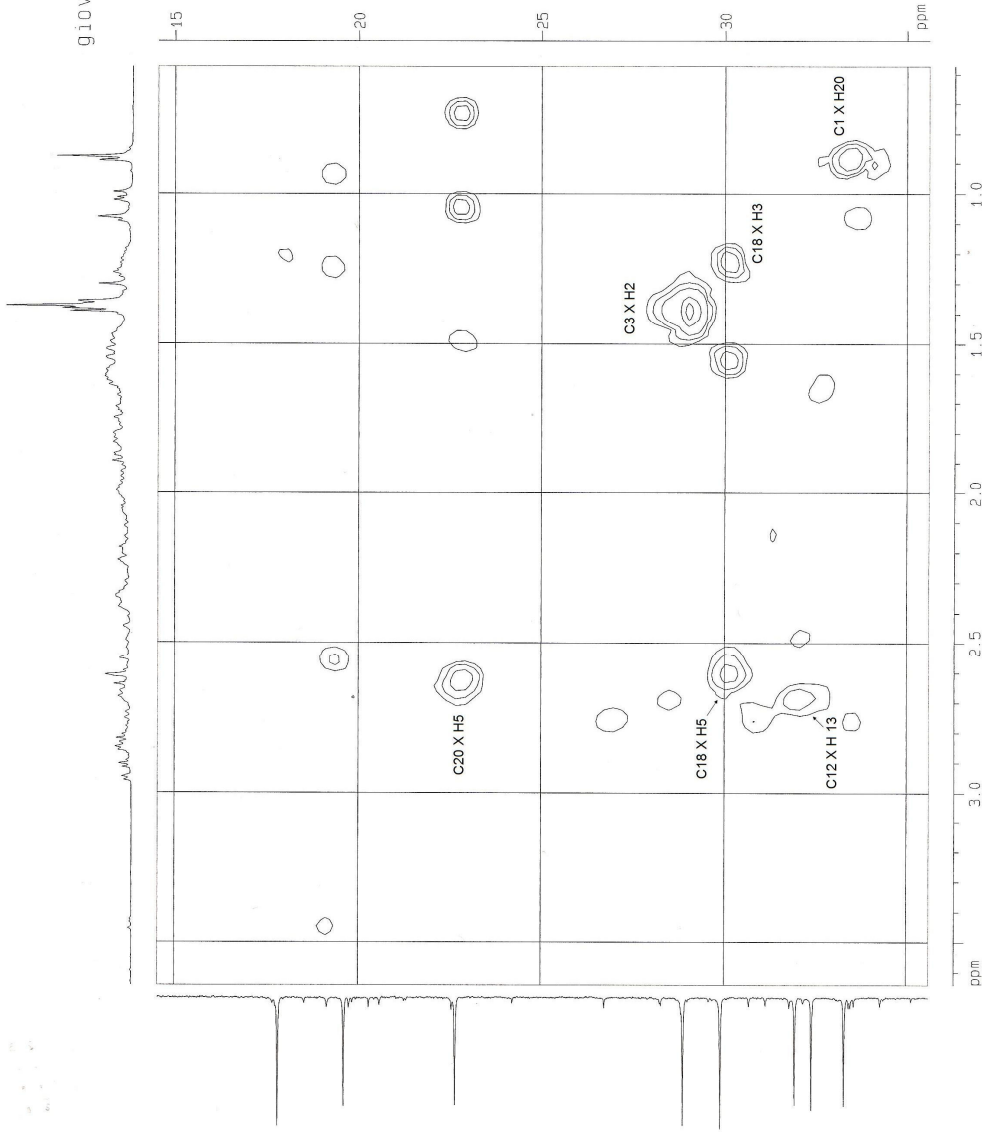
**Figura 49 – Subespectro DEPT-135 do fujenal (94) (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz)**







giovanni/jacqueline - gfuj



```

NAME giovanni/jacqueline - gfuj
EXPNO 3
PROCNO 3
F2 - Acquisition Parameters
Date_ 20110503
Time 16.38
INSTRUM spect
PROBHD 5mmQNP1H1
PULPROG zgpg30
AQ 0.0231
RG 327.5
SI 64
SF 500.136
WDW EM
SSB 0
GB 0
PC 1.00
AQ 0.0231
RG 327.5
SI 64
SF 500.136
WDW EM
SSB 0
GB 0
PC 1.00
F2 - Processing parameters
SI 64
SF 500.136
WDW EM
SSB 0
GB 0
PC 1.00
F2 - Acquisition parameters
SI 64
SF 500.136
WDW EM
SSB 0
GB 0
PC 1.00
F2 - Processing parameters
SI 64
SF 500.136
WDW EM
SSB 0
GB 0
PC 1.00

```

Figura 52 – Expansão do mapa de contornos HMBC do fujenal (94)

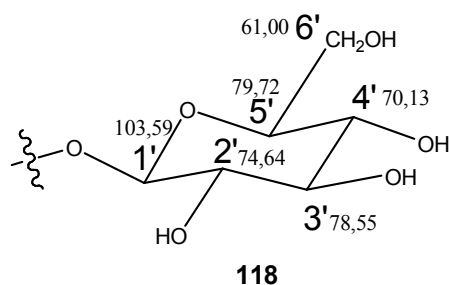
#### 4.3.1.2 Tentativa de elucidação estrutural dos produtos da biotransformação do fujenal pelo fungo *Thamnostylum sp.*

O primeiro produto da biotransformação do fujenal (F1) foi obtido da fração 27 da coluna feita com o extrato obtido do fungo *Thamnostylum sp.*. Na tentativa de se elucidar as mudanças estruturais na molécula de partida, inicialmente fez-se uma comparação dos dados de RMN dessa molécula com os dados obtidos para o fujenal. Foi possível identificar 20 carbonos através dos espectros de RMN de  $^{13}\text{C}$  (**Figuras 59-60**, pág.100-101), confirmados pelos mapas de contornos HMQC. Através dos espectros de DEPT-135 (**Figura 61**, pág.102) verificou-se que eram 2 primários, 9 secundários, 9 terciários e 6 quaternários.

Pelos espectros de HMQC e suas expansões (**Figuras 62-64**, pág.103-105) foi possível determinar a conectividade de quase todos os carbonos da molécula em questão, confirmando a região do substrato em que houve uma mudança estrutural. Nos mapas de contornos HMBC foram encontradas diversas correlações importantes para quase todas as partes da molécula, inclusive para os carbonos do anel lactônico, no qual parece não ter havido alterações após a reação. Não foram encontradas correlações (HMBC) para os carbonos 2, e 12, que tiveram sua atribuição realizada por comparação com os deslocamentos químicos relatados para o fujenal.

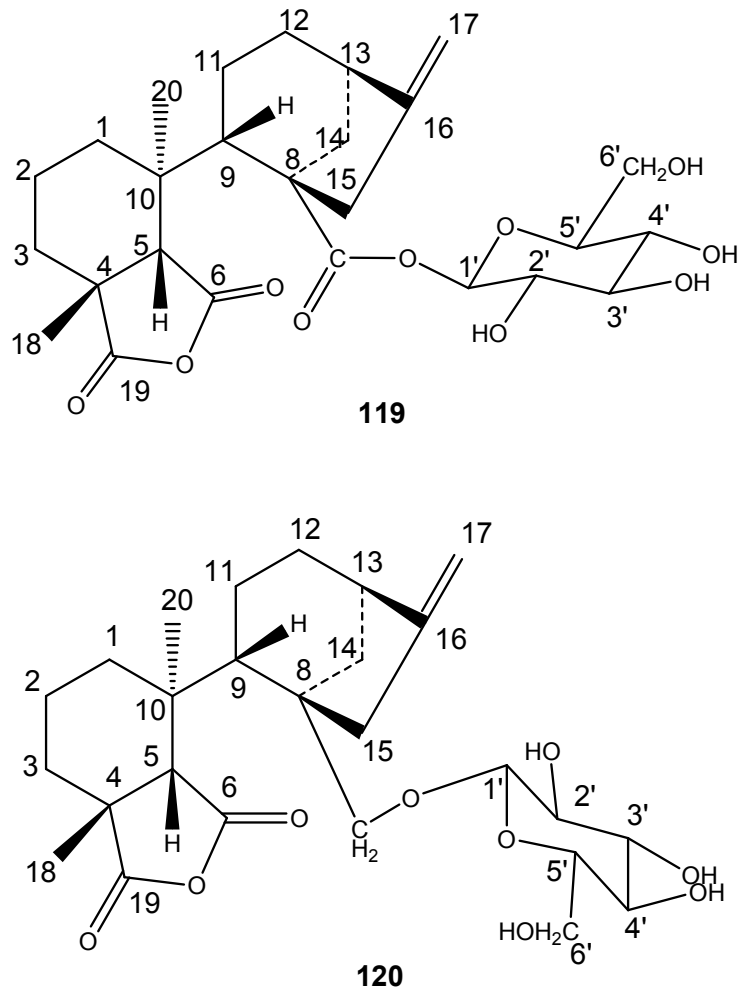
Os sinais característicos dos dois hidrogênios ligados a C-17 foram visualizados no espectro de RMN de  $^1\text{H}$  em  $\delta$  4,76 e  $\delta$  4,83, a exemplo dos simpletos referentes a H-5 ( $\delta$  3,13) e H-18 ( $\delta$  1,37) (**Figuras 56-58**, pág.97-99). Duas mudanças ocorridas em relação aos espectros do substrato inicial foram a ausência do sinal correspondente ao hidrogênio do grupo aldeído do material de partida e a presença de um novo sinal que poderia corresponder a um carbono anomérico de uma glicose ( $\delta$  5,41). Tendo sido utilizada uma quantidade expressiva de glicose para o preparo do meio de cultura, supôs-se, primeiramente, que o material em análise estivesse impuro e fosse constituído por uma mistura de um produto de biotransformação do fujenal e de glicose. Entretanto, foram encontradas correlações, no mapa de contornos HMBC, entre C1' (da glicose) com os carbonos 8 e 15, indicando tratar-se de uma

mesma substância e não de uma mistura. Nos espectros de RMN de  $^{13}\text{C}$ , encontraram-se sinais de outros carbonos que poderiam pertencer a uma molécula de glicose (**Figura 53** e **Tabela 8**, pág.96). O sinal do carbono pertencente ao grupo aldeído do fujenal também não foi detectado nesses espectros.



**Figura 53** – Estrutura da molécula de glicose no produto F1 e respectivos deslocamentos químicos (**118**).

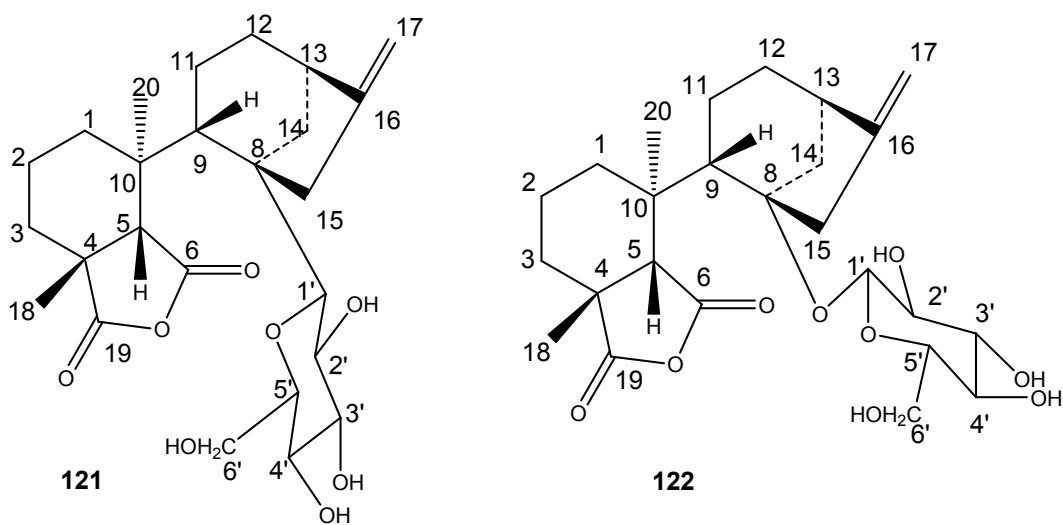
Apesar de parecer ter ocorrido a glicosilação do fujenal com o fungo *Thamnostylum sp.*, não foi possível determinar de forma inequívoca em que carbono do substrato inicial a molécula de glicose estava ligada. Considerando as atribuições feitas até o momento, apenas C-8 ainda não foi atribuído. No material de partida, o sinal de C-8 aparece em  $\delta_c$  58,96. No espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  do produto, o único sinal de carbono quaternário ainda não atribuído aparece em  $\delta_c$  52,89, supondo-se, então, ser este o valor de deslocamento químico de C-8. Haveria diversas possibilidades para a ligação da glicose à molécula do fujenal. Primeiramente, considerando-se que a função em C-7 não é mais um aldeído, mas que este carbono ainda pertence à molécula, as seguintes estruturas (**119** e **120**, **Figura 54**, pág.94) seriam as mais plausíveis:



**Figura 54** – Propostas estruturais para o produto F1 da biotransformação do fujenal por *Thamnostylum* sp..

Entretanto, nem o sinal de uma carbonila de éster, nem o sinal de um carbono metilênico oxigenado (exceto o de C-6') estão presentes no espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  deste produto. Além disto, nas duas situações anteriores, a correlação entre C-1' e C-15 e C-1' e C-8, observadas no mapa de contornos HMBC (**Figura 65-68**, pág.106-109), seriam  $^4\text{J}$  e  $^5\text{J}$  respectivamente, ou seja, improvável de serem observadas.

Assim, passou-se a considerar a possibilidade de ter havido a remoção do carbono 7 da molécula do fujenal, para a entrada da molécula de glicose em C-8. Nesse caso, possuiu-se a considerar duas possibilidades, ter ocorrido uma C-glicosilação levando à estrutura **121** ou uma O-glicosilação, levando à estrutura **122** (**Figura 55**, pág.95).



**Figura 55** – Propostas estruturais para o produto F1 (**121** e **122**) da biotransformação do fujenal por *Thamnostylum* sp..

O valor do deslocamento químico do carbono anomérico C-1', no caso de uma C-glicosilação, não poderia ser  $\delta_c$  103,59, como observado pois, neste caso, C-1' estaria ligado a apenas um átomo de oxigênio, não justificando um valor de deslocamento químico tão alto [Iranshahi et al., 2007; Manns., 1995; Huang et al., 2006].

Considerando-se a estrutura **122**, na qual se propõe ter havido uma O-glicosilação, o valor de deslocamento químico de C-1' é coerente, porém, o valor encontrado para C-8 está abaixo da faixa esperada [Wang et al., 2001; Castillo et al., 1997].

Assim, tendo-se esgotado os recursos disponíveis para esta elucidação estrutural, a proposta estrutural mais coerente encontrada seria a estrutura **122**, respaldada inclusive pelas correlações entre C-1' e C-8 ( $^3J$ ), embora ainda sejam incomuns o valor do deslocamento químico encontrado para C-8 e a visualização de uma correlação do tipo  $^4J$  entre o carbono anomérico e C-15.

Espera-se repetir este experimento em um futuro próximo, em maior escala, visando à obtenção de maiores quantidades de produtos que possibilitem o término desta elucidação estrutural.

