

UFMG/ICEx-DQ. 781^a

T. 326^a

LEONARDO RIBEIRO MARTINS

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE
FUNGOS BRASILEIROS EM REAÇÕES DE
BIOTRANSFORMAÇÃO E BIORREMEDIAÇÃO**

Tese apresentada ao
Departamento de Química do
Instituto de Ciências Exatas da
Universidade Federal de Minas
Gerais, como requisito parcial para
obtenção do grau de Doutor em
Ciências - Química.

Belo Horizonte

2009

M379a
2009
T

Martins, Leonardo Ribeiro

Avaliação do potencial biotecnológico de fungos brasileiros em reações de fungos brasileiros em reações de biotransformação e biorremediação / Leonardo Ribeiro Martins. 2009.

xv, 203 f. : il.

Orientadora: Jacqueline Aparecida Takahashi.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Minas Gerais. Departamento de Química.
Inclui bibliografia.

1. Química orgânica - Teses 2. Fungos - Teses 3. Produtos naturais - Teses 4. Biotransformação - Teses 5. Metais - Teses 6. Biorremediação - 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 - 3409-5711
E-MAIL: pgquimic@qui.ufmg.br



"Avaliação do Potencial Biotecnológico de Fungos Brasileiros em Reações de Biotransformação e Biorremediação"

Leonardo Ribeiro Martins

Tese aprovada pela banca examinadora constituída pelos Professores:

Profa. Jacqueline Aparecida Takahashi - Orientadora
UFMG

Profa. Célia Maria Corrêa
UFOP

Profa. Adriana Akemi Okuma
CEFET-MG

Profa. Lucienir Pains Duarte
UFMG

Prof. Fernando Carazza
UFMG

Belo Horizonte, 05 de agosto de 2009.

**“Este trabalho não poderia ser concluído sem o apoio de minha esposa, Mariana,
e de minha mãe Vera, pessoas queridas que somaram uma dimensão e sentido
especial em minha vida”**

**“A coisa mais bela que o homem pode experimentar é o mistério. É essa a
emoção fundamental que está na raiz de toda ciência e de toda arte”**

Albert Einstein

AGRADECIMENTO

À professora, orientadora e amiga Jacqueline Aparecida Takahashi pela paciência, amizade e orientação durante todo o tempo do nosso trabalho e acima de tudo pela oportunidade de aprender e de fazer ciência.

Aos meus colegas Yuri, Betânia, Silmara, Esther, Fabiana, Poliana, Natalia, Amanda, Giovanni, Lucas, Emanuelle, Mateus pela amizade, colaboração e espírito de equipe, tornando mais gratificante nossa convivência no laboratório.

À todos os professores do Departamento de Química

Agradeço aos funcionários do Departamento de Química Paulete, Kátia, Lilian, Ivana, José Souto, Rogério, Anderson, Ricardo, Romário, Sandra e Gustavo pelo apoio indispensável.

À Universidade Federal de Minas Gerais e ao Departamento de Química.

E à CAPES, CNPq e FAPEMIG pelo apoio financeiro.

Sumário

Índice de equação.....	i
Índice de esquemas.....	ii
Índice de figuras.....	v
Índice de gráficos.....	ix
Índice de tabelas.....	x
Lista de abreviaturas.....	xi
Resumo.....	xii
Abstract.....	xiv
1 Introdução.....	1
1.1 Biotransformação.....	2
1.1.1 Biotransformação de diterpenos caurânicos.....	11
1.1.2 Biotransformação de triterpenos pentacíclicos.....	25
1.2 Biorremediação.....	34
1.2.1 Biorremediação de metais.....	35
2 Objetivos.....	44
2.1 Objetivos.....	45
3 Parte experimental.....	46
3.1 Reagentes.....	47
3.2 Solventes.....	47
3.3 Cromatografia em camada delgada (CCD).....	47
3.4 Reveladores.....	47
3.4.1 Solução de vanilina.....	47
3.4.2 Vapores de iodo.....	48
3.4.3 Radiação ultravioleta.....	48
3.5 Cromatografia em coluna (CC).....	48
3.5.1 Sílica gel 60 (70-230 Mesh) Merck.....	48
3.5.2 Sílica gel (230-400 Mesh) Merck.....	48
3.5.3 Alumina neutra.....	48
3.6 Cromatografia a gás.....	48
3.6.1 Cromatografia a gás	48
3.6.2 Cromatografia a gás acoplada a espectrometria de massas (EM).....	49
3.7 Absorção atômica (AA).....	50
3.8 Ressonância magnética nuclear (RMN).....	50
3.9 Espectroscopia de ultravioleta (UV).....	50
3.10 Espectroscopia no infravermelho (IV).....	50

3.11	Purificação dos materiais de partida fujenal (61), lupeol (152), betulinato de metila (153) e β -amirina (154).....	51
3.11.1	Purificação do fujenal (61).....	51
3.11.2.	Purificação do lupeol (152).....	51
3.11.3	Purificação do betulinato de metila (153).....	51
3.11.4	Purificação da β -amirina (154).....	51
3.12	Condições microbiológicas.....	52
3.12.1	Manutenção dos microrganismos.....	52
3.12.2	Microrganismos utilizados.....	52
3.12.3	Meios de cultura.....	52
3.12.3.1	Meios de cultura líquidos.....	53
3.12.3.1.1	Meios líquidos para transformações microbiológicas.....	53
3.12.3.1.1.1	Meio líquido geral 01 (ML01).....	53
3.12.3.1.1.2	Meio líquido geral 02 (ML02).....	53
3.12.3.1.1.3	Meio líquido geral 03 (ML03).....	53
3.12.3.1.1.4	Meio líquido específico para o gênero <i>Mucor</i> (ML04).....	54
3.12.3.1.1.5	Meio líquido geral modificado (ML05).....	54
3.12.3.1.1.6	Meio líquido específico para o fungo <i>Lecanicillium muscarinum</i> (ML06).....	54
3.12.3.1.1.7	Meio líquido específico para o fungo <i>Thamnostylum</i> sp. (ML07).....	54
3.12.3.2	Meio líquido para crescimento de <i>Penicillium</i> sp. (ML08).....	55
3.12.3.3	Meio líquido para biorremediação.....	55
3.12.3.3.1	Meio líquido para biorremediação (ML09).....	55
3.12.3.4	Meio sólido Agar batata dextrosado (ABD).....	55
3.12.4	Preparo das pré-culturas dos fungos.....	56
3.12.5	Preparo das suspensões de esporos do fungo <i>Penicillium</i> sp e contagem de esporos com a câmara de Neubauer.....	56
3.12.5.1	Preparo das suspensões de esporos.....	56
3.12.5.2	Contagem de esporos com a câmara de Neubauer.....	56
3.13	Biotransformações.....	58
3.13.1	Procedimento geral.....	58
3.13.2	Biotransformação do substrato esteviosídeo (60) pelo fungo <i>Rhizopus oryzae</i> (LAB 16).....	59
3.13.3	Biotransformação do substrato esteviosídeo (60) pelos fungos <i>Beauveria bassiana</i> (LAB 12), <i>Rhizopus oryzae</i> (LAB 16) e <i>Rhizopus stolonifer</i> (LAB 22).....	59
3.13.4	Biotransformação do fujenal (61) pelo fungo <i>Thamnostylum</i> sp. (LAB 32).....	59
3.13.5	Biotransformação do <i>ent</i> -16-cauren-19-ol (62) pelo fungo <i>Thamnostylum</i> sp. (LAB 32).....	60

3.13.6	Biotransformação do lupeol (<u>152</u>) pelo fungo <i>Beuaveria bassiana</i> (LAB 12).....	60
3.13.7	Biotransformação do lupeol (<u>152</u>) pelo fungo <i>Mucor plumbeus</i> (LAB 03) no meio líquido ML04.....	61
3.13.8	Biotransformação do lupeol (<u>152</u>) pelo fungo <i>Mucor plumbeus</i> (LAB 03).....	61
3.13.9	Biotransformação do betulinato de metila (<u>153</u>) pelo fungo <i>Mucor plumbeus</i> (LAB 03).....	62
3.13.10	Biotransformação da β -amirina (<u>154</u>) pelo fungo <i>Lecanicillium muscarinium</i>	62
3.13.11	Biotransformação da friedelina (<u>155</u>) pelo fungo <i>Mucor plumbeus</i> (LAB 03) nos meios de cultura ML01, ML02, ML03 e ML04 monitorado por cromatografia gasosa.....	63
3.13.12	Biotransformação da friedelina (<u>148</u>) pelo fungo <i>Mucor plumbeus</i> (LAB 03).....	64
3.14	Biorremediação.....	64
3.14.1	Teste de concentração inibitória do crescimento de oito espécies de <i>Penicillium</i> com os metais níquel, cobre, lítio, cádmio, cobalto, chumbo e cromo.....	64
3.14.2	Biorremediação dos metais níquel, cobre, lítio, cádmio, chumbo e cobalto por oito espécies de <i>Penicillium</i> em meio de cultura.....	66
3.14.3	Biorremediação dos metais níquel, cobre, lítio, cádmio, chumbo e cobalto por oito espécies de <i>Penicillium</i> em água destilada estéril.....	67
3.14.4	Biorremediação do cromo hexavalente.....	68
3.14.4.1	Biorremediação do cromo por <i>Aspergillus niger</i>	68
3.14.4.2	Biorremediação do cromo por <i>Aspergillus niger</i> e oito espécies de <i>Penicillium</i> em água destilada estéril.....	69
3.14.4.3	Determinação de teor de cromo hexavalente dos experimentos por espectrofotometria no ultravioleta.....	70
4	Discussão dos resultados	73
4.1	Purificação dos substratos: lupeol (<u>152</u>), betulinato de metila (<u>153</u>) e β -amirina (<u>154</u>).....	74
4.1.2.	Caracterização dos substratos: lupeol (<u>152</u>), betulinato de metila (<u>153</u>) e β -amirina (<u>154</u>).....	74
4.1.2.1	Lupeol (<u>152</u>).....	75
4.1.2.2	betulinato de metila (<u>153</u>).....	78
4.1.2.3	β -amirina (<u>154</u>).....	82
4.2	Biotransformações.....	85
4.2.1	Biotransformação do esteviosídeo (<u>60</u>).....	86

4.2.1.1	Biotransformação do esteviosídeo (60) por <i>Rhizopus oryzae</i> (LAB 16).	86
4.2.1.2	Biotransformação do esteviosídeo (60) por <i>Beauveria bassiana</i> (LAB 12), <i>Rhizopus oryzae</i> (LAB 16) e <i>Rhizopus stolonifer</i> (LAB 22).....	87
4.2.2	Biotransformação do fujenal (61) por <i>Thamnostylum</i> sp. (LAB 32) no meio de cultura ML07.....	87
4.2.3	Biotransformação do ent-16-cauren-19-ol (62) por <i>Thamnostylum</i> sp. (LAB 32) no meio de cultura ML 07.....	90
4.2.4	Biotransformação do lupeol (152).....	90
4.2.4.1	Biotransformação do lupeol (152) por <i>Beauveria bassiana</i> (LAB 12) no meio de cultura ML01.....	90
4.2.4.2	Biotransformação do lupeol (152) por <i>Mucor plumbeus</i> (LAB 03) no meio de cultura específico ML04.....	91
4.2.4.3	Biotransformação do lupeol (152) por <i>Mucor plumbeus</i> (LAB 03) no meio de cultura ML01.....	92
4.2.5	Biotransformação do betulinato de metila (153) por <i>Mucor plumbeus</i> (LAB 03) no meio de cultura ML01.....	95
4.2.6	Biotransformação da β -amirina (154) por <i>Lecanicillium muscarinum</i>	98
4.2.7	Biotransformação da friedelina (155).....	107
4.2.7.1	Biotransformação da friedelina (155) por <i>Mucor plumbeus</i> (LAB 03) nos meios de cultura ML01, ML02, ML03 e ML04 monitorada por cromatografia gasosa.....	108
4.2.7.2	Biotransformação da friedelina (155) por <i>Mucor plumbeus</i> (LAB 03) nos meios de cultura ML01.....	111
4.3.	Biorremediação.....	114
4.3.1	Teste de concentração inibitória do crescimento de espécies de <i>Penicillium</i> por metais.....	115
4.3.2	Contagem dos esporos com a câmara de Neubauer.....	116
4.3.3	Biorremediação das misturas binárias de metais.....	117
4.3.3.1	Biorremediação das misturas binárias dos metais níquel, cobre, lítio, cádmio, chumbo e cobalto usando células em crescimento (growing cells).....	118
4.3.3.1.1	Biorremediação da mistura binária dos metais níquel e cobre.....	118
4.3.3.1.2	Biorremediação da mistura binária dos metais lítio e cádmio.....	118
4.3.3.1.3	Biorremediação da mistura binária dos metais cobalto e chumbo.....	119
4.3.3.2	Biorremediação das misturas binárias dos metais níquel, cobre, lítio, cádmio, chumbo e cobalto usando células em repouso (resting cells)...	121
4.3.3.2.1	Biorremediação da mistura binária dos metais níquel e cobre.....	121
4.3.3.2.2	Biorremediação da mistura binária dos metais lítio e cádmio.....	122
4.3.3.2.3	Biorremediação da mistura binária dos metais cobalto e chumbo.....	122
4.3.4	Biorremediação do cromo hexavalente.....	125

4.3.4.1	Biorremediação do cromo por <i>Aspergillus niger</i> usando células em crescimento (growing cells).....	126
4.3.4.2	Biorremediação do cromo por <i>Aspergillus niger</i> e oito espécies de <i>Penicillium</i> usando células em repouso (resting cells).....	127
5	Conclusões	129
6	Referências bibliográficas	132
	Anexos	146
Anexo 01	Lupeol (152).....	147
Anexo 02	Betulinato de metila (153).....	153
Anexo 03	β -amirina (154).....	159
Anexo 04	Acetato de (1S,5bS,7R,7aS,8R,9S,11aR)-7-hidroxi-1-isopropil-5b,7a,8,11a-tetrametil- 2, 3, 3a, 5a, 5b, 6, 7, 7a, 8, 9, 10, 11, 11a, 13b-tetradecahidro-1H- ciclopenta[a]chrisen-9-il (158).....	165
Anexo 05	3 β -hidroxi-olean-12-en-11-ona (159) e o óxido de 11 α , 12 α -taraxerol (160).....	172
Anexo 06	3 β -friedelinol (163).....	181

Índice de Equação

Equação 01	Reação do cromo com 1,5 – difenilcarbazina (DFC) (Narin <i>et al.</i> ; 2008)	71
------------	---	----

Índice de Esquemas

Esquema 01	Redução diastereosselativa de 02 com o microrganismo <i>R. erythropolis</i> SC 13845.....	3
Esquema 02	Redução enantiosseleiva de 05 com os microrganismos <i>Hansenula polymorpha</i> SC 13865 e <i>Hansenula fabianii</i> SC 13894.....	4
Esquema 03	Biotransformação dos substratos 07 (Aranda <i>et al.</i> , 1991), 11 (Arantes <i>et al.</i> , 1999), 15 (Fraga <i>et al.</i> , 2001), 19 (Lamm <i>et al.</i> , 2007).	5
Esquema 04	Biotransformação dos substratos 21 (Fraga <i>et al.</i> , 2003) e 24 (Chen <i>et al.</i> , 2005) com o fungo <i>Mucor plumbeus</i>	6
Esquema 05	Biotransformação dos substratos 27 , 29 , 31 (Martin <i>et al.</i> , 2004a) e 33 (Borges <i>et al.</i> , 2009) com o fungo <i>Rhizopus oryzae</i>	7
Esquema 06	Biotransformação do substrato 36 (Choudhary <i>et al.</i> , 2006a) e 39 (Choudhary <i>et al.</i> , 2006b) com o fungo <i>Rhizopus stolonifer</i>	8
Esquema 07	Biotransformação dos esteróides 44 e 47 (Hu <i>et al.</i> , 1995) com o fungo <i>Thamnostylum piriforme</i>	9
Esquema 08	Biotransformação dos substratos 51 (Choudhary <i>et al.</i> , 2006b), 54 (Kiran <i>et al.</i> , 2005), 56 (Choudhary <i>et al.</i> , 2005) e 58 (Bensasssom <i>et al.</i> , 1999) com o fungo <i>Lecanicillium muscarinum</i>	10
Esquema 09	Hidrólise de 60 levando a formação de 63 e 64	18
Esquema 10	Obtenção das substâncias 65 a 82 pela biotransformação de 64 pelos fungos <i>Mucor recurvatus</i> MR36, <i>Absidia pseudocylindrospora</i> ATCC 24169 e <i>Aspergillus niger</i> BCRC 327 (Chang <i>et al.</i> , 2008).....	19
Esquema 11	Obtenção das substâncias 84 a 97 pela biotransformação de 83 pela bactéria <i>Streptomyces griseus</i> (ATCC 10137) e pelo fungo <i>Cunninghamella bainieri</i> ATCC 9244 (Chang <i>et al.</i> , 2006).....	20
Esquema 12	Obtenção das substâncias 99 , 101 e 102 pela biotransformação de 98 e 100 com os fungos <i>Aspergillus niger</i> e <i>Fusarium moniliforme</i> (Oliveira <i>et al.</i> , 2005).....	21
Esquema 13	Obtenção das substâncias 103 a 107 pela biotransformação de 64 pelos fungos <i>Aspergillus niger</i> , <i>Glomerella cingulata</i> e <i>Mortierella elongata</i> (Akihisa <i>et al.</i> , 2004).....	22

Esquema 14	Obtenção das substâncias 103 , 105 e 108-113 pela biotransformação de 64 com a bactéria <i>Actinoplanes</i> sp. e os fungos <i>Mucor recurvatus</i> , <i>Cunninghamella bainieri</i> (Hsu et al., 2002).....	22
Esquema 15	Obtenção das substâncias 106 , 114 e 115 pela biotransformação de 64 com os fungos <i>Aspergillus niger</i> , <i>Rhizopus arrhizus</i> e <i>Penicillium chrysogenum</i> (Oliveira et al., 1999).....	23
Esquema 16	Obtenção das substâncias 105 e 112 pela biotransformação de 64 com o fungo <i>Fusarium verticilloides</i> (Oliveira et al., 1996).....	23
Esquema 17	Obtenção de 63 pela biotransformação de 60 pelo fungo <i>Gibberella fujikuroi</i> (ATCC 12616) (Oliveira et al., 2007).....	24
Esquema 18	Conversão de 62 a 117 com enzimas microsossomais de <i>M. macrocarpus</i> (Sherwin & Coates, 1982).....	25
Esquema 19	Obtenção de 119 e 120 pela biotransformação de 118 pela bactéria <i>Nocardia</i> sp NRLL 5646 (Qian et al., 2009).....	26
Esquema 20	Obtenção de 122 pela biotransformação de 121 com o fungo <i>Fusarium lini</i> (Choudhary et al., 2008).....	26
Esquema 21	Obtenção de 123 pela biotransformação de 121 com o fungo <i>Fusarium lini</i> (Choudhary et al., 2008).....	27
Esquema 22	Obtenção de 125 , pela biotransformação de 124 pelos fungos <i>Colletotrichum</i> (DPB136) (Bastos et al., 2007).....	27
Esquema 23	Obtenção de 118 , pela biotransformação de 124 pelos fungos <i>Chaetophoma</i> (DPB125) e <i>Dematium</i> (DPB157) (Bastos et al., 2007).	28
Esquema 24	Obtenção de 126 , 127 e 128 pela biotransformação de 118 pelo fungo <i>Arthrotrichum</i> (DPB134) (Bastos et al., 2007).....	28
Esquema 25	Obtenção de 125 , 128 e 129 pela biotransformação de 118 pelos fungos e <i>Colletotrichum</i> (DPB136) e <i>Chaetophoma</i> (DPB 125) (Bastos et al., 2007).....	29
Esquema 26	Obtenção de 131 , 132 , 133 e 135 pela biotransformação de 130 e 134 pela bactéria <i>Nocardia</i> sp. (Zhang et al., 2005).....	30
Esquema 27	Obtenção de 140 e 141 pela biotransformação de 136 a 139 pela bactéria <i>Nocardia</i> sp. NRRL 5646 (Cheng et al., 2004).....	31
Esquema 28	Obtenção de 143 , pela biotransformação de 142 pelo fungo <i>Mucor plumbeus</i> ATCC 4740 (Collins et al., 2002).....	31
Esquema 29	Obtenção de 118 , 144 , 145 e 146 pela biotransformação de 124 pelo bacilo <i>Bacillus megaterium</i> ATCC 13368 (Chatterjee et al., 2000).....	32

Esquema 30	Obtenção de 148 pela biotransformação de 147 pela bactéria <i>Alcaligenes faecalis</i> (Singh <i>et al.</i> , 1999).....	33
Esquema 31	Obtenção de 150 e 151 pela biotransformação de 149 pelo fungo <i>Chaetomium longirostre</i> (Shirane <i>et al.</i> , 1996).....	33
Esquema 32	Hidrólise do esteviosídeo (60) formando 63 e 64 (por rearranjo de 63 no meio, Hanson, 2003).....	86
Esquema 33	Extração e separação cromatográfica do material proveniente da biotransformação do fujenal (61).....	88
Esquema 34	Extração e separação cromatográfica do material proveniente da biotransformação do lupeol (152) no meio ML04	91
Esquema 35	Extração e separação cromatográfica do material proveniente da biotransformação do lupeol (152) no meio ML01	93
Esquema 36	Extração e separação cromatográfica do material proveniente da biotransformação do betulinato de metila (146) no meio ML01	95
Esquema 37	Biotransformação de 153 por <i>Mucor plumbeus</i>	96
Esquema 38	Extração e separação cromatográfica do material proveniente da biotransformação do β -amirina (154) no meio ML06	100
Esquema 39	Biotransformação da 154 por <i>Lecanicillium muscarinium</i>	101
Esquema 40	Proposta do mecanismo de formação da substância 160	108
Esquema 41	Extração e separação cromatográfica do material proveniente da biotransformação de 155	112

Índice de Figuras

Figura 01	Possível interação das hidroxilas do substrato 27 com os sítios da enzima (Martin <i>et al.</i> , 2004a).....	7
Figura 02	Estrutura base dos diterpenos caurânicos.....	11
Figura 03	Posições mais hidroxiladas no esqueleto caurânico.....	16
Figura 04	Representação da parede celular de um fungo.....	36
Figura 05	Câmara de Neubauer.....	57
Figura 06	Estrutura da 1,5 – difenilcarbazida.....	70
Figura 07	Estrutura do complexo DFC+Cr [Cr(HL) ₂] ⁺ e da difenilcarbazona (H ₂ L)....	71
Figura 08	Algumas correlações observadas no mapa de contornos ROESY do lupeol (152).....	77
Figura 09	Algumas correlações observadas no espectro ROESY do betulinato de metila (153).....	82
Figura 10	Algumas correlações observadas no espectro ROESY da β-amirina (154).....	83
Figura 11	Correlações observadas no mapa de contorno COSY para 158	97
Figura 12	Espectro de massas de 158	97
Figura 13	Alguns possíveis fragmentos de 158	97
Figura 14	Ionograma da mistura das substâncias presentes no grupo G4-5.....	99
Figura 15	Espectro de massas de 159 . a) espectro de massas completo. b) expansão do espectro de massas na região de 290 a 500 m/z.....	101
Figura 16	Alguns possíveis fragmentos para 159	102
Figura 17	Espectro de massas de 160 . a) espectro de massas completo. b) expansão do espectro de massas na região de 350 a 470 m/z.....	102
Figura 18	Alguns possíveis fragmentos para 160	103
Figura 19	Correlações observadas nos mapas de contornos COSY e NOESY para 160	105
Figura 20	Cromatogramas do extrato resultante da incubação de 155 com <i>Mucor plumbeus</i> no meio ML01	109
Figura 21	Cromatogramas do extrato resultante da incubação de 155 com <i>Mucor plumbeus</i> no meio ML02	110
Figura 22	Cromatogramas do extrato resultante da incubação de 155 com <i>Mucor plumbeus</i> no meio ML03	110
Figura 23	Cromatogramas do extrato resultante da incubação de 155 com <i>Mucor plumbeus</i> no meio ML04	111
Figura 24	Espectro no infravermelho do lupeol (152) (KBr).....	147
Figura 25	Espectro de RMN de ¹ H do lupeol (152) (400 MHz, CDCl ₃).....	148
Figura 26	Ampliação do espectro de RMN de ¹ H do lupeol (152) (400 MHz, CDCl ₃).....	148

Figura 27	Espectro de RMN de ^{13}C do lupeol (152) (100 MHz, CDCl_3).....	149
Figura 28	Ampliação do espectro de RMN de ^{13}C do lupeol (152) (100 MHz, CDCl_3).....	149
Figura 29	Subespectro DEPT-135 do lupeol (152) (x sinais excluídos) (100 MHz, CDCl_3).....	150
Figura 30	Mapa de contornos HMQC do lupeol (152) (400 MHz, CDCl_3).....	150
Figura 31	Expansão do mapa de contornos HMQC do lupeol (152) (400 MHz, CDCl_3).....	151
Figura 32	Mapa de contornos HMBC do lupeol (152) (400 MHz, CDCl_3).....	151
Figura 33	Mapa de contornos ROESY do lupeol (152) (400 MHz, CDCl_3).....	152
Figura 34	Espectro no Infravermelho do betulinato de metila (153) (KBr).....	153
Figura 35	Espectro de RMN de ^1H do betulinato de metila (153) (400 MHz, CDCl_3).....	154
Figura 36	Ampliação do espectro de RMN de ^1H do betulinato de metila (153) (400 MHz, CDCl_3).....	154
Figura 37	Espectro de RMN de ^{13}C do betulinato de metila (153) (100 MHz, CDCl_3).....	155
Figura 38	Ampliação do espectro de RMN de ^{13}C do betulinato de metila (153) (100 MHz, CDCl_3).....	155
Figura 39	Subespectro DEPT-135 do betulinato de metila (153) (100 MHz, CDCl_3).....	156
Figura 40	Mapa de contornos HMQC do betulinato de metila (153) (400 MHz, CDCl_3).....	156
Figura 41	Expansão do mapa de contornos HMQC do betulinato de metila (153) (400 MHz, CDCl_3).....	157
Figura 42	Mapa de contornos HMBC do betulinato de metila (153) (400 MHz, CDCl_3).....	157
Figura 43	Mapa de contornos ROESY do betulinato de metila (153) (400 MHz, CDCl_3).....	158
Figura 44	Espectro no Infravermelho da β -amirina (154) (KBr).....	159
Figura 45	Espectro de RMN de ^1H da β -amirina (154) (400 MHz, CDCl_3).....	160
Figura 46	Ampliação do espectro de RMN de ^1H da β -amirina (154) (400 MHz, CDCl_3).....	160
Figura 47	Espectro de RMN de ^{13}C da β -amirina (154) (100 MHz, CDCl_3).....	161
Figura 48	Ampliação do espectro de RMN de ^{13}C da β -amirina (154) (100 MHz, CDCl_3).....	161
Figura 49	Subespectro DEPT-135 da β -amirina (154) (100 MHz, CDCl_3).....	162
Figura 50	Mapa de contornos HMQC da β -amirina (154) (100 MHz, CDCl_3).....	162
Figura 51	Expansão do mapa de contornos HMQC da β -amirina (154) (400 MHz, CDCl_3).....	163
Figura 52	Mapa de contornos HMBC da β -amirina (154) (400 MHz, CDCl_3).....	163
Figura 53	Mapa de contornos ROESY da β -amirina (154) (400 MHz, CDCl_3).....	164
Figura 54	Espectro de RMN de ^1H de 158 (400 MHz, CDCl_3).....	165

Figura 55	Ampliação do espectro de RMN de ^1H de 158 (400 MHz, CDCl_3).....	166
Figura 56	Ampliação do espectro de RMN de ^1H de 158 (400 MHz, CDCl_3).....	166
Figura 57	Espectro de RMN de ^{13}C de 158 (100 MHz, CDCl_3).....	167
Figura 58	Ampliação do espectro de RMN de ^{13}C de 158 (100 MHz, CDCl_3).....	167
Figura 59	Subespectro DEPT-135 de 158 (100 MHz, CDCl_3).....	168
Figura 60	Ampliação do subespectro DEPT-135 de 158 (100 MHz, CDCl_3).....	168
Figura 61	Mapa de contornos HMQC de 158 (400 MHz, CDCl_3).....	169
Figura 62	Mapa de contornos HMQC de 158 (400 MHz, CDCl_3).....	169
Figura 63	Mapa de contornos HMBC de 158 (400 MHz, CDCl_3).....	170
Figura 64	Ampliação do mapa de contornos HMBC de 158 (400 MHz, CDCl_3).....	170
Figura 65	Mapa de contornos COSY de 158 (400 MHz, CDCl_3).....	171
Figura 66	Ampliação do mapa de contornos COSY de 158 (400 MHz, CDCl_3).....	171
Figura 67	Espectro no infravermelho de 3 β -hidroxi-olean-12-en-11-ona (159) e do óxido de 11 α ,12 α -taraxerol (160) (KBr).....	172
Figura 68	Espectro de RMN de ^1H de 3 β -hidroxi-olean-12-en-11-ona (159) e do óxido de 11 α ,12 α -taraxerol (160) (400 MHz, CDCl_3).....	173
Figura 69	Ampliação do espectro de RMN de ^1H de 3 β -hidroxi-olean-12-en-11-ona (159) e do óxido de 11 α ,12 α -taraxerol (160) (400 MHz, CDCl_3).....	173
Figura 70	Ampliação do espectro de RMN de ^1H de 3 β -hidroxi-olean-12-en-11-ona (159) e do óxido de 11 α ,12 α -taraxerol (160) (400 MHz, CDCl_3).....	174
Figura 71	Espectro de RMN de ^{13}C de 3 β -hidroxi-olean-12-en-11-ona (159) e do óxido de 11 α ,12 α -taraxerol (160) (100 MHz, CDCl_3).....	174
Figura 72	Ampliação do espectro de RMN de ^{13}C de 3 β -hidroxi-olean-12-en-11-ona (159) e do óxido de 11 α ,12 α -taraxerol (160) (100 MHz, CDCl_3).....	175
Figura 73	Ampliação do espectro de RMN de ^{13}C de 3 β -hidroxi-olean-12-en-11-ona (159) e do óxido de 11 α ,12 α -taraxerol (160) (100 MHz, CDCl_3).....	175
Figura 74	Subespectro DEPT-135 de 3 β -hidroxi-olean-12-en-11-ona (159) e do óxido de 11 α ,12 α -taraxerol (160) (100 MHz, CDCl_3).....	176
Figura 75	Ampliação do subespectro DEPT-135 de 3 β -hidroxi-olean-12-en-11-ona (159) e do óxido de 11 α ,12 α -taraxerol (160) (100 MHz, CDCl_3).....	176
Figura 76	Mapa de contornos HMQC de 3 β -hidroxi-olean-12-en-11-ona (159) e do óxido de 11 α ,12 α -taraxerol (160) (400 MHz, CDCl_3).....	177
Figura 77	Ampliação do mapa de contornos HMQC de 3 β -hidroxi-olean-12-en-11-ona (159) e do óxido de 11 α ,12 α -taraxerol (160) (400 MHz, CDCl_3).....	177
Figura 78	Mapa de contornos HMBC de 3 β -hidroxi-olean-12-en-11-ona (159) e do óxido de 11 α , 12 α -taraxerol (160) (400 MHz, CDCl_3).....	178
Figura 79	Ampliação do mapa de contornos HMBC de 3 β -hidroxi-olean-12-en-11-ona (159) e do óxido de 11 α , 12 α -taraxerol (160) (400 MHz, CDCl_3).....	178

Figura 80	Mapa de contornos COSY de 3 β -hidroxi-olean-12-en-11-ona (159) e do óxido de 11 α ,12 α -taraxerol (160) (400 MHz, CDCl ₃).....	179
Figura 81	Ampliação do mapa de contornos COSY de 3 β -hidroxi-olean-12-en-11-ona (159) e do óxido de 11 α ,12 α -taraxerol (160) (400 MHz, CDCl ₃).....	179
Figura 82	Mapa de contornos NOESY de 3 β -hidroxi-olean-12-en-11-ona (159) e do óxido de 11 α ,12 α -taraxerol (160) (400 MHz, CDCl ₃).....	180
Figura 83	Mapa de contornos NOESY de 3 β -hidroxi-olean-12-en-11-ona (159) e do óxido de 11 α ,12 α -taraxerol (160) (400 MHz, CDCl ₃).....	180
Figura 84	Espectro de RMN de ¹ H de 3 β -friedelinol (156) (400 MHz, CDCl ₃).....	181
Figura 85	Espectro de RMN de ¹³ C de 3 β -friedelinol (156) (100 MHz, CDCl ₃).....	182
Figura 86	Subespectro DEPT 135 de 3 β -friedelinol (156) (100 MHz, CDCl ₃).....	182
Figura 87	Mapa de contornos HMQC de 3 β -friedelinol (156) (400 MHz, CDCl ₃).....	183

Índice de Gráficos

Gráfico 01	Curva de calibração do experimento de biorremediação do cromo com o fungo <i>Aspergillus niger</i> em meio de cultura.....	72
Gráfico 02	Curva de calibração do experimento de biorremediação do cromo com os fungos <i>Aspergillus niger</i> e os oito <i>Penicilliums</i> em água.....	72
Gráfico 03	Porcentagem de remoção do níquel, cobre, lítio, cádmio, cobalto e lítio por células em crescimento de oito espécies de <i>Penicillium</i>	120
Gráfico 04	Porcentagem de remoção do níquel, cobre, lítio, cádmio, cobalto e lítio por células em repouso de oito espécies de <i>Penicillium</i>	123
Gráfico 05	Porcentagem de remoção do cromo (VI) por células em crescimento de <i>A. niger</i>	126
Gráfico 06	Variação da concentração do cromo (VI) no decorrer do tempo.....	127
Gráfico 07	Porcentagem de remoção do cromo (VI) em água.....	128

Índice de tabelas

Tabela 01	Resumo das biotransformações de diterpenos caurânicos da literatura.	12
Tabela 02	Biomassas fúngicas utilizadas para a remoção de metais pesados.....	38
Tabela 03	Resumo dos resultados dos experimentos usando quatro cepas de <i>Penicillium</i> sp. com o cobalto.....	42
Tabela 04	Resumo dos resultados dos experimentos usando biomassa imobilizada e livre do fungo <i>R. arrizus</i> para remoção de cromo.....	43
Tabela 05	Quantidade de frascos e condições por experimento.....	58
Tabela 06	Resultado das purificações dos materiais de partida.....	74
Tabela 07	Comparação dos deslocamentos químicos de RMN de ^{13}C da literatura e dos valores experimentais obtidos para do lupeol (152).....	76
Tabela 08	Resumo dos dados de RMN do lupeol (152).....	78
Tabela 09	Comparação dos deslocamentos químicos de RMN de ^{13}C e de ^1H da literatura e experimentais do betulinato de metila (153).....	80
Tabela 10	Resumo dos dados de RMN do betulinato de metila (153).....	81
Tabela 11	Resumo dos dados de RMN obtidos para β -amirina (154).....	84
Tabela 12	Comparação dos deslocamentos químicos de RMN de ^{13}C e ^1H da literatura e experimentais obtidos para a β -amirina (154).....	85
Tabela 13	Dados de RMN da literatura para o ergosterol e aqueles obtidos para 156	89
Tabela 14	Dados de RMN de ^{13}C do β -sitosterol da literatura e aqueles obtidos para 157	94
Tabela 15	Dados de RMN de ^1H e de ^{13}C obtidos para 153 e 158	98
Tabela 16	Comparação das atribuições de RMN de ^{13}C das substâncias 154 , 159 e 160 com dados da literatura.....	105
Tabela 17	Dados de RMN de ^1H da β -amirina (154) e dos produtos de biotransformação 159 e 160	106
Tabela 18	Comparação dos dados de RMN de ^{13}C da literatura de 162 e 163 com os dados experimentais obtidos para a substância G4-6	114
Tabela 19	Concentração Inibitória dos metais sobre as oito espécies de <i>Penicillium</i>	116
Tabela 20	Quantidade média de esporos obtidos pela contagem utilizando a câmara de Neubauer.....	116
Tabela 21	Quantidade de esporos por mL determinada para as oito espécies de <i>Penicillium</i> e para <i>A. niger</i>	117

Lista de abreviaturas

α	Orientação axial
β	Orientação equatorial
δ	Deslocamento químico
Δ	Aquecimento
AA	Absorção atômica
CC	Cromatografia em coluna
CCD	Cromatografia em camada delgada
CG	Cromatografia gasosa
CG/EM	Cromatografia gasosa acoplado à espectrometria de massas
COSY	<u>C</u> orrelation <u>S</u> pectroscop <u>Y</u>
d	Dupleto
dd	Dupleto duplo
DEPT	<u>D</u> istorlionless <u>E</u> nhancement by <u>P</u> olarization <u>T</u> ransfer
DFC	1,5-difenilcarbazida
DMPC	Dimiristoilfosfatidilcolina
EM	Espectrometria de massas
f	Fenda (mm)
HMBC	<u>H</u> eteronuclear <u>M</u> ultiple <u>B</u> ond <u>C</u> orrelation
HMQC	<u>H</u> eteronuclear <u>M</u> ultiple <u>Q</u> uantum <u>C</u> oherence
IV	Infravermelho
J	Constante de acoplamento escalar
m	Multiplete
m/z	Relação massa/carga
MHz	Megahertz
NOESY	<u>N</u> uclear <u>O</u> verhauser <u>E</u> ffect <u>S</u> pectroscopy
q	Quarteto
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
RMN de ^{13}C	Ressonância Magnética Nuclear de carbono-13
RMN de ^1H	Ressonância Magnética Nuclear de hidrogênio
ROESY	<u>R</u> otating frame <u>N</u> OESY
s	Simpleto
sp.	Espécie
t	Triplete
UV	Ultravioleta
v/v	Volume/volume

RESUMO

Nesse trabalho foram estudadas as biotransformações do esteviosídeo, fujenal, *ent*-16-cauren-19-ol, lupeol, betulinato de metila, β -amirina e friedelina pelos fungos *Mucor plumbeus*, *Beauveria bassiana*, *Rhizopus stolonifer*, *Rhizopus oryzae*, *Lecanicillium muscarinium* e *Thamnostylum* sp.