**Tabela 8** – Dados de RMN de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$  encontrados para o produto F1 de biotransformação do fujenal com o fungo *Thamnostylum sp.* em  $\text{CDCl}_3$

<b>Carbono</b>	$\delta_{\text{C}}$ (100 MHz)	$\delta_{\text{H}}$ (400 MHz)	<b>HMBC</b>
1	34,57	1,68 (m) e 2,72 (m)	H9 ( $^3\text{J}$ )
2	17,20	1,23 (s) e 1,57 (m)	-
3	28,29	1,26 (m)	H18 ( $^3\text{J}$ )
4	45,11	-	H5 ( $^2\text{J}$ ), H18 ( $^2\text{J}$ )
5	55,39	3,13 (s)	-
6	171,75	-	H5 ( $^2\text{J}$ )
7	-	-	-
8	52,89	-	H1' , H9 ( $^2\text{J}$ )
9	45,36	2,12 (m)	-
10	41,44	-	H5 ( $^2\text{J}$ ), H9 ( $^2\text{J}$ )
11	21,16	-	H9 ( $^2\text{J}$ )
12	31,94	1,26 (m)	-
13	43,46	2,68 (m)	H17 ( $^3\text{J}$ )
14	32,53	1,53 (m) e 1,63 (m)	H9 ( $^3\text{J}$ )
15	39,99	2,10 (m)	H1' , H17 ( $^3\text{J}$ )
16	154,85	-	H14 ( $^2\text{J}$ ), H15 ( $^2\text{J}$ )
17	103,25	4,79 (s) e 4,83 (s)	-
18	28,30	1,37 (s)	H5 ( $^3\text{J}$ )
19	175,89	-	H5 ( $^3\text{J}$ ), H18 ( $^3\text{J}$ )
20	25,36	1,29 (s)	-
1'	103,59	5,41 (s)	-
2'	74,64	4,74 (m)	-
3'	78,55	3,49 (m)	-
4'	70,13	3,74 (qui) (J) 3,75 Hz	-
5'	79,72	3,55 (m)	-
6'	61,00	4,11 (q) (J) 4,12 Hz	-

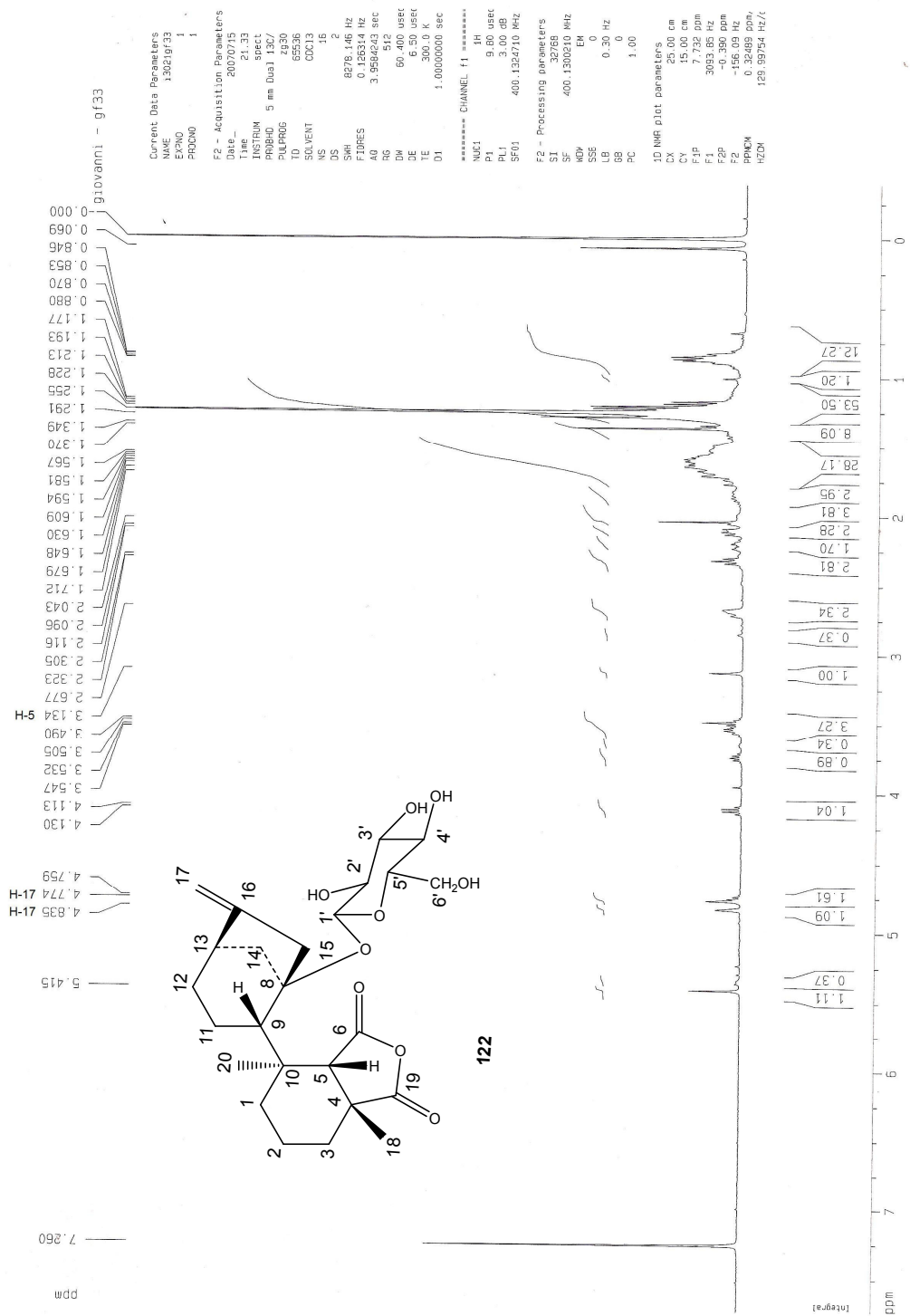
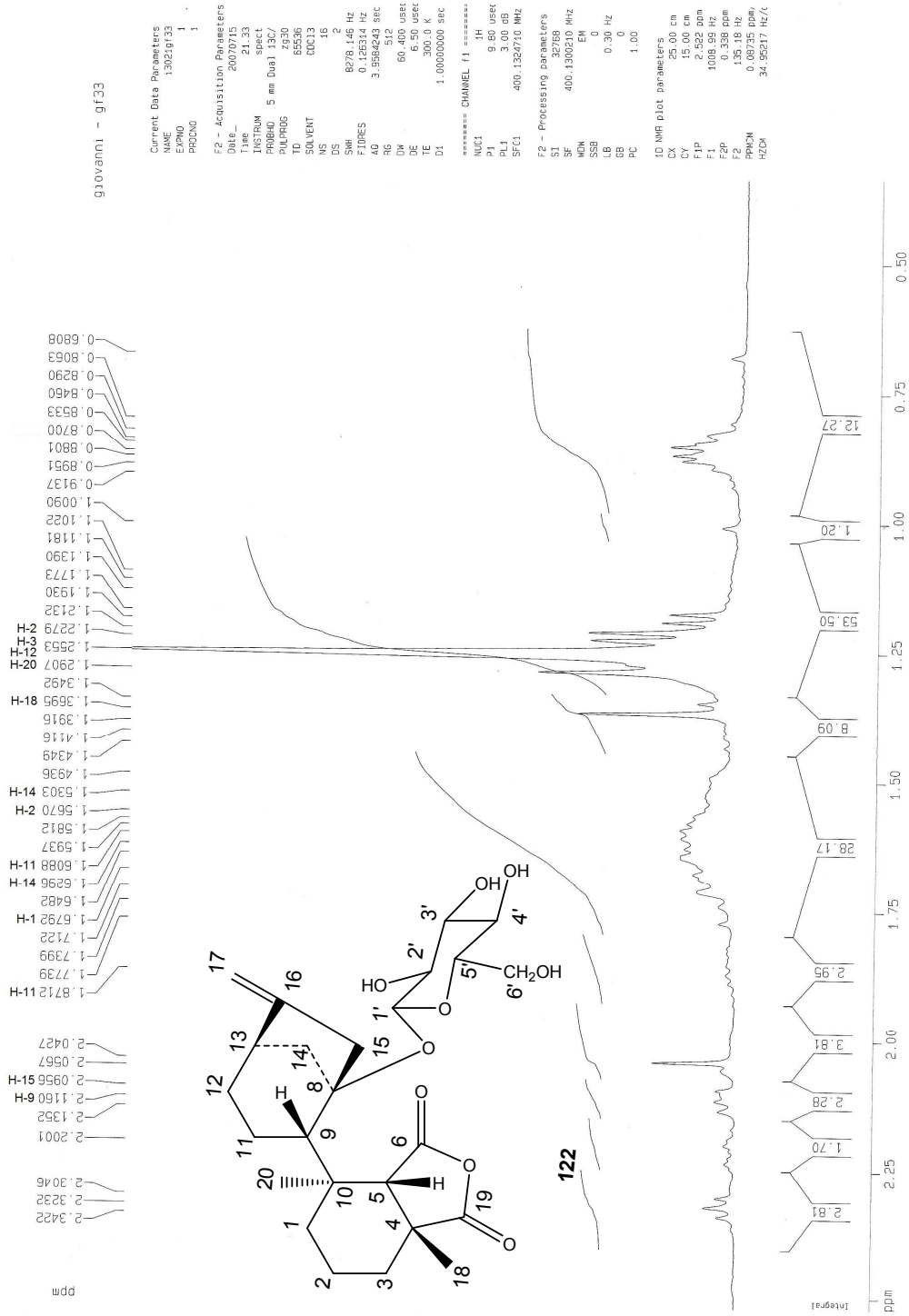
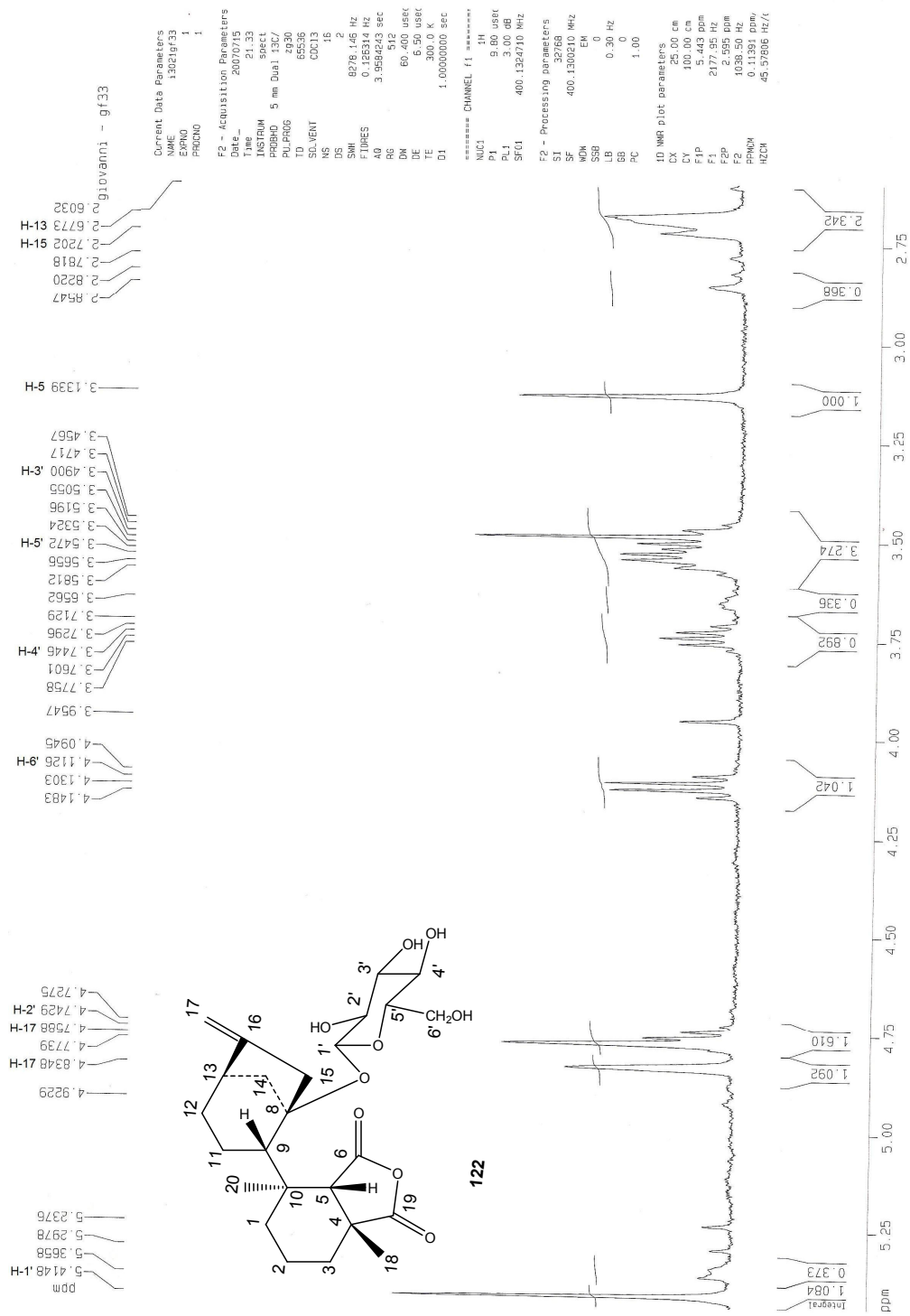


Figura 56 – Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do produto F1 (122) ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)

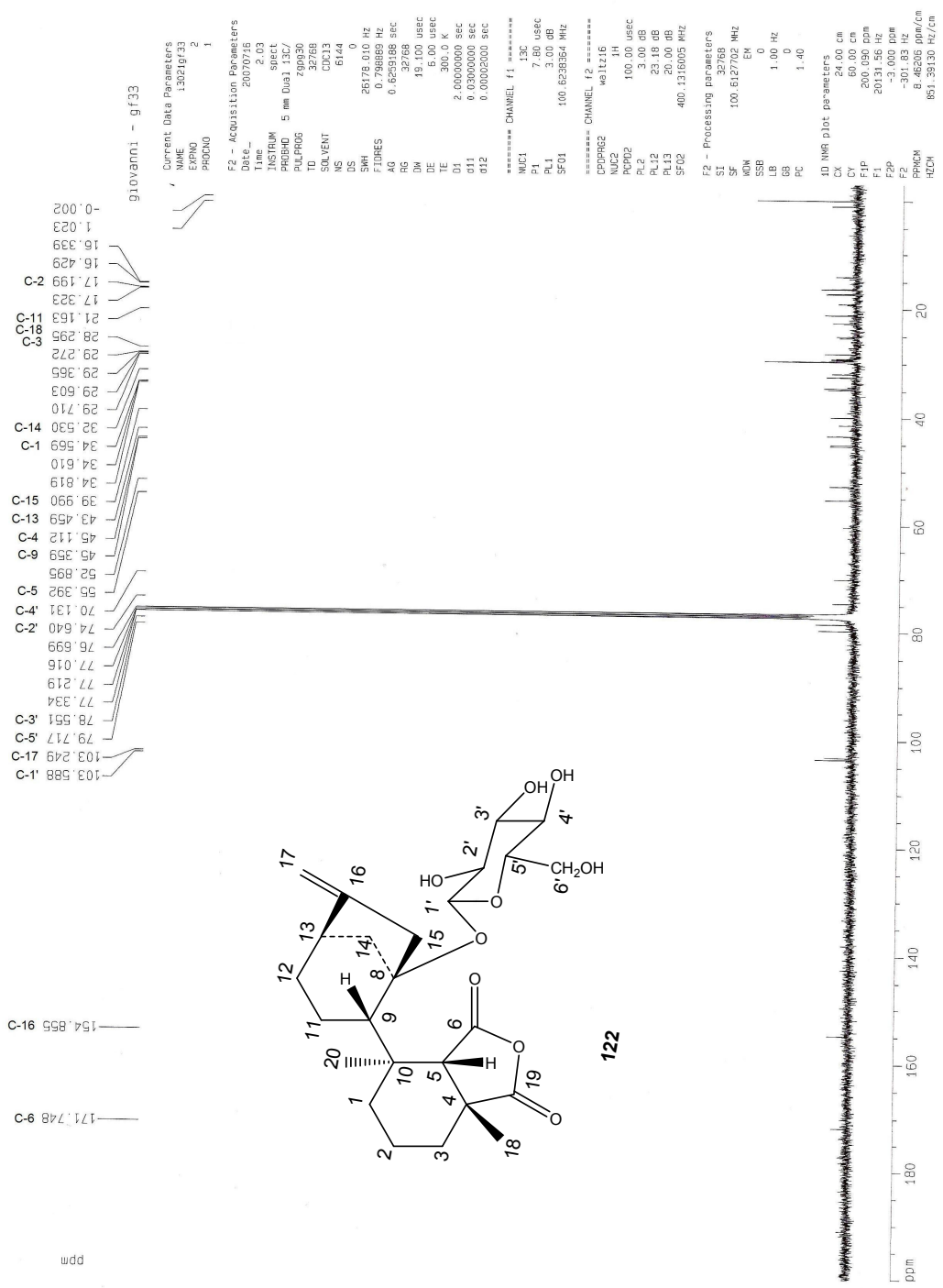


**Figura 57** – Ampliação do espectro de RMN de <sup>1</sup>H do produto F1 (122), na região entre δ 0,6 e 2,5 (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz)