Inicialmente, foi feita a análise espectroscópica por RMN de ^1H e de ^{13}C das substâncias lupeol, betulinato de metila e β -amirina, tendo sido possível identificar os deslocamentos químicos de todos os carbonos e hidrogênios, com discriminação dos hidrogênios α e β de carbonos metilênicos, quando estes possuíam deslocamentos químicos diferentes.

Os fungos *Rhizopus stolonifer* e *Rhizopus oryzae* mostraram-se eficientes para realizar a hidrólise do esteviosídeo em suas agliconas esteviol e isoesteviol. As tentativas de biotransformação dos substratos fujenal, *ent*-16-cauren-19-ol e lupeol com os fungos *Thamnostylum* sp., *Beauveria bassiana* e *Mucor plumbeus* resultaram em misturas complexas e em substâncias que não puderam ser caracterizadas como produtos de biotransformação.

A biotransformação do betulinato de metila e da friedelina com o fungo *Mucor plumbeus* levou ao isolamento e identificação de uma substância nova nomeada de acetato de (1*S*,5*bS*,7*R*,7*aS*,8*R*,9*S*,11*aR*)-7-hidroxi-1-isopropil-5*b*,7*a*,8,11*a*-tetrametil-2,3,3*a*,5*a*,5*b*,6,7,7*a*,8,9,10,11,11*a*,13*b*-tetradecahidro-1*H*ciclopenta[*a*]chri-sen-9-ila, enquanto que a biotransformação da friedelina com o fungo *Mucor plumbeus*, levou ao isolamento e identificação do 3 β -friedelinol.

Da biotransformação envolvendo o fungo *Lecanicillium muscarinium* e a β -amirina, foram isoladas as substâncias 3 β -hidroxi-olean-12-en-11-ona, cuja formação envolve a hidroxilação em C-11, seguida por um interessante rearranjo estrutural com migração de um grupo metila e o óxido de 11 α ,12 α -taraxerol, sendo estas, pela primeira vez, obtidas por biotransformação.

Os resultados apontam o potencial das espécies *Lecanicillium muscarinium* e *Mucor plumbeus* para uso na biotransformação de triterpenos, especialmente na produção de moléculas obtidas por rearranjos. Entretanto, o baixo rendimento das reações ainda precisa ser superado.

Foram feitos experimentos de biorremediação, utilizando oito espécies de fungos *Penicillium*, para avaliar o potencial de biosorção seletiva de níquel, cobre, lítio, cádmio, cobalto e chumbo em misturas binárias. A biosorção de cromo por oito espécies de *Penicillium* bem como pelo fungo *Aspergillus niger* também foi estudada. Diversos resultados interessantes foram alcançados, tendo sido observada, em alguns casos, uma maior afinidade dos fungos por um dos metais presentes na mistura. Foram testadas duas metodologias para a biorremediação dos metais em solução, células em crescimento e células em repouso. O meio de cultura usado no protocolo com células em crescimento mostrou interferir nos experimentos, portanto, o uso de células em repouso mostrou-se mais adequado. Os melhores resultados foram conseguidos para a remoção de chumbo, sendo que, usando-se células em repouso, observou-se a remoção de 40% do chumbo presente em solução em apenas 1 hora de experimento.

As espécies de *Penicillium* estudadas mostraram-se, portanto, muito promissoras para a remoção de metais em matrizes aquosas.

ABSTRACT

In this work, the biotransformations of stevioside, fujenal, *ent*-16-kauren-19-ol, lupeol, betulinic acid methyl ester, β -amiryn and friedelin by the fungi *Mucor plumbeus*, *Beauveria bassiana*, *Rhizopus stolonifer*, *Rhizopus oryzae*, *Lecanicillium muscarinium* and *Thamnostylum* sp. were studied.

Initially, full ^1H and ^{13}C NMR spectroscopic analysis of lupeol, betulinic acid methyl ester and β -amiryn was accomplished. It was possible to identify chemical shifts of all carbons and hydrogens, including discrimination of α and β hydrogens present in methylene carbons, when they showed different chemical shifts.

The fungi *Rhizopus stolonifer* and *Rhizopus oryzae* were efficient for carrying on stevioside hydrolysis into its aglycons steviol and isosteviol. The tentatives of biotransforming fujenal, *ent*-16-kauren-19-ol and lupeol by the fungal species *Thamnostylum* sp., *Beauveria bassiana* and *Mucor plumbeus*, resulted in complex mixtures and in substances that were not biotransformation products.

The biotransformation of betulinic acid methyl ester by *Mucor plumbeus* lead to a new compound named (1*S*,5*bS*,7*R*,7*aS*,8*R*,9*S*,11*aR*)-7-hydroxy-1-isopropyl-5*b*,7*a*,8,11*a*-tetramethyl-2,3,3*a*,5*a*,5*b*,6,7,7*a*,8,9,10,11,11*a*,13*b*-tetradecahydro-Hcycle-penta[*a*]chri-sen-9-il acetate. When friedelin was fed to this species, 3 β -friedelinol was the recovered product.

From the biotransformation of β -amiryn by *Lecanicillium muscarinium*, there were isolated two compounds, 3 β -hydroxy-olean-12-en-11-one and 11 α ,12 α -taraxerol oxide. A mechanism for the formation of the first product was proposed, involving first the hydroxylation in C-11, followed by an interesting structural rearrangement with a methyl group migration.

The results point out for the potential of the species *Lecanicillium muscarinium* and *Mucor plumbeus* to be used in the biotransformation of triterpenes, especially for the production of rearranged molecules. However, the low yields of the reactions are still to be overcome.

Bioremediation experiments were also carried out, using eight *Penicillium* species to evaluate their potential to carry on the selective biosorption of nickel, cooper, lithium, cadmium, cobalt and lead present in binary mixtures. The biosorption of chromium by the same *Penicillium* species, as well as by the fungus *Aspergillus*

niger was also studied. Several interesting results were achieved and the higher affinity by one of the metals present in the mixture was observed in some cases.

Two bioremediation methodologies were tested, growing cells and resting cells. The culture medium used in the growing cells protocol has showed to be an interfering agent, therefore, resting cells showed to be the more suitable experimental methodology. The best results were found for lead removing reached 40% by using resting cells in only one hour time. The *Penicillium* species addressed in this work showed to be very promising for the removal of metals present in aqueous matrixes.

Capítulo I

Introdução

1.1 - Biotransformação

As biotransformações são processos que têm sido usados pela humanidade por milhares de anos, como por exemplo, para a conversão do etanol a ácido acético (vinagre) por povos da Babilônia (Mesopotâmia), Egito, México e no Sudão (Leresche & Meyer, 2006).

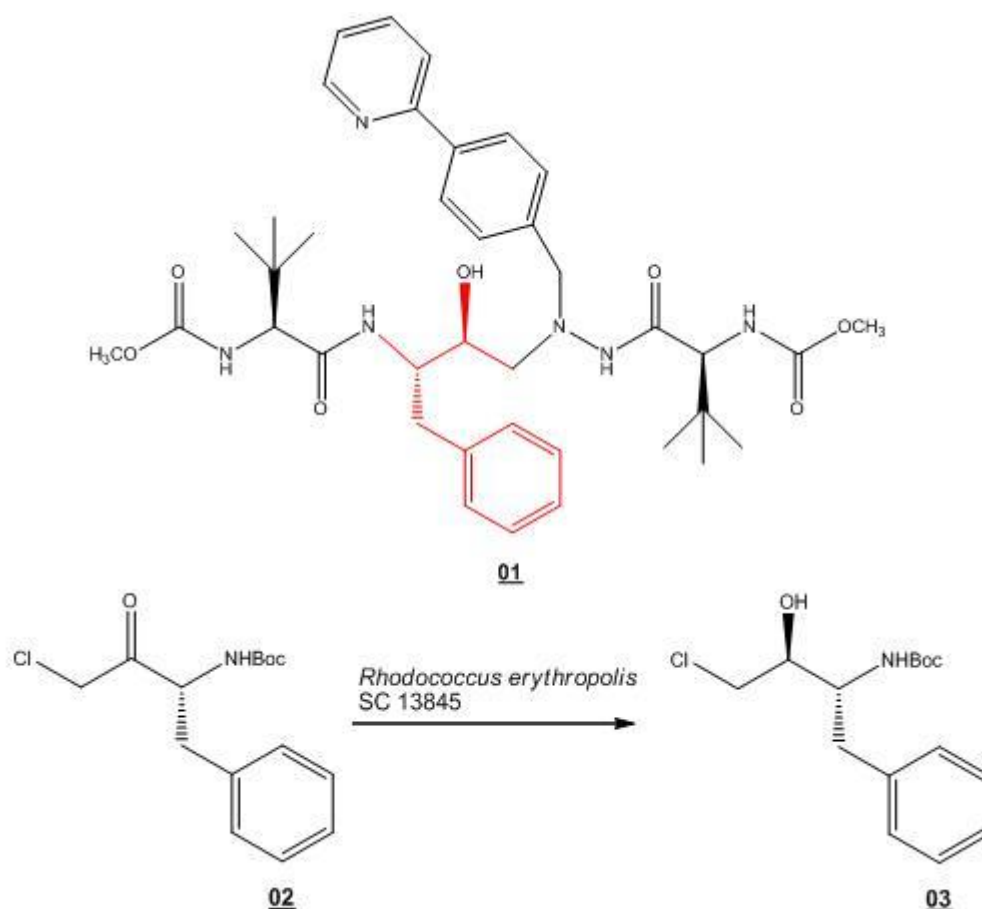
Biotransformações são definidas como um conjunto de reações químicas catalisadas por enzimas, células ou tecidos de origem vegetal, microbiana ou animal (Giri *et al.*, 2001). O estudo das reações de biotransformação estabelece uma ponte entre a química e a bioquímica, podendo ser melhor definida como: “o uso de sistemas biológicos capazes de promover mudanças químicas em compostos orgânicos que não sejam seus substratos naturais” (Aleu, 2001).

A produção de um único enantiômero de intermediários quirais tornou-se cada vez mais importante na indústria farmacêutica. As biotransformações são frequentemente utilizadas para a obtenção destes intermediários oferecendo vantagens em relação à síntese convencional, pois podem ser enantiosseletivas e regioseletivas, são realizadas em temperatura ambiente e pressão atmosférica, evitando assim a utilização de condições mais extremas, que poderiam causar problemas como isomerização, racemização, epimerização e rearranjo. Células microbianas e enzimas são os biocatalisadores mais utilizados, pois podem ser reutilizados por muitos ciclos (Patel, 2008).

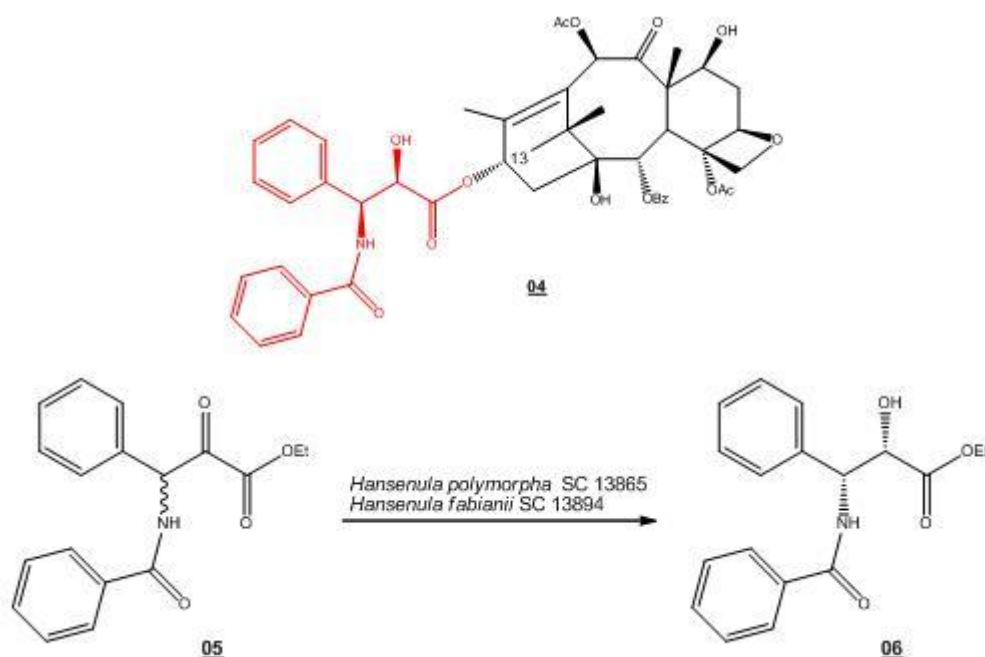
Em 1998, o mercado mundial de produtos químicos faturou cerca de U\$ 50 bilhões, dos quais U\$ 25 bilhões foram do setor farmacêutico e U\$ 10 bilhões do setor agroquímico, sendo estes os setores mais importantes (Demain & Adrio, 2008).

Vários fármacos são atualmente produzidos por biotransformação. A síntese do inibidor da HIV protease, Atazanavir (**01**), conta com uma etapa na qual o intermediário **03** é obtido pela redução microbiológica diastereosseletiva realizada pelo microrganismo *Rhodococcus erythropolis* SC 13845 a partir do intermediário **02** (Esquema 01, pag. 03). Na síntese do paclitaxel (taxol) (**04**), a cadeia lateral em C-13 (**06**) é obtida pela redução microbiológica seletiva do intermediário (**05**) pelos microrganismos *Hansenula polymorpha* SC 13865 e *Hansenula fabianii* SC 13894 (Esquema 02, pag. 04) (Patel, 2008).

Além das vantagens já citadas das biotransformações, pode-se ainda acrescentar que esta técnica se enquadra dentro da “química verde” ou “green chemistry” que é definida como a concepção, desenvolvimento e aplicação de processos e produtos químicos para reduzir ou eliminar o uso ou a geração de substâncias perigosas à saúde humana e ao meio ambiente (Hai-Feng *et al.*, 2008). Esta área tem desenvolvido novas ferramentas para melhorar a precisão e ampliar processos de produção que reduzam os gastos de energia e de matérias-primas, bem como reduzam resíduos tóxicos (Lenardão *et al.*, 2003).



Esquema 01 – Redução seletiva de **02** com o microrganismo *R. erythropolis* SC 13845 (Patel, 2008)



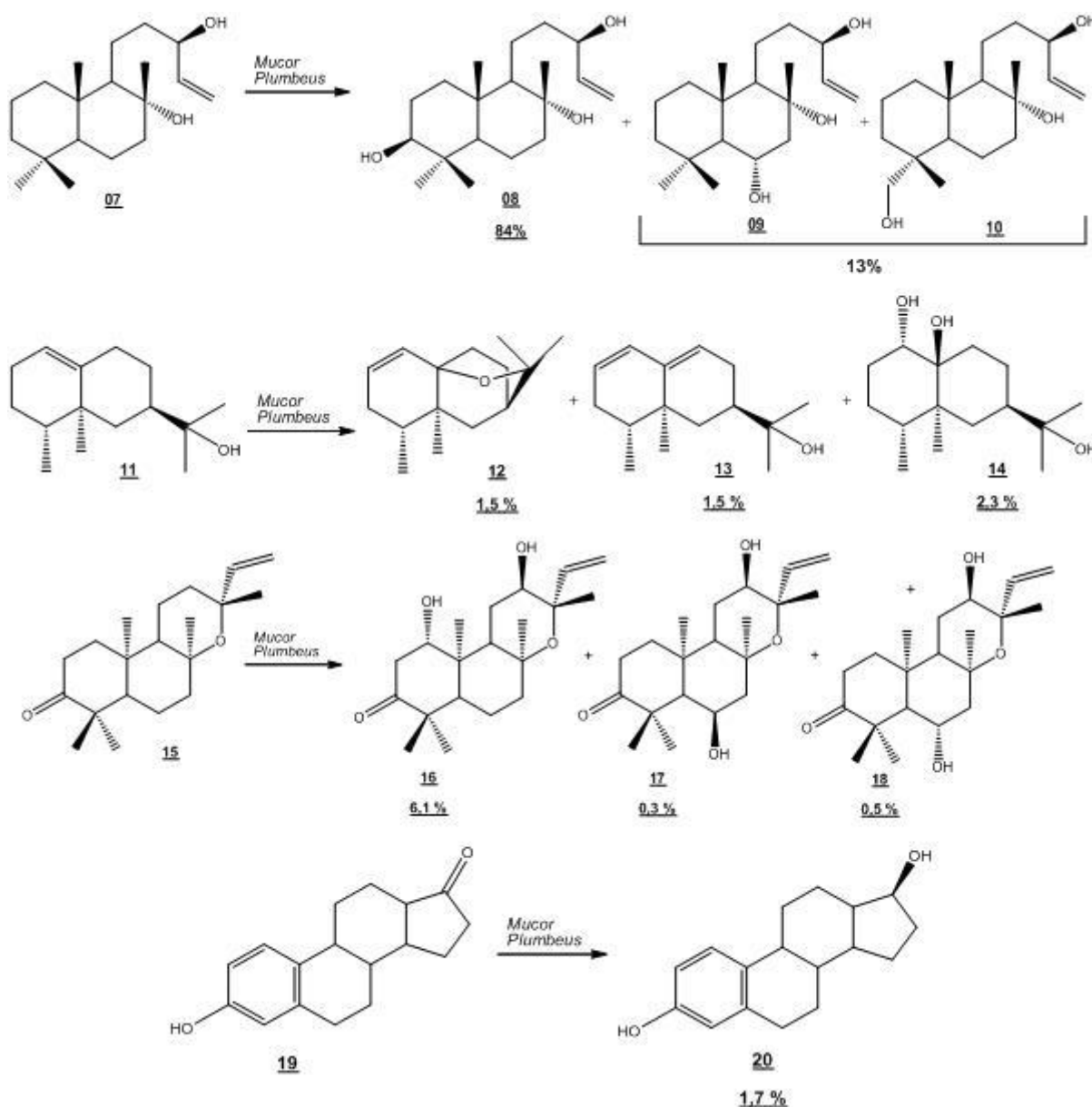
Esquema 02 – Redução seletiva de **05** com os microrganismos *Hansenula polymorpha* SC 13865 e *Hansenula fabianii* SC 13894 (Patel, 2008)

Existe um crescente número de informações sobre o uso de biotransformações para modificações seletivas de produtos naturais e sintéticos. Uma atenção muito especial tem sido dada aos fungos, pois o isolamento de fungos do ambiente tem suscitado o interesse de pesquisadores, sendo que as estimativas apontam que poucas espécies fúngicas sejam realmente conhecidas (Borges *et al.*, 2009). A incidência de fungos nas plantas ocorre por infecção natural no ambiente favorecido por climas úmidos, e seu isolamento pode ser considerado como um primeiro passo para a compreensão da origem de alguns metabólitos secundários em plantas e da ativação de enzimas específicas em fungos que possuem habilidade de catalisar reações régio e estereosseletivas (Borges *et al.*, 2009).

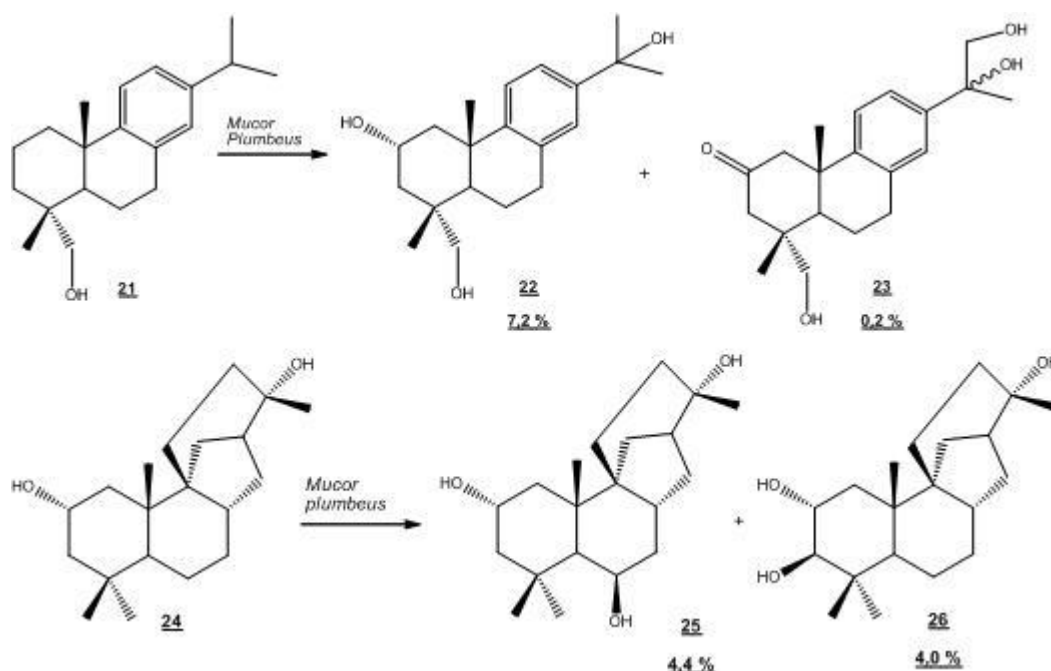
Neste trabalho foram avaliados os fungos filamentosos *Mucor plumbeus*, *Rhizopus stolonifer*, *Rhizopus oryzae*, *Lecanicillium muscarinum* e *Thamnostylum* sp. pertencentes à coleção do Laboratório de Biotecnologia e Bioensaios (LaβB) na tentativa de modificação estrutural de diterpenos caurânicos e de triterpenos das classes lupano, oleanano e friedelano.

O fungo *M. plumbeus* é muito utilizado em biotransformações devido à sua baixa especificidade por substratos, sendo utilizado na funcionalização de sesquiterpenos, diterpenos, triterpenos e esteróides (Fraga *et al.*, 2004). Os

Esquemas 03 e 04 (pag. 06) mostram alguns exemplos de biotransformação de compostos de diferentes classes efetuadas por *M. plumbeus* (Aranda *et al.*, 1991; Arantes *et al.*, 1999; Fraga *et al.*, 2001, Fraga *et al.*, 2003, Chen *et al.*, 2005 e Lamm *et al.*, 2007).



Esquema 03 – Biotransformação dos substratos **07** (Aranda *et al.*, 1991), **11** (Arantes *et al.*, 1999), **15** (Fraga *et al.*, 2001) e **19** (Lamm *et al.*, 2007) com o fungo *Mucor plumbeus*

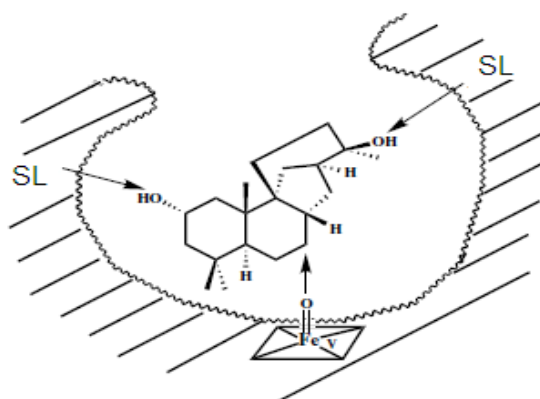


Esquema 04 – Biotransformação dos substratos **21** (Fraga *et al.*, 2003) e **24** (Chen *et al.*, 2005) com o fungo *Mucor plumbeus*

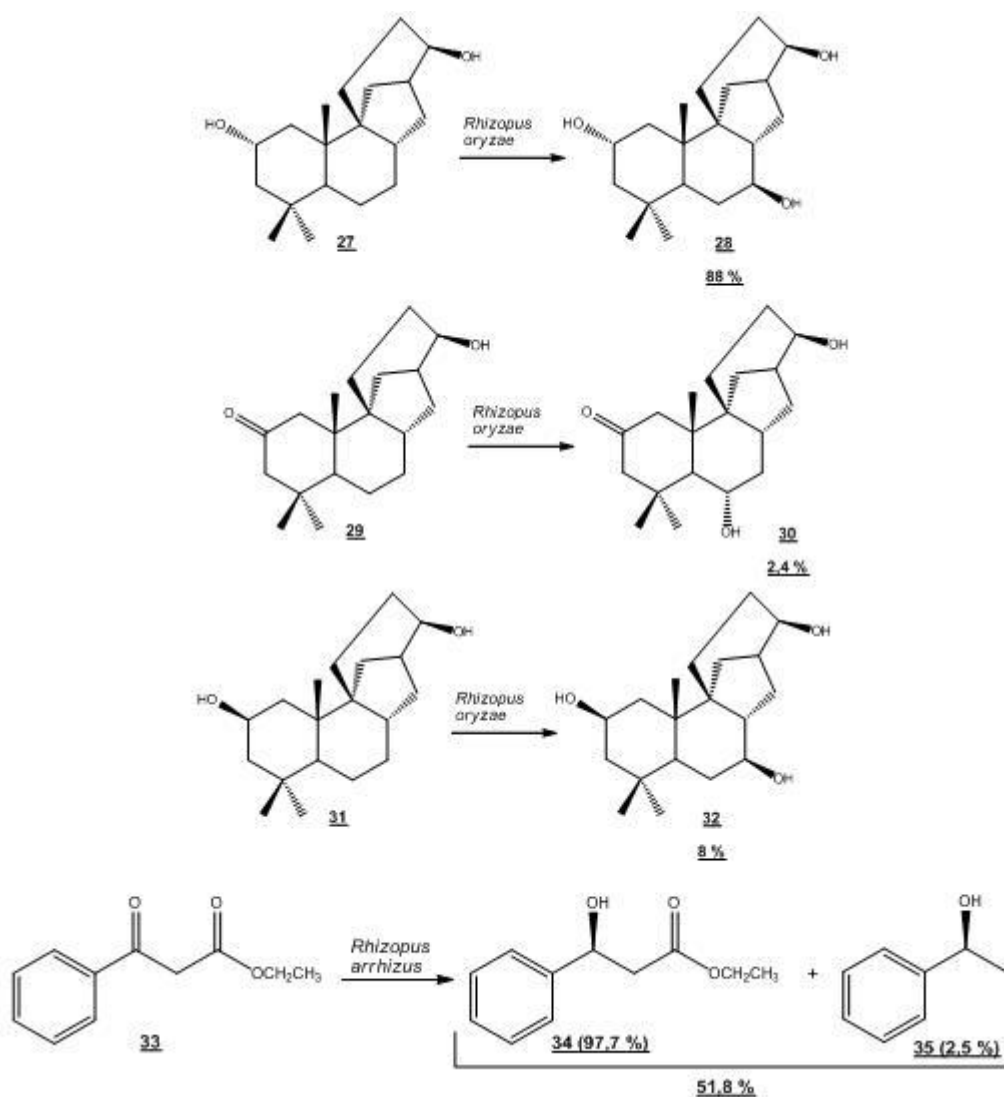
O fungo *R. oryzae*, anteriormente conhecido como *Rhizopus arrhizus*, é comumente encontrado no solo, sendo muito eficiente e versátil na transformação de uma vasta gama de substâncias, como esteróides, terpenos, prostaglandinas, tioéteres, compostos aromáticos, entre outras (Martin *et al.*, 2004 e Borges *et al.*, 2009). O Esquema 05 (pag. 07) mostra exemplos de biotransformações realizadas com este fungo.

Acredita-se que o complexo enzimático citocromo P450, presente em fungos, seja o responsável por estas reações. A Figura 01 (pag. 07) mostra uma proposta para a hidroxilação em C-7 com orientação β do substrato **27** levando à formação da substância **28** (Martin *et al.*, 2004), mostrando esquematicamente a provável interação do substrato com o citocromo P450.