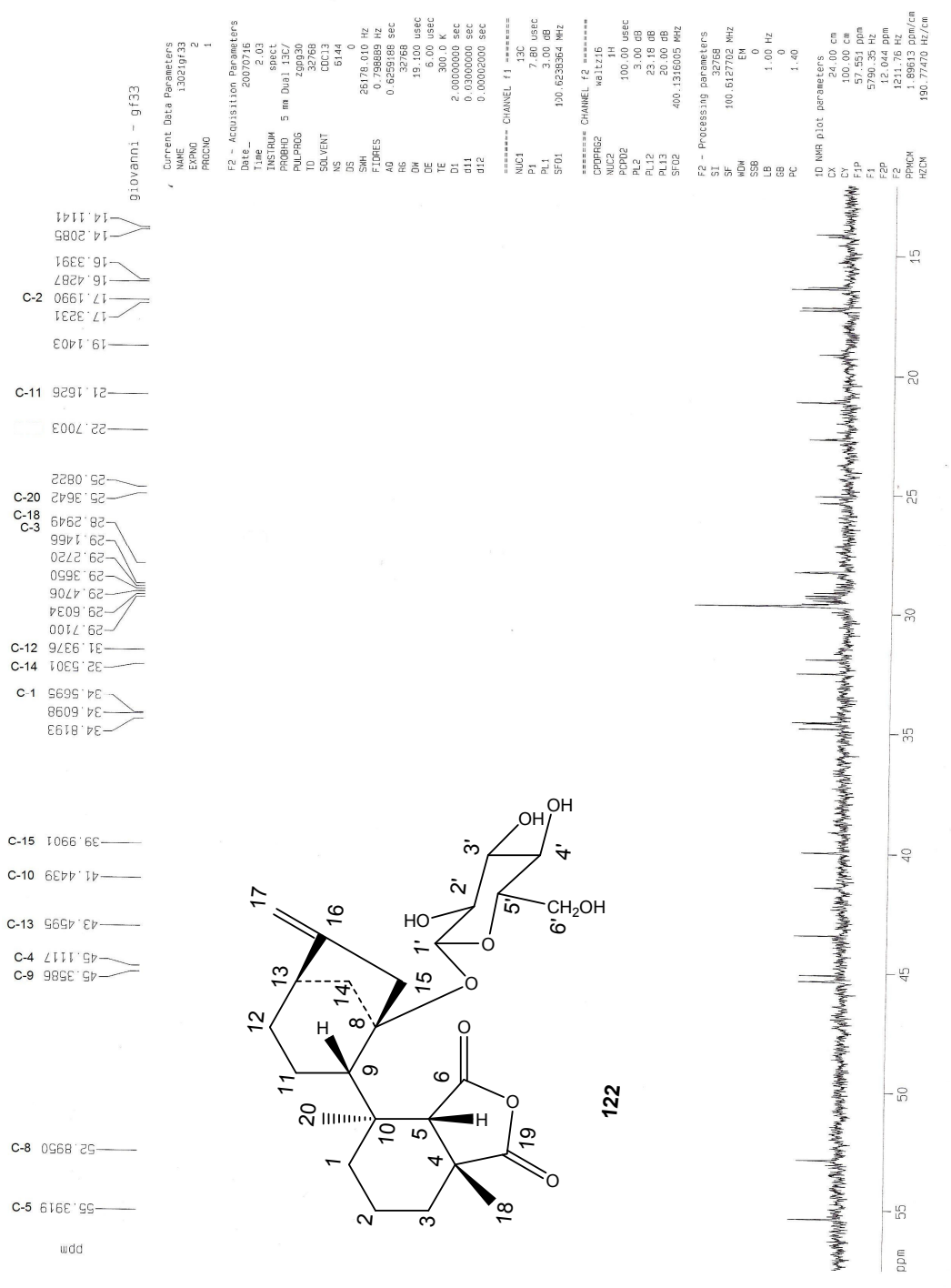




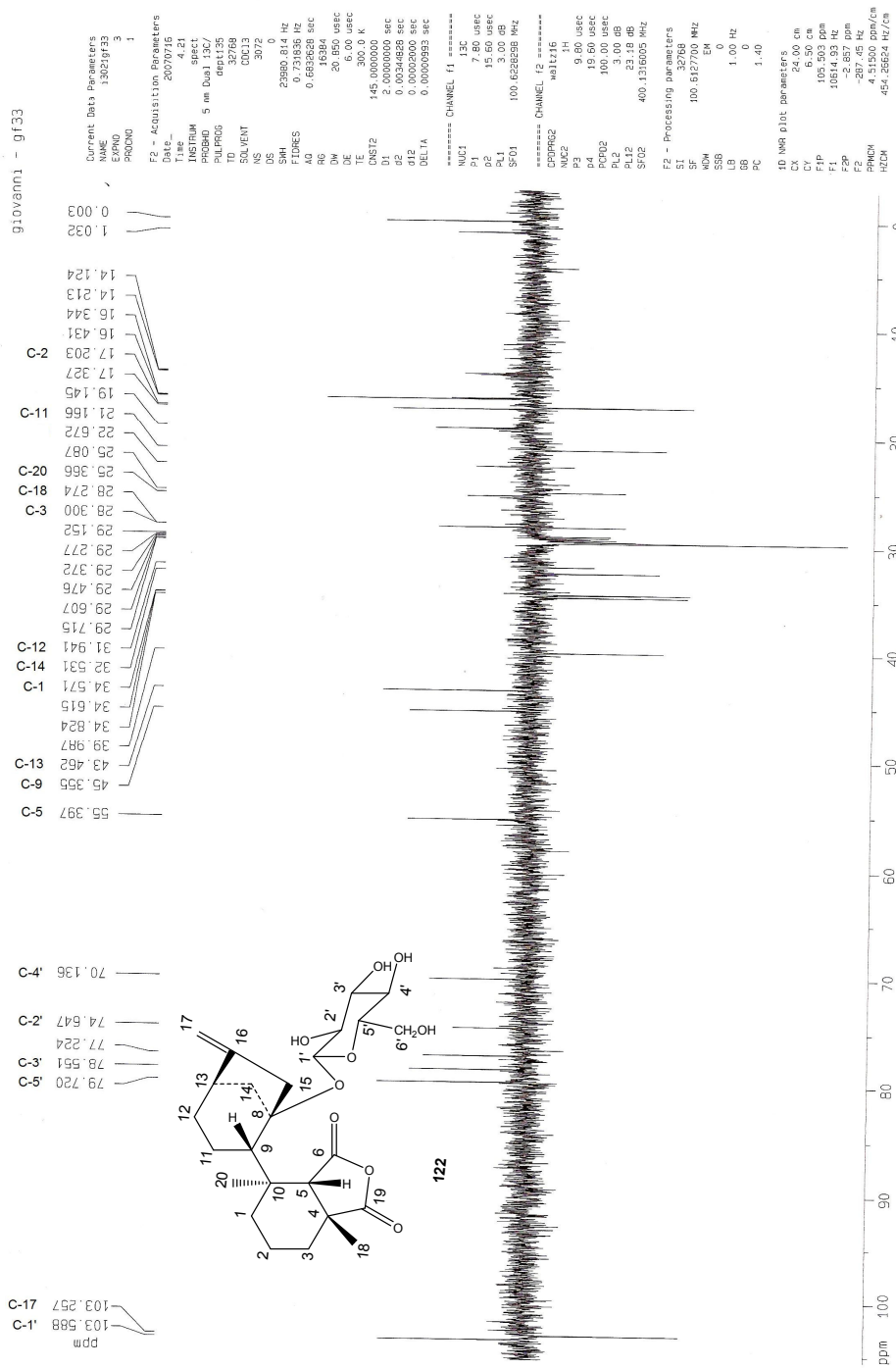
**Figura 58** – Ampliação do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do produto F1 (122), na região entre  $\delta$  2,6 e 5,5 (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz)



**Figura 59 – Espectro de RMN de <sup>13</sup>C do produto F1 (122) (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz)**

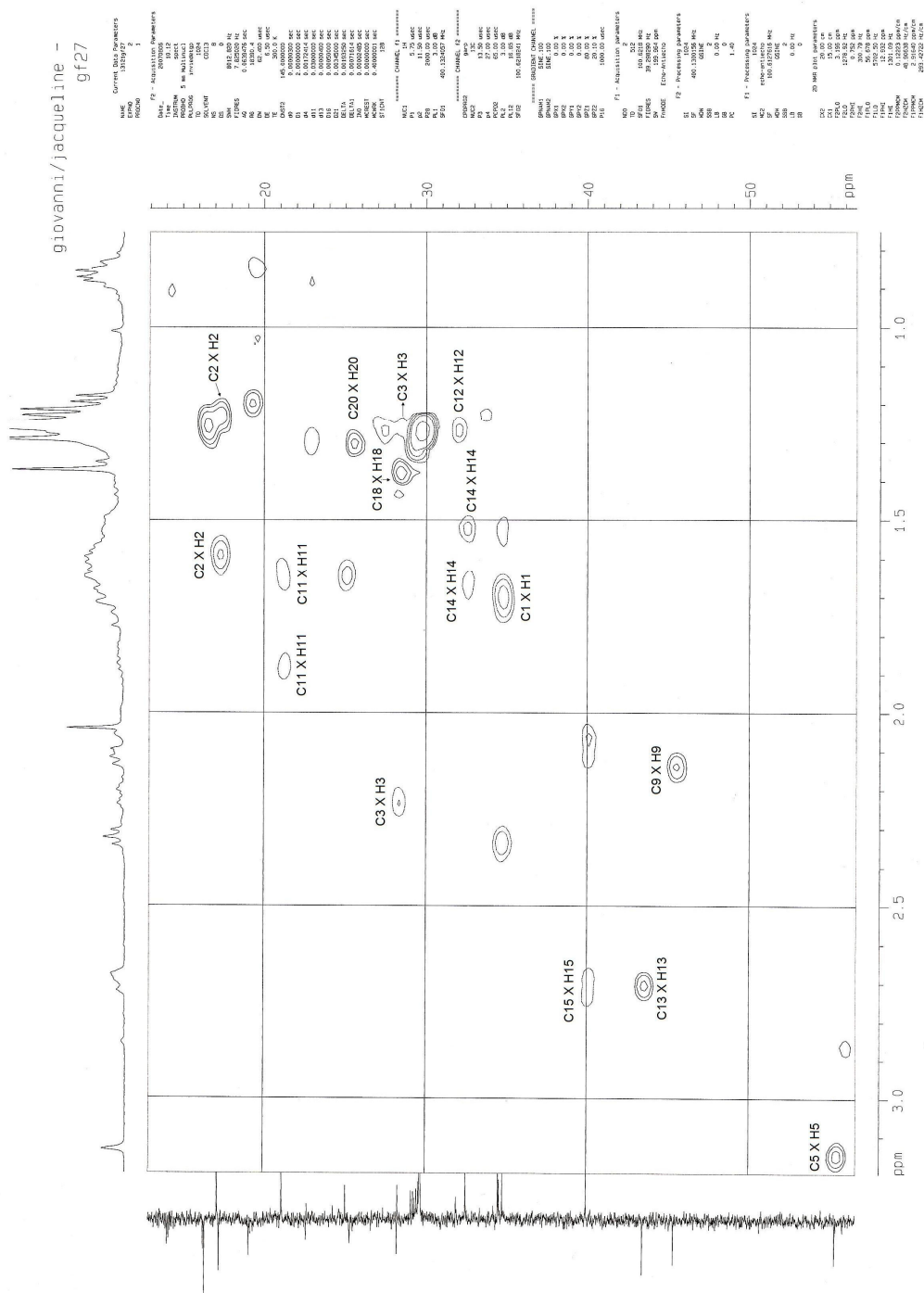


**Figura 60** – Ampliação do espectro de RMN de <sup>13</sup>C do produto F1 (**122**), na região entre δ 14,0 e 56,0 (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz)



**Figura 61** – Subespectro DEPT-135 do produto F1 (122), na região entre  $\delta$  0,0 e 105,0 (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz)





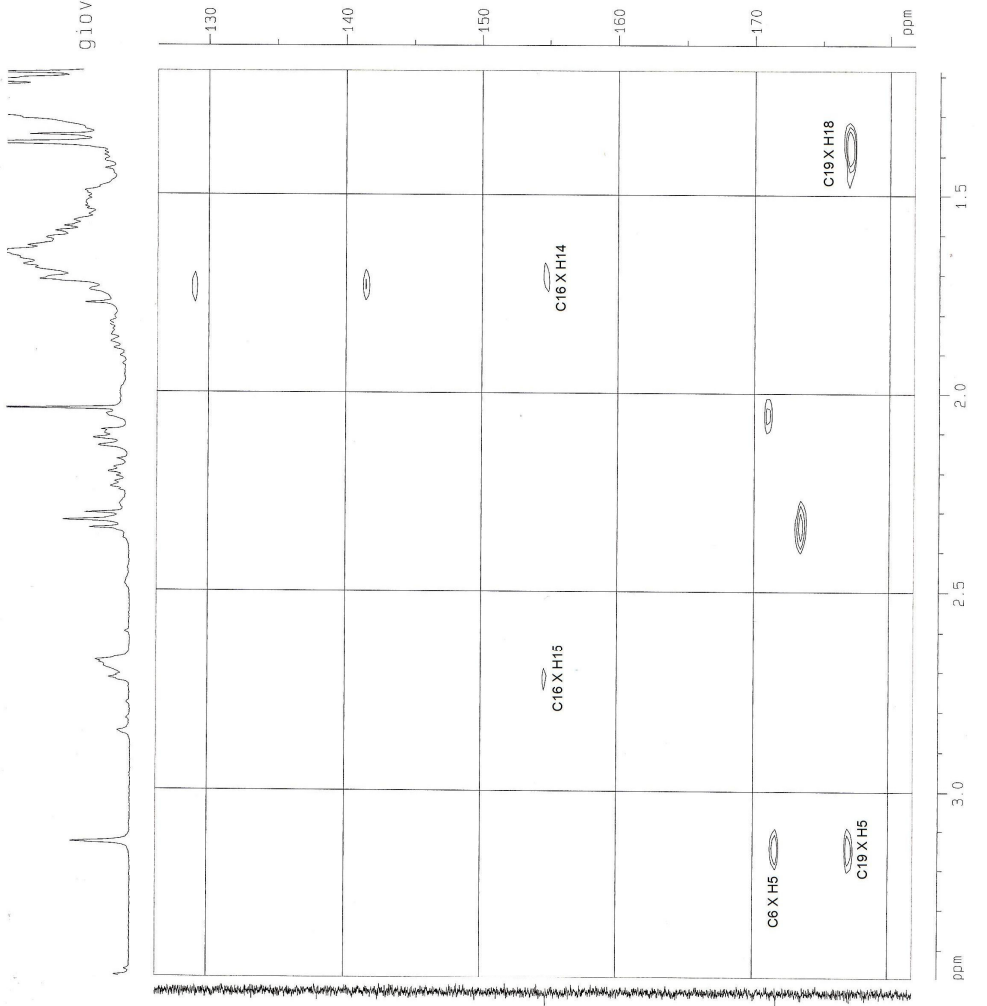
**Figura 63** – Ampliação do mapa de contornos HMQC do produto F1 (122), na região entre  $\delta$  0,0 e 3,25 e  $\delta$  10 e 60







giovanni/jacqueline - gf27



```

Current Data Parameters
NAME          gf27
PROBHD        5 mm NML101
PULPROG       zgpg30
TD             65536
AQ             0.141
RG             327.68
SR             1024
FIDRES        0.000158 Hz
AQRES         0.000001 Hz
SFO            500.1362500 MHz
WDW            EM
SSB            0
GB             0
PC             1.00
DE              0.00100000
TE              300.2
D1             1.40000000 sec
d11            0.05000000 sec
d12            0.05000000 sec
d13            0.05000000 sec
d14            0.05000000 sec
d15            0.05000000 sec
d16            0.05000000 sec
d17            0.05000000 sec
d18            0.05000000 sec
d19            0.05000000 sec
d20            0.05000000 sec
d21            0.05000000 sec
d22            0.05000000 sec
d23            0.05000000 sec
d24            0.05000000 sec
d25            0.05000000 sec
d26            0.05000000 sec
d27            0.05000000 sec
d28            0.05000000 sec
d29            0.05000000 sec
d30            0.05000000 sec
d31            0.05000000 sec
d32            0.05000000 sec
d33            0.05000000 sec
d34            0.05000000 sec
d35            0.05000000 sec
d36            0.05000000 sec
d37            0.05000000 sec
d38            0.05000000 sec
d39            0.05000000 sec
d40            0.05000000 sec
d41            0.05000000 sec
d42            0.05000000 sec
d43            0.05000000 sec
d44            0.05000000 sec
d45            0.05000000 sec
d46            0.05000000 sec
d47            0.05000000 sec
d48            0.05000000 sec
d49            0.05000000 sec
d50            0.05000000 sec
d51            0.05000000 sec
d52            0.05000000 sec
d53            0.05000000 sec
d54            0.05000000 sec
d55            0.05000000 sec
d56            0.05000000 sec
d57            0.05000000 sec
d58            0.05000000 sec
d59            0.05000000 sec
d60            0.05000000 sec
d61            0.05000000 sec
d62            0.05000000 sec
d63            0.05000000 sec
d64            0.05000000 sec
d65            0.05000000 sec
d66            0.05000000 sec
d67            0.05000000 sec
d68            0.05000000 sec
d69            0.05000000 sec
d70            0.05000000 sec
d71            0.05000000 sec
d72            0.05000000 sec
d73            0.05000000 sec
d74            0.05000000 sec
d75            0.05000000 sec
d76            0.05000000 sec
d77            0.05000000 sec
d78            0.05000000 sec
d79            0.05000000 sec
d80            0.05000000 sec
d81            0.05000000 sec
d82            0.05000000 sec
d83            0.05000000 sec
d84            0.05000000 sec
d85            0.05000000 sec
d86            0.05000000 sec
d87            0.05000000 sec
d88            0.05000000 sec
d89            0.05000000 sec
d90            0.05000000 sec
d91            0.05000000 sec
d92            0.05000000 sec
d93            0.05000000 sec
d94            0.05000000 sec
d95            0.05000000 sec
d96            0.05000000 sec
d97            0.05000000 sec
d98            0.05000000 sec
d99            0.05000000 sec
d100           0.05000000 sec
  