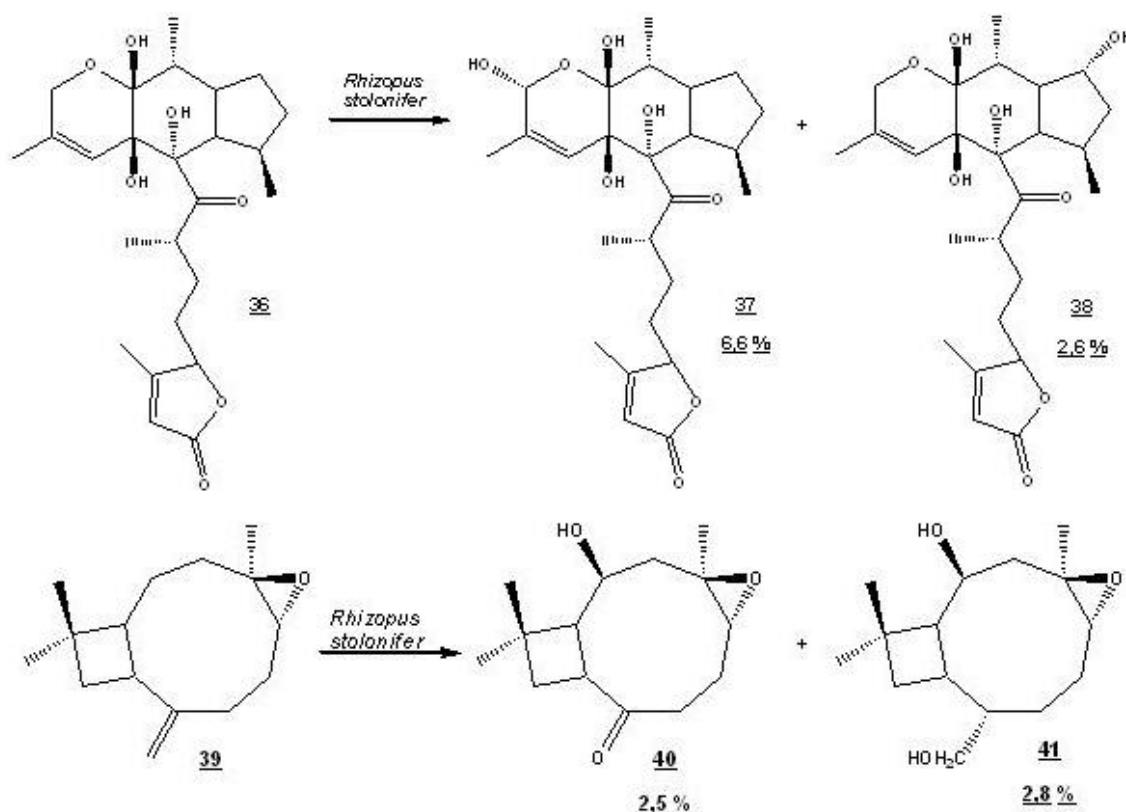
Segundo esta proposta, a interação entre enzima e substrato se daria por meio de dois sítios ligantes neste caso, os grupos hidroxilas presentes no substrato e a hidroxilação ocorreria no carbono próximo ao sítio ativo do complexo enzimático, contendo um átomo de oxigênio.



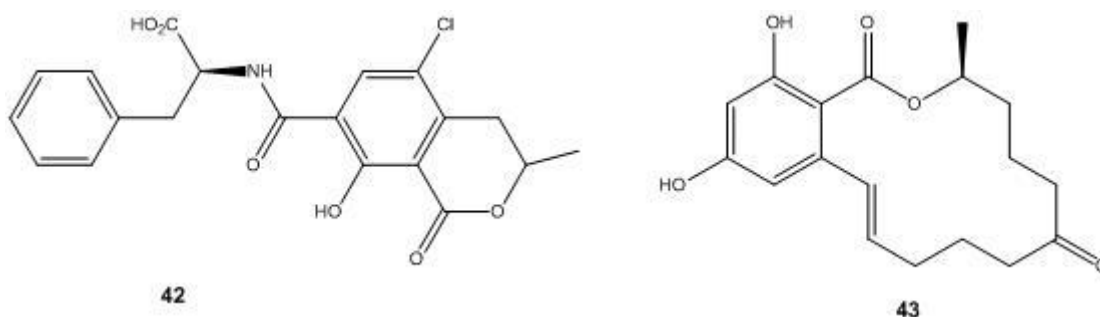
SL - Sítio de ligação

Figura 01 – Possível interação das hidroxilas do substrato **27** com os sítios da enzima (Martin *et al.*, 2004)Esquema 05 – Biotransformação dos substratos **27**, **29**, **31** (Martin *et al.*, 2004) e **33** (Salvi & Chattopadhyay, 2006) com o fungo *Rhizopus oryzae*

O fungo *R. stolonifer*, além de muito citado na literatura por realizar modificações estruturais em terpenos, também é conhecido por degradar algumas micotoxinas como a ochratoxina A (**42**) e zearalenona (**43**) (Varga *et al.*, 2005). O Esquema 06 mostra exemplos de biotransformações efetuadas por *R. stolonifer*, sendo possível observar inclusive, uma hidroxilação alílica (**37**) (Choudhary *et al.*, 2006a e Choudhary *et al.*, 2006b).

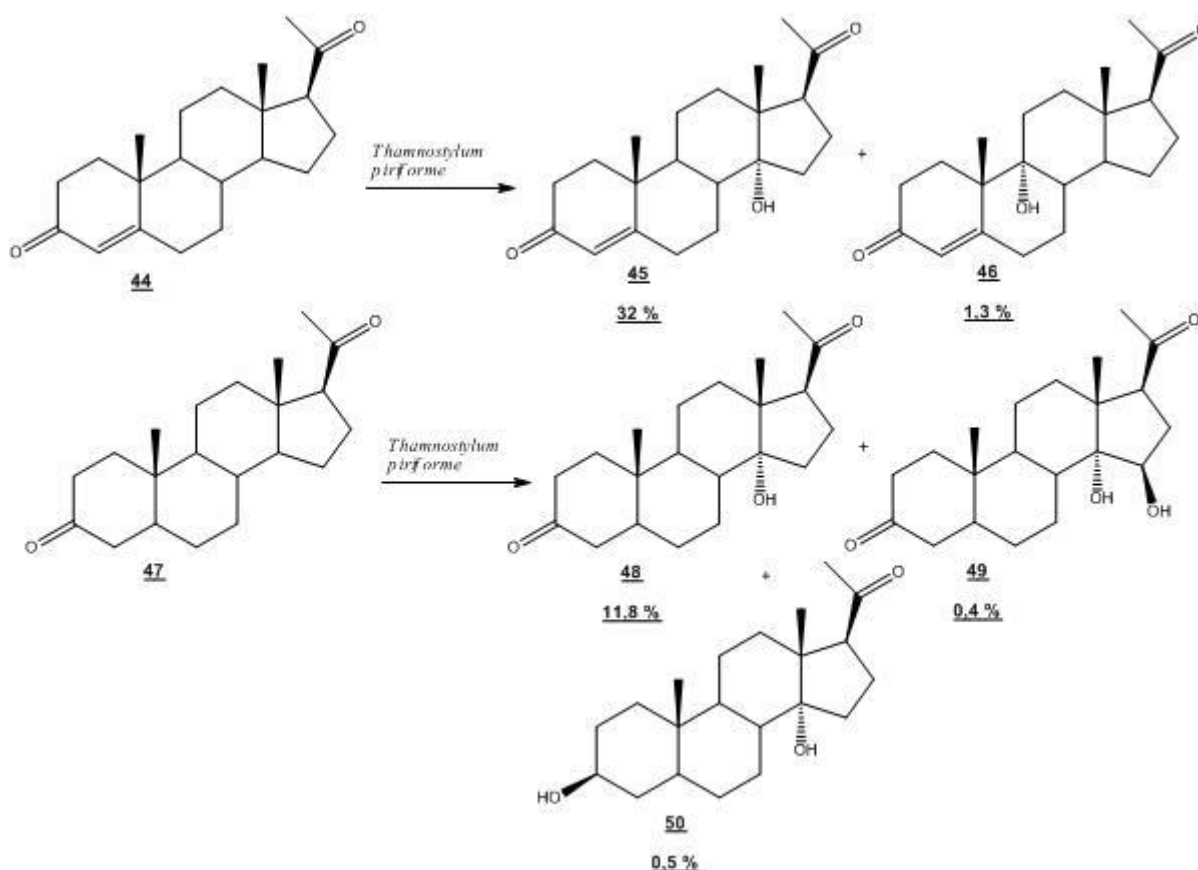


Esquema 06 – Biotransformação do substrato **36** (Choudhary *et al.*, 2006a) e **39** (Choudhary *et al.*, 2006b) com o fungo *Rhizopus stolonifer*



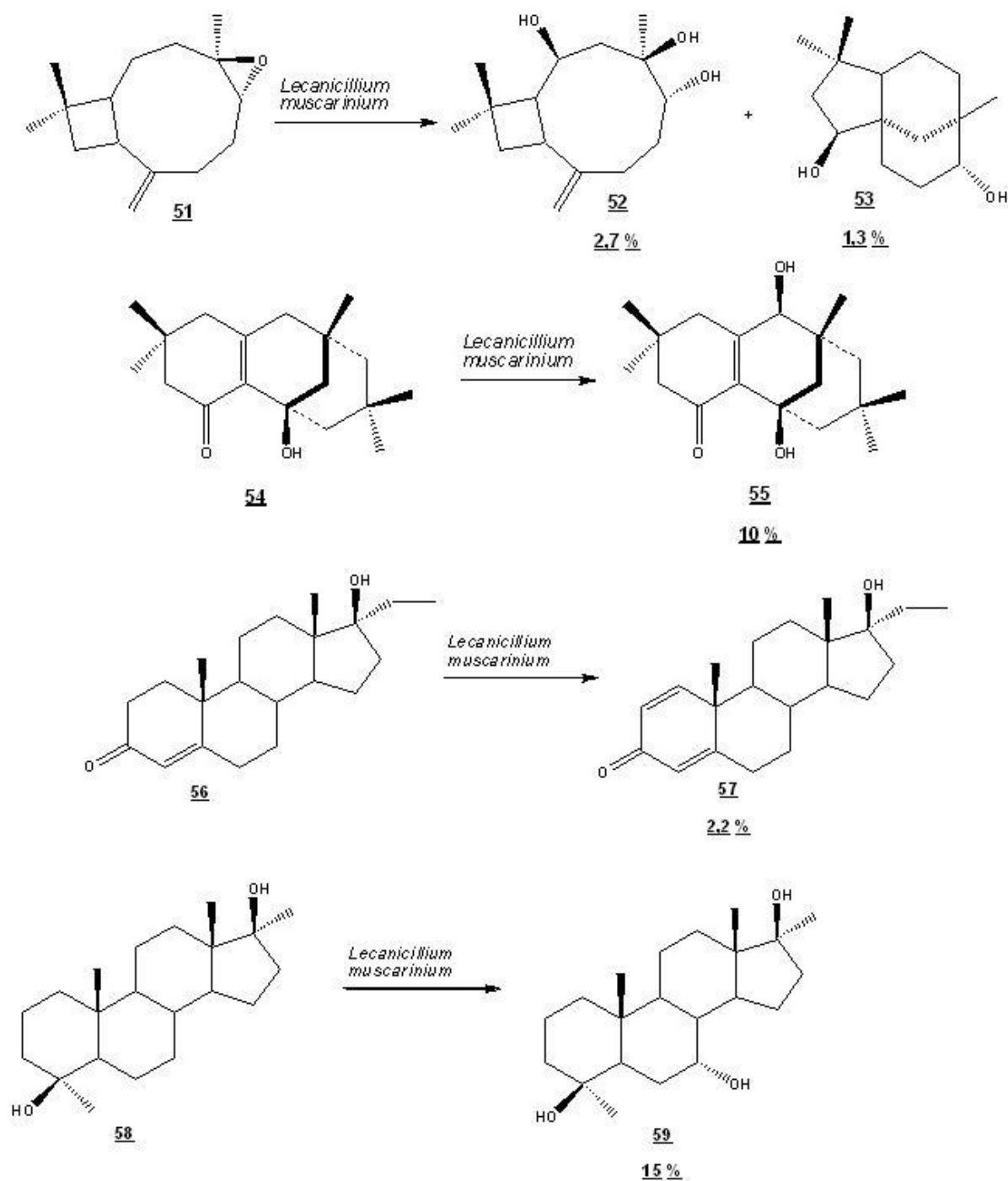
Os fungos do gênero *Thamnostylum* são citados na literatura pela utilização de suas lipases para a resolução cinética de misturas racêmicas (Nagy *et al.*, 2006) e pela modificação de esteróides, principalmente pela hidroxilação de algumas

posições e redução da carbonila em C-3 (Hu *et al.*, 1995). O Esquema 07 mostra a hidroxilação de **44** em dois diferentes carbonos terciários resultando em **45** e **46**. Este padrão se repete quando o substrato **47** é usado, com a formação de **48**, **49** e **50** realizados pelo fungo *Thamnostylum piriforme*.



Esquema 07 – Biotransformação dos esteróides **44** e **47** (Hu *et al.*, 1995) com o fungo *Thamnostylum piriforme*

O fungo *Lecanicillium muscarinum*, anteriormente conhecido como *Cephalosporium aphidicola* ou *Verticillium lecanii*, é utilizado pela sua habilidade de transformar terpenóides em derivados hidroxilados (Vieira *et al.*, 2002). O Esquema 08 (pag. 10) mostra a biotransformação de alguns terpenóides pelo fungo *Lecanicillium muscarinum* (Choudhary *et al.*, 2006b; Choudhary *et al.*, 2005, Kiran *et al.*, 2005 e Bensassom *et al.*, 1999).



Esquema 08 – Biotransformação dos substratos **51** (Choudhary *et al.*, 2006b), **54** (Kiran *et al.*, 2005), **56** (Choudhary *et al.*, 2005) e **58** (Bensassom *et al.*, 1999) com o fungo *Lecanicillium muscarinum*

1.1.1 - Biotransformação de diterpenos caurânicos

Diterpenos caurânicos são um alvo interessante para biotransformações, pois estes constituem uma classe de substâncias rica em atividades biológicas tais como: antimicrobiana, antitumoral, tripanosomicida, antiinflamatória, analgésica e anti-HIV (Ghisalberti, 1997). A Figura 02 mostra a estrutura base dos diterpenos caurânicos.

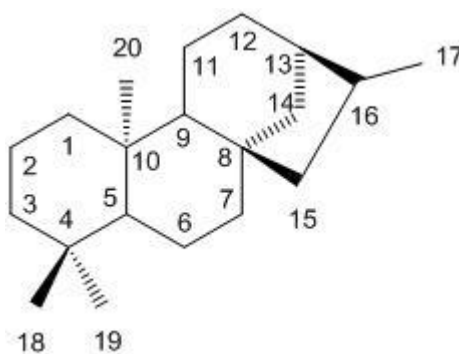


Figura 02 – Estrutura base dos diterpenos caurânicos

Uma pesquisa realizada na literatura mostrou uma grande diversidade de diterpenos caurânicos biotransformados por bactérias e fungos. A Tabela 01 (pag. 12) resume as biotransformação destes diterpenos. Por motivos estéticos as referências estão citadas por letras, correspondentes aos seguintes artigos: (a) Fraga *et al.*, 2007 (b) Fraga *et al.*, 2005 (c) Fraga *et al.*, 2004 (d) Fraga *et al.*, 2003 (e) Silva *et al.*, 2002; (f) Vieira *et al.*, 2002 (g) Vieira *et al.*, 2000 (h) Silva *et al.*, 1999 (i) Fraga *et al.*, 1996 (j) Boaventura *et al.*, 1995 (k) Fraga *et al.*, 1995 (l) Hanson *et al.*, 1995 (m) Oliveira *et al.*, 1995 (n) Fraga *et al.*, 1992 (o) Alam *et al.*, 1991 (p) Garcia-Granado *et al.*, 1990 (q) Fraga *et al.*, 1988 (r) Fraga *et al.*, 1987 (s) Arias *et al.*, 1984.

Tabela 01- Resumo das biotransformações de diterpenos caurânicos da literatura

Material de partida	Fungo	Prodto(s)	Ref.
7 α -hidroxi- <i>ent</i> -caur-16-eno (<i>epi</i> -cando A)	<i>Gibberella fujikuroi</i>	7 α ,16 α ,17-trihidrox- <i>ent</i> -caurano	a
		fujenal	
7 α ,18-dihidrox- <i>ent</i> -caur-16-eno (candicandiol)	<i>Gibberella fujikuroi</i>	7 α ,18,19-trihidrox- <i>ent</i> -caur-16-eno	
7 α ,15 α ,18-trihidrox- <i>ent</i> -caur-16-eno (canditriol)	<i>Gibberella fujikuroi</i>	7 α ,11 β ,15 α ,18- tetrahidrox- <i>ent</i> -caur-16-eno	
7-oxo- <i>ent</i> -caur-16-eno	<i>Gibberella fujikuroi</i>	17,19-dihidrox-11 β ,16 β -epoxi-7-oxo- <i>ent</i> -caurano	b
		11 β ,13-dihidrox-7-oxo- <i>ent</i> -caur-16-eno	
		ácido fujenóico	
18-hidrox-7-oxo- <i>ent</i> -caur-16-eno	<i>Gibberella fujikuroi</i>	18,19-dihidrox-7-oxo- <i>ent</i> -caur-16-eno	
		11 β ,18-dihidrox-7-oxo- <i>ent</i> -caur-16-eno	
		11 α ,18-dihidrox-7-oxo- <i>ent</i> -caur-16-eno	
		18-hidrox,11 β ,16 β ,-epoxi-7-oxo- <i>ent</i> -caur-16-eno	
		6 β ,18-dihidrox-7-oxo- <i>ent</i> -caur-16-eno	
		18-hidrox-16 α ,17-epoxi-7-oxo- <i>ent</i> -caurano	
		1 α ,18-dihidrox-7-oxo- <i>ent</i> -caur-16-eno	
		7-oxo- <i>ent</i> -caur-16-en-18,6 β -olídeo	
3 β ,18-dihidrox-7-oxo- <i>ent</i> -caur-16-eno	<i>Gibberella fujikuroi</i>	3 β ,6 β ,18-trihidrox-7-oxo- <i>ent</i> -caur-16-eno	
		3 β ,11 β ,18-trihidrox-7-oxo- <i>ent</i> -caur-16-eno	
15 β -hidrox-3-oxo- <i>ent</i> -caur-16-eno	<i>Gibberella fujikuroi</i>	11 β -hidrox-3,15-dioxo- <i>ent</i> -caurano	c
		11 β ,15 β -dihidrox-3-oxo- <i>ent</i> -caur-16-eno	
		7 β ,11 β ,15 β -trihidrox-3-oxo- <i>ent</i> -caur-16-eno	
15 β -hidrox-3-oxo- <i>ent</i> -caur-16-eno	<i>Gibberella fujikuroi</i>	7 α ,11 β -dihidrox-3,15-dioxo- <i>ent</i> -caurano	
		7 α ,11 β ,15 β -trihidrox-3-oxo- <i>ent</i> -caur-16-eno	
15 β -hidrox- <i>ent</i> -caur-2,16-dieno	<i>Gibberella fujikuroi</i>	7 α ,11 β -dihidrox-15-oxo- <i>ent</i> -(16S)-caur-2-eno	
		7 α ,11 β ,15 β -trihidrox- <i>ent</i> -caur-2,16-dieno	

Continuação			
Material de Partida	Fungo	Produto(s)	Ref.
15 β -hidroxi- <i>ent</i> -caur-2,16-dieno	<i>Gibberella fujikuroi</i>	7 β ,15 β -dihidroxi- <i>ent</i> -caur-2,16-dien-19,6-olídeo	c
		ácido 1 β ,7 β ,15 β -trihidroxi- <i>ent</i> -caur-2,16-dien-19-óico	
15 β -hidroxi- <i>ent</i> -caur-2,16-dieno	<i>Gibberella fujikuroi</i>	7 α ,11 β ,16 α -trihidroxi-15-oxo- <i>ent</i> -caur-2-eno	
15 β -hidroxi- <i>ent</i> -caur-2,16-dieno	<i>Gibberella fujikuroi</i>	epoxi- <i>ent</i> -caur-2-eno	
7 β ,18-dihidroxi- <i>ent</i> -caur-16-eno (epicandiciol)	<i>Mucor plumbeus</i>	3 α ,7 β ,18-trihidroxi- <i>ent</i> -caur-16-eno (foliol)	d
		7 β ,17,18-trihidroxi- <i>ent</i> -caur-15-eno (sideritriol)	
		7 β ,16 β ,17,18-tetrahidroxi- <i>ent</i> -caurano	
7 α ,18-dihidroxi- <i>ent</i> -caur-16-eno (candiciol)	<i>Mucor plumbeus</i>	7 α ,9 β ,18-trihidroxi- <i>ent</i> -caur-16-eno	
7 α ,18-dihidroxi- <i>ent</i> -caur-16-eno (candiciol)	<i>Mucor plumbeus</i>	7 α ,15 α ,18-trihidroxi- <i>enti</i> -caur-16-eno (canditriol)	
		7 α ,16 α ,17,18-tetrahidroxi- <i>ent</i> -caurano	
<i>ent</i> -17,19-dihidroxi-16 β H-caurano	<i>Verticillium lecanii</i>	<i>ent</i> -11 α ,16,19-trihidroxi-16 β H-caurano	e
		<i>ent</i> -7 α ,17,19-trihidroxi-16 β H-caurano	
		<i>ent</i> -7 β ,17,19-trihidroxi-16 β H-caurano	
<i>ent</i> -17-hidroxi-16 β -cauran19-oato de metila	<i>Rhizopus stolonifer</i>	<i>ent</i> -9 α ,17-dihidroxi-16 β -cauran19-oato de metila	g
		<i>ent</i> -7 α ,17-dihidroxi-16 β -cauran19-oato de metila	
ácido <i>ent</i> -caur-16-en-19-óico	<i>Rhizopus stolonifer</i>	ácido <i>ent</i> -7 α -hidroxi-kaur-16-en-19-óico	h
		ácido <i>ent</i> -12 β -hidroxi-caur-9(11),16-dien-19-óico	
		ácido <i>ent</i> -16 β ,17-dihidroxi-cauran19-óico	
3 α ,15 β -dihidroxi- <i>ent</i> -caur-16-eno	<i>Gibberella fujikuroi</i>	3 α ,7 α ,15 β -trihidroxi- <i>ent</i> -caur-16-eno	i
		3 α ,11 β ,15 β -trihidroxi- <i>ent</i> -caur-16-eno	
		3 α ,7 α ,11 β ,15 β -tetrahidroxi- <i>ent</i> -caur-16-eno	
		3 α ,15 β -dihidroxi-11 β ,16 β -epoxi- <i>ent</i> -caurano	
		3 α ,7 α -dihidroxi-15-oxo- <i>ent</i> -(16S)-caurano	

Continuação			
Material de partida	Fungo	Produto(s)	Ref.
3 α -hidroxi-15-oxo-ent-(16S)-caurano	<i>Gibberella fujikuroi</i>	3 α ,7 α -dihidroxi-15-oxo-ent-(16S)-caurano	i
		3 α ,7 α ,11 β -trihidroxi-15-oxo-ent-(16S)-caurano	
		3 α ,11 β -dihidroxi-15-oxo-ent-(16S)-caurano	
		3 α ,6 α ,11 β -trihidroxi-15-oxo-ent-(16S)-caurano	
		3 α ,6 β ,7 α -trihidroxi-15-oxo-ent-(16S)-caurano	
		3 α ,11 β ,16 α -trihidroxi-15-oxo-ent-caurano	
ent-15-oxo-caur-16-en-19-oato de metila	<i>Rhizopus stolonifer</i>	ent-7 β ,11 α -dihidroxi-15-oxo-caur-19-oato de metila	j
ent-15-oxo-caur-16-en-19-oato de metila	<i>Mucor plumbeus</i>	ent-7 β ,16 β -dihidroxi-15-oxo-caur-19-oato de metila	
15-oxo-ent-caur-16-eno	<i>Gibberella fujikuroi</i>	16 α ,17-dihidro-7 β -hidroxi-15-oxo-cauranolídeo	k
		16 α ,17-dihidro-15-oxo-GA ₁₂	
		16 α ,17-dihidro-15-oxo-GA ₂₅	
		16 α ,17-dihidro-15-oxo-GA ₂₄	
		7-aldeído- 16 α ,17-dihidro-15-oxo-GA ₁₄	
		ácido ent-3 α ,7 α -dihidroxi-15-oxo-cauran-19-óico	
		16 α ,17-dihidro-15-oxo-GA ₇	
ent-16 β ,19-dihidroxi-caurano	<i>Cephalosporium aphidicola</i>	ent-11 α ,16 β ,19-trihidroxi-caurano	l
		ent-19-hidroxi-11 β ,16 β -epoxi-caurano	
ácido ent-15-oxo-caur-16-en-19-óico	<i>Cephalosporium aphidicola</i>	ácido ent-16 β -hidroxi-15-oxo-cauran-19-óico	m
ent-15-oxo-caur-16-en-19-oato de metila	<i>Cephalosporium aphidicola</i>	ent-16 β -hidroxi-15-oxo-cauran-19-oato de metila	
		ent-11 α ,16 β -dihidroxi-15-oxo-cauran-19-oato de metila	
		ent-16 β ,18-dihidroxi-15-oxo-cauran-19-oato de metila	
ent-15 β -hidroxi-caur-16-eno	<i>Gibberella fujikuroi</i>	ent-11 α ,15 β -dihidroxi-caur-16-eno	n
		ent-7 β ,11 α ,15 β -trihidroxi-caur-16-eno	
		ent-11 α ,13,15 β -trihidroxi-caur-16-eno	
		ent-11 α ,15 β ,19-trihidroxi-caur-16-eno	

Continuação			
Material de partida	Fungo	Produto(s)	Ref.
<i>ent</i> -15 β -hidroxi-caur-16-eno	<i>Gibberella fujikuroi</i>	<i>ent</i> -11 α ,14 α ,15 β -trihidroxi-caur-16-eno	n
		<i>ent</i> -7 β ,15 β ,17-triacetoxi-11 α ,16 α -epoxi-caur-15-eno	
<i>ent</i> -15 β ,18-dihidroxi-caur-16-eno (candidiol)	<i>Gibberella fujikuroi</i>	<i>ent</i> -11 α ,15 β ,18-tirhidroxi-caur-16-eno	
		<i>ent</i> -11 α ,15 β ,18-triacetoxi-caur-16-eno	
		<i>ent</i> -7 β ,11 α ,15 β ,18-tetracetoxi-caur-16-eno	
<i>ent</i> -6 β ,19-dihidroxi-caur-16-eno	<i>Gibberella fujikuroi</i>	fujenal	o
		<i>ent</i> -caur-16-en-19-olídeo	
		7 β -hidroxi-caurenolídeo	
<i>ent</i> -6 β ,7 α ,19-trihidroxi-caur-16-eno	<i>Gibberella fujikuroi</i>	Fujenal	
<i>ent</i> -6,19-dioxo-caur-16-eno	<i>Gibberella fujikuroi</i>	7 β ,18-dihidroxi-caurenolídeo	
ácido <i>ent</i> -6-oxo-caur-16-en-19-óico	<i>Gibberella fujikuroi</i>	Fujenal	
<i>ent</i> -18-acetoxi-caur-15-en-7-ona	<i>Rhizopus nigricans</i>	<i>ent</i> -18-acetoxi-13-hidroxi-caur-15-en-7-ona	p
		<i>ent</i> -3 β ,18-diacetoxi-13-hidroxi-caur-15-en-7-ona	
<i>ent</i> -15 β ,19-dihidroxi-caur-16-eno	<i>Gibberella fujikuroi</i>	<i>ent</i> -11 α ,15 β ,19-trihidroxi-caur-16-eno	q
		<i>ent</i> -7 β ,11 α ,15 β ,19-tetrahidroxi-caur-16-eno	
ácido <i>ent</i> -15 β -hidroxi-caur-16-en-19-óico (ácido grandiflórico)	<i>Gibberella fujikuroi</i>	7 β ,15 α -dihidroxi-caur-19-enolídeo	
		éster metílico do 15 α -hidroxi-5,15-lactona GA ₁₄	
<i>ent</i> -15 β ,18-dihidroxi-caur-6,16-dieno	<i>Gibberella fujikuroi</i>	<i>ent</i> -15 β ,18-dihidroxi-6 α ,7 α -epoxi-caur-16-eno	
		<i>ent</i> -11 α ,15 β ,18-trihidroxi-caur-6,16-dieno	
		<i>ent</i> -16 β ,17-epoxi-11 α ,15 β ,18-trihidroxi-caur-16-eno	
<i>ent</i> -3 β ,15 β ,18-trihidroxi-caur-6,16-dieno	<i>Gibberella fujikuroi</i> (os produtos obtidos foram acetilados)	<i>ent</i> -3 β ,15 β ,18-triacetoxi-caur-6,16-dieno	
		<i>ent</i> -6 α ,7 α -epoxi-3 β ,15 β ,18-triacetoxi-caur-16-eno	
<i>ent</i> -caur-15-eno	<i>Gibberella fujikuroi</i>	éster metílico do isofujenal	r
		éster metílico da isogiberelina A ₁₃	
		éster metílico da isogiberilina A ₁₆	
		7 β ,18 - dihidroxi-caur-15-enolídeo	

Continuação			
Material de partida	Fungo	Produto(s)	Ref.
<i>ent</i> -7 α -hidroxi-caur-15-eno	<i>Gibberella fujikuroi</i>	éster metílico da isogiberilina A ₇	r
		<i>ent</i> -7 α -hidroxi-15 β ,16 β -epoxi-caurano	
		éster metílico da giberilina A ₁₃	
<i>ent</i> -18-hidroxi-caur-15-eno	<i>Gibberella fujikuroi</i>	<i>ent</i> -7 α ,18-dihidroxi-caur-15-en-19-oato de metila	r
		7 β ,18 - dihidroxi-caur-15-enolídeo	
<i>ent</i> -3 β ,7 α -dihidroxi-18-acetoxi-16(S)-caurano	<i>Rhizopus nigricans</i>	<i>ent</i> -3 β ,7 α ,16 β -trihidroxi-18-acetoxi-caurano	s
		<i>ent</i> -7 α ,16 β ,18-trihidroxi-3 β -acetoxi-caurano	
<i>ent</i> -18-acetoxi-16(S)-cauran-3,7-diona	<i>Rhizopus nigricans</i>	<i>ent</i> -3 α ,16 β -dihidroxi-18-acetoxi-cauran-7-ona	
		<i>ent</i> -16 β ,18-dihidroxi-3 α -acetoxi-cauran-7-ona	
		<i>ent</i> -18-acetoxi-16 β -hidroxi-cauran-3,7-diona	

Os fungos utilizados na literatura foram capazes de realizar as seguintes modificações nos substratos caurânicos iniciais: hidroxilações, epoxidações, reduções, oxidações e rearranjos de esqueleto; a modificação mais relatada foi a hidroxilação, a Figura 03 mostra as posições mais hidroxiladas, com as respectivas referências. Até o momento não foram relatadas hidroxilações nas posições 2, 5 e 20.

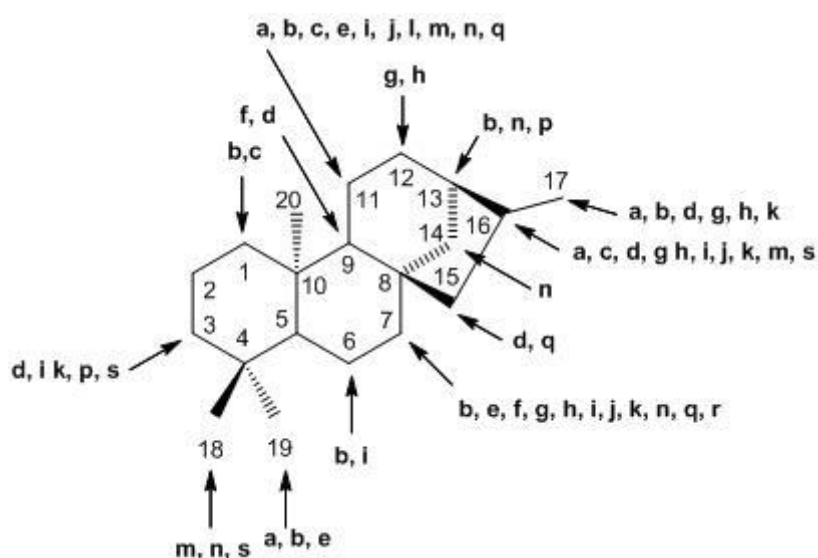
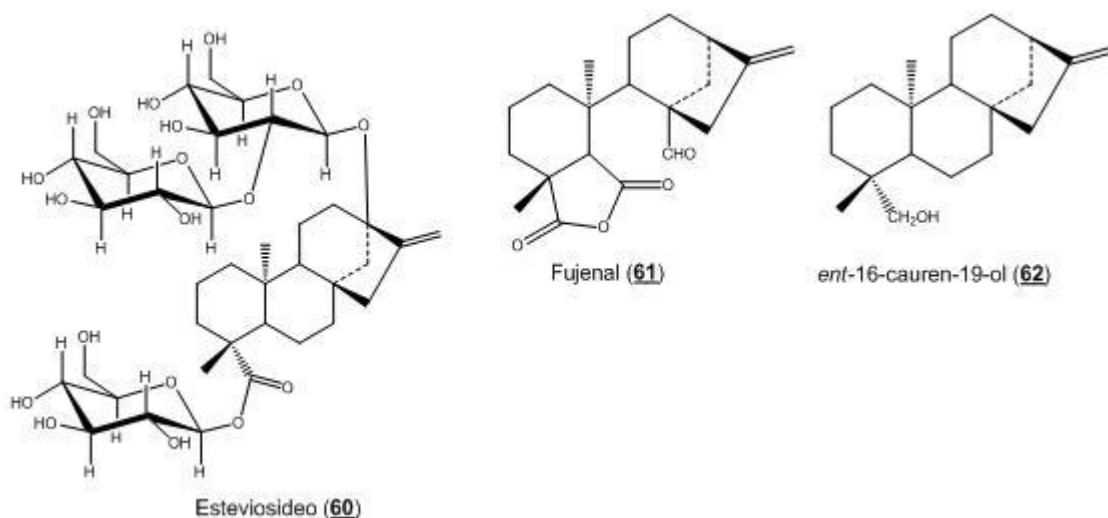


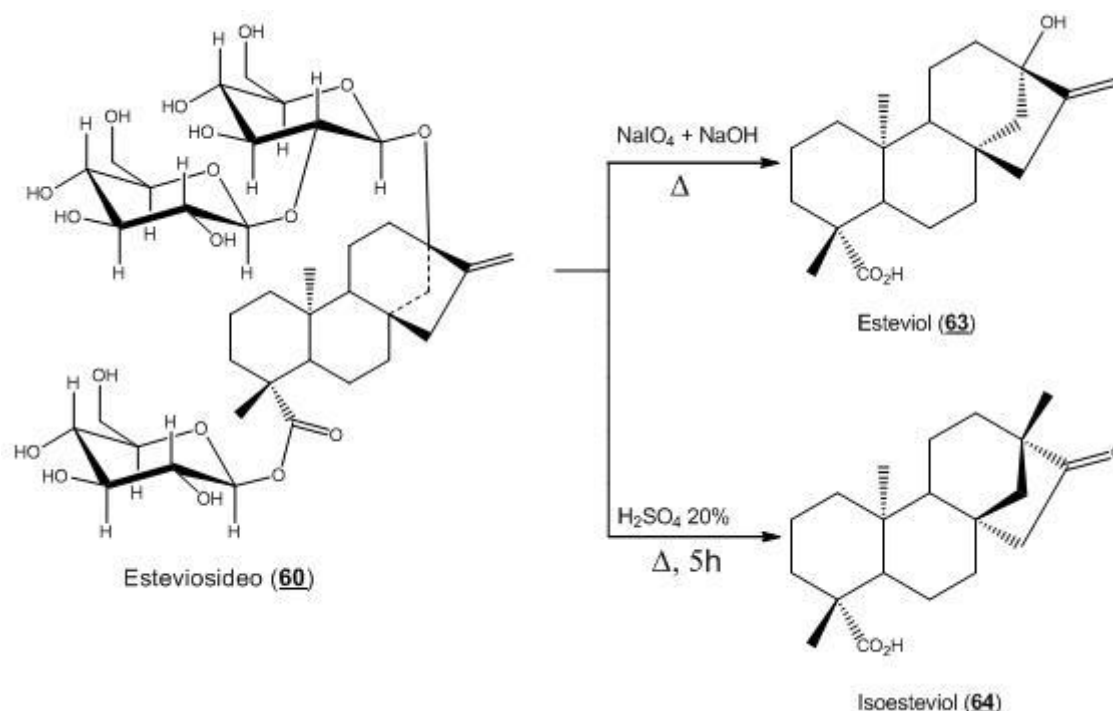
Figura 03 – Posições mais hidroxiladas no esqueleto caurânico

Neste trabalho testaram-se os diterpenos caurânicos: esteviosídeo (**60**), fujenal (**61**) e *ent*-cauren-19-ol (**62**) como substratos para a biotransformação com os fungos *Rhizopus stolonifer*, *Rhizopus oryzae* e *Thamnostylum* sp.



O esteviosídeo (**60**) é um edulcorante natural não calórico isolado de *Stevia rebaudiana*, um arbusto perene da família Asteraceae (Compositae) nativo do Paraguai e do Brasil, sendo 300 vezes mais doce que a sacarose, com base no teste organoléptico, e vem sendo utilizado como um substituto do açúcar em uma variedade de alimentos e bebidas. Nos Estados Unidos foi aprovado o uso do esteviosídeo como um suplemento dietético. Sugere-se que seu consumo exerça efeitos benéficos à saúde humana, sendo utilizado por pacientes que sofrem de obesidade, *diabetes mellitus* (doença metabólica caracterizada por um aumento anormal da glicose no sangue), doenças cardiovasculares e cárie. Em modelos animais e cultivos de células tem sido relatada sua influência no metabolismo glicídico e função renal e apresenta efeitos antioxidantes, anti-inflamatório e antitumoral, além de atividades anti-hipertensivo e anti-hiperglicêmico (Boonkaewwan *et al.*, 2008).

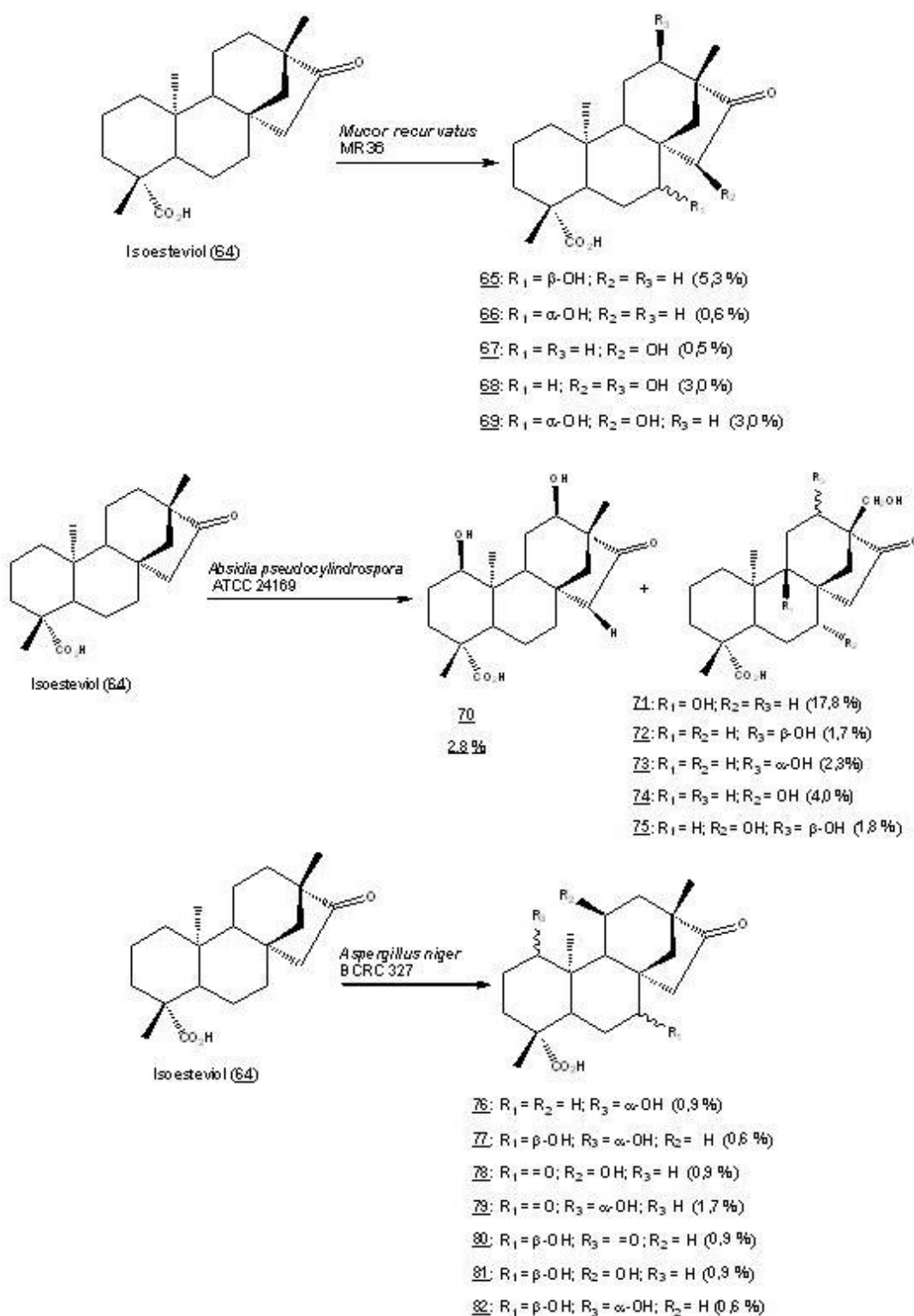
A hidrólise do esteviosídeo (**60**) (Esquema 09, pag. 18) produz duas agliconas, o esteviol (ácido 13-hidroxi-*ent*-caur-16-en-19-óico) (**63**) um diterpeno da classe dos caurânos e o isoesteviol (ácido *ent*-16-cetobeiran-19-óico) (**64**) um diterpeno da classe dos beieranos.



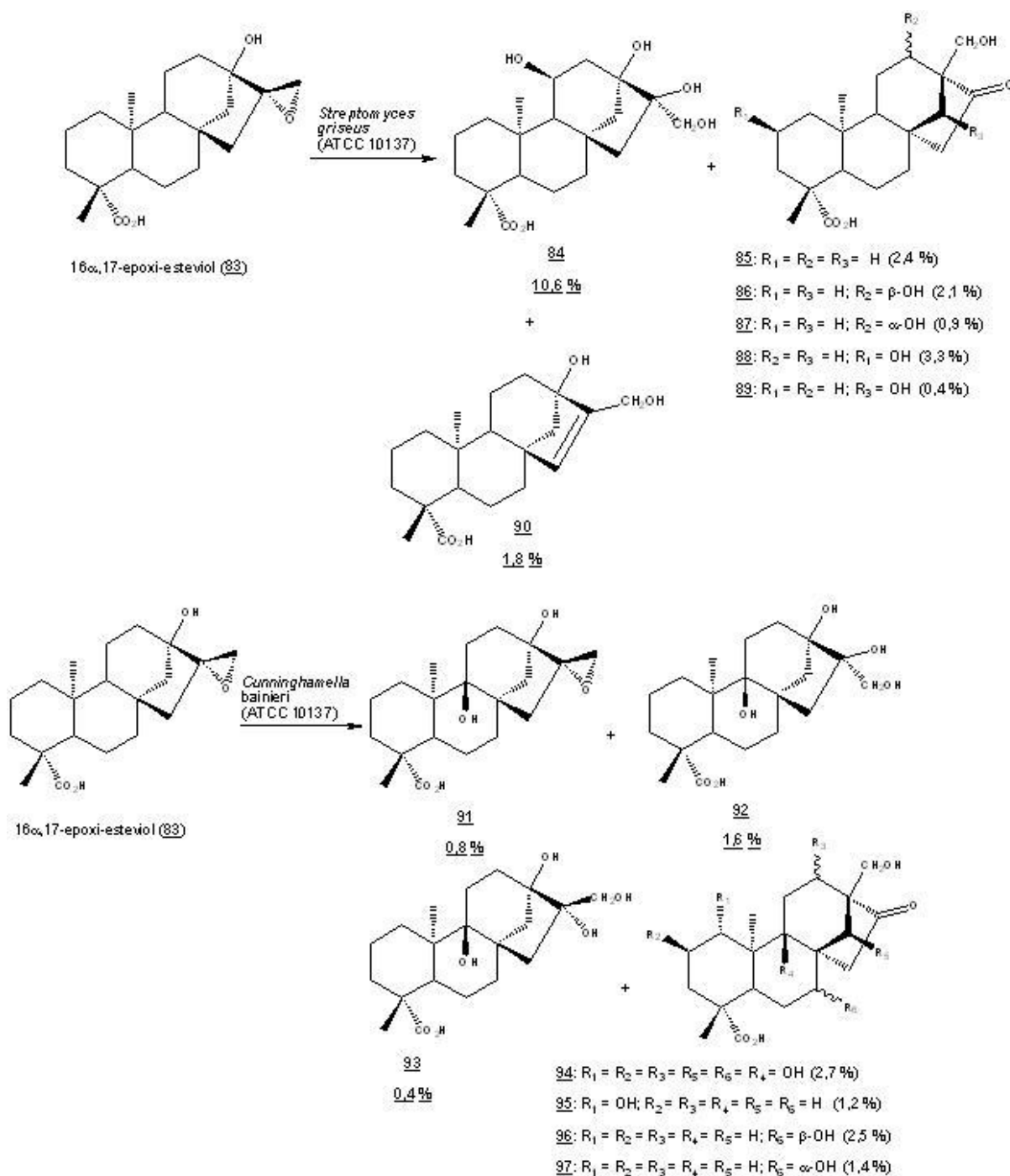
Esquema 09 – Hidrólise de **60** levando a formação de **63** e **64** (Pezzuto *et al.*, 1985)

Estas duas agliconas do esteviosídeo (**60**) são de grande interesse, pois apresentam atividades biológicas. O esteviol (**63**) demonstrou ser capaz de reduzir os níveis de glicose no organismo por estimular a secreção de insulina através da ação direta nas células β (Yang *et al.*, 2007) e o isoesteviol (**64**) apresentou uma ação antialimentar sobre insetos, diminuição dos níveis de glicose no organismo, inibição do transporte da D-glicose e da D-frutose através da membrana celular e diminuição da pressão arterial em ratos espontaneamente hipertensos por meio da abertura do canal de sódio e potássio (Akihisa *et al.*, 2004 e Hsu *et al.*, 2002).

Na literatura existem relatos de biotransformações realizadas com as agliconas **63**, **64** e seus derivados com bactérias e fungos. Em 2008, Chang e colaboradores obtiveram 18 produtos de biotransformação do isoesteviol (**64**); cinco usando o fungo *Mucor recurvatus* MR36; produzindo as substâncias **65** a **69**, seis usando o fungo *Absidia pseudocylindrospora* ATCC 24169 (substâncias **70** a **75**) e, com o fungo *Aspergillus niger* BCRC 32720, foram obtidas as substâncias **76** a **82**, como mostra o Esquema 10 (pag. 19). Chang e colaboradores, em 2006, obtiveram 15 produtos de biotransformação do 16 α ,17-epoxi-esteviol (**83**). Com a bactéria *Streptomyces griseus* ATCC 10137 obtiveram as substâncias **84** a **90** e, com o fungo *Cunninghamella bainieri* ATCC 9244 foram obtidas as substâncias **91** a **97**, como mostra o Esquema 11 (pag. 20).

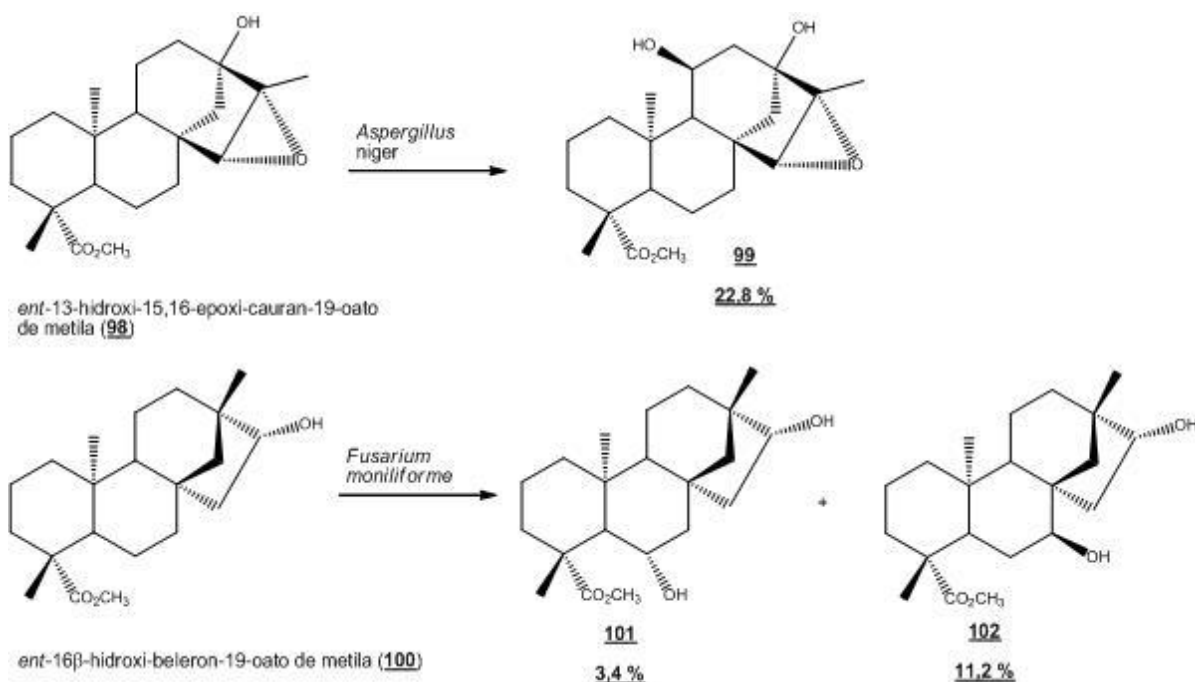


Esquema 10 – Obtenção das substâncias **65** a **82** pela biotransformação de **64** pelos fungos *Mucor recurvatus* MR36, *Absidia pseudocylindrospora* ATCC 24169 e *Aspergillus niger* BCRC 327 (Chang et al., 2008)



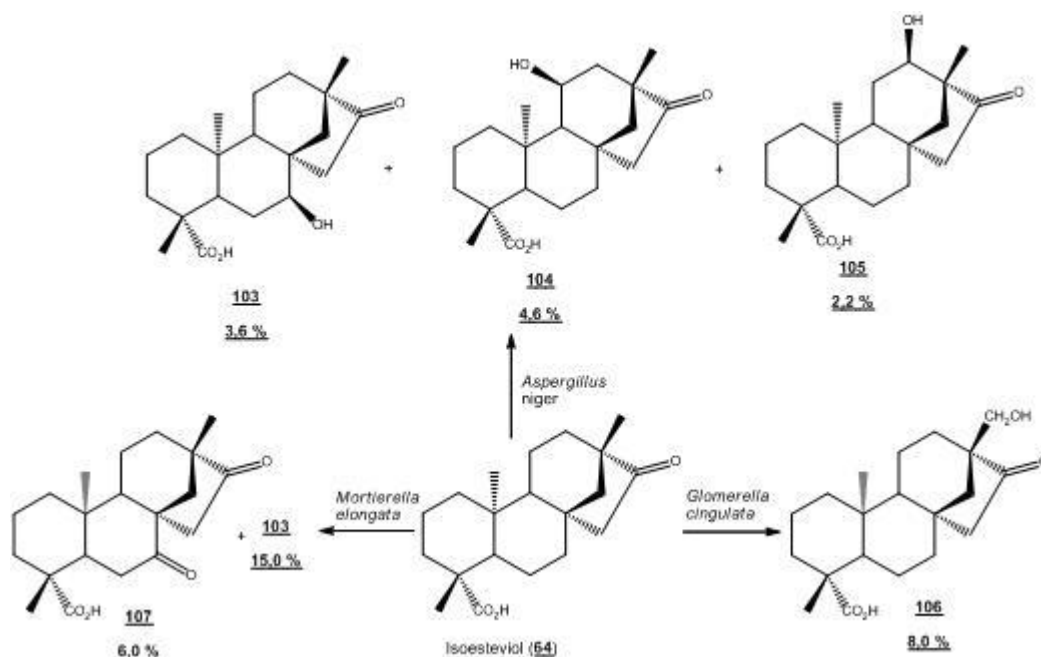
Esquema 11 – Obtenção das substâncias **84** a **97** pela biotransformação de **83** pela bactéria *Streptomyces griseus* (ATCC 10137) e pelo fungo *Cunninghamella bainieri* ATCC 9244 (Chang et al., 2006)

Em 2005, Oliveira e colaboradores obtiveram três produtos de biotransformação dos derivados do esteviol (**63**) e isoesteviol (**64**). O *ent*-13-hidroxi-15,16-epoxi-cauran-19-oato de metila (**98**) com o fungo *Aspergillus niger* produziu a substância **99** e o *ent*-16 β -hidroxi-beieron-19-oato de metila (**100**), com o fungo *Fusarium moniliforme*, produziu as substâncias **101** e **102** (Esquema 12, pag. 21).

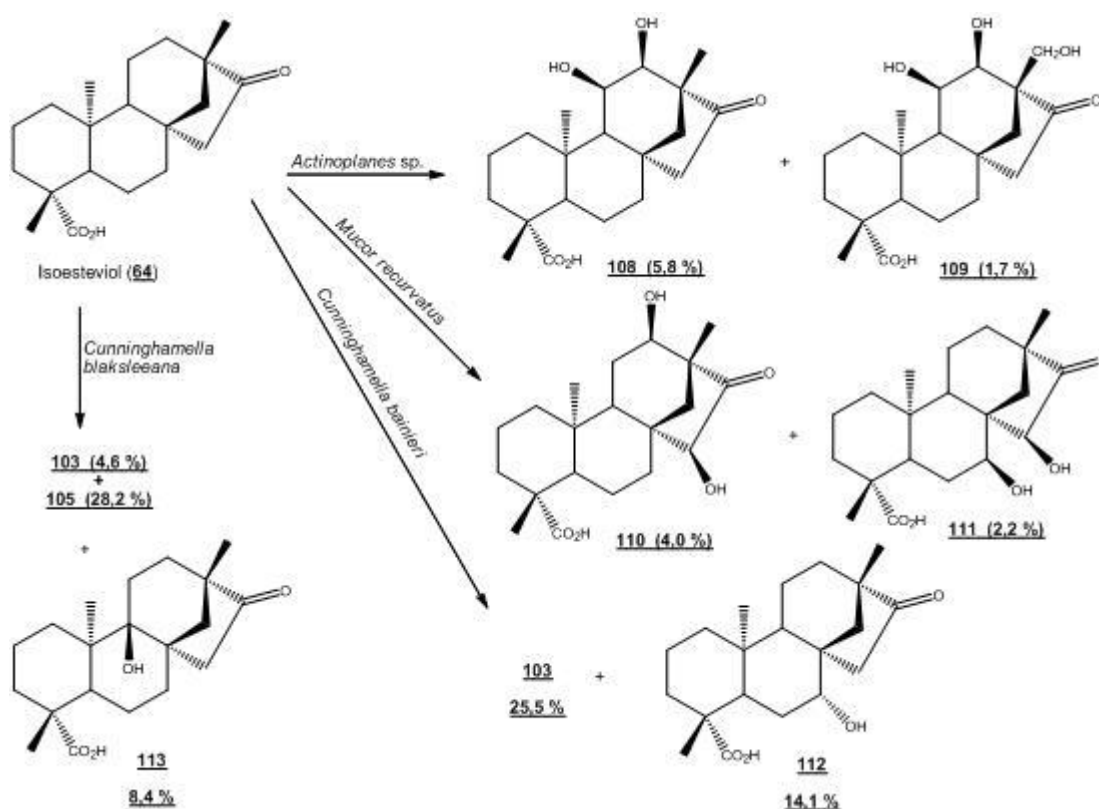


Esquema 12 – Obtenção das substâncias **99**, **101** e **102** pela biotransformação de **98** e **100** com os fungos *Aspergillus niger* e *Fusarium moniliforme* (Oliveira et al., 2005)

Akihisa e colaboradores (2004) obtiveram cinco produtos de biotransformação do isoesteviol (**64**) com o fungo *Aspergillus niger* produzindo as substâncias de **103** a **105**; com o fungo *Mortierella elongata* obtiveram a substância **106** e com o fungo *Glomerella cingula* foram isoladas as substâncias **103** e **107** (Esquema 13, pag. 22). Hsu e colaboradores, em 2002, obtiveram oito produtos de biotransformação de **64**: com a bactéria *Actinoplanes* sp. obtiveram as substâncias **108** e **109**, com o fungo *Mucor recurvatus*, as substâncias **110** e **111**, com *Cunninghamella bainieri* isolaram as substâncias **103** e **112** e com *Cunninghamella blaksleeana* as substâncias **103**, **105** e **113** (Esquema 14, pag 22).

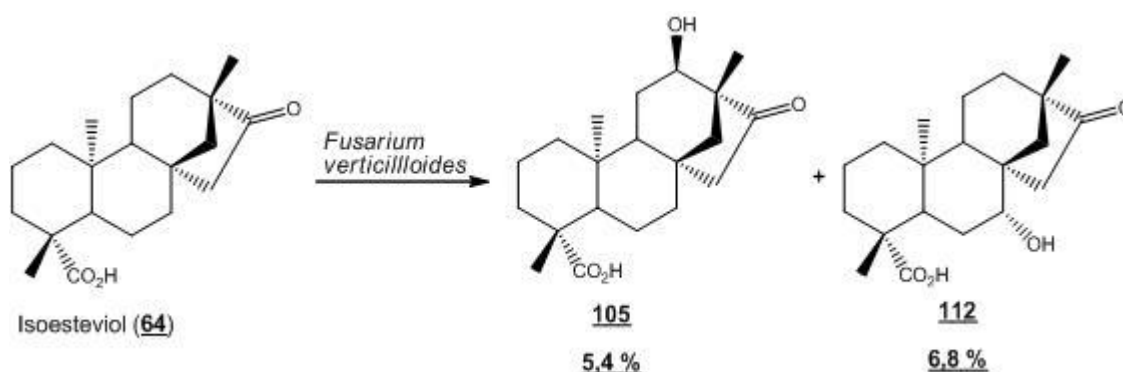
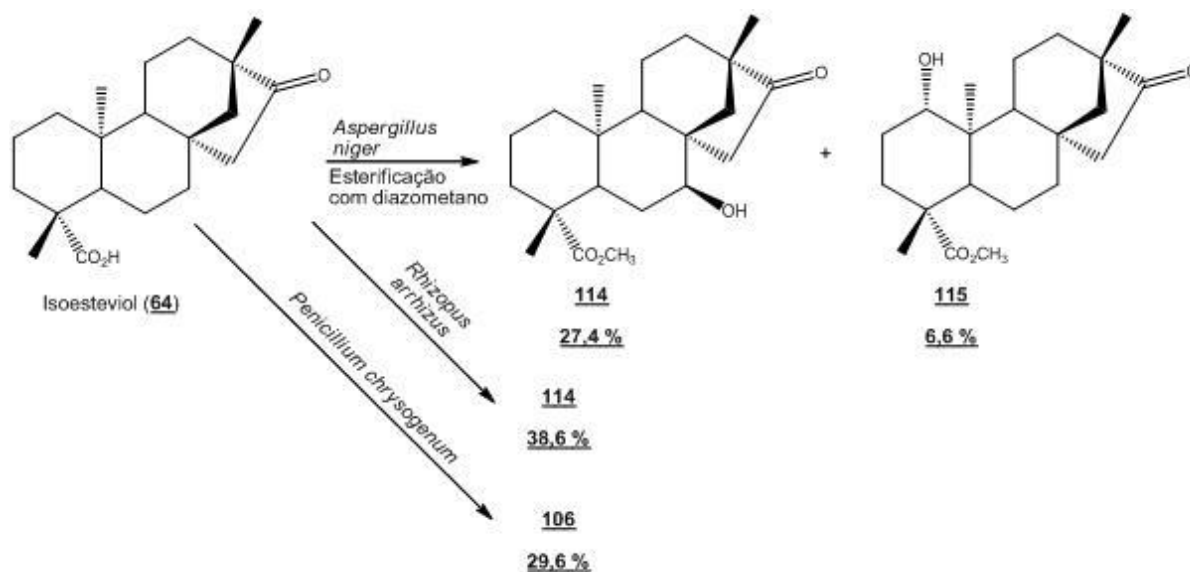


Esquema 13 – Obtenção das substâncias **103** a **107** pela biotransformação de **64** pelos fungos *Aspergillus niger*, *Glomerella cingulata* e *Mortierella elongata* (Akihisa et al., 2004)

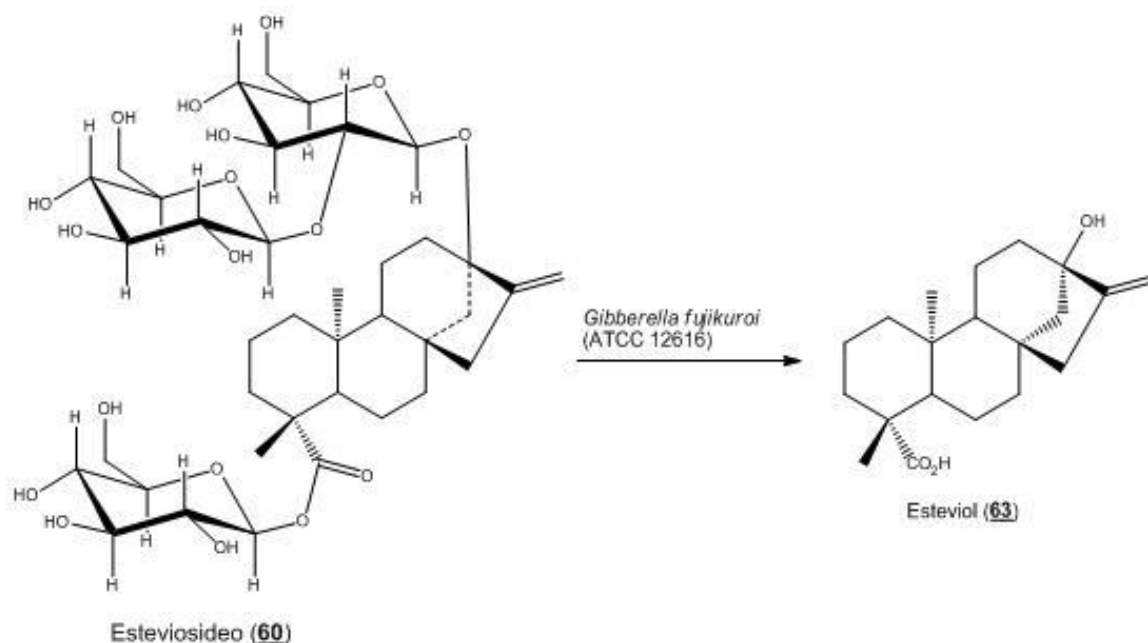


Esquema 14 – Obtenção das substâncias **103**, **105** e **108-113** pela biotransformação de **64** com a bactéria *Actinoplanes sp.* e os fungos *Mucor recurvatus*, *Cunninghamella bairdii* (Hsu et al., 2002)

Oliveira e colaboradores (1999) obtiveram três produtos de biotransformação do isoesteviol (**64**) com o fungo *Aspergillus niger* produzindo as substâncias **114** e **115**. Com o fungo *Rhizopus arrhizus* obtiveram **114**. Com o fungo *Penicillium chrysogenum* isolaram a substância **106** (Esquema 15). Oliveira e Strapasson (1996) obtiveram dois produtos de biotransformação de **64** com o fungo *Fusarium verticilloides* produzindo as substâncias **105** e **112** (Esquema 16).

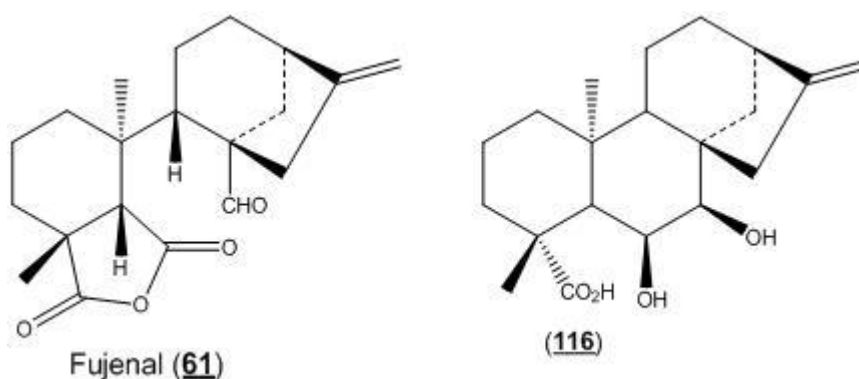


As agliconas esteviol (**63**) e isoesteviol (**64**) podem ser obtidas a partir da hidrólise enzimática ou microbiológica do esteviosídeo (**60**). Em 2007, Oliveira e colaboradores obtiveram o esteviol (**63**) pela biotransformação do esteviosídeo (**60**) com o fungo *Gibberella fujikuroi* (ATCC 12616), como mostra o Esquema 17 (pag. 24).



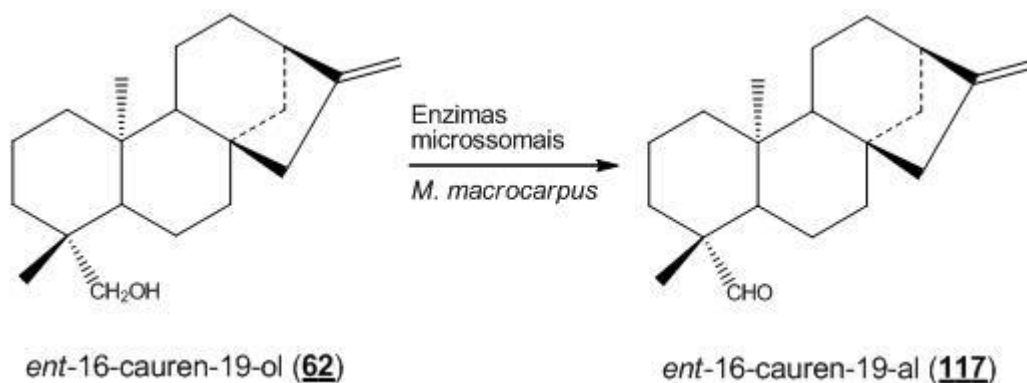
Esquema 17 – Obtenção de **63** pela biotransformação de **60** pelo fungo *Gibberella fujikuroi* (ATCC 12616) (Oliveira *et al.*, 2007)

O fujenal (**61**) é descrito como um metabólito do fungo *Gibberella fujikuroi*, formado pela oxidação do ácido *ent*-6 α ,7 α -dihidroxi-caurenóico (**116**) pela enzima monooxigenase P450-1 (Rojas *et al.*, 2004), possuindo atividade inibitória de tumores (Hanson & Fraga, 2008).



O *ent*-16-cauren19-ol (**62**) é isolado de plantas como a *Coffea arabica* e *Abrotanella nivigena* (Wahlberg & Enzell, 1975 e Anthonsen *et al.*, 1971). Em 2008 Gaspar-Marques e colaboradores relatam, para **62**, a atividade anti-herpética. A biotransformação de **62** foi realizada por Sherwin & Coates (1982) que, como

produto, obtiveram o *ent*-16-cauren-19-al (**117**) utilizando enzimas microssomais extraídas de *Marah macrocarpus*, como mostra o Esquema 18.