```

Figura 66 – Ampliação do mapa de contornos HMBC do produto F1 (122), na região entre  $\delta$  1,0 e 3,5 e  $\delta$  125 e 180.



giovanni/jacqueline - gf27

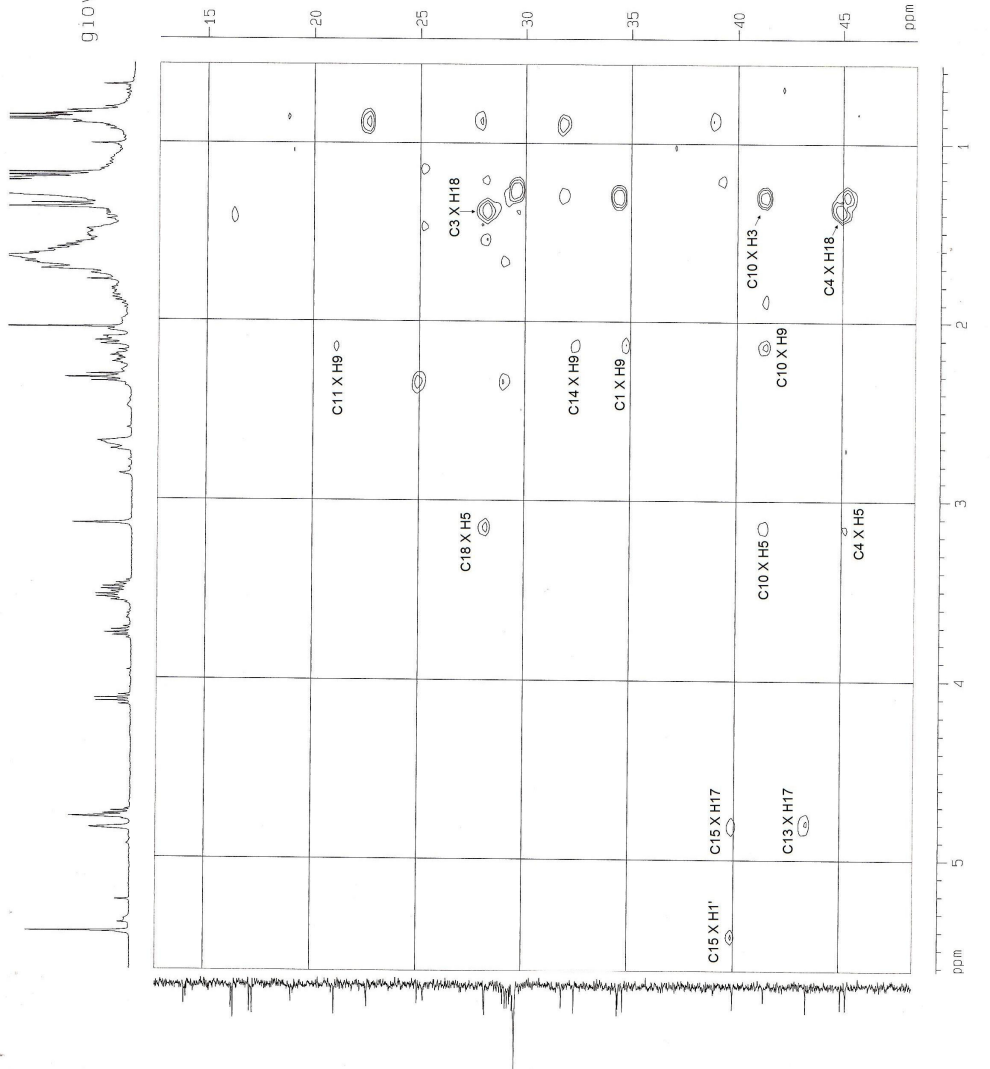


Figura 68 – Ampliação do mapa de contornos HMBC do produto F1 (122), na região entre  $\delta$  0,5 e 5,5 e  $\delta$  15 e 50.

Para o segundo produto da reação (F2) não foi possível a obtenção de espectros 2-D, devido à pequena quantidade de material. Pelo espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (**Figura 69**, pág.112) foram observados os simpletos correspondentes a H-5 ( $\delta$  3,13), H-18 ( $\delta$  1,37) e H-20 ( $\delta$  0,88) (**Tabela 9**), além dos sinais correspondentes a H-9 ( $\delta$  2,12), H15( $\delta$  3,13) e H13( $\delta$  3,13), também presentes no primeiro produto e no fujenal.

Nos espectros de RMN de  $^{13}\text{C}$  observou-se também o mesmo aspecto geral encontrado no fujenal e em F1 (**Figuras 70-71**, pág.113-114). A análise conjunta com os espectros de DEPT-135 (**Figura 72**, pág.115) mostrou a presença de sinais de 17 dos vinte carbonos da molécula do fujenal, não sendo possível a atribuição dos demais carbonos devido à falta de dados inequívocos. Na **Figura 70**, foi adicionada uma expansão na região do espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  entre  $\delta$  27,5 e 30,5, mostrando que os picos correspondentes aos carbonos C-3 e C-18 possuem deslocamentos químicos muito próximos, sendo necessária a expansão para a sua visualização. Quatro dos picos de carbonos correspondentes ao açúcar presente no primeiro produto apareceram também nos espectros de RMN de  $^{13}\text{C}$  desse segundo produto (foi observado também o mesmo simpleto correspondente a H1' no espectro de RMN de  $^1\text{H}$ ), estando ausentes, no entanto, dois dos picos da glicose, tornando inconclusiva a presença do açúcar. Não foi possível, portanto, a proposição de uma estrutura para esse produto.

**Tabela 9** - Dados de RMN de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$  encontrados para o segundo produto de biotransformação do fujenal com o fungo *Thamnostylum sp.* em  $\text{CDCl}_3$

Carbono	$\delta_{\text{C}}$ (100 MHz)	$\delta_{\text{H}}$ (400 MHz)
1	35,12	-
2	17,49	-
3	28,59	-
4	45,40	-
5	55,69	3,13 (s)
6	172,04	-
7	-	-

8	53,19	-
9	45,65	2,12 (m)
10	-	-
11	21,46	-
12	32,82	-
13	43,75	2,68 (m)
14	34,86	-
15	40,29	2,10 (m) e 2,72 (m)
16	155,15	-
17	103,54	4,78 (s) e 4,83 (s)
18	28,59	1,37 (s)
19	175,51	-
20	25,66	1,29 (s)

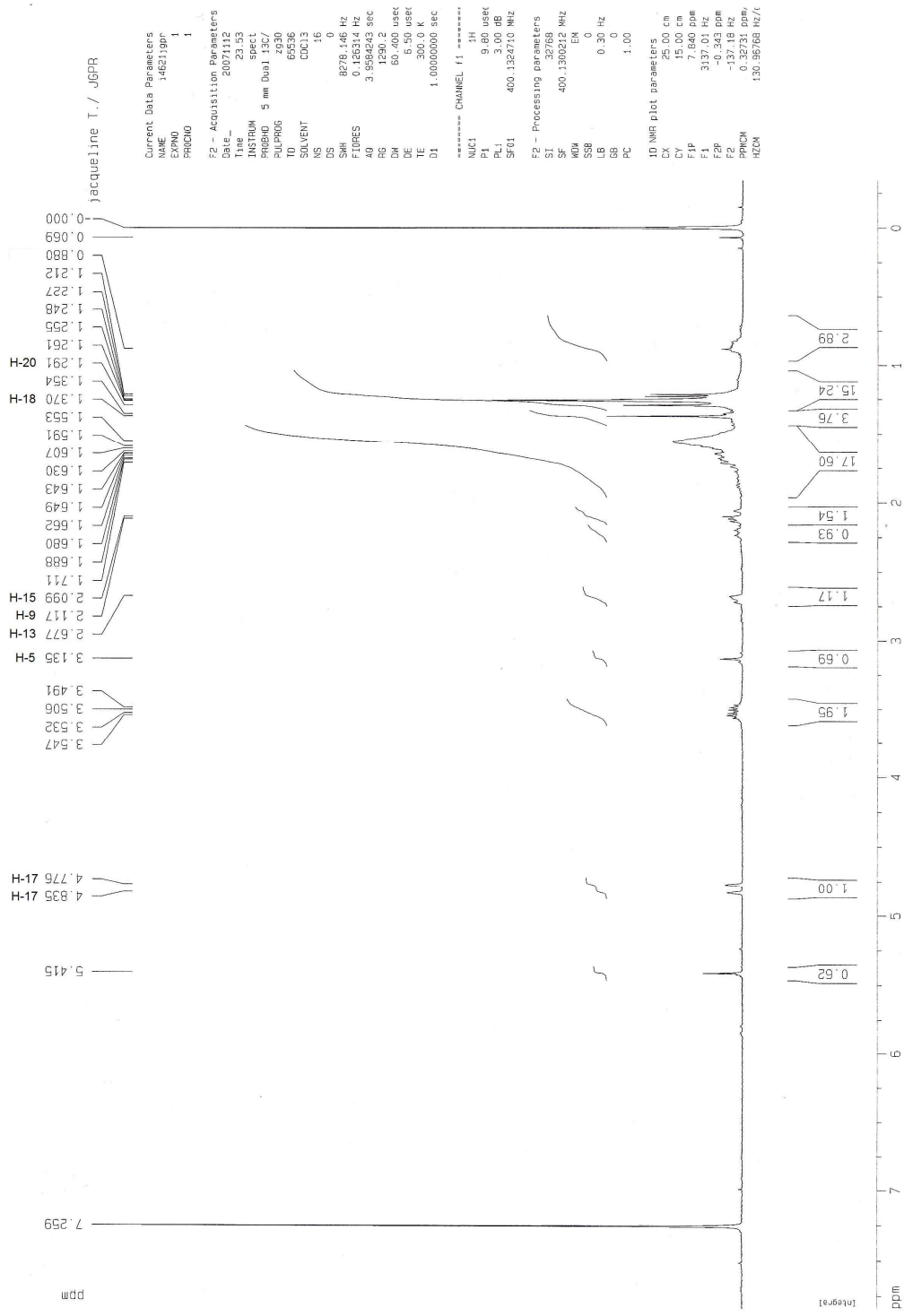


Figura 69 – Espectro de RMN de <sup>1</sup>H do produto F2 (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz)

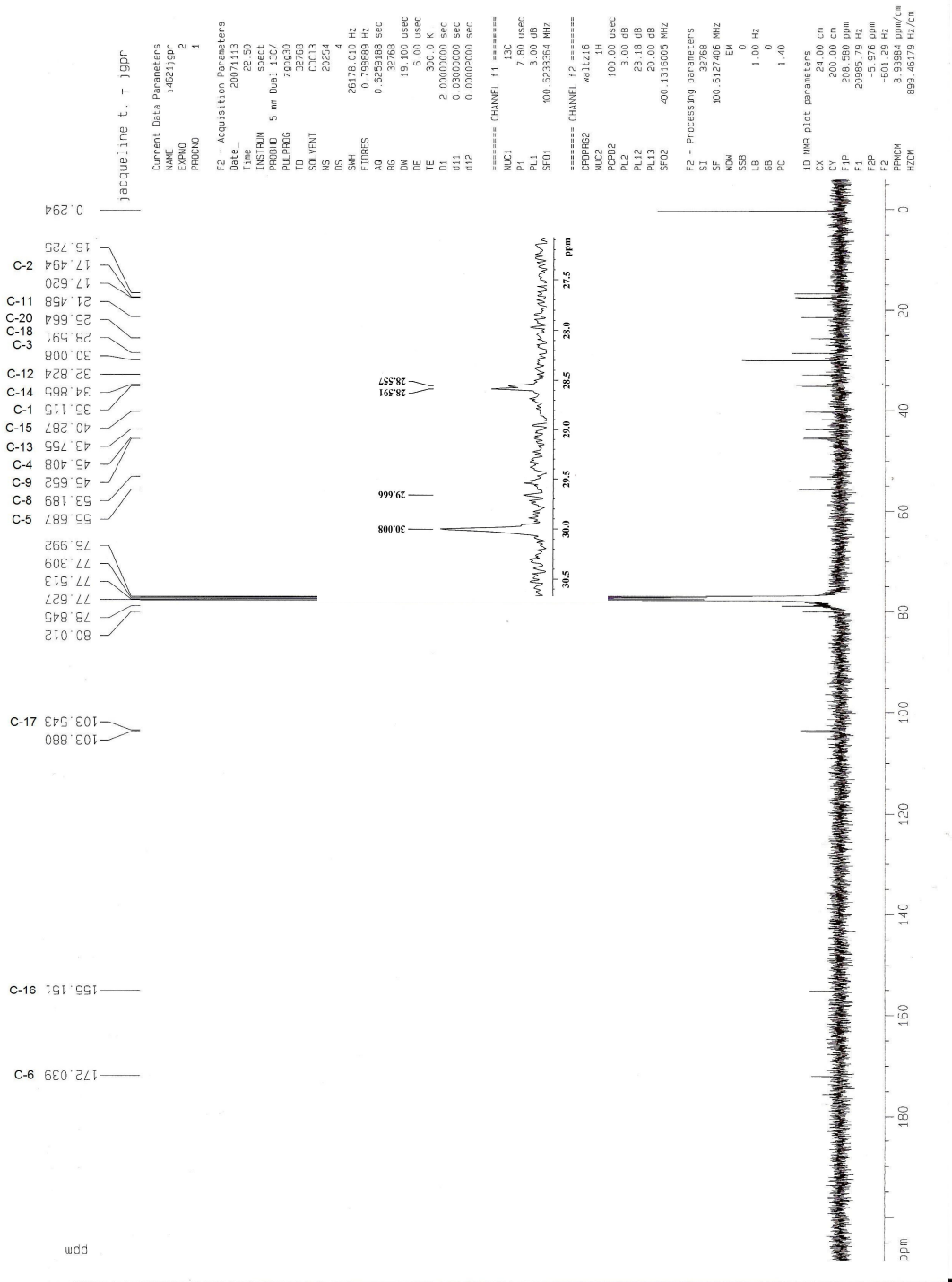


Figura 70 – Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  do produto F2 ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz)

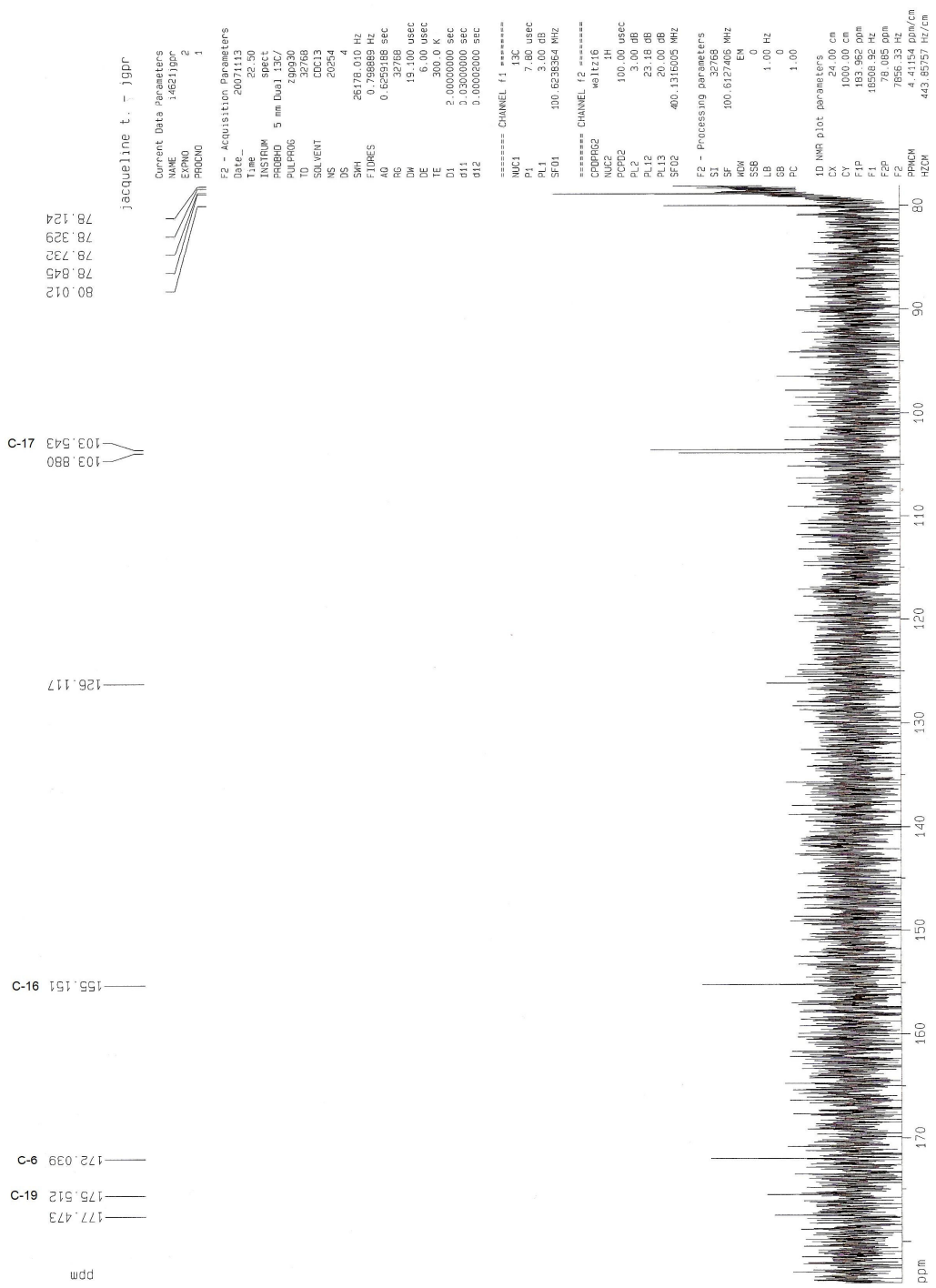


Figura 71 – Ampliação do espectro de RMN de <sup>13</sup>C do produto F2 (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz)