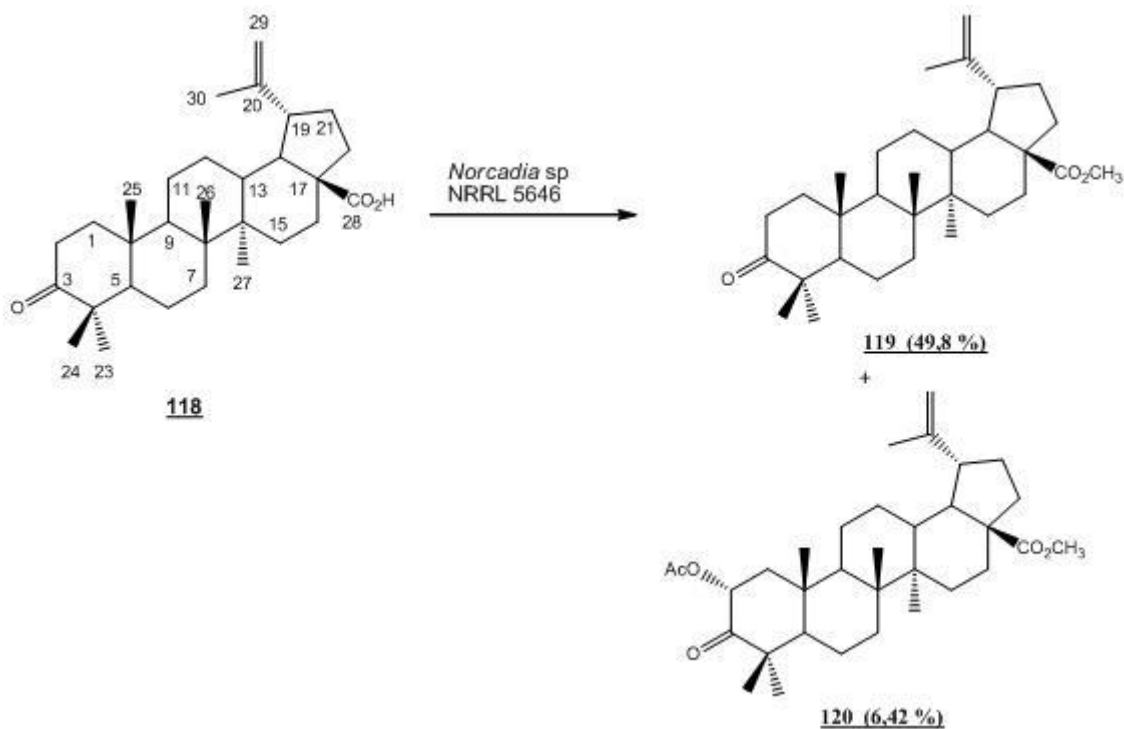
Esquema 18 – Conversão de **62** a **117** com enzimas microssomais de *M. macrocarpus* (Sherwin & Coates, 1982)

1.1.2 - Biotransformação de triterpenos pentacíclicos

O interesse pelo estudo de biotransformação de triterpenos pentacíclicos se dá pela sua larga distribuição no reino vegetal e por apresentarem um amplo espectro de atividades biológicas, possibilitando, assim, a obtenção de análogos destes triterpenos para novos testes de atividade biológica (Zhang *et al.*, 2005).

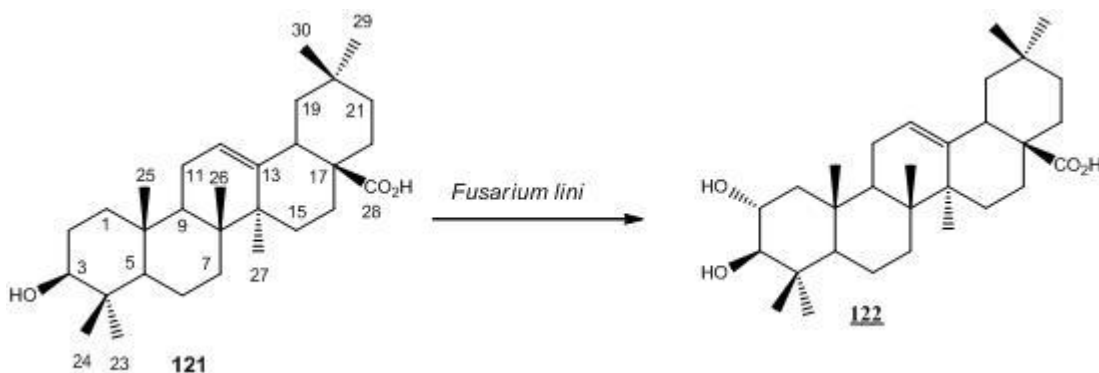
Uma pesquisa realizada na literatura mostrou um pequeno número de triterpenos pentacíclicos biotransformados com bactérias e fungos.

Em 2009, Qian e colaboradores relataram a biotransformação do ácido betulônico (**118**) (triterpeno da classe lupano) pela bactéria *Nocardia* sp. NRRL 5646 produzindo as substâncias 3-oxo-lup-20(29)-en-28-oato de metila (**119**) e 2 α -acetoxi-3-oxo-lup-20(29)-en-28-oato de metila (**120**), como mostra o Esquema 19 (pag. 26).

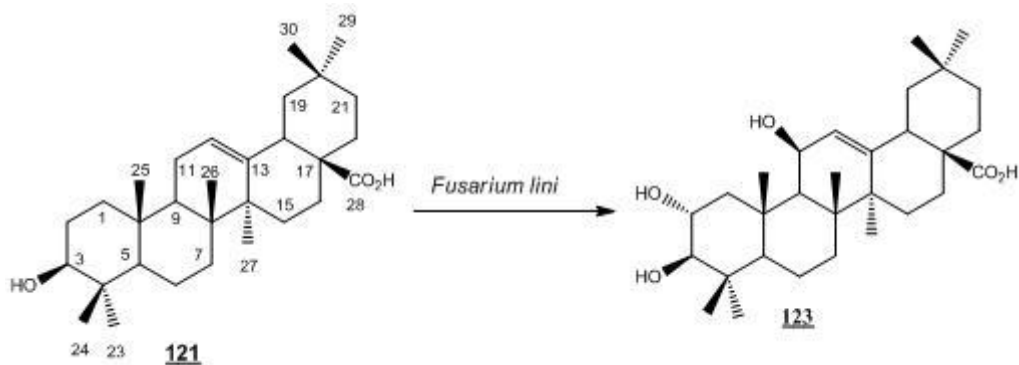


Esquema 19 – Obtenção de **119** e **120** pela biotransformação de **118** pela bactéria *Nocardia* sp NRLL 5646 (Qian et al., 2009)

Choudhary e colaboradores, em 2008, relataram a biotransformação do ácido oleanólico (**121**) (triterpeno da classe oleanano) pelo fungo *Fusarium lini*, produzindo as substâncias ácido 2 α ,3 β -dihidroxi-olean-12-en-28-óico (**122**) e o ácido 2 α ,3 β ,11 β -trihidroxi-olean-12-en-28-óico (**123**), mostrados nos Esquemas 20 e 21 (pag. 27), sendo que, para estas substâncias, os autores relataram uma potente inibição da enzima α -glicosidase.

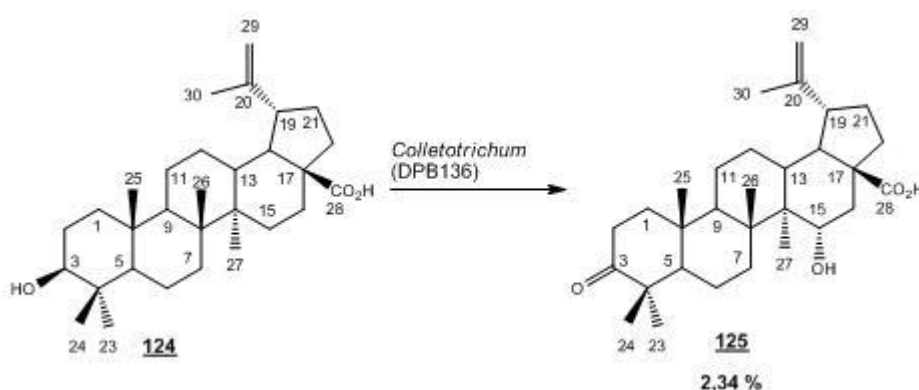


Esquema 20 – Obtenção de **122** pela biotransformação de **121** com o fungo *Fusarium lini* (Choudhary et al., 2008)

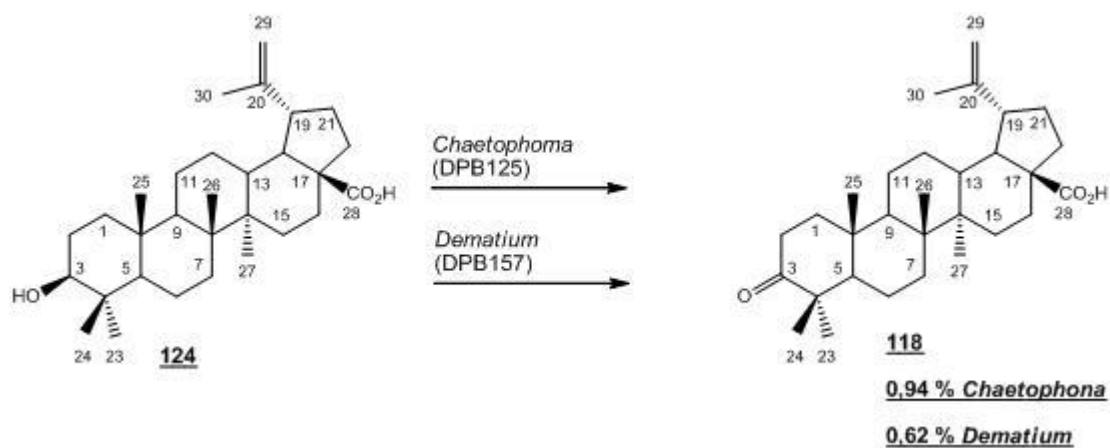


Esquema 21 – Obtenção de **123** pela biotransformação de **121** com o fungo *Fusarium lini* (Choudhary et al., 2008)

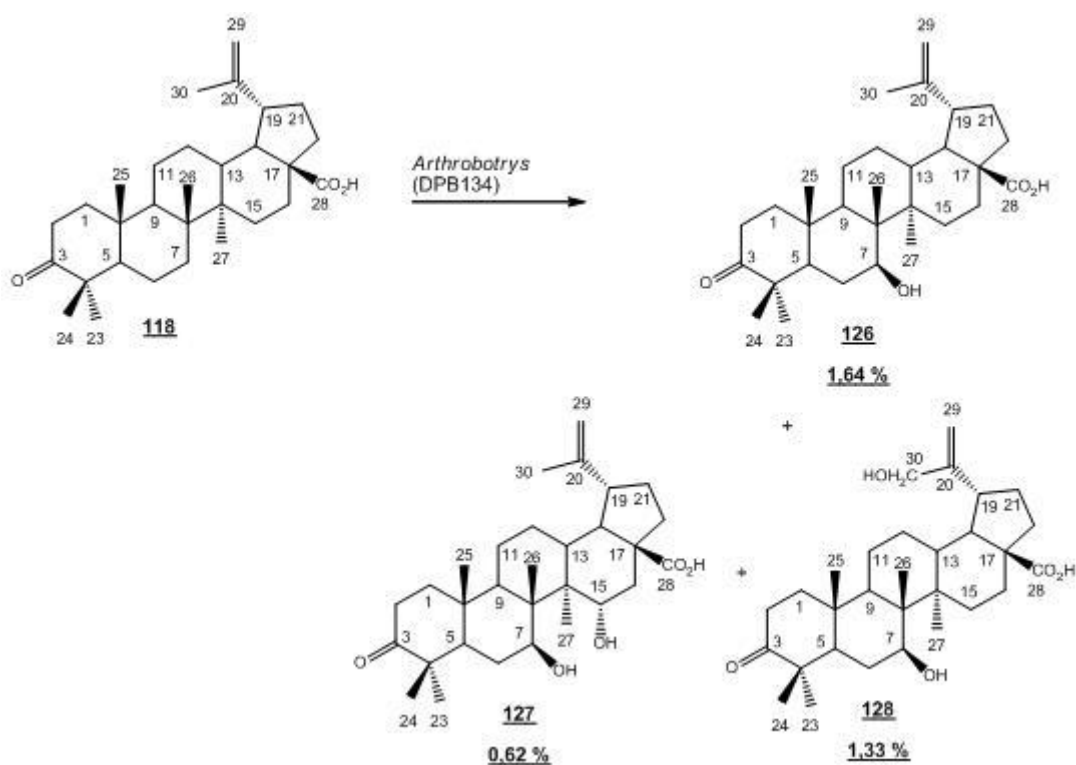
Bastos e colaboradores, em 2007, relataram a biotransformação do ácido betulínico (**124**) e do ácido betulônico (**118**) (triterpenos da classe lupano). O substrato **124** foi biotransformado pelo fungo *Colletotrichum* (DPB136) produzindo o ácido 3-oxo-15 α -hidroxi-lup-20(29)-en-28-óico (**125**) e, usando os fungos *Chaetophoma* (DPB125) e *Dematium* (DPB157) obtiveram **118**. O substrato **118** foi biotransformado usando-se o fungo *Arthrobotrys* (DPB134) obtendo-se as substâncias ácido 3-oxo-7 β -hidroxi-lup-20(29)-en-28-óico (**126**), ácido 3-oxo-7 β ,15 α -dihidroxi-lup-20(29)-en-28-óico (**127**) e ácido 3-oxo-7 β ,30-dihidroxi-lup-20(29)-en-28-óico (**128**); com o fungo *Colletotrichum* (DPB136) isolou-se as substâncias **125** e **128** e, com o fungo *Chaetophoma* (DPB125) obteve-se o ácido 3-oxo-25-hidroxi-lup-20(29)-en-28-óico (**129**), como mostram os esquemas 22, 23, 24 (pag. 28) e 25 (pag. 29).



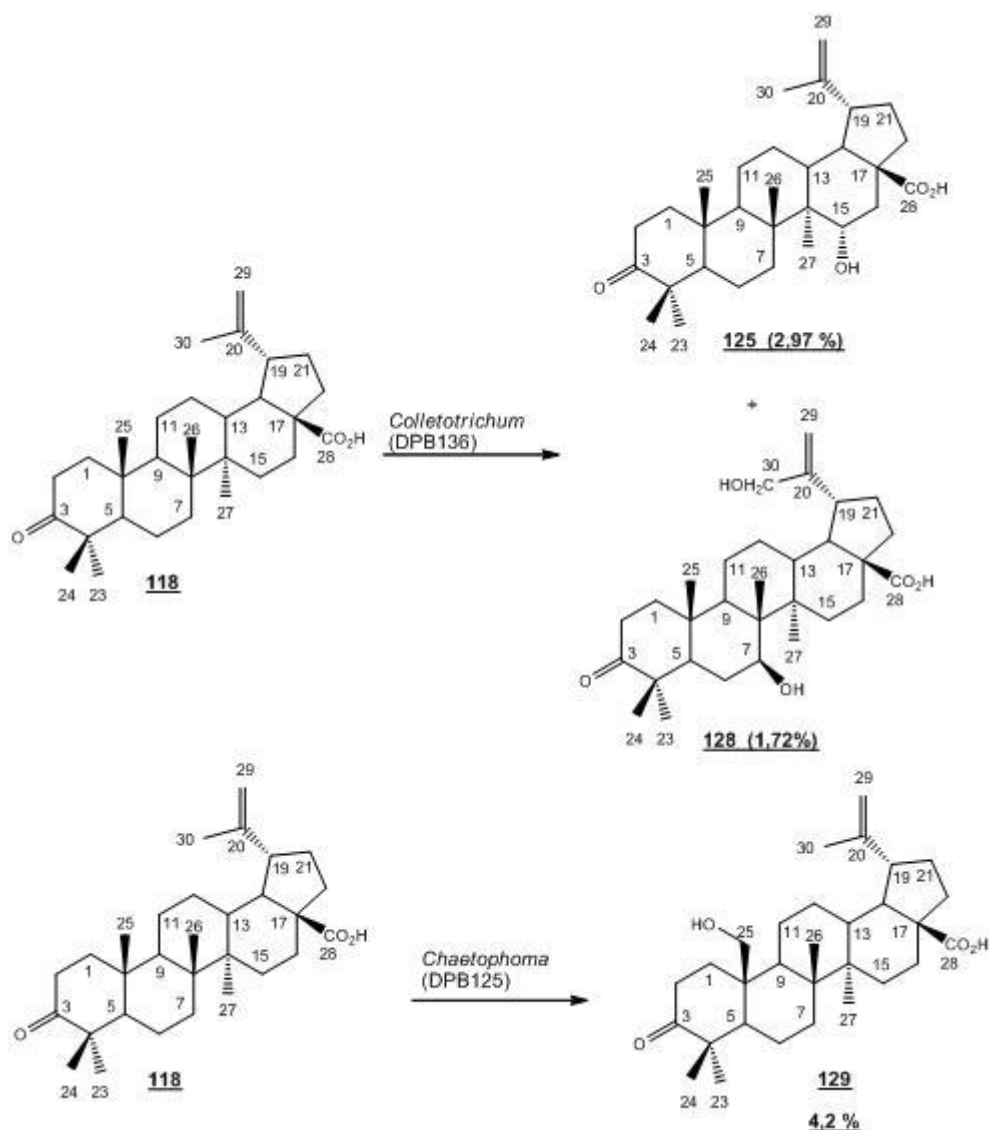
Esquema 22 – Obtenção de **125**, pela biotransformação de **124** pelos fungos *Colletotrichum* (DPB136) (Bastos et al., 2007)



Esquema 23 – Obtenção de **118**, pela biotransformação de **124** pelos fungos *Chaetophoma* (DPB125) e *Dematium* (DPB157) (Bastos *et al.*, 2007)

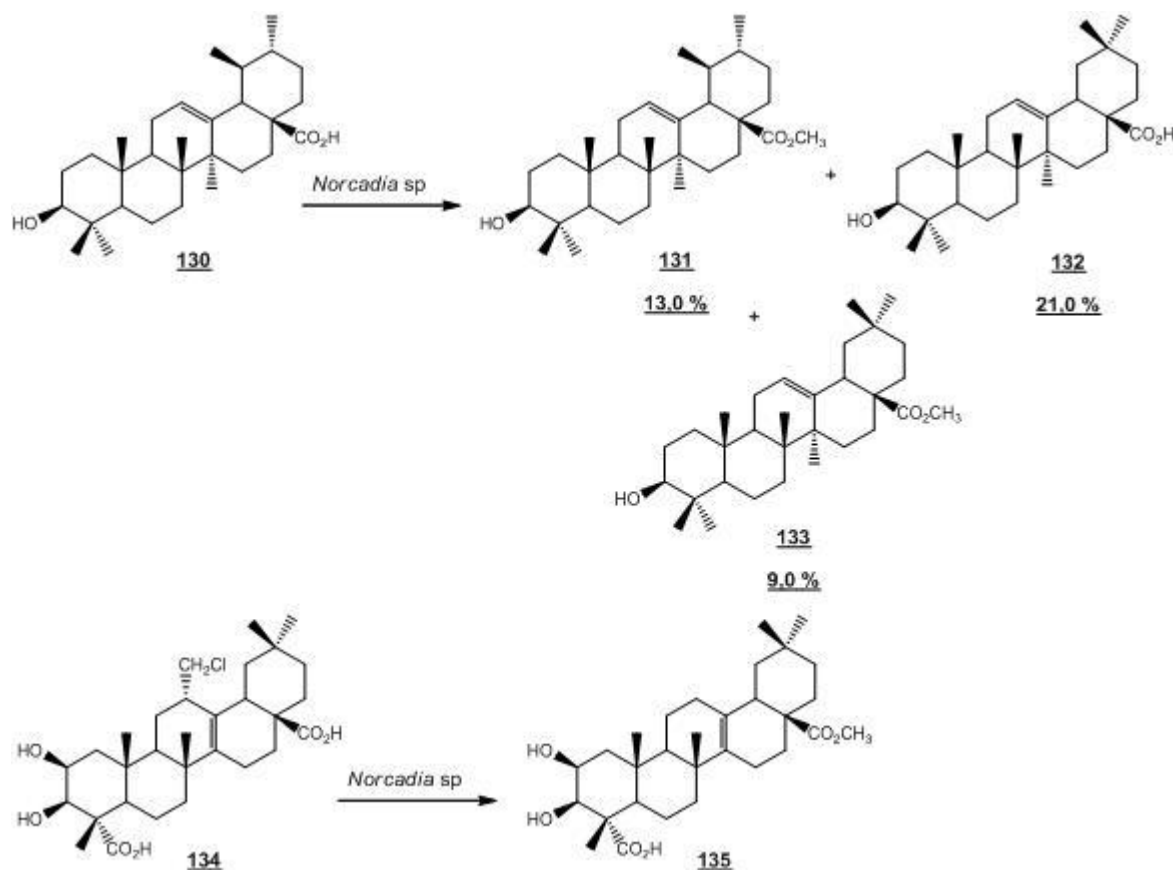


Esquema 24 – Obtenção de **126**, **127** e **128** pela biotransformação de **118** pelo fungo *Arthrobotrys* (DPB134) (Bastos *et al.*, 2007)



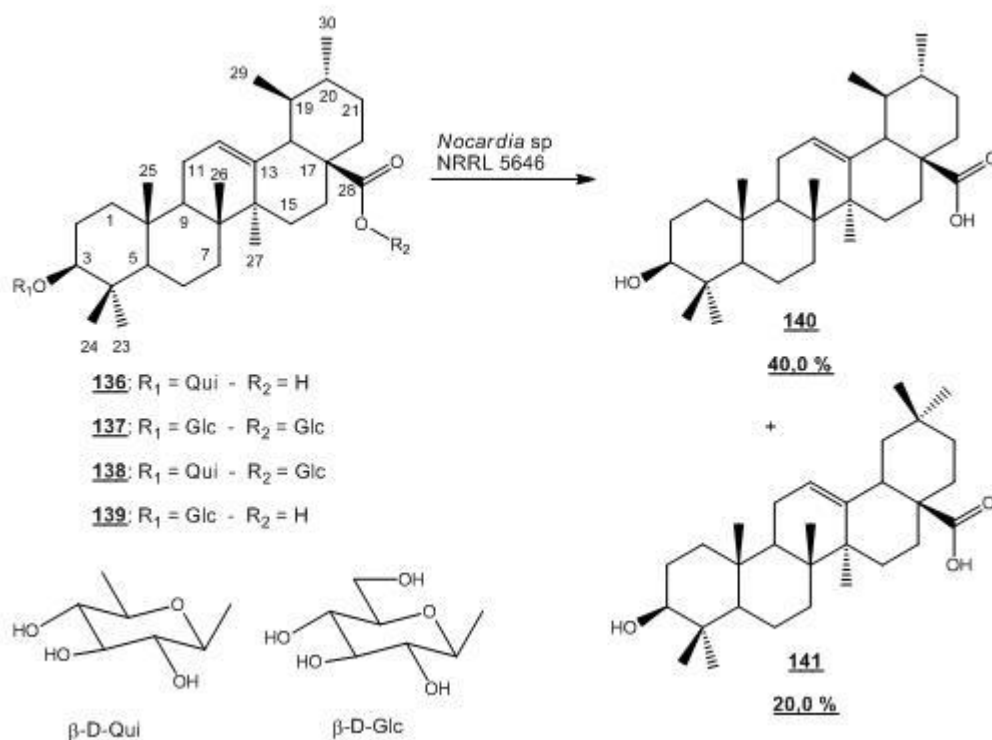
Esquema 25 – Obtenção de **125**, **128** e **129** pela biotransformação de **118** pelos fungos *Colletotrichum* (DPB136) e *Chaetophoma* (DPB125) (Bastos *et al.*, 2007)

Zhang e colaboradores (2005) relataram a biotransformação do éster ursolinato de metila (**130**) (triterpeno da classe ursano) e da senegenina (**134**) (triterpeno da classe oleanano) com a bactéria *Nocardia* sp produzindo as substâncias (**131**, **132**, **134** e **135**) como mostra o Esquema 26 (pag. 30).



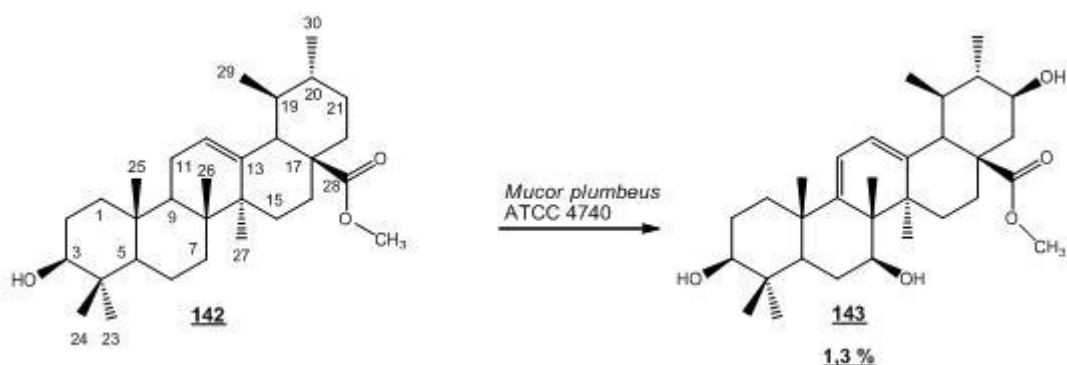
Esquema 26 – Obtenção de **131**, **132**, **133** e **135** pela biotransformação de **130** e **134** pela bactéria *Nocardia* sp. (Zhang *et al.*, 2005)

Cheng e colaboradores (2004) relataram a biotransformação de glicosídeos do ácido quinóico (**136** a **139**) (triterpeno da classe ursano) com a bactéria *Nocardia* sp NRRL 5646 produzindo as substâncias ácido quinóico (**140**) e o ácido cincólico (**141**) (triterpeno da classe oleanano), como mostra o Esquema 27 (pag. 31). Os autores relatam a capacidade da bactéria *Nocardia* sp em realizar um rearranjo no esqueleto carbônico, envolvendo a migração de um grupo metila de C-19 para C-20, transformando o esqueleto ursano de um dos produtos da biotransformação para um esqueleto oleanano, sendo também relatado por Zhang e colaboradores em 2005.



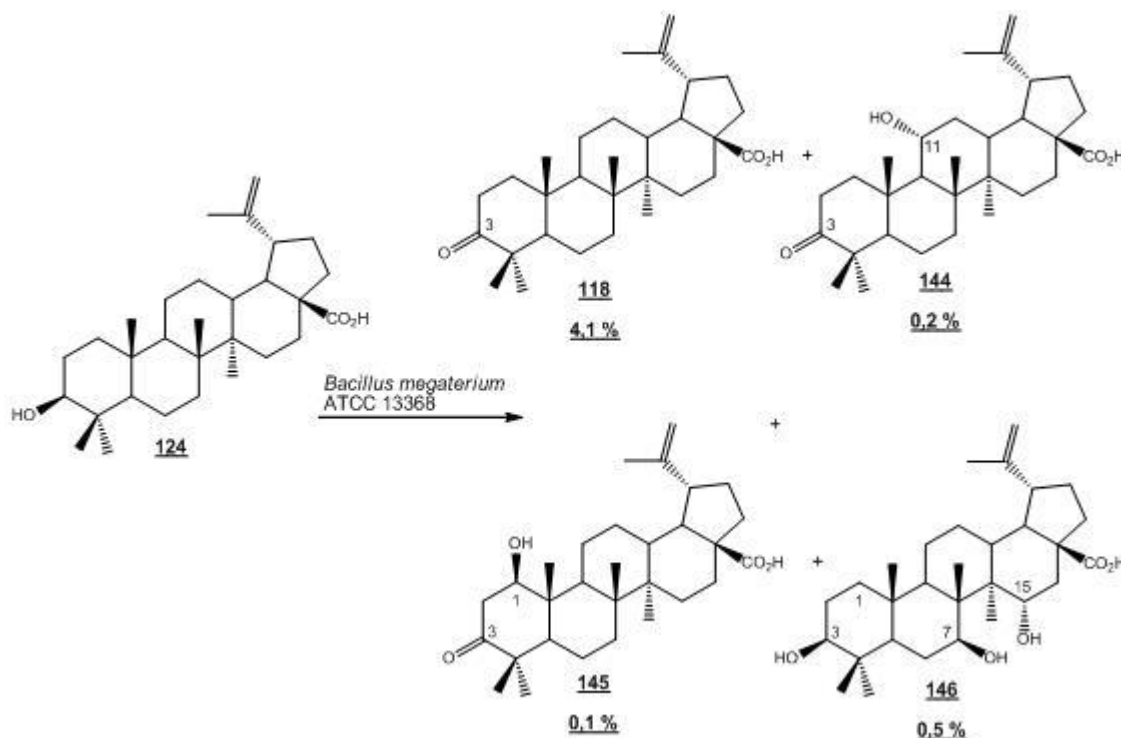
Esquema 27 – Obtenção de **140** e **141** pela biotransformação de **136** a **139** pela bactéria *Nocardia* sp. NRRL 5646 (Cheng *et al.*, 2004)

Collins e colaboradores (2002) relataram a biotransformação do ursolato de metila (**142**) (triterpeno da classe ursano) pelo fungo *Mucor plumbeus* ATCC 4740 produzindo a substância 3 β ,7 β ,21 β -trihidroxi-urs-9(11),12-dien-28-oato de metila (**143**), como mostra o Esquema 28.



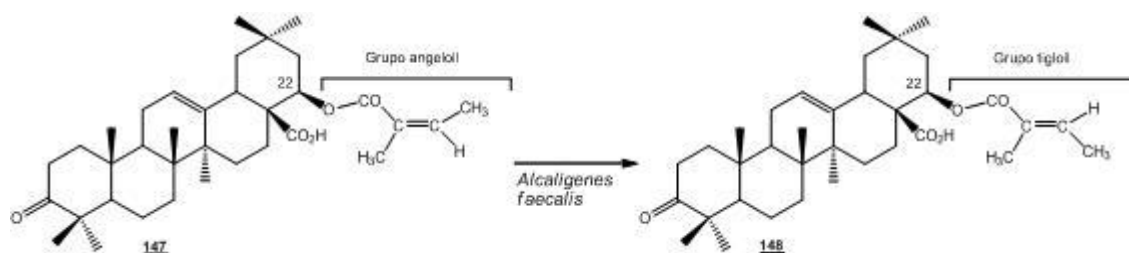
Esquema 28 – Obtenção de **143**, pela biotransformação de **142** pelo fungo *Mucor plumbeus* ATCC 4740 (Collins *et al.*, 2002)

Chatterjee e colaboradores (2000) relataram a biotransformação do ácido betulínico (**124**) (triterpeno da classe lupano) com o bacilo *Bacillus megaterium* ATCC 13368, produzindo as substâncias ácido betulônico (**118**), ácido 3-oxo-11 α -hidróxi-lup-20(29)-en-28-óico (**144**), ácido 1 β -hidroxi-3-oxo-lup-20(29)-en-29-óico (**145**) e o ácido 3 β ,7 β ,15 α -trihidroxi-lup-20(29)-en-28-óico (**146**), como mostra o Esquema 29.



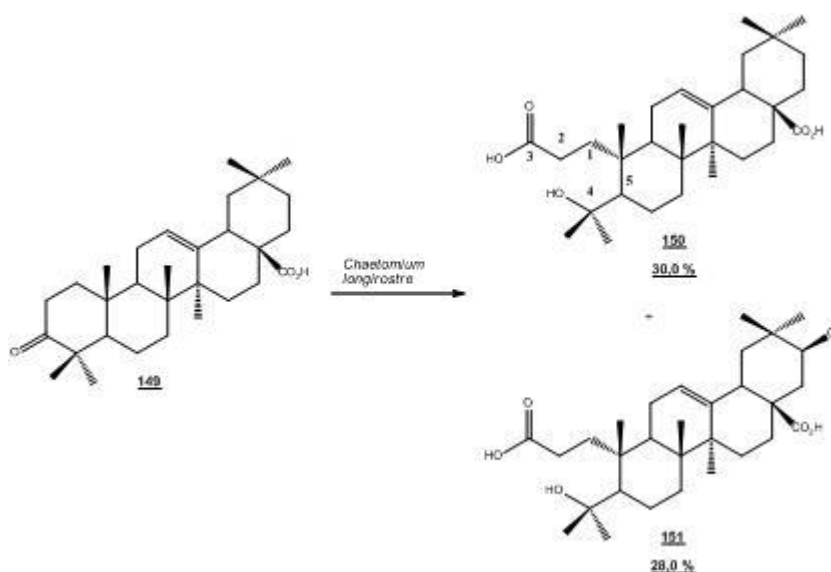
Esquema 29 – Obtenção de **118**, **144**, **145** e **146** pela biotransformação de **124** pelo bacilo *Bacillus megaterium* ATCC 13368 (Chatterjee et al., 2000)

Singh e colaboradores, em 1999, relataram a biotransformação do lantadeno A (ácido 22 β -angeloiloxi-3-oxo-olean-12-en-28-óico) (**147**) (triterpeno da classe oleanano), extraído do cambará (*Lantana camara*), pela bactéria *Alcaligenes faecalis* produzindo a substância ácido 22 β -tigloiloxi-3-oxo-olean-12-en-28-óico (**148**), sendo esta o isômero *cis* de **147**, como mostra o Esquema 30 (pag. 33). Os autores ainda descreveram para o lantadeno A as seguintes atividades biológicas: anti-HIV, anti-inflamatória, antimicrobiana, antitumoral e antimutagênica.



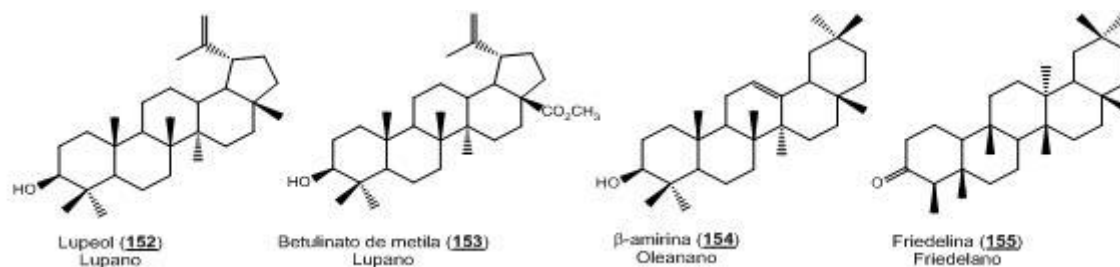
Esquema 30 – Obtenção de **148** pela biotransformação de **147** pela bactéria *Alcaligenes faecalis* (Singh *et al.*, 1999)

Shirane e colaboradores (1996) relataram a biotransformação do ácido 3-oxo-olean-12-en-28-óico (**149**) (triterpeno da classe oleanano) pelo fungo *Chaetomium longirostre*, produzindo as substâncias ácido 3,4-seco-olean-12-en-4-ol-3,28-dióico (**150**) e o ácido 21 β -3,4-seco-olean-12-en-4-ol-3,28-dióico (**151**), como mostra o Esquema 31.



Esquema 31 – Obtenção de **150** e **151** pela biotransformação de **149** pelo fungo *Chaetomium longirostre* (Shirane *et al.*, 1996)

Os resultados obtidos da pesquisa realizada na literatura mostraram que as classes de triterpenos mais estudadas em reações de biotransformação são lupano e oleanano, justificando assim a escolha dos triterpenos lupeol (**152**), betulinato de metila (**153**) e β -amirina (**154**) utilizados neste trabalho. Não foram encontrados estudos de biotransformação para o triterpeno da classe friedelano. Este fato motivou a utilização da friedelina (**155**) a fim de se observar o comportamento deste tipo de esqueleto frente à biotransformação.



Triterpenos da classe lupano e seus derivados são compostos de grande interesse, pois apresentam atividades biológicas como hepatoprotetores, antiinflamatórios, antiulcerogênicos, imunomoduladores, apresentam atividade antivirais e como agentes antineoplásicos; entre eles podemos citar o lupeol (**152**), o ácido betulínico e seu derivado, o betulinato de metila (**153**) (Tolstikova *et al.*, 2006).

Para o lupeol (**152**) destacam-se as seguintes atividades biológicas: inibição da HLE (Elastase leucocítica humana), supressão do crescimento das células de leucemia humana HL-60, devido à indução de apoptose e atividade contra as células humanas do carcinoma bronco pulmonar NSGLG-N6 (Tolstikova *et al.*, 2006).

O ácido betulínico e seus derivados apresentam uma grande gama de atividades biológicas, entre elas antiinflamatória, antiviral (inibição da replicação do HIV), antibacteriana (tanto contra bactérias Gram-positivas quanto contra Gram-negativas), antitumoral, bronco vasodilatadora, analgésico, antiespasmódica, antielmíntica e bloqueadora de receptores (Tolstikova *et al.*, 2006).

O triterpeno da classe oleanano, β-amirina, apresenta atividades antiinflamatória, gastroprotetora e contra lesões hepáticas causadas pelo paracetamol. Estas atividades estão associadas à mistura das suas formas α e β (Aragão *et al.* 2006). O triterpeno da classe friedelano, friedelina apresentam atividade antitumoral e inseticida (Moiteiro *et al.*, 2006).

1.2 – Biorremediação

Biorremediação é uma tecnologia que utiliza da habilidade de microrganismos ou outros membros da biosfera para restaurar e preservar a qualidade ambiental para todas as formas de vida de um ecossistema, especialmente a humana. Tem

sido sugerido que a tecnologia de biorremediação possa ser mais efetiva do que as técnicas térmicas e físico-químicas tradicionais correspondentes (Migid *et al.*, 2007).

A utilização de plantas, bactérias e fungos para os processos de biorremediação tem sido muito relatada ultimamente, principalmente o uso de fungos e bactérias devido ao seu grande potencial genético. Estes, por sua vez, podem ser isolados de ambientes altamente contaminados devido ao seu poder de adaptação a estas condições. Estes processos se dão pela utilização dos complexos enzimáticos destes microrganismos, pois geralmente íons metálicos podem ser absorvidos por meio de reações enzimáticas específicas (Srivastava & Thakur, 2006).

1.2.1 – Biorremediação de metais

O aumento da utilização de metais em processos industriais, como mineração, transformação de minérios e metalurgia, resultaram na geração de enormes quantidades de efluentes contendo grande quantidade de metais pesados e tóxicos e causando sérios problemas ambientais, principalmente para sua eliminação devido à sua natureza não-degradável (Ahluwalia & Goyal, 2007).

Os metais pesados são geralmente retirados de efluentes por processos químicos e físicos tais como precipitação química, cristalização, coagulação floculação, redução, troca iônica, ultrafiltração, eletrólise, eletrodialise, osmose reversa e adsorção a substâncias inorgânicas. Porém, quando as concentrações de metais estão entre 1 a 100 mg/L, estes métodos podem apresentar desvantagens, como a remoção incompleta de metais, a elevada necessidade de reagentes e energia, a geração de subprodutos ou resíduos tóxicos e custos elevados (Souza *et al.*, 2008).

Por outro lado, a biomassa fúngica tem recebido considerável atenção devido à sua grande capacidade de fixação de metais, podendo ser usada em processos de tratamento de efluentes que podem superar as resinas de troca iônica. Cálculos comparativos realizados com os dados provenientes de experimento de adsorção de cobre por biomassa fúngica, mostram que a eficiência do produto comercial Filtrasorb 400 foi superada 4 vezes pelo uso da biomassa de *Aspergillus niger* ou de *Cladosporium resinae*, 5 vezes por biomassa de *Penicillium spinulosum*, 8,3 vezes por biomassa de *Rhizopus arrhizus* e 12,7 vezes por biomassa de *Ganoderma*

lucidum. Outro estudo comparativo mostrou que as biomassas de *Mortierella ramanniana*, *Rhizopus sexualis*, *Zygorrhynchus heterogamus* e *Zygorrhynchus moelleri* superaram o carvão ativado, o Aberlite (Ionex) IRA-400, o carbonato de cálcio, a quitina e a celulose quanto à capacidade de adsorção de cádmio, enquanto a biomassa de *Agaricus bisporus*, *Aspergillus terreus*, *Penicillium capsulatum* e *Penicillium spp.* apresentaram rendimento inferior somente em relação ao carvão ativado (Souza *et al.* 2008).

O processo de biosorção e bioacumulação de metais por fungos pode ocorrer por vários mecanismos, incluindo troca iônica, quelação, adsorção, cristalização, transformação da valência, precipitação extra e intracelular e captação ativa. A acumulação dos metais em solução por fungos pode ser dividida em três categorias: (a) biosorção de íons metálicos sobre a superfície do fungo, (b) captação intracelular de íons metálicos, e (c) transformação química de íons metálicos. A biosorção pode ser realizada por biomassa viva ou morta (Leitão, 2009).

A parede celular pode agir como um permutador de cátions, devido à presença de cargas negativas provenientes de diferentes grupos funcionais, como por exemplo, carboxilas, fosfatos, aminas ou sulfidrilas. A parede celular dos fungos é rica em polissacarídeos e glicoproteínas, como mostra a Figura 04 (Leitão, 2009).

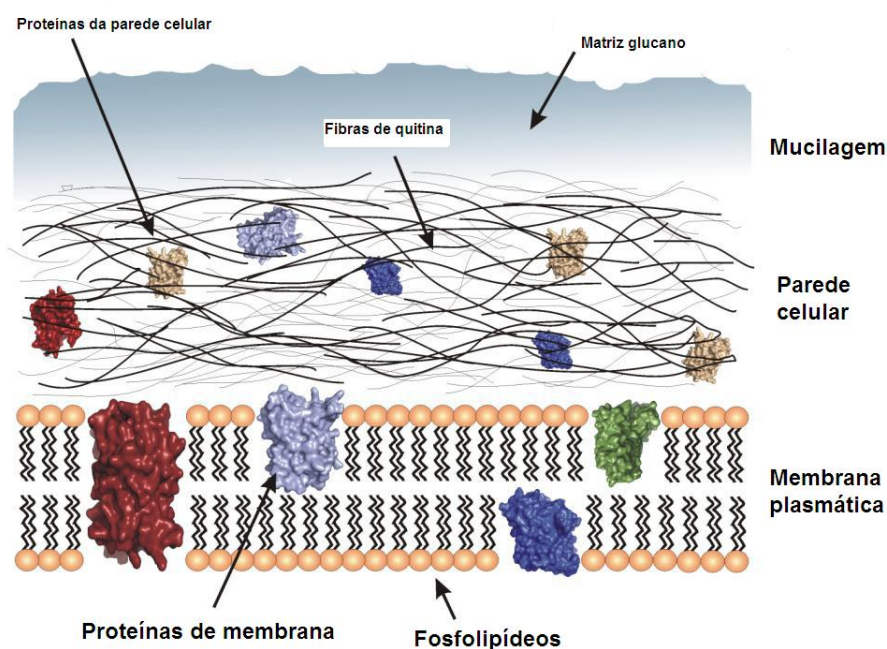


Figura 04 – Representação da parede celular fúngica
Adaptado de Leitão, 2009

A remoção de metais pesados a partir de soluções aquosas utilizando-se biomassas de fungos é considerada uma tecnologia alternativa e inovadora para a remoção destes poluentes, devido à sua abundância na natureza e também por serem uma fonte barata para a produção de biomassa (Ahluwalia & Goyal, 2007).

Dentre as biomassas fúngicas podem-se destacar aquelas dos gêneros *Penicillium*, *Rhizopus* e *Aspergillus* (Souza *et al.* 2008), como as mais utilizadas para a remoção de metais em soluções aquosas. A Tabela 02 (pag. 38) mostra alguns trabalhos encontrados na literatura que relatam a utilização de fungos destes gêneros em processos de biorremediação de metais pesados.

Neste trabalho foram utilizados oito espécies de *Penicillium* (*P. minioluteum*, *P. citrinum*, *P. janczewskii*, *P. funiculosun*, *P. pinophilum*, *P. sclerotiorum*, *P. janthinellum* e *P. brasilianum*) isolados de solo (Takahashi *et al.*, 2008) para avaliar a capacidade de absorção de metais em misturas binárias de níquel/cobre, lítio/cádmio e cobalto/chumbo. Também foi realizada uma avaliação utilizando-se o cromo com as oito espécies de *Penicillium* e com o fungo *Aspergillus niger* para determinar a capacidade de absorção do metal por estes fungos.

Estes metais são utilizados em vários processos industriais, resultando em grandes quantidades de resíduos, que possuem uma variedade de efeitos tóxicos tanto para o meio ambiente como para o homem. O cobre e o níquel possuem uma pequena toxicidade para o homem, provocando dermatites, doenças respiratórias, náuseas e vômitos. O cromo causa dermatite pelo contato e é também citado como um agente carcinogênico. O chumbo é muito tóxico ao homem causando diminuição do quociente intelectual, aumento da pressão arterial e danos nos rins, fígado e na fertilidade (Poggio *et al.*, 2009). O lítio é levemente tóxico e seu principal alvo é o sistema nervoso central (Aral & Vecchio-Dadus, 2008). O cobalto é tóxico em altas concentrações, induz a dermatoses por contato além dos danos causados pela radiação devido à sua utilização em indústrias nucleares (Ortega *et al.*, 2009).

Tabela 02 – Biomassas fúngicas utilizadas para a remoção de metais pesados

Fungo	Metais	Referências
<i>Aspergillus flavus</i>	Pb, Cu, Zn	Akar & Tunali, 2006 Faryal <i>et al.</i> , 2006
<i>Aspergillus foetidus</i>	Cr	Prasenjit & Sumathi, 2005
<i>Aspergillus fumigatus</i>	Zn	Faryal <i>et al.</i> , 2006
<i>Aspergillus niger</i>	Cd, Cu, Pb, Cr, As, Hg, Zn, Th, U	Dursun <i>et al.</i> , 2003 Júnior <i>et al.</i> , 2003 Kartal <i>et al.</i> , 2004 Kartal <i>et al.</i> , 2006 Karunasagar <i>et al.</i> , 2003 Kumar <i>et al.</i> , 2008 Liu <i>et al.</i> , 2006 Qazilbash <i>et al.</i> , 2006 Ren <i>et al.</i> , 2009 in press Srivastava & Thakur, 2006 Tsezos & Volesky, 1981
<i>Aspergillus sp.</i>	Cd e Cr	Ahmad <i>et al.</i> , 2005 Fukuda <i>et al.</i> , 2008
<i>Aspergillus sydony</i>	Cr	Kumar <i>et al.</i> , 2008
<i>Aspergillus terreus</i>	Ni, Cr, Fe, Th e U	Dias <i>et al.</i> , 2002 Tsezos & Volesky, 1981
<i>Penicillium canescens</i>	Cd, As e Hg	Say <i>et al.</i> , 2003
<i>Penicillium chrysogenum</i>	Cd, Cu, Pb, Th, U Zn e Cr	Holan & Volsky, 1995 Niu <i>et al.</i> , 1993 Pazouki <i>et al.</i> , 2007 Skowronski <i>et al.</i> , 2001 Su <i>et al.</i> , 2003 Tan & Cheng, 2003 Tsezos & Volesky, 1981
<i>Penicillium cyclopium</i>	Cu	Ianis <i>et al.</i> , 2006
<i>Penicillium digitatum</i>	Zn	Galun <i>et al.</i> , 1987
<i>Penicillium funiculosum</i>	Cu, Cr e As	Kartal <i>et al.</i> , 2006
<i>Penicillium italicum</i>	Mn, Fe, Ni e Co	Mendil <i>et al.</i> , 2008
<i>Penicillium janthinellum</i>	Cr	Kumar <i>et al.</i> , 2008
<i>Penicillium simplicissimum</i>	Cd, Zn e Pb	Fan <i>et al.</i> , 2008
<i>Penicillium pupurogenum</i>	Cr	Say <i>et al.</i> , 2004
<i>Penicillium sp.</i>	Co e Cr	Fukuda <i>et al.</i> , 2008 Pal <i>et al.</i> , 2006
<i>Penicillium spinulosum</i>	Cu e Zn	Townsley & Ross, 1985
<i>Rhizopus arrhizus</i> ou <i>Rhizopus oryzae</i>	Cu, Th, U, Zn, Cr,	Bhainsa & D'Souza, 2008 Prakasham <i>et al.</i> , 1999 Preetha & Viruthagiri, 2005 Subudhi & Kar, 2008 Tsezos & Volesky, 1981
<i>Rhizopus delemar</i>	Ni e Cu	Açikel & Alp, 2009 in press
<i>Rhizopus nigricans</i>	Cr	Bai & Abraham, 2002
<i>Rhizopus sp.</i>	Cr e Cd	Ahmad <i>et al.</i> , 2005
<i>Rhizopus oligosporus</i>	Cd	Aloysius <i>et al.</i> , 1999

A remoção de chumbo e cobre por biomassa de *Aspergillus flavus* foi relatado por Akar & Tunali (2006), sendo utilizada neste experimento a biomassa morta do fungo. O valor máximo da biosorção foi de 13,46 mg/g (quantidade de metal/grama de biomassa) de chumbo e de 10,82 mg/g de cobre em 2 horas de experimento. A remoção de zinco com a biomassa do fungo *A. flavus* e *A. fumigatus* foi relatada por

Faryal e colaboradores (2006); o resultado obtido para biosorção do Zn com a biomassa de *A. flavus* foi de 64,53% e, para a biomassa de *A. fumigatus*, foi de 88,00% em 30 minutos de experimento.

Prasenjit & Sumathi (2005) relataram a utilização de biomassa de *A. foitidos* em fase estacionária de crescimento, para a remoção de cromo, com remoção de 97,00% do cromo em 92 horas de experimento.

Dursun e colaboradores (2003) utilizaram o fungo *Aspergillus niger* para a remoção de cobre, chumbo e cromo; a biomassa do fungo mostrou-se capaz de remover 15,60 mg/g de cobre, 34,40 mg/g a 100,00 mg/dm³ de chumbo e 75,00 mg/dm³ de cromo do meio. Júnior e colaboradores (2003) utilizaram a biomassa do *A. niger* para a remoção de cádmio, utilizando o reciclo da biomassa e, nesse processo, observou-se, no primeiro ciclo, 84,00% de remoção e, no segundo ciclo, 76,40% de remoção do zinco. Kartal e colaboradores (2004) testaram a biomassa do *A. niger* para a remoção de cobre, cromo e arsênio. A biosorção do arsênio foi de 97,00%, a do cobre de 49,00%, e a do cromo de 55,00% após 10 dias de experimento. Em 2006, Kartal e colaboradores realizaram o mesmo experimento, entretanto acidificaram o meio utilizado e obtiveram resultados semelhantes ao estudo anterior. Karunasagar e colaboradores (2003) avaliaram o potencial da biomassa do *A. niger* para a remoção de mercúrio, sendo, o fungo, capaz de biosorver 80,00% do mercúrio do meio.

Liu e colaboradores (2006) testaram a biomassa de *A. niger* para remoção de zinco e cádmio. Após 24 horas, a biomassa foi capaz de remover 15,50 mg/g de cádmio e 23,70 mg/g de zinco. Qazilbash e colaboradores (2006) utilizaram duas cepas de *A. niger* (NP17 e NP18) para avaliarem o potencial de remoção de chumbo sendo utilizadas biomassas vivas e mortas dos fungos. A cepa do *A. niger* NP18 removeu 99,75% do chumbo em 80 minutos, utilizando-se a biomassa morta. Para a cepa do *A. niger* NP17, utilizando-se a biomassa viva, a porcentagem de remoção do chumbo foi de 96,37% em 30 minutos. Ren e colaboradores (2009) relatam que a produção de ácidos orgânicos por *A. niger* favorece a remoção dos metais cobre, cádmio, chumbo e zinco. Em um experimento realizado em duas etapas, na primeira verificou-se uma remoção de 56,00% para o cobre, 100,00% para o cádmio, 30,00% para o chumbo e de 19,00% para o zinco. Na segunda etapa, com o reciclo da

biomassa, verificou-se a remoção de 97,50% para o cobre, 99,20% para o cádmio, 26,00% para o chumbo e de 14,50% para o zinco. Srivastava & Thakur (2006) relataram a utilização de uma cepa de *A. niger* isolada de solo de uma siderúrgica para avaliarem o potencial de remoção de cromo. A biomassa do fungo removeu 75,00% do metal em 7 dias de experimento.

Kumara e colaboradores (2008) testaram o potencial de remoção de cromo de efluentes de uma indústria de galvanoplastia com as biomassas secas dos fungos *Aspergillus niger*, *Aspergillus sydoni* e *Penicillium janthinellum*. Após 60 minutos de experimento a biosorção do *A. niger* chegou a 91,03%, usando-se a biomassa de *A. sydoni* 87,95% do cromo foi absorvido, valor semelhante àquele observado para a biomassa do *P. janthinellum* (86,61%).

Tsezos & Volesky (1981) avaliaram o potencial de remoção de urânio e tório das biomassas de *Aspergillus niger*, *Aspergillus terreus*, *Penicillium chrysogenum* e *Rhizopus arrhizus*. A biomassa do fungo *A. terreus* removeu 1,00 mg/g de urânio e 8,00 mg/g do tório; a biomassa do fungo *A. niger* removeu 31,00 mg/g de urânio e 22,00 mg/g do tório, a biomassa do fungo *P. chrysogenum* removeu 165,00 mg/g de urânio e 142,00 mg/g de tório, a biomassa do fungo *R. arrhizus* removeu 180,00 mg/g de urânio e 185,00 mg/g do tório, sendo 20 vezes mais eficiente do que a resina IONEX IRA-400 (9,00 mg/g) e 2,3 vezes mais eficiente do que o carvão ativado (61,00 mg/g).

Ahmad e colaboradores (2005) testaram cepas de *Aspergillus* sp. e *Rhizopus* sp. isolados de efluentes industriais, para avaliarem o potencial de remoção de cromo e cádmio no meio, utilizando as biomassas secas dos fungos. *Aspergillus* sp removeu 6,20 mg/g do cromo e 2,30 mg/g do cádmio; o fungo *Rhizopus* sp. removeu 9,50 mg/g do cromo e 8,21 mg/g do cádmio, sendo esta biomassa a mais eficiente para a remoção dos metais estudados. Fukuda e colaboradores (2008) utilizaram as cepas de *Aspergillus* sp. N2 e *Penicillium* sp. N3, resistentes a cromatos, em um experimento realizado por 120 horas. O *Aspergillus* sp. N2 removeu 75,00% e o *Penicillium* sp. N3 removeu 35,00% do cromo. Quando o meio foi acidificado, o *Penicillium* sp. N3 removeu 93,00% do cromo.

Dias e colaboradores (2002) testaram a biomassa do fungo *Aspergillus terreus* imobilizada em poliuretano para avaliarem o potencial de remoção de ferro,

níquel e cromo de efluentes de uma metalúrgica. O valor de remoção para o ferro foi de 164,50 mg/g, 96,50 mg/g para o cromo e 19,60 mg/g para o níquel após 6 dias de experimento.

Say e colaboradores (2003) avaliaram o potencial de remoção dos metais cádmio, chumbo, mercúrio e arsênio com o fungo *Penicillium canescens*, relatando um valor máximo da biosorção para o arsênio de 26,40 mg/g, 54,80 mg/g para o mercúrio, 102,70 mg/g para o cádmio e de 213,20 mg/g para o chumbo após 4 horas. Quando misturados estes metais em concentrações iguais, em solução, a biosorção máxima foi de 2,00 mg/g para o arsênio, 5,80 mg/g para o mercúrio, 11,70 mg/g para o cádmio e de 32,10 mg/g para o chumbo.

Holan & Volesky (1995) testaram a biomassa do fungo *Penicillium chrysogenum* para avaliarem seu potencial na remoção de cádmio, chumbo e níquel, observando o valor máximo para a biosorção de 224,00 mg/g do chumbo, 56,00 mg/g de cádmio e 26,00 mg/g de níquel. Niu e colaboradores (1993) avaliaram o potencial de remoção do fungo *P. chrysogenum* para o chumbo; o valor máximo obtido foi de 66,00 mg/g do metal. Skowronski e colaboradores (2001) testaram a biomassa granulada do fungo *P. chrysogenum* para a remoção do chumbo, cádmio, zinco e cobre. Os valores máximos observados para a biosorção dos metais foram as seguintes: 96,00 mg/g para o chumbo, 21,50 mg/g para o cádmio, 13,00 mg/g para o zinco e 11,70 mg/g do cobre. Su e colaboradores (2003) avaliaram a biomassa do *P. chrysogenum* para a remoção do níquel, que variou entre 40,00-45,00 mg/g do metal. Tan & Cheng (2003) testaram a biomassa do *P. chrysogenum*, para a remoção dos metais cromo, níquel e zinco, relatando que o pré-tratamento da biomassa, com NaOH, 0,5 M, aumentou o valor da adsorção de 18,60 mg/g para 27,20 mg/g para o cromo, de 13,20 mg/g para 19,20 mg/g para o níquel e de 6,80 mg/g para 24,50 mg/g para o zinco.

Ianis e colaboradores (2006) relataram a capacidade de remoção de metais pelo fungo *P. cyclopium* chegando a 75,00% de biosorção do cobre.

Galun e colaboradores (1987) estudaram o potencial de remoção da biomassa do *Penicillium digitatum* com relação ao zinco, usando biomassa tratada com base e dimetilsulfóxido (DMSO). O valor da biosorção observado foi de 9,70 mg/g do zinco. Kartal e colaboradores (2006) estudaram o potencial de remoção da

biomassa do *Penicillium funiculosum* com relação aos metais cobre, cromo e arsênio em meio acidificado. Os valores máximos da biosorção foram de 97,00% para o cobre, 40,00% para o cromo e 85,00% do arsênio.

Mendil e colaboradores (2008) relataram a utilização da biomassa do fungo *Penicillium italicum* imobilizado em SEPHABEADS SP70 em coluna de vidro, técnica descrita como sendo um método eficiente para a biosorção de cádmio, cobalto, cobre, ferro, chumbo, manganês e níquel. Esta matriz pode ser utilizada por pelo menos 100 vezes sem perder suas propriedades de adsorção. Fan e colaboradores (2008) avaliaram o potencial de remoção dos metais cádmio, zinco e chumbo com o fungo *Penicillium simplicissimum*, encontrando um valor máximo de biosorção para o cádmio de 52,50 mg/g, 65,60 mg/g para o zinco e 76,90 mg/g para o chumbo. Say e colaboradores (2004) testaram a biomassa do fungo *Penicillium pupurogenum* para a remoção de cromo, relatando o valor máximo da biosorção de 36,50 mg/g após 4 horas de reação.

Pal e colaboradores (2006) utilizaram quatro cepas de *Penicillium* sp. isoladas de solo serpentino para avaliarem o potencial de remoção de cobalto; o experimento foi analisado em dois tempos (15 e 60 minutos) e os resultados estão resumidos na Tabela 03.

Tabela 03 – Resumo dos resultados dos experimentos usando quatro cepas de *Penicillium* sp. com o cobalto

Fungo	Biosorção (mg/g)	
	15 min	60 min
<i>Penicillium</i> sp. AND 104	651,20	882,40
<i>Penicillium</i> sp. SPS 102	648,70	761,80
<i>Penicillium</i> sp. SPS 106	776,10	813,20
<i>Penicillium</i> sp. CTS 402	738,80	775,30

Bhainsa & D'Souza (2008) avaliaram a biomassa do fungo *Rhizopus oryzae* para a remoção do cobre variando a temperatura de 21 a 55 °C. Os valores de biosorção observados foram de 19,40 a 43,70 mg/g, mostrando a relação da biosorção com a temperatura. Prakashan e colaboradores (1999) testaram a biomassa do *R. arrhizus* para remover cromo. O experimento foi realizado com a biomassa imobilizada e com a biomassa livre do fungo nos tempos de 2, 4, 6 e 8 horas; os resultados estão resumidos na Tabela 04 (pag. 43).

Tabela 04 – Resumo dos resultados dos experimentos usando biomassa imobilizada e livre do fungo *R. arrhizus* para remoção de cromo

Tempo	Biosorção (%)	
	Imobilizada	Livres
2	46,50	50,63
4	50,85	53,55
6	54,90	62,80
8	63,54	73,98

Subudhi & Kar (2008) avaliaram a biomassa de *R. arrhizus* em pH 5,5 na remoção de cobre e níquel. O experimento foi realizado com os metais separadamente e na forma de mistura binária, os valores de biosorção para os metais individualmente foi de 97,00% para o cobre e de 80,00% para o níquel. Na mistura binária a biosorção foi de 95,00% para o cobre e 55,00% para o níquel.

Açike & Alp (2009) testaram a biomassa do fungo *Rhizopus delemar* na remoção do cobre e níquel, relatando a biosorção de cobre (72,94%) e de 51,26% para o níquel. Bai & Abrahan (2002) testaram a biomassa do fungo *R. nigricans* na remoção do cromo, utilizando biomassa pré-tratada e não tratada. Os resultados observados para a biomassa pré-tratada, com NaOH e solução de amônia 0,01N e formaldeído (10% m/v), foi de 212,00 mg/g e de 119,00 mg/g para a biomassa não tratada. Aloysius e colaboradores (1999) testaram a biomassa imobilizada e livre do fungo *R. oligosporus* na remoção de cádmio, observando o valor de biosorção para a biomassa imobilizada de 34,25 mg/g e de 17,09 mg/g para a biomassa livre.

Capítulo II

Objetivos

2.1 – Objetivos

- Avaliar o potencial biotecnológico de alguns fungos da coleção de culturas do LaßB em biotransformações e biorremediações;
- Realizar a biotransformação, dos seguintes substratos: esteviosídeo (**60**), fujenal (**61**), *ent*-16-cauren-19-ol (**62**), lupeol (**152**), betulinato de metila (**153**), β -amirina (**154**) e friedelina (**155**) com os fungos *Mucor plumbeus* (**Lab 03**), *Beauveria bassiana* (**Lab 12**), *Rhizopus oryzae* (**Lab 16**), *Rhizopus stolonifer* (**Lab 18**), *Thamnostylum* sp (**Lab 32**) e *Lecanicillium muscarinium*;
- Testar a capacidade das biomassas dos fungos *Penicillium minioluteum* (**Lab 01**), *Penicillium citrinum* (**Lab 04**), *Penicillium janczewskii* (**Lab 05**), *Penicillium funiculosum* (**Lab 07**), *Penicillium pinophilum* (**Lab 13**), *Penicillium sclerotiorum* (**Lab 18**), *Penicillium janthinellum* (**Lab 21**), *Aspergillus niger* (**Lab 24**) e *Penicillium brasilianum* (**Lab 34**) para efetuarem a biorremediação de misturas binárias dos seguintes metais: níquel e cobre, lítio e cádmio, cobalto e chumbo e do cromo individualmente.

Capítulo III

Parte experimental

3.1 - Reagentes

Foram utilizadas as seguintes substâncias para biotransformação: esteviosídeo (Stevita Cristal[®], Steviafarma SA), betulinato de metila, β -amirina (purificados a partir de substratos de plantas anteriormente estudadas), friedelina e lupeol (cedidos pela Prof^a. Lucienir Pains Duarte, do Departamento de Química da UFMG), fujenal e kaurenol (obtidos de estudos anteriores pelo grupo de pesquisa). Os sais dos metais utilizados para as biorremediações eram das marcas Synth (Labsynth Produtos para Laboratórios Ltda., Diadema, SP, Brasil) e Vetec (Vetec Química Fina Ltda., Rio de Janeiro, RJ, Brasil).

3.2 - Solventes

Foram utilizados os seguintes solventes nos processos de extração, isolamento e purificação dos produtos obtidos: acetato de etila; n-hexano, diclorometano, clorofórmio, n-butanol e metanol das marcas Synth (Labsynth Produtos para Laboratórios Ltda., Diadema, SP, Brasil), Vetec (Vetec Química Fina Ltda., Rio de Janeiro, RJ, Brasil), CPQ (Cromatos Produtos Químicos Ltda., Diadema, SP, Brasil) e CAQ (Casa da Química Ind. e Com. Ltda., Diadema, SP, Brasil). Foram utilizados os seguintes solventes deuterados para obtenção dos espectros de RMN de ^1H e de ^{13}C : clorofórmio (CDCl_3), água (D_2O) e metanol (CD_3OD) das marcas Aldrich Chemical Company, Inc (Milwaukee, WI – USA) e Cambridge Isotope Laboratories Inc. (Andover, MA – USA).

3.3 – Cromatografia em camada delgada (CCD)

Foram utilizadas placas de vidro recobertas com sílica gel 60G em camadas de 0,25 mm de espessura (analítica) ou 0,50 mm de espessura (preparativa), previamente ativadas a 100 °C. Também foram utilizadas placas cromatográficas de polietileno cobertas com gel de sílica 60 F254 da marca Merck.

3.4 - Reveladores

3.4.1 – Solução de vanilina

Vanilina (1 g) foi dissolvida em 100 mL de uma solução contendo 45% de água, 45% de metanol e 10% de ácido sulfúrico concentrado (revelador geral). As

placas foram borifadas com esta solução e submetidas a aquecimento até o aparecimento das manchas na placa.

3.4.2 – Vapores de iodo

A placa foi colocada em uma cuba contendo cristais de iodo (revelador geral).

3.4.3 – Radiação ultravioleta

A placa foi analisada sob luz ultravioleta ($\lambda = 254 \text{ nm}$) (detecção de substâncias com grupos cromofóricos).

3.5 – Cromatografia em coluna (CC)

3.5.1 - Sílica gel 60 (70-230 Mesh) Merck

Foi utilizada sílica gel 60 (63 – 200 μm) para cromatografia em coluna com sílica da marca Merck. Os eluentes foram escolhidos por meio das análises por CCD do perfil cromatográfico das amostras.

3.5.2 - Sílica gel (230-400 Mesh) Merck

Foi utilizada sílica gel 60 (40 – 63 μm) para cromatografia em coluna com sílica do tipo “flash” da marca Merck. Os eluentes foram escolhidos por meio de análise em CCD do perfil cromatográfico das amostras.

3.5.3 – Alumina neutra

Foi utilizada alumina neutra (Macherey-Nagel GmbH & Co, Duren, Alemanha) para cromatografia em coluna. Os eluentes foram escolhidos por meio de análise em CCD do perfil cromatográfico das amostras.

3.6 – Cromatografia a gás

3.6.1 – Cromatografia a gás (CG)

As análises foram realizadas em cromatógrafo a gás modelo HP-5890 Series II. Condições de análise: Coluna HP-5, 25 m x 0,2 mm, 310 °C, programa de temperatura: 310 °C por 20 minutos, sendo usado H_2 como gás de arraste.