Jacqueline T. / USPR

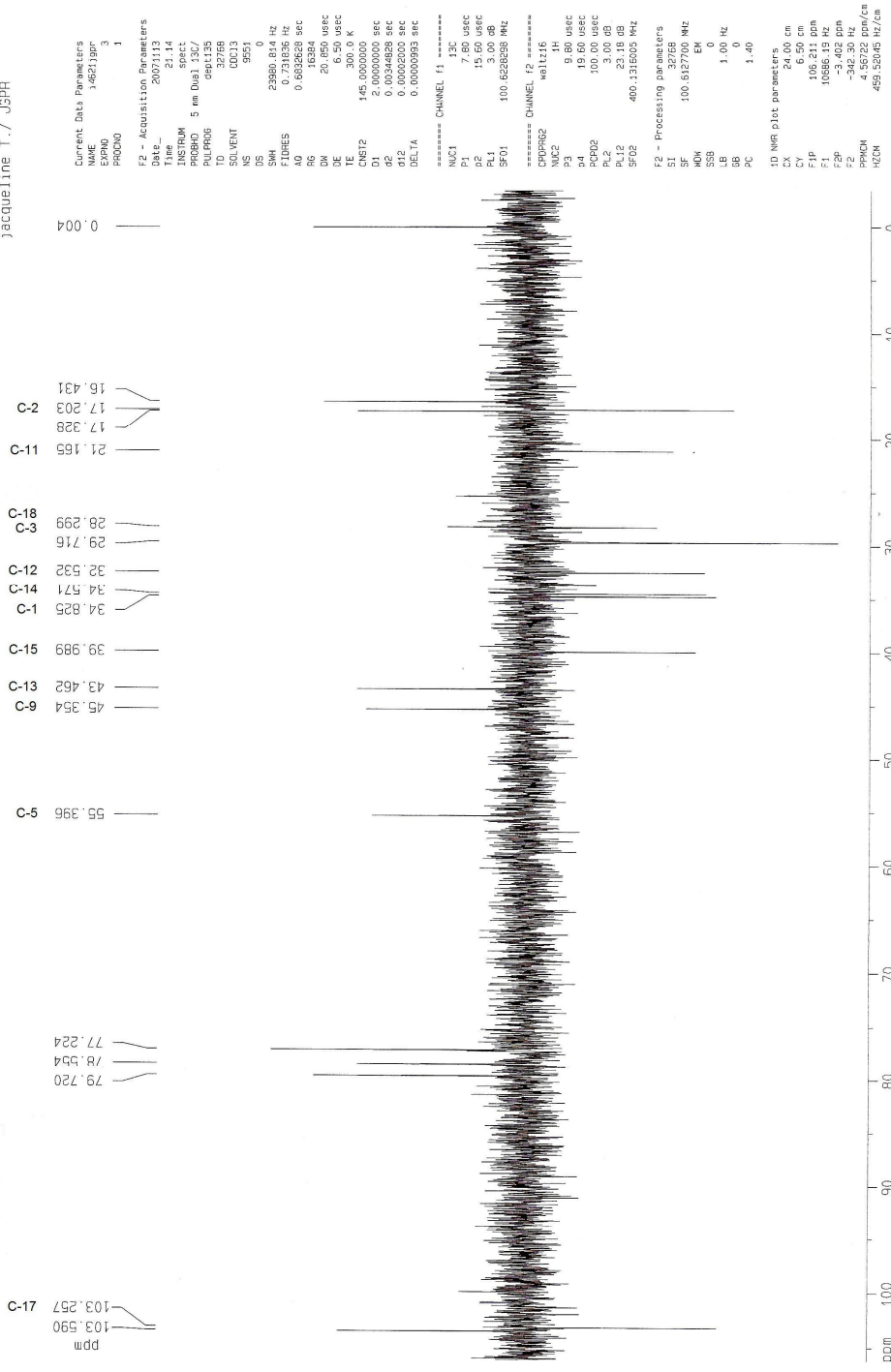


Figura 72 – Subespectro DEPT-135 do produto F2

# Capítulo 5

## CONCLUSÕES

## 5 CONCLUSÕES

Nesse trabalho estudou-se a reação de biotransformação da 1*R*-(-)-canforquinona com quatro fungos, *Mucor plumbeus*, *Thamnostylum sp.*, *Lecanicillium muscarium* e *Syncephalastrum racemosum*.

O processo de metabolização da 1*R*-(-)-canforquinona pelo fungo *Mucor plumbeus* foi monitorado, com êxito, utilizando-se cromatografia gasosa e cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas.

O fungo *Mucor plumbeus* produziu três diferentes produtos, sendo um deles em grande quantidade percentual (94,15% com 5 dias de reação). Foi detectada para esse fungo, por CG-EM, a formação de um derivado com *m/z* 168, durante todo o período de reação. Esse dado indica que houve a redução de uma das carbonilas da canforquinona, formando um ceto-álcool.

A presença de um produto da redução de uma carbonila (*m/z* 168) foi verificada também após 15 dias de reação com o fungo *Lecanicillium muscarium*, embora não tenha sido possível realizar-se o monitoramento completo da reação envolvendo esse fungo.

Observou-se, também, através de CG e CG-EM, a estabilidade da 1*R*-(-)-canforquinona nos meios reacionais utilizados. Dessa forma, pode-se garantir que as reações de formação dos produtos devem-se ao metabolismo dos microrganismos utilizados.

O estudo teórico realizado para os quatro possíveis cetoálcoois resultantes da biotransformação da 1*S*-(-)-canforquinona mostrou que a substância (-)-3*S*-*endo*-hidroxiepicanfor seria, teoricamente, a mais abundante em solução, o que está de acordo com os dados práticos encontrados na literatura. Isso indicou que, em alguns organismos, as enzimas responsáveis pela redução da canforquinona reagem de forma a se obter o produto mais estável termodinamicamente.

Da biotransformação do diterpeno fujenal obtiveram-se dois produtos. Obtiveram-se fortes indícios espectroscópicos de que um deles consiste em um glicosídeo, embora não tenha sido possível a elucidação completa da estrutura dos produtos com os dados espectrométricos obtidos.

# Capítulo 6

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

## 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] Ackland, M.J.; Gordon, J.F.; Hanson, J.R.; Yeoh, B.L. Studies in Terpenoid Biosynthesis. Part 35. Biosynthetic Sequences leading to the Diterpenoid Aphidicolin in *Cephalosporium aphidicola*. *Journal Chemistry Society Perkin Trans* 1988, 1, 1477-80.
- [2] Alan, M.; Hanson, J.R.; Sarah, F.Y. The bio-transformation of some 6-substituted ent-kaur-16-enes by *Gibberella fujikuroi*. *Phytochemistry* 1991, 3, 807-9.
- [3] Alarcón, J.; Águila, S.; Cornejo, F.; Alderete, J. Biotransformation of 5 $\alpha$ -hydroxy-14-eudesm-11-en-3-one by *Rhizopus nigricans*, *Cunninghamella elegans* and *Mucor plumbeus*. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 2007, 48, 23-7.
- [4] Arantes, S.F.; Hanson, J.R.; Hitchcock, P.B. The hydroxylation of the sesquiterpenoid valerianol by *Mucor plumbeus*. *Phytochemistry* 1999, 52, 1063-7.
- [5] Atta-ur- Rahman.; Yaqoob, M.; Farooq, A.; Anjum, S.; Asif, F.; Choudhary, M.I. Fungal Transformation of (1R,2S,5R)-(-)-Mentol by *Cephalosporium aphidicola*. *J. Nat. Prod.* 1998, 61, 1340-2.
- [6] Avent, A.G.; Chamberlain, C.; Hanson, J.R.; Hitchcock, P.B. The Conformation of Fujenal, a Seco-ring B ent-Kaurenoid Diterpene. *J. Chem. Soc. Perkin Trans.* 1985, 1, 2493-6.
- [7] Barone, V.; Cossi, M.; Tomasi, J. *Journal of Chemical Physics* 1997, 107, 3210-21.

- [8] Baynham, M.K.; Dickinson, J.M.; Hanson, J.R.; Hitchcock, P.B. Neighbouring group participation in the reduction of the diterpenoid fujenal. *J. Chem. Perkin Trans* 1987, 1, 1987-90.
- [9] Bensasson, C.S.; Hanson, J.R. Huerou, Y.L. The Microbiological hydroxylation of 3 $\alpha$ ,5-cicloandrostanes by *Cephalosporium aphidicola*. *Phytochemistry* 1999, 52, 1279-82.
- [10] Boaventura, M.A.D.; Oliveira, A.B.; Hanson, J.R.; Hitchcock, P.B.; Takahashi, J.A. The biotransformation of methyl ent-15-oxokaur-16-en-19-oate by *Rhizopus stolonifer* and *Mucor plumbeus*. *Phytochemistry* 1995, 40, 1667-9.
- [11] Castillo, U.F.; Wilkins, A.L.; Lauren, D.R.; Smith, B.L.; Towers, N.R.; Alonso-Amelot, M.E.; Jaimes-Espinoza, R. Isoptaquiloside and Caudatoside, Illudane-type Sesquiterpene Glucosides from *Pteridium aquilinum* var. *caudatum*. *Phytochemistry* 1997, 44, 901-6.
- [12] Cavell, B.D.; MacMillan, J. Plant hormones - IV. Isolation of (-)-kaur-16-en-19-oic acid from the mycelium of *Gibberella fujikuroi*. *Phytochemistry* 1967, 6, 1151-4.
- [13] Chai, W.; Hamada, H.; Suhara, J.; Horiuchi, C.A. Biotransformation of (+)- and (-)-camphorquinones by plant cultured cells. *Phytochemistry* 2001, 57, 669-73.
- [14] Chenevert, R.; Thiboutot, S. Baker's yeast reduction of 1,2-diketones. Preparation of pure S-(-)-2-hydroxy-1-phenyl-1-propanone. *Chemistry Letters* 1998, 1191-2.
- [15] Cornelissen, J. Fungal biotransformations of terpenes and alkaloids WUR – Wageningen University and Research Centre Wageningen, The Netherlands 2006, 36p.

- [16] Cossi, M.; Barone, V.; Cammi, R.; Tomasi, J. *Chemical Physics Letters* 1996, 255, 327-35.
- [17] D.A. McQuarrie, *Statistical Thermodynamics*, University Science Books, Mill Valley, 1973.
- [18] de Carvalho, C.C.C.R.; da Fonseca, M.M.R. *Biotransformations of terpenes. Biotechnol. Adv.* 2006, 24, 134-42.
- [19] Delgado et al. *Thamnostylum piriforme* (Bain) Von Arx & Upadhyay, a New Record from Venezuela, South America. *Multiciencias*. 2005, 5(1), 71-5.
- [20] Ditchfield, R.; Hehre, W. J.; Pople, J. A. *J. Chem. Phys.* 1971, 54, 724;
- [21] Faber, K. *Biotransformation in Organic Chemistry*. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag 1992, 283-91.
- [22] Farooq, A.; Hanson, J.R. The Microbial Hydroxylation of some Pinane Monoterpenoids by *Cephalosporium aphidicola*. *Phytochemistry* 1995, 40, 815-7.
- [23] Fraga, B.M.; Alvarez, L.; Suárez, S. Biotransformation of diterpenes epicandiciol and cancandiciol by *Mucor plumbeus*. *J. Nat. Prod.* 2003, 66, 327-31.
- [24] Fraga, B.M.; González, P.; Guilherme, R.; Hernández, M.G. Microbiological transformation of manoyl oxide derivatives by *Mucor plumbeus*. *J. Nat. Prod.* 1998, 61, 1237-41.
- [25] Fraga, B.M.; Guilherme, R.; Hanson, J.R.; Truneh, A. Biotransformation of cedrol and related compounds by *Mucor plumbeus*. *Phytochemistry* 1996, 42, 1583-6.

- [26] Fraga, B.M.; Guilherme, R.; Hernández, M.G.; Chamy, M.; Garbarino, J.A. Biotransformation of two stemodane diterpenes by *Mucor plumbeus*. *Tetrahedron* 2004, 60, 7921-32.
- [27] Fraga, B.M.; Hernández, M.G.; González, P.; López, M.; Suárez, S. Biotransformation of the diterpene ribenone by *Mucor plumbeus*. *Tetrahedron* 2001, 57, 761-70.
- [28] Frisch, M. J., et al *Gaussian 2003 (Revision B.04)*; Pittsburgh PA, 2003.
- [29] Galt, R.H.B.; Hanson, J.R. New Metabolites of *Gibberella fujikuroi*. Part VII. The Preparation of Some Ring-B Nor-derivatives. *J. Chem. Soc.* 1965, 1565-71.
- [30] Gand, E.; Hanson, J.R.; Nasir, H. The Biotransformation of 8-epicedrol and some Relatives by *Cephalosporium aphidicola*. *Phytochemistry* 1995, 39, 1081-4.
- [31] Giri, A.; Dhingra, V.; Giri, C.C.; Singh, A.; Ward, O.P.; Narasu, M.L. Biotransformation using plant cells, organ cultures and enzyme systems: current trends and future prospects. *Biotechnology Advances* 2001, 19, 175-99.
- [32] Hanson, J.R. The Microbial Transformation of Terpenoids. *Natural Products Reports* 1992, 139-51.
- [33] Hanson, J.R. The microbiological transformation of diterpenoids. *Natural Product Reports* 1992, 139-51.
- [34] Hanson, J.R.; Hitchcock, P.B., Takahashi, J.A. Biotransformation of ent-16 $\beta$ -dihydroxykaurane by *Cephalosporium aphidicola*. *Phytochemistry* 1995, 40, 797-800.



- [35] Hanson, J.R.; Hitchcock, P.B.; Hunter, A.C. The Microbial Hydroxylation of 3,16-disubstituted Androstanes by *Cephalosporium aphidicola*. *Phytochemistry* 1998, 49, 1287-92.
- [36] Hanson, J.R.; Jarvis, A.G.; Ratcliffe, A.H. Biotransformation of some Aphidicolane Derivatives by *Cephalosporium aphidicola*. *Phytochemistry* 1992, 31, 3851-3.
- [37] Hanson, J.R.; Nasir, H.; Parvez, A. The hydroxylation of Testosterone and some Relatives by *Cephalosporium aphidicola*. *Phytochemistry* 1996, 42, 411-5.
- [38] Hanson, J.R.; Triana, J. The Acyloin Condensation of the Diterpenoid Fujenal. *J. Chem. Soc. Perkin Trans.* 1982, 1, 611-4.
- [39] Hanson, J.R.; Truneh, A. The Biotransformation of Ambrox® and Sclareolide by *Cephalosporium aphidicola*. *Phytochemistry* 1996, 42, 1021-3.
- [40] Hanson, J.R.; White, A.F. The Chemistry of Tetracyclic Diterpenoids-VII. Stereochemical Studies in the Fujenal Series. *Tetrahedron* 1968, 24, 2527-31.
- [41] Hanson, J.R.; Willis, C.L. The Preparation of Some ent-7-Nor-5 $\beta$ -gibberell-16-enes as potential Gibberellin Biosynthesis Inhibitors. *J. Chem. Soc. Perkin Trans.* 1981, 1, 3020-4.
- [42] He, X.; Tang, J.; Qiao, A.; Wang, G.; Jiang, M.; Liu, R.H.; Yao, X. Cytotoxic biotransformed products from cynobufagin by *Mucor spinosus* and *Aspergillus niger*. *Steroids* 2006, 71, 392-402.
- [43] Hu, S.H.; Genain, G.; Azerad, R. Microbial transformation of steroids: contribution to 14 $\alpha$ -hydroxylation. *Steroids* 1995, 60, 337-52.