3.6.2 – Cromatografia a gás acoplada à espectrometria de massas (CG/EM)

As análises foram realizadas em um cromatógrafo a gás acoplado a espectrometria de massas da marca Varian modelo 4000 do Laboratório de Cromatografia do Setor de Medições Ambientais da Fundação Centro Tecnológico de Minas Gerais (CETEC). Condições de análise:

Cromatografia a gás

Volume de Injeção de 3,00 µL

Programa de temperatura do injetor

Temp. (°C)	Rate (°C/min)	Hold (min)	Total (min)
250	0	0,01	0,01
310	200	40,00	40,31

Fluxo constante de 1,0 mL/min de He

Coluna de 30 m x 0,25 mm x 0,25 µm de filme.

Fase estacionária 100% polidimetilsiloxano (HP-1).

Programa de temperatura de:

Temp. (°C)	Rate (°C/min)	Hold (min)	Total (min)
150	0	7,00	7,00
300	40,00	40,00	50,75

Espectrometria de Massas

Interface a 300 °C

Manifold a 45 °C

Ion trap 150°C

Programa de coleta de fragmentos

Segment: 1 Desligado

Running Time: 0.00 - 5.00 minutes

Ionization: Off

Segment: 2 Coleta

Running Time: 5.00 - 50.00 minutes

Ionization: IE a 70eV

Scan Type: Full

Mass Range: 25:700 - Faixa de massas coletada de 25 a 700 uma.

Target TIC: 20000 counts

Max Ion Time: 25000 μ s

Emission Current: 10 μ A

3.7 – Absorção atômica (AA)

As análises foram realizadas no aparelho modelo Hitachi Z – 8200 (Departamento de Química, ICEx, UFMG). Condições de análise:

Metal	Corrente (mA)	λ (nm)	f (nm)	Chama	Técnica
Cu	7,5	324,8	1,3	Ar-C ₂ H ₂	Chama
Ni	10,0	232,0	0,2	Ar-C ₂ H ₂	Chama
Cd	7,5	228,8	1,3	Ar-C ₂ H ₂	Chama
Pb	7,5	283,3	1,3	Ar-C ₂ H ₂	Chama
Co	12,5	240,7	0,2	Ar-C ₂ H ₂	Chama
Li	10,0	670,8	0,4	Ar-C ₂ H ₂	Emissão

3.8 – Ressonância magnética nuclear (RMN)

Os espectros de RMN de ¹H e de ¹³C, subespectros DEPT 135 e mapas de contornos (COSY, HMBC, HMQC e ROESY) foram obtidos em espectrômetros Bruker modelos DX-200 (200 MHz) e DRX-400 (400 MHz) linha AVANCE (Departamento de Química, ICEx, UFMG). Como referência interna foi usado o tetrametilsilano (TMS).

3.9 – Espectroscopia no ultravioleta (UV)

As análises foram realizadas nos espectrofotômetros B-380 da marca Micronal e Cary 50 Conc da marca Varian (Departamento de Química, ICEx, UFMG).

3.10 – Espectroscopia no infravermelho (IV)

Os espectros na região do infravermelho foram obtidos no equipamento Perkin Elmer Spectrum BX (Departamento de Química, ICEx, UFMG).

3.11 - Purificação dos materiais de partida fujenal (61), lupeol (152), betulinato de metila (153) e β - amirina (154)

Os substratos foram submetidos a diversas colunas para obtenção destes em estado de pureza adequado às análises estruturais e para as biotransformações, como exemplificado a seguir.

3.11.1 – Purificação do fujenal (61)

A amostra contendo o fujenal (61, 2,4 g) foi submetida a uma coluna filtrante com sílica gel, sendo coletadas 8 frações de 20 mL cada, utilizando como eluente o diclorometano. As frações coletadas foram analisadas por cromatografia em camada delgada de sílica e combinadas de acordo com o perfil cromatográfico.

3.11.2 – Purificação do lupeol (152)

A amostra contendo o lupeol (152, 300 mg) foi cromatografada em coluna de sílica gel, sendo coletadas 74 frações de 20 mL cada, utilizando para a eluição hexano e acetato de etila, em polaridades crescentes. As frações coletadas foram analisadas por cromatografia em camada delgada de sílica e combinadas de acordo com o perfil cromatográfico.

3.11.3 – Purificação do betulinato de metila (153)

A amostra contendo o éster betulínico (153, 500 mg) foi cromatografada em coluna de sílica gel, sendo coletadas 95 frações de 20 mL cada, utilizando para a eluição, hexano e acetato de etila, em polaridades crescentes. As frações coletadas foram analisadas por cromatografia em camada delgada de sílica e combinadas de acordo com o perfil cromatográfico.

3.11.4 – Purificação da β -amirina (154)

A amostra contendo a β -amirina (154, 500 mg) foi cromatografada em coluna de sílica gel, sendo coletadas 85 frações de 20 mL cada, utilizando, para a eluição, hexano e acetato de etila, em polaridades crescentes. As frações coletadas foram analisadas por cromatografia em camada delgada de sílica e combinados de acordo com o perfil cromatográfico.

3.12 - Condições microbiológicas

3.12.1 - Manutenção dos microrganismos

A manutenção dos microrganismos foi feita por meio de subculturas sucessivas em meio sólido ágar batata dextrosado (**ABD**) da marca BioBrás (BioBrás S.A. – Montes Claros, MG - Brasil), em tubos inclinados ou placas de Petri.

3.12.2 - Microrganismos utilizados

Os fungos utilizados foram:

- | | |
|-------------------------------------|----------|
| 1) <i>Penicillium minioluteum</i> | (LAB 01) |
| 2) <i>Mucor plumbeus</i> | (LAB 03) |
| 3) <i>Penicillium citrinum</i> | (LAB 04) |
| 4) <i>Penicillium janczewskii</i> | (LAB 05) |
| 5) <i>Penicillium funiculosun</i> | (LAB 07) |
| 6) <i>Beauveria bassiana</i> | (LAB 12) |
| 7) <i>Penicillium pinophilum</i> | (LAB 13) |
| 8) <i>Rhizopus oryzae</i> | (LAB 16) |
| 9) <i>Penicillium sclerotiorum</i> | (LAB 18) |
| 10) <i>Penicillium janthinellum</i> | (LAB 21) |
| 11) <i>Rhizopus stolonifer</i> | (LAB 22) |
| 12) <i>Aspergillus niger</i> | (LAB 24) |
| 13) <i>Thamnostylum sp.</i> | (LAB 32) |
| 14) <i>Penicillium brasilianum</i> | (LAB 34) |
| 15) <i>Aspergillus flavus</i> | (LAB 43) |
| 16) <i>Lecanicillium muscarinum</i> | |

Os fungos listados pertencem ao patrimônio do Laboratório de Biotecnologia e Bioensaios (**LaßB**) do Departamento de Química da Universidade Federal de Minas Gerais.

3.12.3 - Meios de cultura

Todos os reagentes utilizados na preparação dos meios de culturas foram das marcas BioBrás (BioBrás S.A., Montes Claros, MG – Brasil), Sigma (Sigma Chemical

Co., St. Louis , MO – USA) e Synth (Labsynth produtos para laboratórios Ltda., Diadema, SP – Brasil).

3.12.3.1 – Meios de cultura líquidos

3.12.3.1.1 – Meios líquidos para transformações microbiológicas

3.12.3.1.1.1 – Meio líquido geral 01 (ML01)

Os fungos *Beauveria bassiana*, *Mucor plumbeus*, *Rhizopus oryzae* e *Rhizopus stolonifer* foram cultivados em meio de cultura líquido contendo:

D –Glicose	20,00 g/L
Peptona	10,00 g/L
Extrato de levedura	5,00 g/L

3.12.3.1.1.2 – Meio líquido geral 02 (ML02)

O fungo *Mucor plumbeus* também foi cultivado em meio de cultura líquido contendo:

D–Glicose	30,00 g/L
Corn steep liquor (licor de milho)	5,00 g/L
Nitrato de sódio	2,00 g/L
Cloreto de potássio	0,50 g/L
Sulfato de magnésio	0,50 g/L
Sulfato ferroso	0,02 g/L

3.12.3.1.1.3 – Meio líquido geral 03 (ML03)

O fungo *Mucor plumbeus* também foi cultivado em meio de cultura líquido contendo:

D–Glicose	30,00 g/L
Corn steep liquor (licor de milho)	10,00 g/L
Cloreto de potássio	0,50 g/L
Sulfato de magnésio	0,50 g/L
Sulfato ferroso	0,01 g/L
Fosfato monobásico de potássio	1,00 g/L
Tartarato de amônia	2,00 g/L
pH	5,00

3.12.3.1.1.4 – Meio líquido específico para o gênero *Mucor* (ML04)

O fungo *Mucor plumbeus* também foi cultivado em meio de cultura líquido contendo:

D-Glicose	40,00 g/L
Asparagina	2,00 g/L
Fosfato monobásico de potássio	0,50 g/L
Sulfato de magnésio	0,25 g/L
Tiamina	0,50 g/L
pH	6,00

3.12.3.1.1.5 – Meio líquido geral modificado (ML05)

Os fungos *Beauveria bassiana*, *Rhizopus oryzae* e *Rhizopus stolonifer* também foram cultivados em meio de cultura líquido contendo:

Esteviosídeo	0,30 g/L
Peptona	10,00 g/L
Extrato de levedura	5,00 g/L

3.12.3.1.1.6 – Meio líquido específico para o fungo *Lecanecillium muscarinium* (ML06)

O fungo *Lecanecillium muscarinium* foi cultivado em meio de cultura líquido contendo:

D-Glicose	240,00 g/L
Fosfato de potássio dibásico	4,80 g/L
Sulfato de magnésio	2,40 g/L
Cloreto de potássio	4,80 g/L
Glicina	4,80 g/L
Solução de elementos traço	4,80 mL/L

3.12.3.1.1.7 – Meio líquido específico para o fungo *Thamnsostylum* sp. (ML07)

Os fungos *Thamnsostylum* sp. foi cultivado em meio de cultura líquido contendo:

D-Glicose	30,00 g/L
Corn steep liquor (licor de milho)	10,00 g/L
Fosfato de potássio monobásico	2,00 g/L

Fosfato de potássio dibásico	1,00 g/L
Nitrato de sódio	2,00 g/L
Cloreto de potássio	0,50 g/L
Sulfato de magnésio hepta-hidratado	0,50 g/L
Sulfato ferroso hepta-hidratado	0,02 g/L

3.12.3.2 – Meio líquido para crescimento de *Penicillium* sp. (ML08)

Os fungos *Penicillium minioluteum*, *Penicillium citrinum*, *Penicillium janczewskii*, *Penicillium funiculosum*, *Penicillium pinophilum*, *Penicillium sclerotiorum*, *Penicillium janthinellum* e *Penicillium brasilianum* foram cultivados em meio de cultura cuja composição foi:

D–Glicose	20,00 g/L
Peptona	5,00 g/L
Fosfato de potássio dibásico	1,00 g/L
Sulfato de magnésio hepta-hidratado	0,50 g/L
Cloreto de potássio	5,00 g/L

3.12.3.3 – Meios líquidos para biorremediação

3.12.3.3.1 – Meio líquido para biorremediação (ML09)

Os fungos *Aspergillus niger*, *Penicillium minioluteum*, *Penicillium citrinum*, *Penicillium janczewskii*, *Penicillium funiculosum*, *Penicillium pinophilum*, *Penicillium sclerotiorum*, *Penicillium janthinellum* e *Penicillium brasilianum* foram cultivados em meio de cultura Czapek-Dox Broth cuja composição foi:

Sulfato ferroso	0,01 g/L
Sulfato de manganês	0,50 g/L
Cloreto de potássio	0,50 g/L
Fosfato de potássio dibásico	1,00 g/L
Nitrato de sódio	3,00 g/L
Sacarose	30,00 g/L
pH	7,40

3.12.3.4 – Meio sólido ágar batata dextrosado (ABD)

O meio sólido ágar batata dextrosado (ABD) foi preparado da seguinte forma:

Ágar batata dextrosado

39 g/L

Todos os meios de cultura foram esterilizados em autoclave por 120 °C por 15 minutos.

3.12.4 - Preparo das pré-culturas dos fungos

Para cada uma das reações foi preparada uma pré-cultura dos fungos no meio líquido apropriado (**ML01, ML02, ML03, ML04, ML05, ML06, ML07, ML08 e ML09**).

Os fungos foram inoculados aos meios de cultura líquidos pela retirada de um pequeno fragmento do meio de cultura sólido usando-se uma alça do tipo agulha, em forma de “L”, sendo posteriormente incubados à temperatura ambiente sob agitação orbital de 120 rpm.

3.12.5 – Preparo das suspensões de esporos do fungo *Penicillium sp.* e contagem de esporos com a câmara de Neubauer

3.12.5.1 – Preparos das suspensões de esporos

As suspensões de esporos dos fungos *P. minioluteum*, *P. citrinum*, *P. janczewskii*, *P. funiculosum*, *P. pinophilum*, *P. sclerotiorum*, *P. janthinellum* e *P. brasilianum* foram preparadas pela adição de 20 mL de água destilada estéril contendo Tween 80 na proporção de 0,5% (m/v) ao tubo contendo o fungo a ser utilizado, sendo este submetido à agitação manual para uma eficiente extração dos esporos.

3.12.5.2 – Contagem de esporos com a câmara de Neubauer

A determinação da quantidade de esporos por mL das suspensões foi determinada com o auxílio de uma câmara de Neubauer (Figura 05, pag. 57) que é composta por uma lâmina de vidro fina com duas áreas de contagem (uma de cada lado da Câmara), cada uma possuindo 0,1 mm de profundidade. Cada câmara é dividida em 9 quadrados grandes (Figura 05 – a, pag. 57), delimitados por três linhas brancas. O quadrado grande central é subdividido em 25 quadrados médios (Figura 05 – b, pag. 57). Estes 25 quadrados são novamente subdivididos em 16 quadrados

3.13 – BIOTRANSFORMAÇÕES

3.13.1 – Procedimento geral

Foram preparados frascos em quantidade suficiente para cada experimento em diversas condições, como resumido na Tabela 05.

Tabela 05 – Quantidade de frascos e condições por experimento

Item	Substrato	Quantidade	Meio de cultura	Volume (mL)	Concentração do substrato (mg/mL)
3.13.2	Esteviosídeo (<u>60</u>)	6	ML01	200	30
3.13.2	Esteviosídeo (<u>60</u>)	6	ML05	200	30
3.13.3	Esteviosídeo (<u>60</u>)	8	ML05	200	30
3.13.4	Fujenal (<u>61</u>)	24	ML07	200	20
3.13.5	<i>Ent</i> -16-cauren-19-ol (<u>62</u>)	23	ML07	200	12,2
3.13.6	Lupeol (<u>152</u>)	24	ML01	200	20
3.13.7	Lupeol (<u>152</u>)	24	ML04	200	29,2
3.13.8	Lupeol (<u>152</u>)	24	ML01	200	37,5
3.13.9	Betulinato de metila (<u>153</u>)	11	ML01	200	20
3.13.10	β -amirina (<u>154</u>)	24	ML06	200	20
3.13.11	Friedelina (<u>155</u>)	3	ML01	200	20
3.13.11	Friedelina (<u>155</u>)	3	ML02	200	20
3.13.11	Friedelina (<u>155</u>)	3	ML03	200	20
3.13.11	Friedelina (<u>155</u>)	3	ML04	200	20
3.13.12	Friedelina (<u>155</u>)	24	ML01	200	20

As pré-culturas dos fungos foram inoculadas aos meios de culturas e estes foram colocados em uma incubadora, à temperatura ambiente, sob agitação de 120 rpm.

Após um período de 48 horas, 1 mL de uma solução contendo o substrato foi adicionada ao meio de cultura. Este procedimento foi realizado em capela de fluxo laminar previamente esterilizada com etanol 70% e após incidência de luz ultravioleta por 15 minutos.

O material dos experimentos foi filtrado a vácuo para remoção dos micélios e a fase aquosa foi extraída com acetato de etila (3 x 50 mL). Os micélios dos fungos

foram lavados com acetato de etila para uma maior remoção de possíveis substâncias que pudessem ficar aderidas ao micélio. As fases orgânicas foram agrupadas e secadas com sulfato de magnésio anidro, filtradas e concentradas sob pressão reduzida em evaporador rotativo

3.13.2 - Biotransformação do substrato esteviosídeo (60) com o fungo *Rhizopus oryzae* (LAB 16)

O experimento foi realizado por um período de 30 dias. Nos seguintes tempos (em dias): 5, 10, 15, 20, 25 e 30, foi retirado um frasco. Cada experimento foi analisado por cromatografia em camada delgada utilizando-se padrões dos produtos esperados.

3.13.3 - Biotransformação do substrato esteviosídeo (60) com os fungos *Beauveria bassiana* (LAB 12), *Rhizopus oryzae* (LAB 16) e *Rhizopus stolonifer* (LAB 22)

Os frascos foram distribuídos da seguinte maneira:

Controle	2 frascos
<i>Beauveria bassiana</i>	2 frascos
<i>Rhizopus oryzae</i>	2 frascos
<i>Rhizopus stolonifer</i>	2 frascos

O controle da reação era constituído somente pelo meio de cultura **ML 05**, tendo sido usado para verificar se os demais componentes do meio poderiam modificar o substrato.

O experimento foi realizado por um período de 5 dias. Cada experimento foi analisado por cromatografia em camada delgada utilizando-se padrões dos produtos esperados, mostrando a presença de **63** e **64** em todos os experimentos.

3.13.4 – Biotransformação do fujenal (61) com o fungo *Thamnsotylum sp.* (LAB 32)

O experimento foi realizado por um período de 15 dias. O extrato resultante (774,5 mg) foi submetido à cromatografia em coluna de sílica, sendo empregados os seguintes eluentes: n-hexano, n-hexano:acetato de etila (polaridades crescentes) e metanol. Foram coletadas 100 frações de 150 mL, sendo agrupadas as frações 16 a

22 (**G1-1**, 57,8 mg), eluídas com os seguintes eluentes hexano:acetato de etila (9:1 v/v) e hexano:acetato (8,5:1,5 v/v). O grupo **G1-1** (57,8 mg) foi submetido a uma segunda coluna cromatográfica do tipo “flash” isocrática onde foi empregado como eluente: hexano:acetato de etila (7:3 v/v). Foram coletadas 36 frações de 10 mL, sendo agrupadas as frações de 05 a 11 (**G2-1**, 25,8 mg). O grupo **G2-1** (25,8 mg) foi submetido a uma terceira coluna cromatográfica do tipo “flash” onde foi empregado como eluente: n-hexano : acetato de etila (85:15 v/v); foram coletadas 35 frações de 10 mL, sendo agrupadas as frações de 12 a 20 (**G3-1**, 18,2 mg). O grupo **G3-1** (18,2 mg) foi submetido a uma quarta coluna cromatográfica do tipo “flash” onde foi empregado como eluente: hexano:isopropanol (85:15 v/v). Foram coletadas 40 frações de 10 mL, sendo agrupadas as frações de 09 a 15 (**G4-1**, 16,4 mg). O **G4-1** (16,4 mg) foi submetido a uma quinta coluna cromatográfica do tipo “flash” onde foi empregado o seguinte eluente: hexano:diclorometano (85:15 v/v), foram coletadas 70 frações de 10 mL, sendo agrupadas as frações de 51 a 66 (**G5-1**, 6,6 mg). O grupo **G5-1** foi submetido à análise por RMN de ^1H e de ^{13}C , sendo identificado com o ergosterol (**156**).

3.13.5 – Biotransformação do *ent*-16-cauren-19-ol (62**) pelo fungo *Thamnosotylum* sp. (LAB 32)**

O experimento foi realizado por um período de 15 dias. O extrato resultante (634,2 mg) foi submetido à cromatografia em coluna de sílica, sendo empregados os seguintes eluentes: n-hexano, n-hexano : acetato de etila (polaridades crescentes), acetato de etila e metanol, sendo coletadas 117 frações de 200 mL. Pela análise em cromatografia em camada delgada de sílica gel observou-se a presença de misturas muito complexas e nenhum produto foi isolado.

3.13.6 – Biotransformação lupeol (152**) pelo fungo *Beauveria bassiana* (LAB 12)**

O experimento foi realizado por um período de 15 dias. O extrato resultante (874,7 mg) foi submetido à análise em cromatografia em camada delgada de sílica gel e observou-se somente a presença do lupeol (**152**).

3.13.7 – Biotransformação do lupeol (152) pelo fungo *Mucor plumbeus* (LAB 03) no meio líquido ML04

O experimento foi realizado por um período de 15 dias. O extrato resultante (1,07 g) foi submetido à cromatografia em coluna de sílica, sendo empregados os seguintes eluentes: n-hexano, diclorometano, diclorometano:acetato de etila (9:1 v/v) e metanol. Foram coletadas 33 frações de 250 mL, sendo agrupadas as frações 14 a 18 (**G1-2**, 15,7 mg), obtidas com eluição de diclorometano:acetato de etila (9:1 v/v). O grupo **G1-2** (15,7 mg) foi submetido a uma segunda coluna cromatográfica do tipo “flash”, isocrática, onde foi empregado o eluente hexano:acetato de etila (7:3 v/v). Foram coletadas 40 frações de 9 mL, sendo agrupadas as frações de 16 a 18 (**G2-2**, 1,3 mg). O grupo **G2-2** foi submetido à análise por RMN de ^1H e de ^{13}C , mas os espectros de RMN obtidos para a amostra não colaboraram para a elucidação da estrutura da substância obtida, pois foi observado somente um sinal intenso de uma impureza em δ_{H} 1,27.

3.13.8 – Biotransformação do lupeol (152) pelo fungo *Mucor plumbeus* (LAB 03)

O experimento foi realizado por um período de 15 dias. O extrato resultante (2,43 g) foi submetido à cromatografia em coluna de sílica gel, sendo empregados os seguintes eluentes: diclorometano, diclorometano:acetato de etila (9:1 v/v) e acetato de etila; foram coletadas 75 frações de 250 mL, sendo agrupadas as frações 16 a 70 (**G1-3**, 302,5 mg), obtidas usando diclorometano e diclorometano:acetato de etila (9:1 v/v). O grupo **G1-3** (302,5 mg) foi submetida a uma segunda coluna cromatográfica de sílica gel, onde foram empregados os seguintes eluentes: hexano e hexano:acetato de etila (9,5:0,5 v/v). Foram coletadas 102 frações de 40 mL, sendo agrupadas as frações de 11 a 102 (**G2-3**, 9,5 mg). O grupo **G2-3** foi submetido a uma terceira coluna cromatográfica do tipo “flash”, isocrática, com o seguinte eluente: hexano:acetato de etila (8:2 v/v). Foram coletadas 45 frações de 9 mL, sendo agrupadas as frações de 07 a 12 (**G3-3**, 4,3 mg). O grupo **G3-3** foi submetido à análise por RMN de ^1H e de ^{13}C e permitiu a identificação do β -sitosterol (157).

3.13.9 – Biotransformação do betulinato de metila (153) pelo fungo *Mucor plumbeus* (LAB 03)

O experimento foi realizado por um período de 18 dias. O extrato resultante (748,4 mg) foi submetido à cromatografia em coluna de sílica gel, sendo empregados os seguintes eluentes: n-hexano e n-hexano:acetato de etila (9,5:0,5 v/v), foram coletadas 35 frações de 50 mL, sendo agrupadas as frações 06 a 35 (**G1-4**, 32,5 mg), obtidas eluindo-se com n-hexano:acetato de etila (9,5:0,5 v/v). O grupo **G1-4** (32,5 mg) foi submetido a uma segunda coluna cromatográfica do tipo “flash”, isocrática, sendo empregado os eluentes hexano e hexano:acetato de etila (9,5:0,5 v/v). Foram coletadas 69 frações de 10 mL, sendo agrupadas as frações de 39 a 59 (**G2-4**, 3,9 mg). O grupo **G2-4** foi submetido à análise por RMN de ^1H e de ^{13}C e espectrometria de massas, sendo identificada a substância acetato de (1S,5bS,7R,7aS,8R,9S,11aR)-7-hidroxi-1-isopropil-5b,7a,8,11a-tetrametil- 2, 3, 3a, 5a, 5b, 6, 7, 7a, 8, 9, 10, 11, 11a, 13b- tetradecahidro-1H- ciclopenta[a]chrisen-9-il (158).

3.13.10 – Biotransformação da β -amirina (154) pelo fungo *Lecanicillium muscarinium*

O experimento foi realizado por um período de 15 dias. O extrato resultante (1,23 g) foi submetido à cromatografia em coluna de sílica gel, sendo empregados os seguintes eluentes: n-hexano, n-hexano:acetato de etila (9,5:0,5 v/v), n-hexano:acetato de etila (9:1 v/v), n-hexano:acetato de etila (8,5:1,5 v/v), n-hexano:acetato de etila (8:2 v/v), n-hexano:acetato de etila (6:4 v/v) e metanol, foram coletadas 50 frações de 50 mL, sendo agrupadas as frações 15 a 17 (**G1-5**, 82,4 mg), eluídas com n-hexano:acetato de etila (8:2 v/v). O grupo **G1-5**, 82,4 mg) foi submetido a uma segunda coluna cromatográfica de sílica gel, onde foram empregados os seguintes eluentes: n-hexano, n-hexano:acetato de etila (9,5:0,5 v/v), n-hexano:acetato de etila (9:1 v/v), n-hexano:acetato de etila (8,5:1,5 v/v), n-hexano:acetato de etila (8:2 v/v). Foram coletadas 16 frações de 50 mL, sendo agrupadas as frações de 06 a 07 (**G2-5**, 45,8 mg) eluídas com n-hexano:acetato de etila (8,5:1,5 v/v). O grupo **G2-5** (45,8 mg) foi submetido a uma terceira coluna cromatográfica em alumina neutra, onde foi empregado os seguintes eluentes: n-hexano:clorofórmio (8:2 v/v) a clorofórmio, foram coletadas 17 frações de 5 mL,

sendo agrupado as frações de 01 a 12 (**G3-5**, 30,5 mg), na seguinte eluição: n-hexano:clorofórmio (8:2 v/v) e clorofórmio. O grupo **G3-5** foi submetido a uma quarta coluna cromatográfica de sílica gel, sendo empregados os seguintes eluentes: n-hexano:clorofórmio (1:1 v/v), clorofórmio e clorofórmio:acetona (9,5:0,5 v/v). Foram coletadas 105 frações de 9 mL, sendo agrupadas as frações de 100 a 105 (**G4-5**, 13,9mg). O grupo de frações **G4-5** foi submetido à análise por RMN de ^1H e de ^{13}C e espectrometria de massas, sendo identificada como uma mistura das substâncias 3 β -hidroxi-olean-12-en-11-ona (**159**) e óxido de 11 α , 12 α -taraxerol (**160**).

3.13.11 – Biotransformação da friedelina (**155**) pelo fungo *Mucor plumbeus* (LAB 03) nos meios de cultura ML01, ML02, ML03 e ML04 monitorada por cromatografia gasosa

Os frascos foram distribuídos da seguinte maneira:

ML 01 + friedelina	(Controle positivo)
ML 01 + fungo	(Controle negativo)
ML 01 + fungo + friedelina	
ML 02 + friedelina	(Controle positivo)
ML 02 + fungo	(Controle negativo)
ML 02 + fungo + friedelina	
ML 03 + friedelina	(Controle positivo)
ML 03 + fungo	(Controle negativo)
ML 03 + fungo + friedelina	
ML 04 + friedelina	(Controle positivo)
ML 04 + fungo	(Controle negativo)
ML 04 + fungo + friedelina	

Os controles da reação foram divididos em dois, os controles positivos, constituídos pelos meios líquidos contendo somente a friedelina. Este controle permitiu verificar se havia atividade dos componentes dos meios de cultura sobre o substrato. Os controles negativos eram constituídos pelos meios de líquidos contendo somente o fungo, para verificar a presença de substâncias provenientes da biossíntese fúngica.

O experimento foi realizado por um período de 14 dias. Os extratos resultantes foram submetidos à cromatografia gasosa para análise dos resultados.

3.13.12 – Biotransformação da friedelina (155) pelo fungo *Mucor plumbeus* (LAB 03)

O experimento foi realizado por um período de 10 dias. O extrato resultante (751,8 g) foi submetido à cromatografia em coluna de sílica gel, sendo empregados os seguintes eluentes: n-hexano:clorofórmio (3:7 v/v), n-hexano:clorofórmio (2:8 v/v), clorofórmio, clorofórmio: acetato de etila (7:3 v/v), clorofórmio:acetato de etila (5:5 v/v) e acetato de etila. Foram coletadas 130 frações de 50 mL, sendo agrupadas as frações 51 a 65 (**G1-6**, 93,3 mg), eluídas com n-hexano:clorofórmio (2:8 v/v) e clorofórmio. As frações 66 a 80 (**G2-6**, 112,2 mg), foram eluídas com clorofórmio e clorofórmio:acetato de etila (7:3 v/v), assim como as frações 81 a 93 (**G3-6**, 281,9 mg). O grupo **G1-6** (93,3 mg) foi identificado como sendo a friedelina (155) pela comparação por cromatográfica em camada delgada de sílica gel com o material de partida. O grupo **G2-6** (112,2 mg) foi submetido a uma segunda coluna cromatográfica de sílica gel, onde foram empregados os seguintes eluentes: n-hexano:acetato de etila (97:3 v/v) e n-hexano:acetato de etila (95:5 v/v). Foram coletadas 18 frações de 20 mL, sendo agrupadas as frações 06 a 09 (**G4-6**, 4,4 mg), eluídas com n-hexano:acetato de etila (97:3 v/v). O grupo de frações **G4-6** foi submetido à análise por RMN de ^1H e de ^{13}C , sendo obtido 3 β -friedelinol (163). O grupo **G3-6** (281,9 mg) resultou em uma mistura de substâncias que não foram possíveis de serem separadas por cromatografia em coluna de sílica gel.

3.14 - BIORREMEDIAÇÃO

3.14.1 – Teste de concentração inibitória do crescimento de oito espécies de *Penicillium* com os metais níquel, cobre, lítio, cádmio, cobalto, chumbo e cromo.

Foi realizado um teste para se determinar a concentração inibitória do crescimento, frente aos metais níquel, cobre, lítio, cádmio, cobalto, chumbo e cromo para os seguintes fungos: *P. minioluteum*, *P. citrinum*, *P. janczewskii*, *P. funiculosum*, *P. pinophilum*, *P. sclerotiorum*, *P. janthinellum* e *P. brasilianum*. Foram

preparados 336 tubos com 10 mL do meio de cultura **ML09**, sendo estes divididos da seguinte forma:

- 56 tubos contendo os metais na concentração de 50 µg/mL, sendo divididos em 8 grupos de 7 tubos, um grupo para cada fungo e um tubo de cada grupo para cada metal;
- 56 tubos contendo os metais na concentração de 150 µg/mL, sendo divididos em 8 grupos de 7 tubos, um grupo para cada fungo e um tubo de cada grupo para cada metal;
- 56 tubos contendo os metais na concentração de 250 µg/mL, sendo divididos em 8 grupos de 7 tubos, um grupo para cada fungo e um tubo de cada grupo para cada metal;
- 56 tubos contendo os metais na concentração de 350 µg/mL, sendo divididos em 8 grupos de 7 tubos, um grupo para cada fungo e um tubo de cada grupo para cada metal;
- 56 tubos contendo os metais na concentração de 450 µg/mL, sendo divididos em 8 grupos de 7 tubos, um grupo para cada fungo e um tubo de cada grupo para cada metal;
- 56 tubos contendo os metais na concentração de 500 µg/mL, sendo divididos em 8 grupos de 7 tubos, um grupo para cada fungo e um tubo de cada grupo para cada metal;

Foi preparada uma suspensão de esporos de cada um dos oito fungos, pela adição de água destilada estéril contendo Tween 80 na proporção de 0,5% (m/v) às culturas dos fungos em fase de esporulação, seguida por agitação manual para a separação dos esporos. A quantidade de esporos presentes em cada suspensão foi determinada por contagem em câmara de Neubauer. Com o auxílio de uma pipeta automática, 1 mL da suspensão contendo os esporos dos fungos foi coletado e inoculado em cada um dos tubos correspondentes contendo o meio de cultura **ML09**. Os tubos foram mantidos em temperatura ambiente sem agitação por 4 dias. Após este período o experimento foi analisado.

3.14.2 - Biorremediação dos metais níquel, cobre, lítio, cádmio, chumbo e cobalto por oito espécies de *Penicillium* em meio de cultura

Foi utilizado o meio de cultura **ML08** para a biorremediação dos metais com as oito espécies de *Penicillium* (*P. minioluteum*, *P. citrinum*, *P. janczewskii*, *P. funiculosum*, *P. pinophilum*, *P. sclerotiorum*, *P. janthinellum* e *P. brasilianum*). Foram preparados 35 frascos, cada um contendo 200 mL do meio de cultura **ML08**, sendo estes separados da seguinte maneira:

- 24 frascos foram usados para a biorremediação dos metais;
- 8 frascos foram usados como brancos negativos (meio + fungos);
- 3 frascos foram usados como brancos positivos (meio + metais).

Foi preparada uma suspensão de esporos dos oito fungos, pela adição de água destilada estéril contendo Tween 80 na proporção de 0,5% (m/v) às culturas dos fungos em fase de esporulação, seguida por agitação manual para a separação dos esporos. A quantidade de esporos presentes em cada suspensão foi determinada por contagem em câmara de Neubauer. Com o auxílio de uma pipeta automática, 1 mL da suspensão contendo os esporos dos fungos foi coletado e inoculado em cada um dos frascos correspondentes contendo o meio de cultura **ML08**.