- [44] Huang, X.; Kong, L. Steroidal saponins from roots of *Asparagus officinalis*. *Steroids* 2006, 171-6.
- [45] Iranshahi, M.; Mojarab, M.; Sadeghian, H.; Hanafi-bojd, M. y.; Schneider, B. Polar secondary matabolites *Ferula persica* roots. *Phytochemistry* 2007, doi:10.1016/j.phytochem.2007.08.001.
- [46] Ishihara, K.; Hamada, H.; Hirata, T.; Nakajima, N. Biotransformation using plant cultures cells. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzimatic* 2003, 23, 145-70.
- [47] Kiran, I.; Akar, T.; Gorgulu, A.; Kazaz, C. Biotransformation of racemic diisosporane by *Cephalosporium aphidicola* and *Neurospora crassa*. *Biotechnology Letters* 2005, 27, 1007-10.
- [48] Kuhnt, M.; Bitsch, F.; Ponelle, M.; Fehr, T.; Sanglier, J. Microbial conversion of rapamycin. *Enzyme and Microbial Technology* 1997, 21, 405-12.
- [49] Lacroix I.; Biton, J.; Azerad, R. Microbial Models of Drug Metabolism: Microbial Transformations of Trimegestone® (RU27987), a 3-Keto- $\Delta$ -4,9(10)-19-norsteroid Drug. *Bioorganic e Medicinal Chemistry* 1999, 7, 2329-41.
- [50] Lamm, A.S.; Chen, A.R.M.; Reynolds, W.F.; Reese, P.B. Steroid hydroxylation by *Whetzelinea sclerotiorum*, *Phanerochaete chrysosporium* and *Mucor plumbeus*. *Steroids* 2007, 72, 713-22.
- [51] Leresche, J.L.; Meyer, H.P. Chemocatalysis and Biocatalysis (Biotransformation): Some Thoughts of a Chemist and of a Biotechnologist. *Organic Process Research & Development* 2006, 10, 572-80.

- [52] Loughlin, W. A. Biotransformation in organic synthesis. *Bioresource Technology* 2000, 74, 49-62.
- [53] Manns, D. Linalool and Cineole type Glucosides from *Cunila Spicata*. *Phytochemistry* 1995, 39, 1115-8.
- [54] McClanahan, R.H.; Robertson, L.W. Biotransformation of Olivetol by *Syncephalastrum racemosum*. *J. Nat. Prod.* 1984, 47(5), 828-34.
- [55] Milanova, R.; Moore, M. The Hydroxylation of Plant Diterpene Analogues by the Fungus *Syncephalastrum racemosum*. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 1993, 303(1), 165-71.
- [56] Miyazawa, M.; Nobata, M.; Hyakumachi, M.; Kameoka, H. Biotransformation of (+)- and (-)-camphorquinones by fungi. *Phytochemistry* 1995, 39, 569-73.
- [57] Miyazawa, M.; Nobata, M.; Hyakumachi, M.; Kameoka, H. Biotransformation of (+)- and (-)-camphorquinones to camphanediols by *Glomerella Cingulata*. *Phytochemistry* 1997, 44, 79-81.
- [58] Moussou, P.; Archelas, A.; Baratti, J.; Furstoss, R. Microbiological transformations. 38. Clues for Involvement of a General Acid Activation during Hydrolysis of Para-substituted Styrene Oxides by a Soluble Epoxide Hydrolase from *Syncephalastrum racemosum*. *J. Org. Chem.* 1998, 63, 3532-7.
- [59] Moussou, P.; Archelas, A.; Furstoss, R. Microbiological transformations 41. Screening for novel fungal epoxide hydrolases. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 1998, 5, 447-58.
- [60] Nagy, V.; Tóke, E.R.; Keong, L.C.; Sztazeker, G.; Ibrahim, D.; Omar, I.C.; Szakács, G.; Poppe, L. Kinetic resolutions with novel highly

enantioselective fungal lipases produces by solid state fermentation. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 2006, 39, 141-8.

- [61] Oliveira, A.B.; Hanson, J.R.; Takahashi, A.J. The biotransformation of ent-15-oxokaur-16-en-19-oic acid and its methyl ester by *Cephalosporium aphidicola*. *Phytochemistry* 1995, 40, 439-42.
- [62] Pedras, M.S.C; Okanga, F.I.; Zaharia, I.L.; Khan, A.Q. Phytoalexins from crucifers: synthesis, biosynthesis and biotransformation. *Phytochemistry* 2000, 53, 161-76.
- [63] Pinheiro, L.; Marsaioli, A.J. Microbial monooxygenases applied to fragrance compounds. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 2007, 44, 78-86.
- [64] Raldugin, V.A.; Pentegova, V.A. Isolation of (-)-Kaurenol from the Culture Liquid of *Fusarium moliniforme*. *Siberian Branch of the Academy of Sciences of the USSR*. 1976, 741-2.
- [65] Rathbone, D.A.; Bruce, N.C. Microbial transformation of alkaloids. *Current Opinion in Microbiology* 2002, 5, 274-81.
- [66] Rebolledo, F.; Roberts, S.M.; Willetts, A.J. Biotransformation of cycloalkanediones by microorganisms; stereoselective reduction of (±)-camphorquinone. *Biotechnology Letters* 1991, 13(4), 245-8.
- [67] Schipper, M.A.A. On *Mucor circinelloides*, *Mucor racemosus* and related species. *Studies in mycology*. Baarn, Centraalbureau voor Schimmelcultures. 1976, 12.
- [68] Still, W.C.; Kahn, M.; Mitra, A. Rapid chromatographic technique for preparative separations with moderate resolution. *J. Org. Chem.* 1978, 43(14), 2923-5.

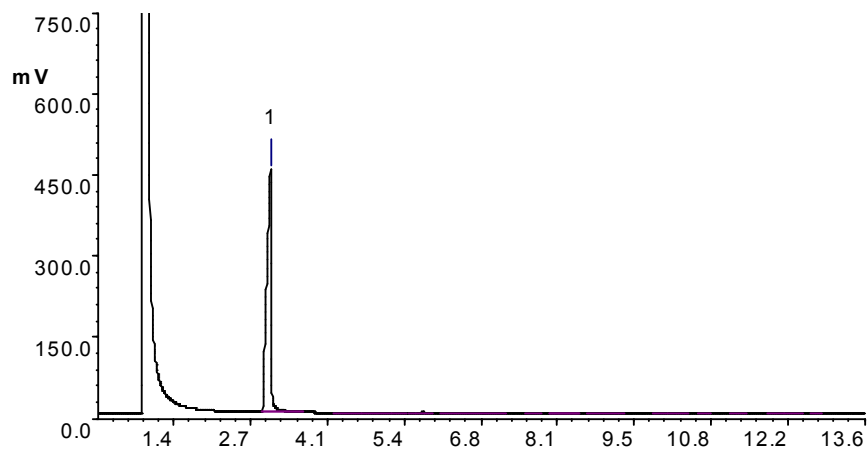
- [69] Stredansky, M.; Conti, E.; Stredanska, S.; Zanetti, F.  $\alpha$ -Linolenic acid production with *Thamnidium elegans* by solid-state fermentation on apple pomace. *Bioresource Technology* 2000, 73, 41-5.
- [70] Szabo, N.S. Ostlund, Modern Quantum Chemistry, Introduction to Advanced Electronic Structure Theory, Dover Publications, Inc., New York, 1996.
- [71] Takahashi, J.A. Estudo Fitoquímico de *Xylopiia frutescens* Aubl. e Transformações Microbianas de Cauranos, Afidicolanos e Estemodanos 1994, 363p..
- [72] Takahashi., J.A.; Barroso, H.A.; Oliveira, A.B. Optimization of Diterpenes Bioconversion Process by the Fungus *Cephalosporium aphidicola*. *Brazilian Journal of Microbiology* 2000, 31, 83-6.
- [73] Tian, Y.; Guo, H.; Han, J.; Guo D. Microbial transformation of 20-(S)-Protopanaxatriol by *Mucor spinosus*. *J. Nat. Prod.* 2005, 68, 678-80.
- [74] Truesdell, S.J. Pfizer Inc. New York, Microbial Biotransformation, NY (US), Patent N<sup>o</sup>.: US 6,180,375 B1, 2001.
- [75] Turner, A.B. Steroids, Reactions and Partial Synthesis. *Natural Products Reports* 1991, 17-52.
- [76] Turner, M.L.; Acosta, E.P. Discrimination of the nature of doping with 19-norsteroids through hair analysis. *Clinical Chemistry* 2000, 46(12), 2020-2.
- [77] Wang, L.; Qin, G.; Chen, S.; Li, C. Three diterpene glucosides and a diphenylamine derivative from *Pieris Formosa*. *Fitoterapia* 2001, 72, 779-87.

- [78] Yang, L.; Hsu, F.; Chang, S.; Cheng, J.; Hsu, J.; Hsu, C.; Liu, P.; Lin, S. Microbial metabolism of steviol and steviol-16 $\alpha$ ,17-epoxide. *Phytochemistry* 2007, 68, 562-70.
- [79] Ye, M.; Han, J.; Tu, G.; An, D.; Guo, D. Microbial hydroxylation of bufalin by *Cunninghamella blakesleana* and *Mucor spinosus*. *J. Nat. Prod.* 2005, 68, 626-8.
- [80] Zaks, A.; Dodds, D.R. Application of biocatalysis and biotransformations to the synthesis of pharmaceuticals. *Drug Discovery Today* 1997, 2(12), 513-31.
- [81] Zare, R.; Gams, W.. A monograph of *Verticillium* section *Prostrata*. *Rostaniha* 2004, No. 3, Supplement 194 pp.
- [82] Zhang, J.; Guo, H.; Tian, Y.; Liu, P.; Li, N.; Zhou, J.; Guo D. Microbial transformation of 20-(S)-Protopanaxatriol by *Mucor spinosus* and the cytotoxic structure activity relationships of the transformed products. *Phytochemistry* 2007, 68, 2523-30.
- [83] Zheng, Z.; Liu, S.; Freyer, A.J.; Bollag, J. Transformation of Metalaxyl by the Fungus *Syncephalastrum racemosum*. *Applied and Environmental Microbiology* 1989, 55(1), 66-71.

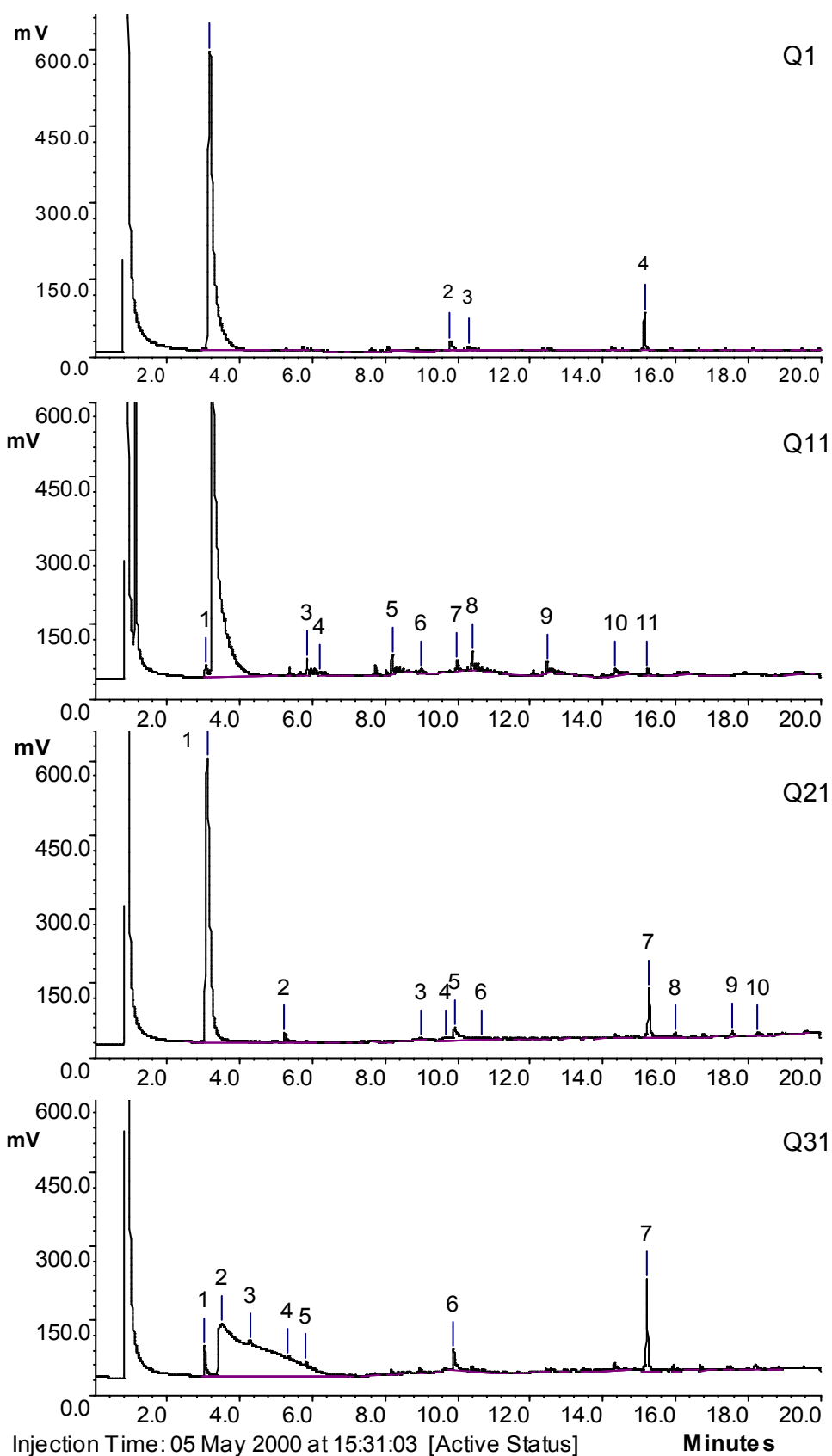
## Anexo

### Cromatogramas obtidos por cromatografia gasosa na biotransformação da canforquinona

A seguir, apresentam-se os cromatogramas obtidos para a canforquinona e para as alíquotas dos experimentos realizados na biotransformação dessa substância (**Figuras 73-83**, pág.129-139).

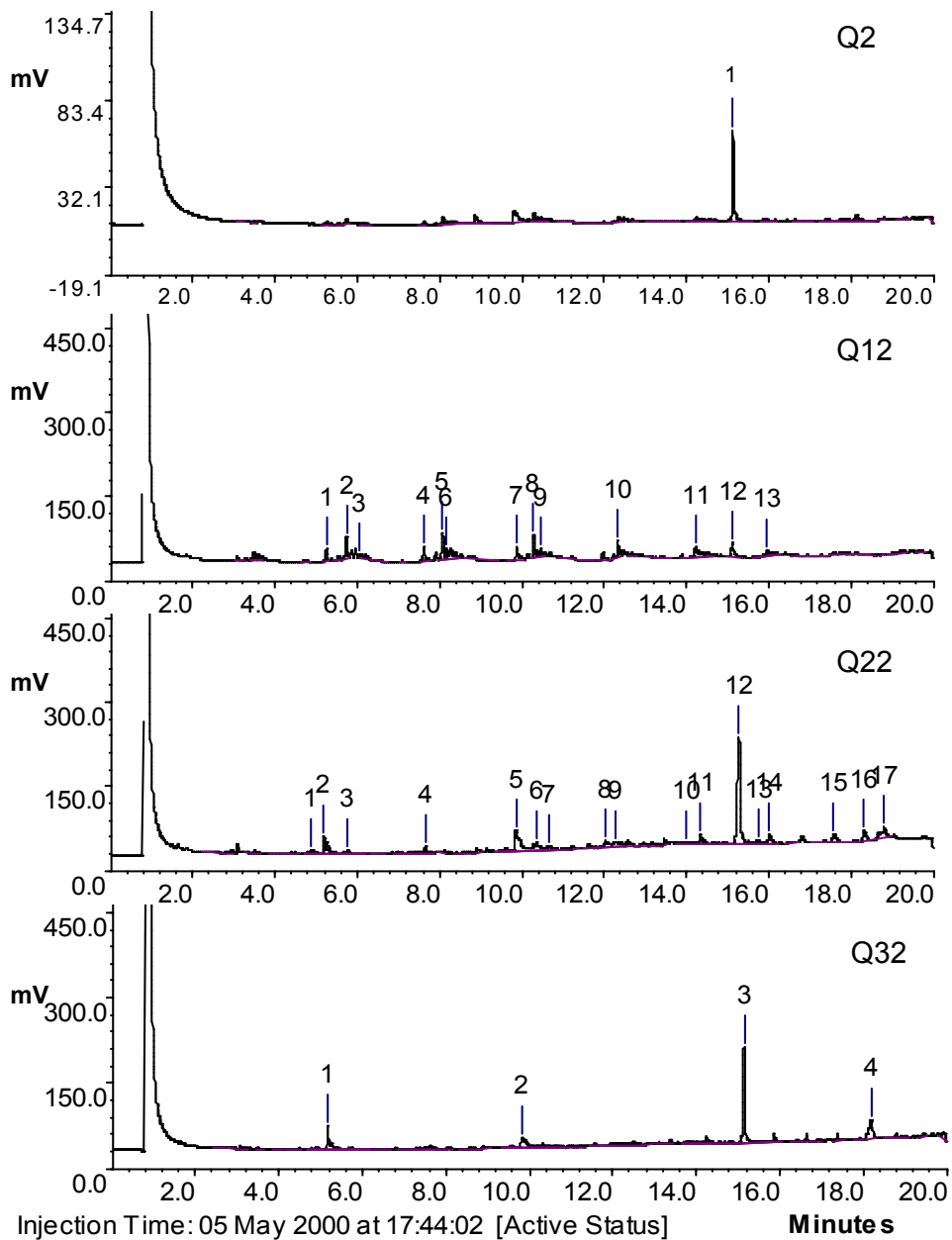


**Figura 73** – Cromatograma da canforquinona obtido por CG

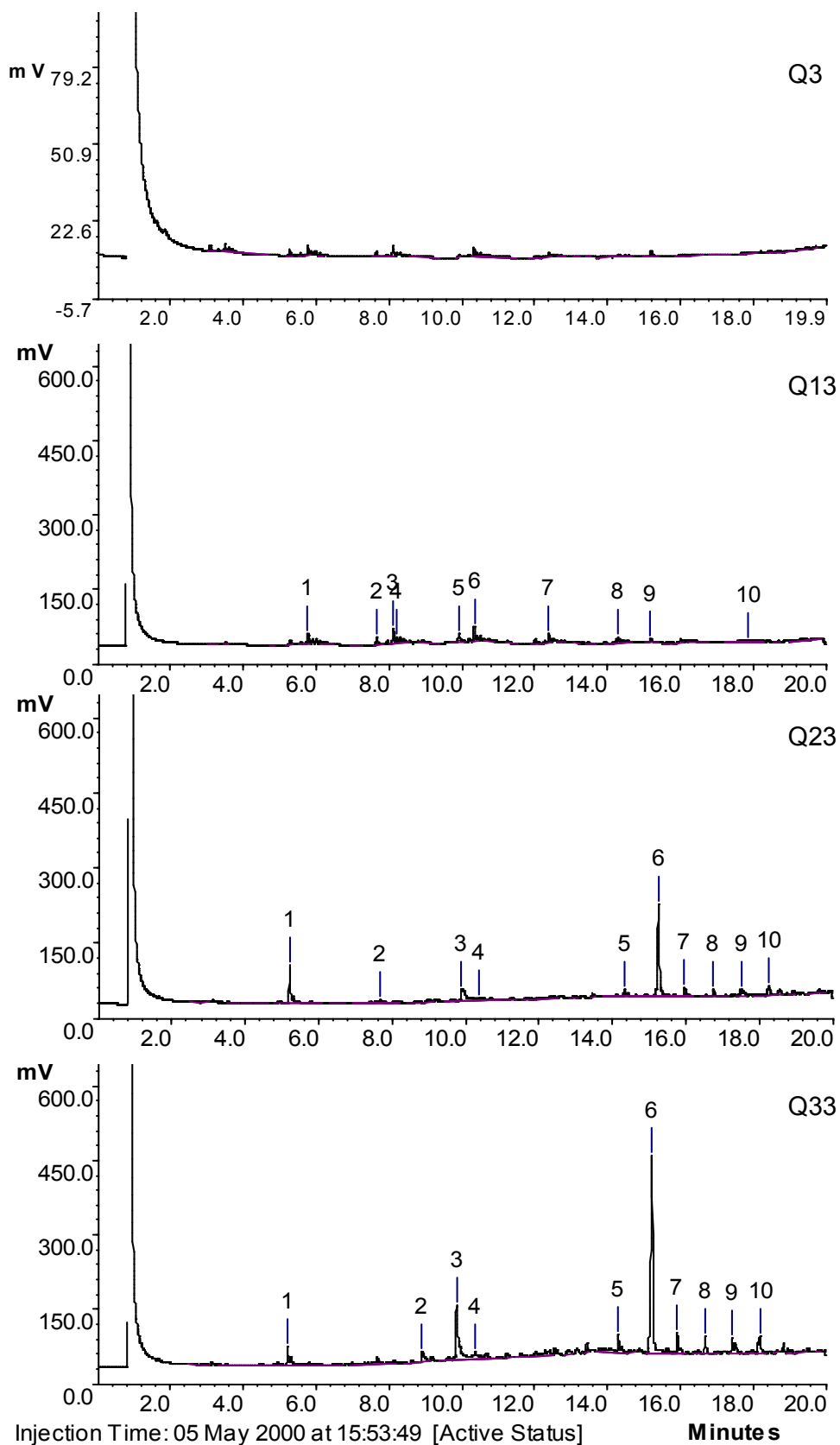


**Figura 74** – Cromatogramas das amostras Q1, Q11, Q21 e Q31, obtidos por CG, referentes aos experimentos de biotransformação da canforquinona com o fungo *Mucor plumbeus*.

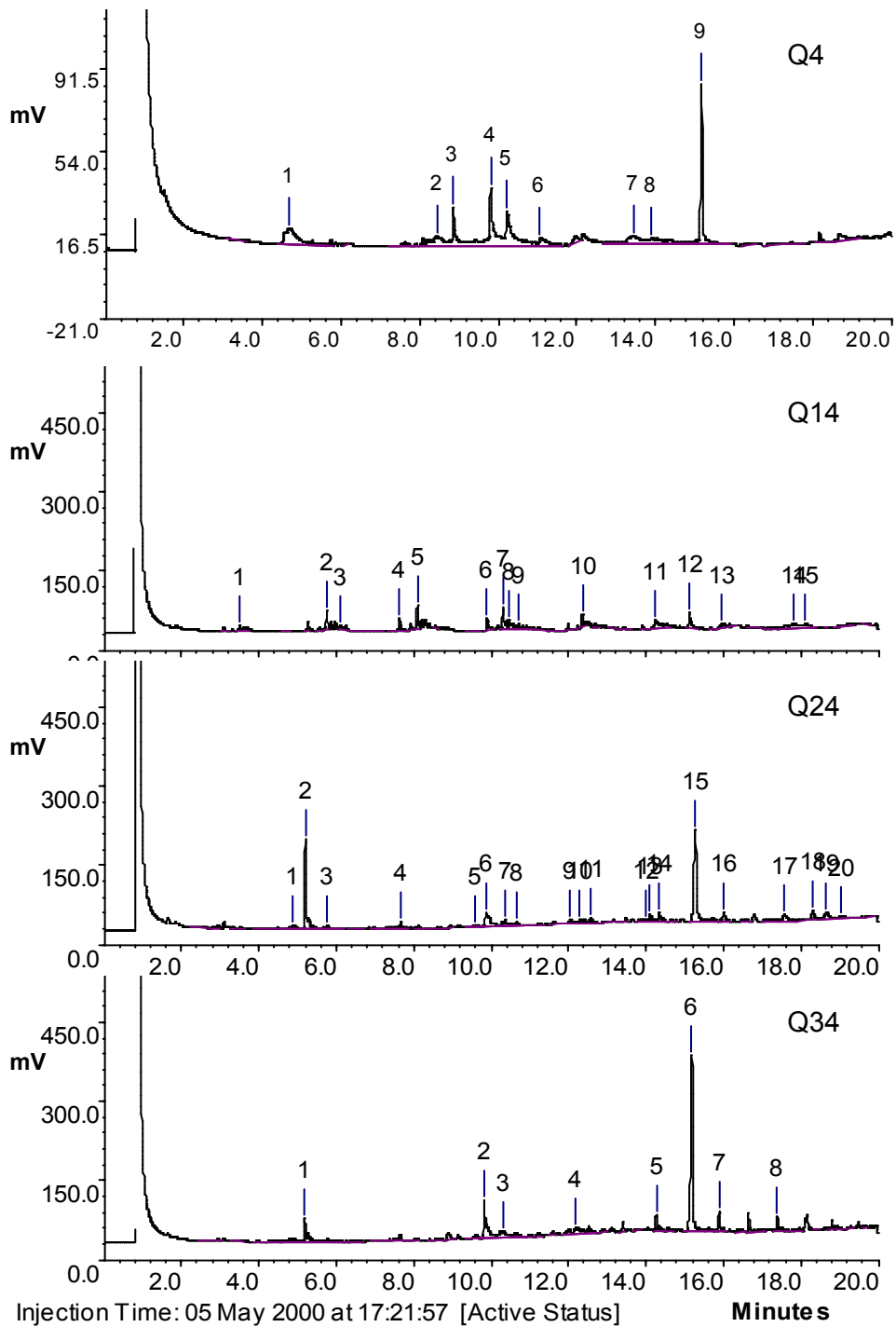




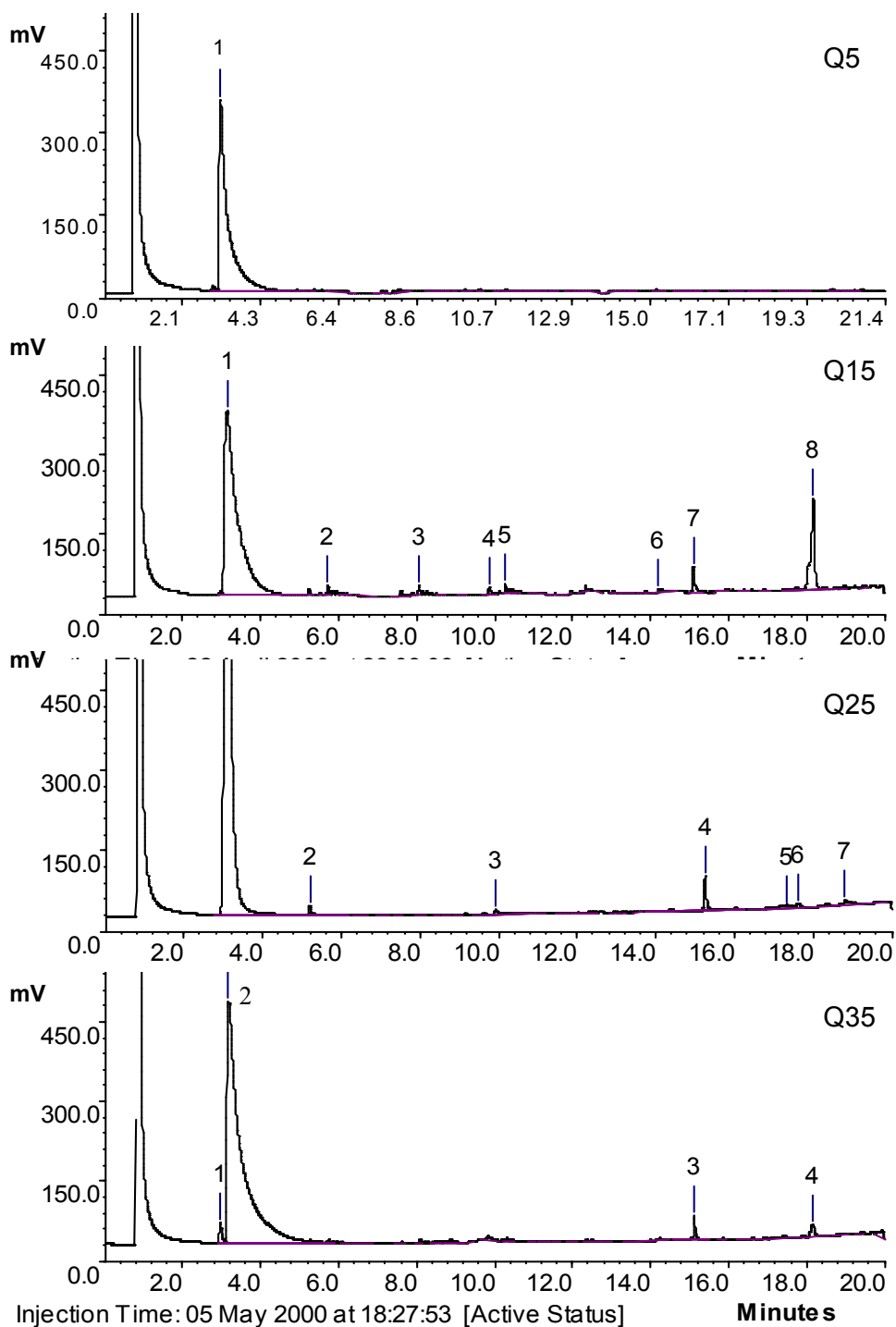
**Figura 75** – Cromatogramas das amostras Q2, Q12 Q22 e Q32, obtidos por CG, referentes aos controles negativos dos experimentos com o fungo *Mucor plumbeus*.



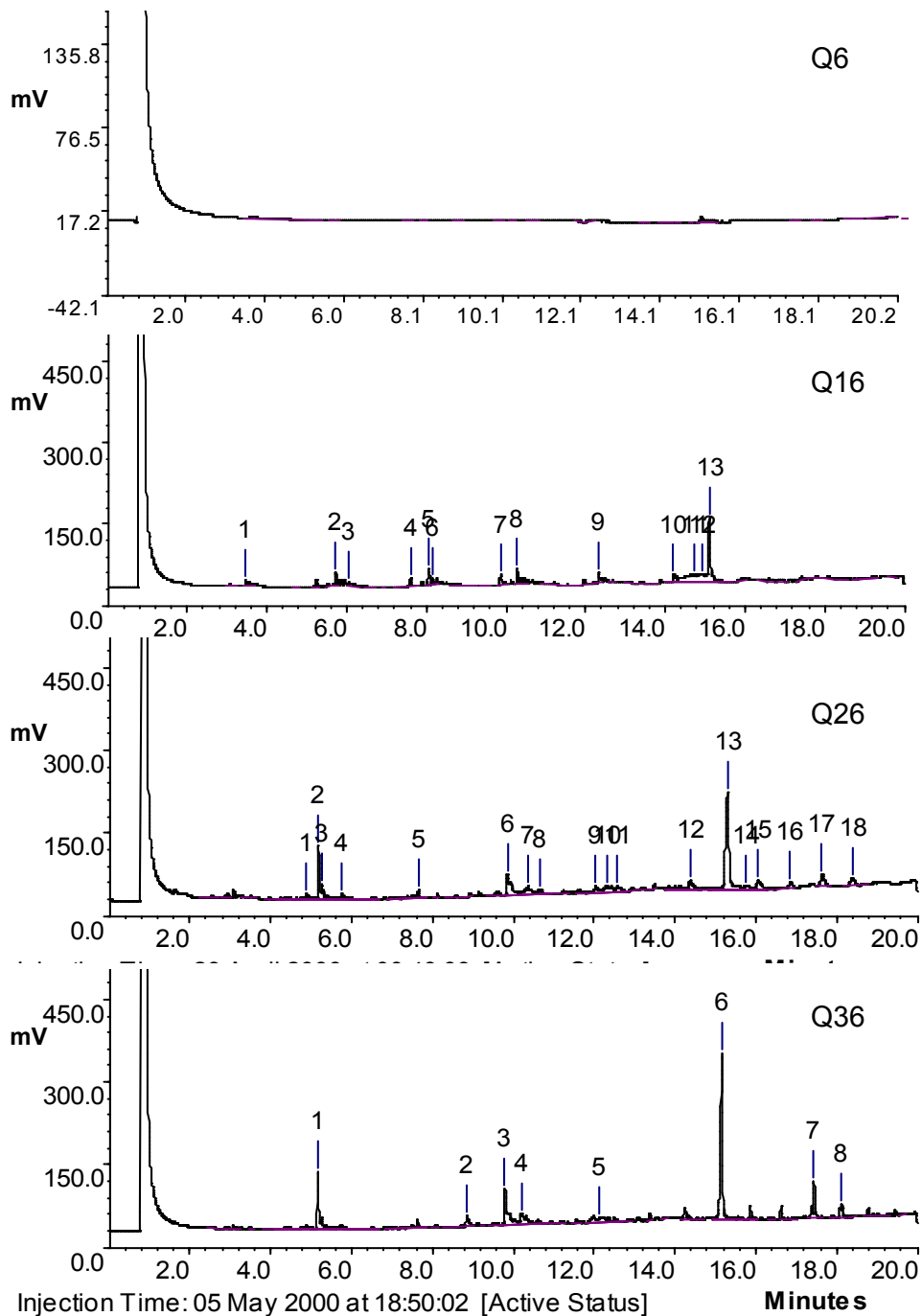
**Figura 76** – Cromatogramas das amostras Q3, Q13, Q23 e Q33, obtidos por CG, referentes aos experimentos de biotransformação da canforquinona com o fungo *Thamnostylum sp.*.



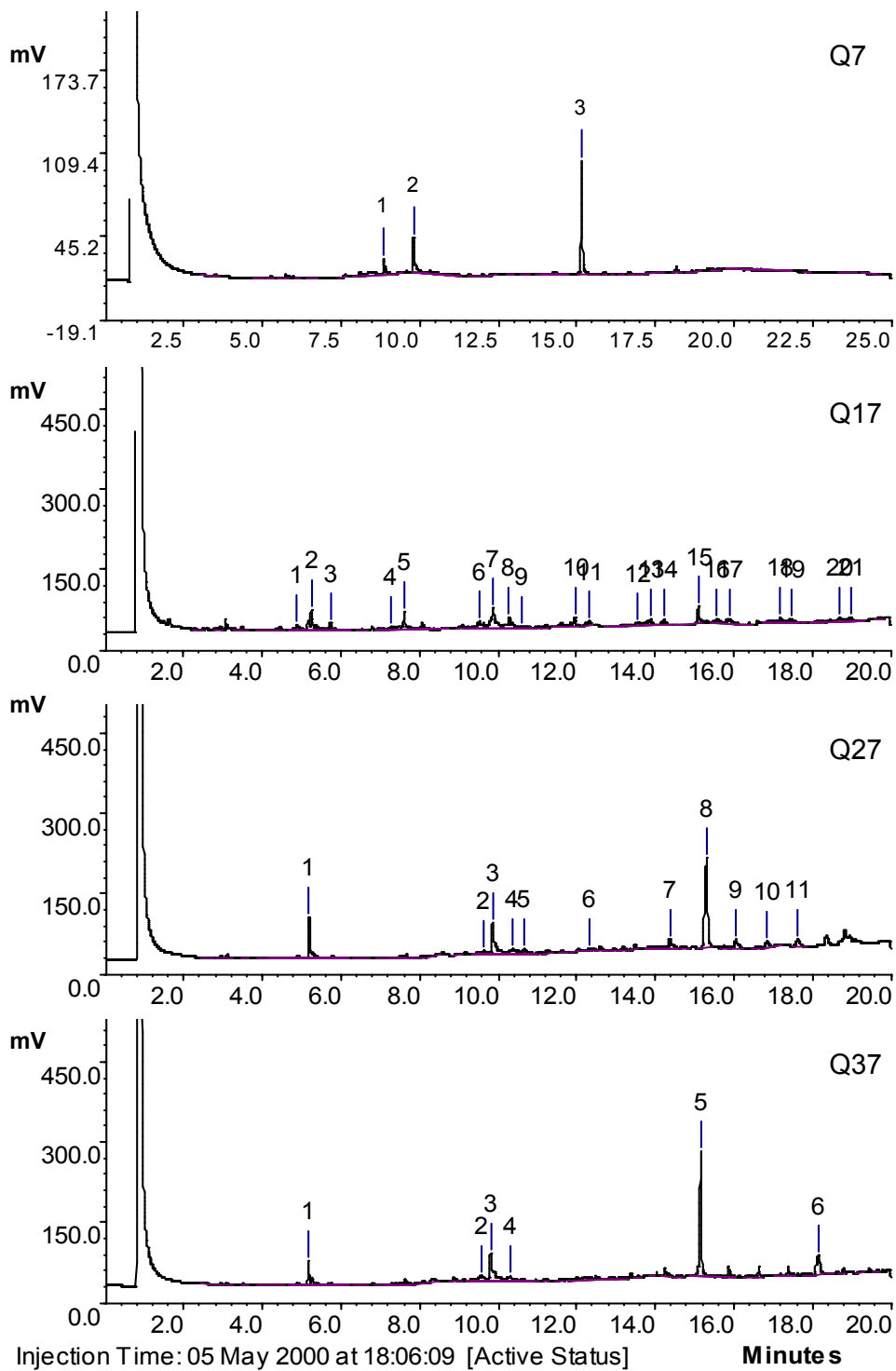
**Figura 77** – Cromatogramas das amostras Q4, Q14, Q24 e Q34, obtidos por CG, referentes aos controles negativos dos experimentos com o fungo *Thamnostylum sp.*.



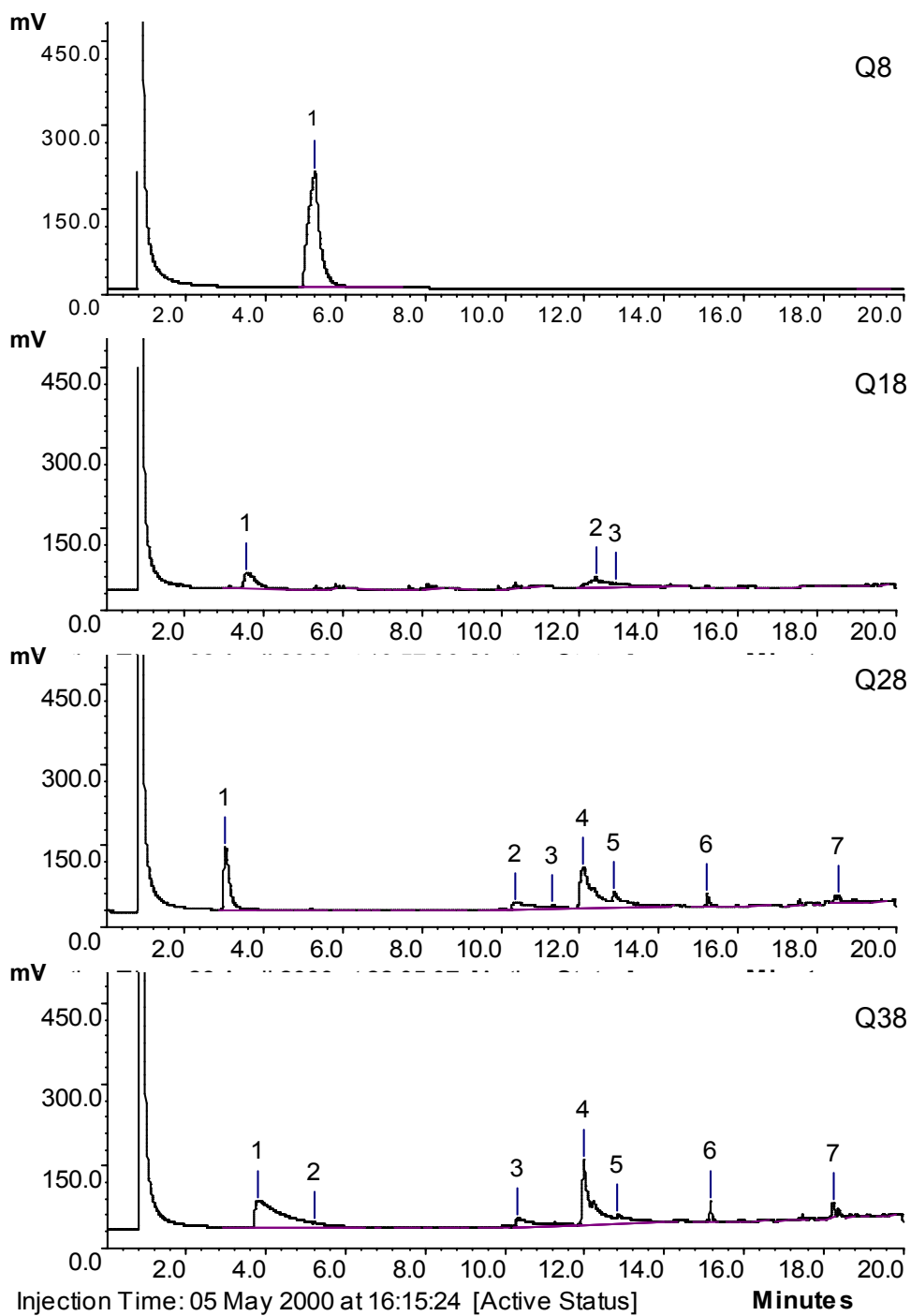
**Figura 78** – Cromatogramas das amostras Q5, Q15, Q25 e Q35, obtidos por CG, referentes aos experimentos de biotransformação da canforquinona com o fungo *Syncephalastrum racemosum*.



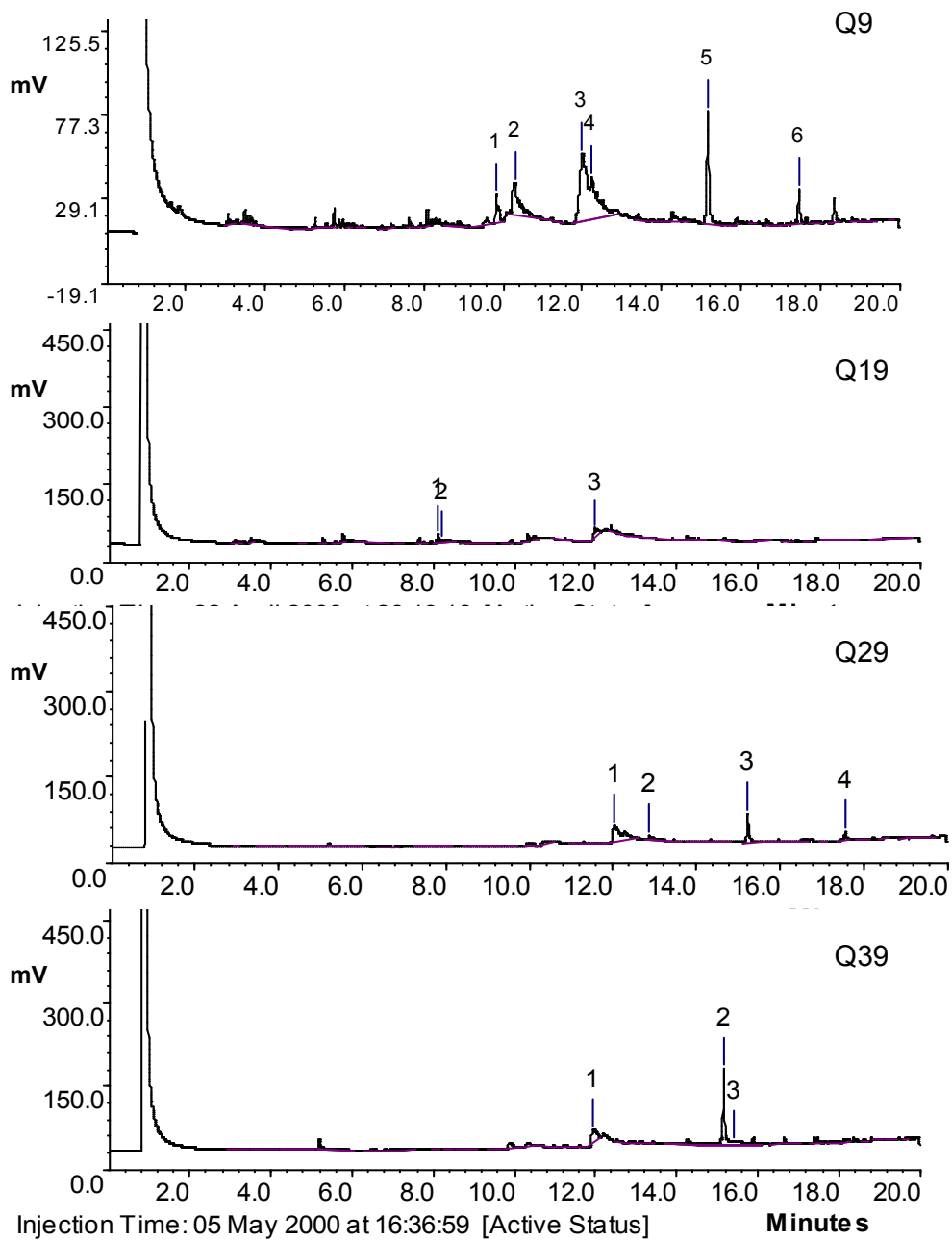
**Figura 79** – Cromatogramas das amostras Q6, Q16, Q26 e Q36, obtidos por CG, referentes aos controles negativos dos experimentos com o fungo *Syncephalastrum racemosum*.



**Figura 80** – Cromatogramas das amostras Q7, Q17, Q27 e Q37, obtidos por CG, referentes aos controles positivos dos experimentos com os fungos *Mucor plumbeus*, *Thamnostylum* sp. e *Syncephalastrum racemosum*.

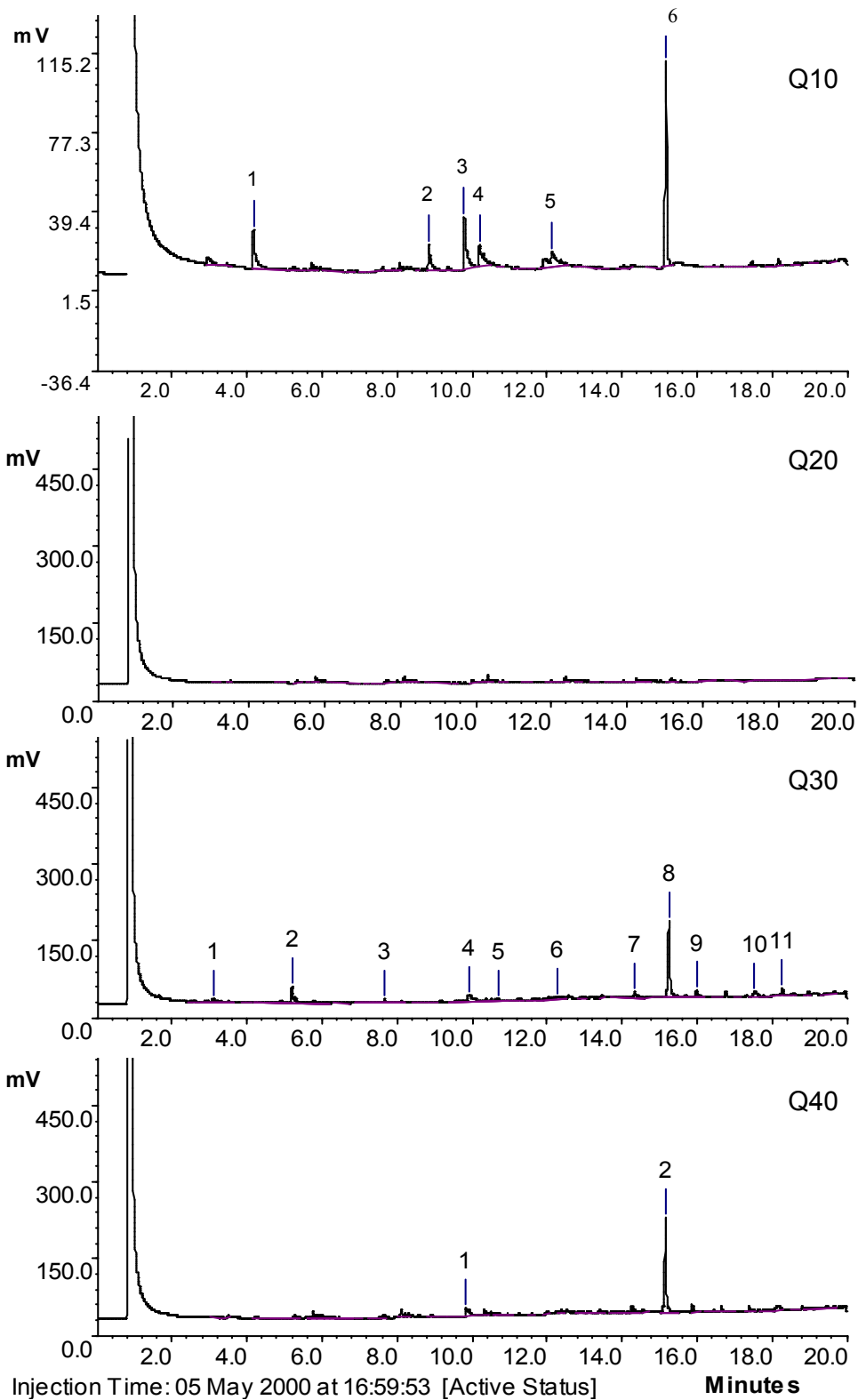


**Figura 81** – Cromatogramas das amostras Q8, Q18, Q28 e Q38, obtidos por CG, referentes aos experimentos de biotransformação da canforquinona com o fungo *Lecanicillium muscarium*.



**Figura 82** – Cromatogramas das amostras Q9, Q19, Q29 e Q39, obtidos por CG, referentes aos controles negativos dos experimentos com o fungo *Lecanicillium muscarium*.





**Figura 83** – Cromatogramas das amostras Q10, Q20, Q30 e Q40, obtidos por CG, referentes aos controles positivos dos experimentos com o fungo *Lecanicillium muscarium*.

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)