Foram preparadas três soluções estoque nas seguintes condições:

Concentração de cada metal	
1ª Solução estoque (níquel + cobre)	20 mg/mL
2ª Solução estoque (lítio + cádmio)	20 mg/mL
3ª Solução estoque (cobalto + chumbo)	20 mg/mL

Adicionou-se 1 mL de cada uma das soluções estoque das misturas binárias dos metais citados nos frascos correspondentes, levando a uma concentração final de cada um dos metais no experimento de 100 µg/mL.

O experimento foi realizado por um período de três dias. Nos seguintes tempos (em horas): 0, 24, 48 e 72, foram retiradas alíquotas de 20 mL de cada frasco e o material dos experimentos foi filtrado a vácuo para remoção dos micélios

da fase aquosa. Em seguida retirou-se uma alíquota de 5 mL da fase aquosa de cada experimento e adicionaram-se 5 mL de ácido nítrico concentrado em cada uma das alíquotas, resultando em um volume final de 10 mL. Este procedimento foi repetido para os brancos positivos e negativos e as soluções resultantes foram analisadas por absorção atômica para determinação da concentração dos metais (resultados no Gráfico 03, pag. 125).

3.14.3 - Biorremediação dos metais níquel, cobre, lítio, cádmio, chumbo e cobalto por oito espécies de *Penicillium* em água destilada estéril

Foi utilizado o meio de cultura **ML08** para a biorremediação dos metais com as 8 espécies de *Penicillium* (*P. minioluteum*, *P. citrinum*, *P. janczewskii*, *P. funiculosum*, *P. pinophilum*, *P. sclerotiorum*, *P. janthinellum* e *P. brasilianum*). Foram preparados 32 frascos contendo 200 mL do meio de cultura **ML08** em cada.

Foi preparada uma suspensão de esporos dos 8 fungos, pela adição de água destilada estéril contendo Tween 80 na proporção de 0,5% (m/v) às culturas dos fungos em fase de esporulação, seguida por agitação manual para a separação dos esporos. A quantidade de esporos presentes em cada suspensão foi determinada por contagem em câmara de Neubauer. Com o auxílio de uma pipeta automática, 1 mL da suspensão contendo os esporos dos fungos foi coletado e inoculado em cada um dos frascos correspondentes contendo o meio de cultura **ML08**. Após um período de 48 horas, o material dos frascos contendo as pré-culturas foi filtrado individualmente e o micélio de cada um dos fungos foi lavado com água destilada estéril (3 x 50 mL) para a remoção total do meio de cultura. Este procedimento foi realizado para cada um dos oito fungos e os micélios foram retornados aos frascos, aos quais adicionaram-se 200 mL de água destilada estéril. O experimento foi realizado da seguinte maneira:

- 24 frascos foram usados para o teste de biorremediação dos metais;
- 8 frascos foram usados como brancos negativos (água + fungos);
- 3 frascos foram usados como brancos positivos (água + metais).

Foi adicionado 1 mL das soluções dos metais citadas no item anterior em seus frascos correspondentes, e a concentração final dos metais neste experimento foi de 100 µg/mL.

O experimento foi realizado por um período de 2 horas. Nos seguintes tempos (em horas) 0, 1 e 2, foram retiradas alíquotas de 20 mL de cada frasco e o material dos experimentos foi filtrado a vácuo para remoção dos micélios da fase aquosa. Então foi retirada uma alíquota de 5 mL da fase aquosa de cada experimento e adicionaram-se 5 mL de ácido nítrico concentrado em cada uma das alíquotas, resultando em um volume final de 10 mL. Este procedimento repetido para os brancos positivos e negativos; as respectivas soluções foram analisadas por absorção atômica para determinação da concentração final dos metais (resultados no Gráfico 04, pag. 128).

3.14.4 - Biorremediação do cromo hexavalente

3.14.4.1 - Biorremediação do cromo por *Aspergillus niger*

Foi utilizado o meio de cultura **ML07** para o teste de biorremediação do Cr(VI) com *Aspergillus niger*. Foram preparados oito frascos contendo 200 mL do meio de cultura **ML07**, sendo um deles reservado para o branco da análise.

Foi preparada uma suspensão de esporos do fungo *A. niger*, pela adição de água destilada estéril contendo Tween 80 na proporção de 0,5% (m/v) à cultura do fungo em fase de esporulação, seguida por agitação manual para a separação dos esporos. Com o auxílio de uma pipeta automática, 1 mL da suspensão contendo os esporos dos fungos foi coletado e inoculado em cada um dos frascos correspondentes contendo o meio de cultura **ML07**, com exceção do que foi reservado para ser o branco do teste.

Após 48 horas, 5,0 mL de uma solução de 100 mg/L de dicromato de potássio ($K_2Cr_2O_7$) foram adicionados em cada um dos frascos anteriores.

O experimento foi realizado por um período de 12 horas. Nos seguintes tempos (em horas): 0, 2, 4, 6, 8, 10 e 12, foram retiradas alíquotas de 10 mL e o material do experimento foi filtrado a vácuo. Para o frasco referente ao branco do teste, foram retiradas alíquotas de 5 mL nos mesmos tempos. As amostras foram congeladas para posterior análise por espectrofotometria no ultravioleta visível para determinação da concentração final do metal.

3.14.4.2 - Biorremediação do cromo por *Aspergillus niger* e oito espécies de *Penicillium* em água destilada estéril

Foi utilizado o meio **ML08** para o teste de biorremediação do metal com as 8 espécies de *Penicillium* (*P. minioluteum*, *P. citrinum*, *P. janczewskii*, *P. funiculosum*, *P. pinophilum*, *P. sclerotiorum*, *P. janthinellum* e *P. brasilianum*) e o fungo *Aspergillus niger*. Foram preparados 9 frascos contendo 200 mL do meio de cultura **ML08** em cada.

Foi preparada uma suspensão de esporos dos oito fungos, pela adição de água destilada estéril contendo Tween 80 na proporção de 0,5% (m/v) às culturas dos fungos em fase de esporulação, seguida por agitação manual para a separação dos esporos. Com o auxílio de uma pipeta automática, 1 mL da suspensão contendo os esporos dos fungos foi coletado e inoculado em cada um dos frascos correspondentes contendo o meio **ML08**. Após um período de 48 horas, o material dos frascos contendo as pré-culturas foram filtrados individualmente e o micélio de cada um dos fungos foi lavado com água destilada estéril (3 x 50 mL) para a remoção total do meio de cultura. Este procedimento foi realizado para cada um dos fungos e os micélios foram retornados aos frascos, agora contendo 200 mL de água destilada estéril. O experimento foi realizado da seguinte maneira:

- 9 frascos foram usados para o teste de biorremediação do cromo;
- 1 frasco foi usado como branco positivo (água + metal).

Foi adicionado 1 mL de uma solução de 100 µg/mL de cromo em seus frascos correspondentes.

O experimento foi realizado por um período de 2 horas. Nos seguintes tempos (em horas) 0, 1 e 2, foram retiradas alíquotas de 20 mL de cada frasco e o material dos experimentos foi filtrado a vácuo para remoção dos micélios da fase aquosa. Então foi retirada uma alíquota de 4 mL da fase aquosa de cada experimento. Para o branco positivo foram retiradas diretamente do frasco, alíquotas de 4 mL a cada tempo. As respectivas soluções foram congeladas para posterior análise por espectrofotometria no ultravioleta visível para determinação da concentração final do metal.

3.14.4.3 – Determinação do teor de cromo hexavalente dos experimentos por espectrofotometria no ultravioleta

Para a determinação das concentrações de Cr (VI) foi utilizado o método da 1,5-difenilcarbazida (DFC) recomendada pela Associação Brasileira de Normas Técnicas – ABNT através da norma NBR 13738 (Água – Determinação de cromo hexavalente – Método colorimétrico da difenilcarbazida) de novembro de 1996, que prescreve o método colorimétrico da difenilcarbazida para determinação de cromo hexavalente em amostras de águas naturais, águas minerais e de mesa, de abastecimento, efluentes domésticos e industriais, em concentrações superiores a 0,005 mg Cr(VI)/L.

O mesmo consiste na preparação da solução de 1,5-difenilcarbazida (DFC) (Figura 06) a partir de 25 mg do reagente solubilizado em 5 mL de acetona e transferido para um balão volumétrico de 50 mL, sendo o volume completado com água deionizada. Foi utilizada também uma solução de ácido sulfúrico a 10% (v/v). Uma solução estoque de dicromato de potássio foi preparada para a determinação da curva de calibração e, para cada um dos experimentos, foram preparadas soluções estoques distintas. No primeiro experimento foi preparada uma solução cuja concentração era de 100 mg/L e, no segundo experimento, de 10.000 mg/L.

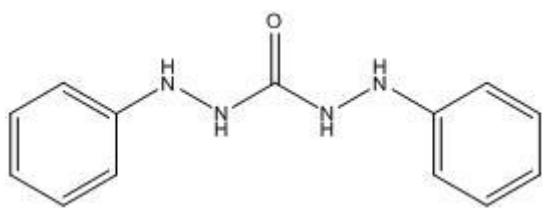


Figura 06 – Estrutura da 1,5 - difenilcarbazida

Foram transferidos, para tubos do tipo Falcon, 1 mL da solução do ácido sulfúrico, 0,5 mL da solução de DFC e volumes variados das soluções estoques de dicromato de potássio, sendo o volume completado para 10 mL de água deionizada para a preparação das soluções em diversas concentrações. Após a mistura, os tubos foram agitados vigorosamente e deixados em repouso por aproximadamente 10 minutos para o desenvolvimento de coloração (Equação 01, pag 71), pois os cromatos formam, com este reagente, um derivado violeta (Figura 07, pag. 71).



H_4L = 1,5 – difenilcarbazida (DFC)

$[\text{Cr}(\text{HL})_2]^+$ = complexo DFC + Cromo (violeta intensa)

H_2L = 1,5 – difenilcarbazona

Equação 01 – Reação do cromo com 1,5 – difenilcarbazina (DFC) (Narin *et al.*; 2008)

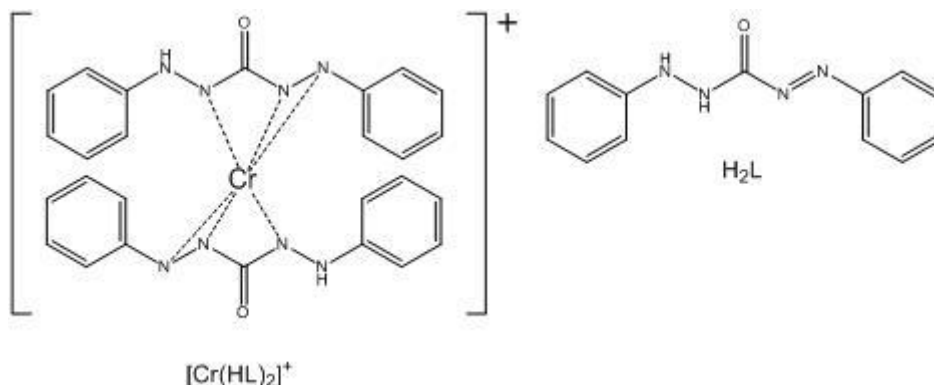


Figura 07 – Estrutura do complexo DFC+Cr $[\text{Cr}(\text{HL})_2]^+$ e da difenilcarbazona (H_2L)

A absorbância das soluções foram medidas transferindo-se uma alíquota das mesmas para uma cubeta de quartzo, de caminho óptico igual a 10 mm, e fazendo-se a leitura em espectrofotômetro no comprimento de onda igual a 542 nm. A determinação da linha de base foi feita com uma amostra, preparada em um tubo do tipo Falcon, contendo 1 mL da solução de ácido sulfúrico, 0,5 mL da solução de DFC e o volume completado para 10 mL com água deionizada. Para cada solução, pelo menos três medidas foram realizadas no equipamento, sendo obtidas as seguintes curvas de calibração para cada experimento (Gráficos 01 e 02, pag. 72).

Para a determinação da concentração de Cr (VI) foram coletadas no primeiro experimento, alíquotas de 20 μL de cada amostra a serem analisadas e, no segundo experimento, uma alíquota de 25 μL de cada amostra a serem analisadas, que foram transferidas para tubos do tipo Falcon contendo 1 mL da solução de ácido sulfúrico, 0,5 mL da solução de DFC sendo posteriormente o volume completado para 10 mL com água deionizada. As determinações foram efetuadas no comprimento de onda de 542 nm.

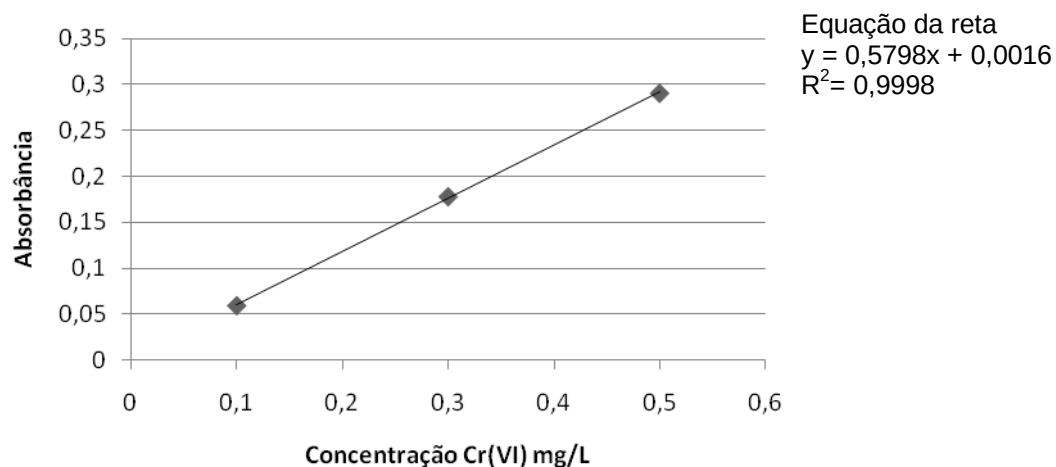


Gráfico 01 – Curva de calibração do experimento de biorremediação do cromo com o fungo *Aspergillus niger* em meio de cultura

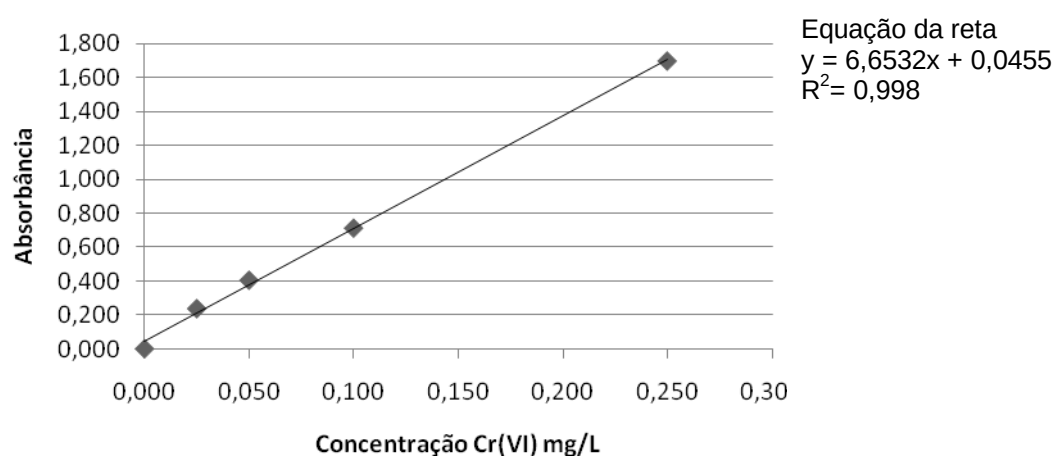


Gráfico 02 – Curva de calibração do experimento de biorremediação do cromo com os fungos *Aspergillus niger* e as oito espécies *Penicillium* em água

Capítulo IV

Discussão dos resultados

4.1 – Purificação dos substratos: lupeol (**152**), betulinato de metila (**153**) e β - amirina (**154**)

Os substratos lupeol (**152**), betulinato de metila (**153**) e β - Amirina (**154**) foram purificados por cromatografia em coluna de sílica gel, utilizando-se hexano e acetato de etila em gradientes de eluição em ordem crescente de polaridades. Os resultados das purificações são resumidos na Tabela 06.

Tabela 06 – Resultado das purificações dos materiais de partida

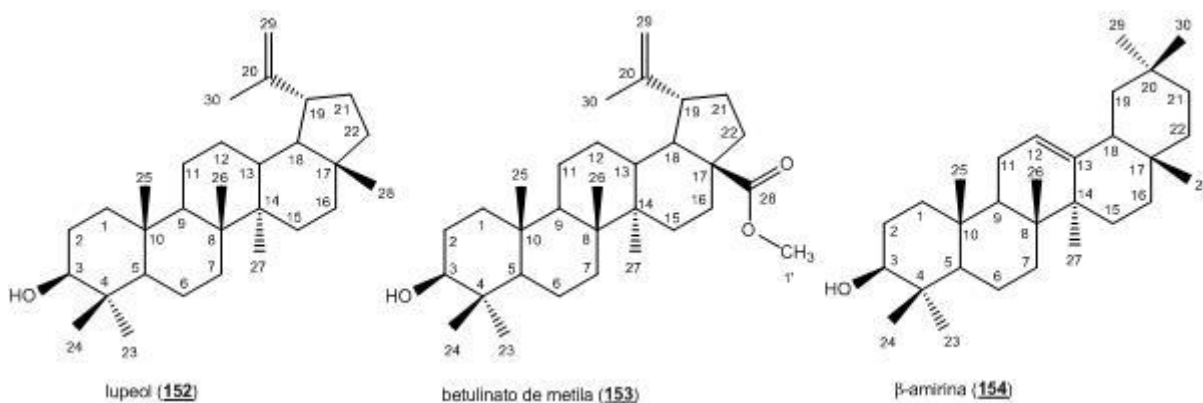
	lupeol (152)	betulinato de metila (153)	β – amirina (154)
Massa inicial	300 mg	500 mg	500 mg
Frações	74	95	85
Massa purificada	255,9 mg	426,9 mg	478,6 mg

4.1.2 – Caracterização dos substratos: lupeol (**152**), betulinato de metila (**153**) e β - amirina (**154**)

Embora as biotransformações sejam técnicas sintéticas interessantes, os rendimentos iniciais dos produtos obtidos são usualmente baixos, tornando difícil a etapa de elucidação estrutural. Este problema é agravado quando se realiza a biotransformação de terpenos superiores, já que estes apresentam espectros de ressonância magnética nuclear complexos.

A literatura apresenta dados de RMN de ^1H e de ^{13}C para alguns dos triterpenos em estudo (Duarte, 2000; Zhang *et al.*, 2005 e Martin *et al.*, 2004). Entretanto, devido à complexidade dos sinais presentes, entre δ 0,8 e δ 1,5, nos espectros de RMN de ^1H de triterpenos, a atribuição total dos hidrogênios deste tipo de substâncias não é comumente descrita. Duarte (2000) fez um estudo detalhado de RMN de diversos triterpenóides, incluindo a β -amirina (**154**) e a friedelina (**155**).

Desta forma, com o intuito de obter dados espectroscópicos que pudessem subsidiar, futuramente, a elucidação estrutural de produtos de biotransformação, realizou-se um estudo detalhado dos espectros de RMN de ^1H e de ^{13}C , subespectro DEPT 135 e os mapas do contorno COSY, HMQC, HMBC e ROESY do lupeol (**152**) (Anexo 01, pag. 147), betulinato de metila (**153**) (Anexo 02, pag. 153) e β -amirina (**154**) (Anexo 03, pag. 159).



Como regra geral, este estudo teve o seguinte direcionamento:

1. O espectro de RMN de ^{13}C da substância, juntamente com o subespectro DEPT-135, foi analisado e, por comparação com a literatura, todos os sinais de carbonos foram atribuídos e tabelados.
2. Utilizando-se o mapa de contornos HMQC, os sinais dos hidrogênios ligados dos respectivos carbonos foram localizados e tabelados.
3. Utilizando-se o mapa de contornos ROESY, fez-se a distinção, no caso dos carbonos metilênicos, sobre o valor de deslocamentos químicos correspondentes aos hidrogênios H_α e H_β .

4.1.2.1 – Lupeol (152)

No espectro no infravermelho do lupeol (152) (Anexo 01, Figura 24, pag. 147) foram observadas bandas de absorção em 3334 cm^{-1} (estiramento de ligação O-H), 2954 cm^{-1} (estiramento de ligação C-H de natureza alifática e/ou alicíclica), 1645 cm^{-1} (deformação axial de C=C), 1456 e 1380 cm^{-1} (deformação angular de C-H de alqueno).

O espectro de RMN de ^1H (Anexo 01, Figura 25 e 26, pag. 148) do lupeol mostrou sete simpletos em δ_{H} 0,76; δ_{H} 0,78 δ_{H} 0,83; δ_{H} 0,94; δ_{H} 0,96; δ_{H} 1,03e δ_{H} 1,67 correspondendo aos sinais de sete grupos metila. O sinal em δ_{H} 1,25 está bastante intenso sugerindo a presença de ácido graxo contaminante na amostra, isto é reforçado pelo aparecimento dos sinais em δ_{C} 29,7 (CH_2) e 178,3 (C=O) no espectro de RMN de ^{13}C . Mostrou também um duplete duplo em δ_{H} 3,19 ($J = 5\text{ Hz}$)

referente ao hidrogênio carbinólico em C-3. Um multiplete em δ_H 4,56 e um duplete em 4,68 ($J= 2$ Hz) foram atribuídos aos dois hidrogênios de C-29.

A análise do espectro de RMN de ^{13}C (Anexo 01, Figura 27 e 28, pag. 149) indicou a presença de 43 carbonos que foram classificados como sendo sete CH_3 , 21 CH_2 , oito CH e sete C, utilizando o subspectro DEPT-135 (Anexo 01, Figura 29 pag. 150). O aparecimento dos 43 carbonos confirma a presença de impureza.

Por comparação com a literatura (Duarte, 2000) fez-se a atribuição comparativa para os carbonos do lupeol (Tabela 07).

Tabela 07 – Comparação dos deslocamentos químicos de RMN de ^{13}C da literatura e dos valores experimentais obtidos para o lupeol (**152**)

	δ_C Duarte, 2000 (62,89 MHz, $CDCl_3$)	δ_C Experimental (100 MHz, $CDCl_3$)	δ_H Duarte, 2000 (250 MHz, $CDCl_3$)
01	38,7	38,7	
02	27,4	27,4	
03	78,8	79,0	3,25 q, $J= 9,6$ Hz
04	38,3	38,8	
05	55,2	55,3	
06	18,3	18,3	
07	34,2	34,3	
08	40,9	40,8	
09	50,3	50,4	
10	37,1	37,1	
11	20,9	20,9	
12	25,1	25,1	
13	38,0	38,0	
14	42,8	42,8	
15	27,4	27,4	
16	35,5	35,6	
17	42,9	42,9	
18	48,2	48,3	
19	47,9	48,0	
20	150,6	150,9	
21	29,8	29,8	
22	39,9	40,0	
23	28,0	28,0	0,98 s
24	15,4	15,3	0,95 s
25	16,1	16,1	1,03 s
26	15,9	15,9	1,06 s
27	14,5	14,5	1,06 s
28	18,0	18,0	0,83 s
29	109,2	109,2	4,62 d (2H) $J= 9,6$ z
30	19,3	19,3	1,70 s

Observou-se que apenas alguns hidrogênios têm a sua atribuição para esta substância na literatura: H-3, H-23, H-24, H-25, H-26, H-27, H-29a, H-29b e H-30.

Para subsidiar a elucidação estrutural dos produtos de biotransformações, foi feita a atribuição completa de todos os hidrogênios da molécula, inclusive discriminando-se todos os deslocamentos químicos dos hidrogênios alfa e beta dos grupos metilênicos.

O mapa de contornos HMQC (Anexo 01, Figuras 30 e 31, pag. 150 e 151) permitiu atribuir todas as correlações δ_C e δ_H na molécula (Tabela 07, pag. 76). O mapa de contornos HMBC (Anexo 01, Figura 32, pag. 151) permitiu atribuir as correlações J^2 e J^3 de alguns carbonos na molécula (Tabela 08, pag. 78).

A Figura 08 mostra algumas correlações observadas no mapa de contornos ROESY (Anexo 01, Figura 32, pag. 151) para a molécula do lupeol.

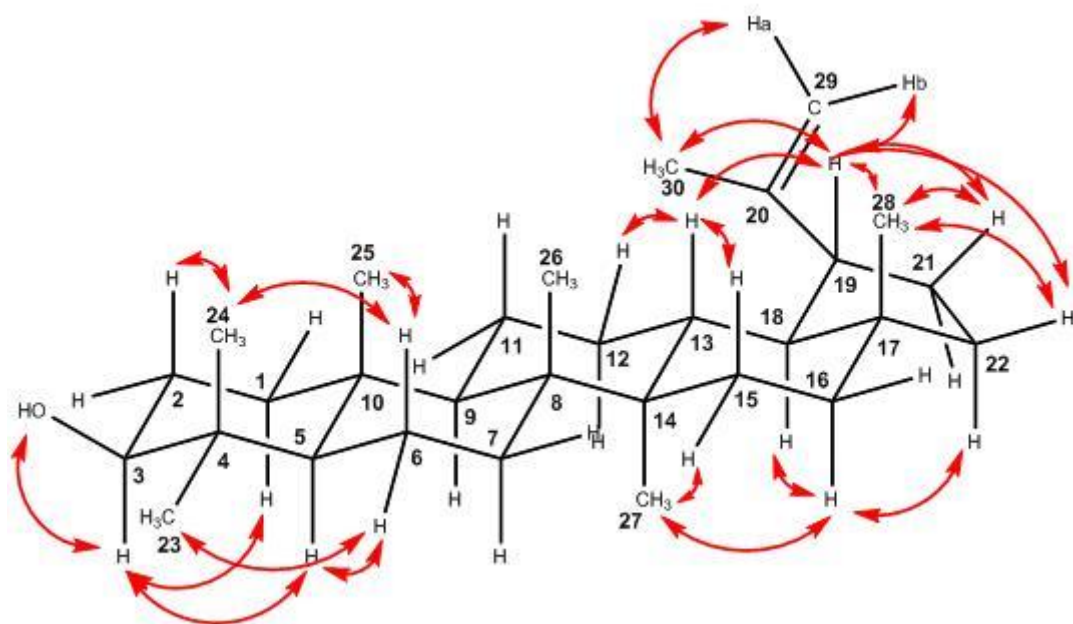


Figura 08 – Algumas correlações observadas no mapa de contornos ROESY do lupeol (152)

Tabela 08 – Dados de RMN do lupeol (**152**)

	δ_H (400 MHz, CDCl ₃)	δ_C (100 MHz, CDCl ₃)	HMBC	ROESY
01	1,65 α , m 0,88 β , m	38,7	C2(² J), C5(³ J), C25(³ J)	H5 H11 β
02	1,65 m	27,4	C1(² J)	H24
03	3,19 dd J= 5,0 Hz e 5,1 Hz	79,0	C1(³ J), C2(² J), C5(³ J), C23(³ J), C24(³ J)	H1 α , H 2, H 5
04	-	38,8	H5(² J), H25(³ J)	-
05	0,68 d, J= 9,2 Hz	55,3	C1(³ J), C6(² J), C23(³ J), C24(³ J)	H1 α , H6 α
06	1,29 α , m 1,65 β , m	18,3	C5(² J)	H5, H 23 H24, H25
07	1,29 m	34,3	C26(³ J)	H12
08	-	40,8	H27(³ J)	-
09	1,29 m	50,4	C7(³ J), C25(³ J)	H7
10	-	37,1	H5 (² J), H25(² J)	-
11	1,29 m	20,9		H26
12	1,29 m	25,1		H7
13	1,65 m	38,0	C27(³ J)	H19
14	-	42,8	H18(³ J), H26 (³ J)	-
15	1,08 m	27,4	H27 (³ J)	H13, H27
16	1,29 α , m 1,65 β , m	35,6	C28(³ J)	H18, H21, H22 α , H28
17	-	42,9	H15(³ J), H28(² J)	-
18	1,29 m	48,3		H16 α
19	2,36 m	48,0	C29 (³ J), C30(³ J)	H13, H21, H22 β , H28
20	-	150,9	H18 (³ J), H30(² J)	-
21	1,91 m	29,8	C19(² J), C22(² J),	H16 α , H19, H28
22	1,17 β , m 1,38 α , m	40,0	C18(³ J), C19(³ J), C28(³ J)	H19 H16 α
23	0,98 s	28,0	C3(³ J), C5(³ J), C24(³ J)	H1 α , H2
24	0,76 s	15,3	C3(³ J), C5(³ J),	H2, H25
25	0,86 s	16,1	C5(³ J), C9(³ J)	H1 β , H2, H6 β
26	1,01 s	15,9		H11, H13, H25
27	0,94 s	14,5	C13 (³ J)	H7, H12, H16 α
28	0,78 s	18,0	C18 (³ J)	H19, H21, H22 β
29	4,56 a, m 4,68 b, d (J= 2,0 Hz)	109,2	C19(³ J), C30(³ J)	H19, H30 H19, H30
30	1,67 s	19,3	C19 (³ J)	H19, H21 α , H29a, H29b

4.1.2.2 – Betulinato de metila (**153**)

No espectro no infravermelho do betulinato de metila (**153**) (Anexo 02, Figura 34, pag. 153) foram observadas bandas de absorção em 3535 cm⁻¹ (estiramento de ligação O-H), 3077 e 2964 cm⁻¹ (deformação axial C-H), 1703 cm⁻¹ (deformação axial de C=O), 1645 cm⁻¹ (deformação axial de C=C), 1450, 1280, 1169 e 1045 cm⁻¹ (deformação de ligação C-H de natureza alifática e/ou alicíclica) e em 878 (deformação de C-H de alqueno).

O espectro de RMN de ^1H do betulinato de metila (Anexo 02, Figura 35 e 36, pag. 154) mostrou a presença de cinco simpletos em δ_{H} 0,75, δ_{H} 0,82, δ_{H} 0,91, δ_{H} 0,96 e δ_{H} 1,66, correspondendo aos sinais de seis grupos metila, já que a integral referente ao simpleto em δ_{H} 0,96 equivale a 6 hidrogênios. O simpleto em δ_{H} 3,66 foi atribuído ao sinal de um grupo metoxila e o duplete duplo em δ_{H} 3,18 ($J = 4,7$ Hz e $4,6$ Hz) refere-se ao hidrogênio carbinólico em C-3. Um simpleto em δ_{H} 4,59 e outro δ_{H} 4,73 foram atribuídos aos sinais dos dois hidrogênios metilênicos de C-29.

A análise do espectro de RMN de ^{13}C (Anexo 02, Figura 37 e 38, pag. 155) indicou a presença de 31 carbonos que foram classificados como sendo sete CH_3 , onze CH_2 , seis CH e sete C , utilizando o subespectro DEPT-135 (Anexo 02, Figura 39, pag. 156).

Por comparação com a literatura (Zhang *et al.*, 2005 e Martin *et al.*, 2004) fez-se as atribuições comparativas para os hidrogênios e carbonos do betulinato de metila (Tabela 09, pag. 80).

Observou-se que apenas alguns hidrogênios, H-3, H-19, H-24, H-25, H-26, H-27, H-29a, H-29b, H-30 e H-1', haviam sido atribuídos, para esta substância, na literatura, portanto realizou-se uma análise detalhada no mapa de contornos para se fazer a atribuição completa dos hidrogênios desta molécula.

O mapa de contornos HMQC (Anexo 02, Figuras 40 e 41, pag. 156 e 157), permitiu atribuir todas as correlações δ_{C} e δ_{H} na molécula discriminando os deslocamentos químicos dos hidrogênios alfas e betas (Tabela 10, pag. 81).

Tabela 09 – Comparação dos deslocamentos químicos de RMN de ^{13}C e de ^1H da literatura e experimentais do betulinato de metila (**153**)

	δ_{C} (Zhang <i>et al.</i> , 2005) (125 MHz, Piridina-d5)	δ_{C} Experimental (100 MHz, CDCl_3)	δ_{H} (Martin <i>et al.</i> , 2004) (200 MHz, CDCl_3)
01	39,3	38,7	
02	28,3	27,4	
03	78,1	78,9	3,19 dd, J= 4,7 Hz e 4,6 Hz
04	39,5	38,8	-
05	55,9	55,3	
06	18,8	18,3	
07	34,8	34,5	
08	41,1	40,7	-
09	50,9	50,5	
10	37,1	37,2	-
11	21,1	20,9	
12	26,0	25,5	
13	38,6	38,2	
14	42,7	42,4	-
15	30,1	30,6	
16	32,4	32,1	
17	56,8	56,5	-
18	47,6	46,9	
19	49,8	49,5	2,99, w/2= 14,9 Hz
20	150,9	150,5	-
21	31,0	29,6	
22	37,5	36,9	
23	28,7	27,9	0,91, s
24	16,4	15,3	0,75, s
25	16,3	15,9	0,82, s
26	18,8	16,1	0,96, s
27	14,9	14,7	0,96, s
28	176,5	176,6	-
29	110,1	109,5	4,60 a, w/2= 4,7 Hz 4,74 b, d, J= 1,6 Hz
30	19,4	19,3	1,68, s
1'	51,3	51,2	3,67 s

Utilizou-se, então, o mapa de contornos ROESY (Anexo 02, Figura 43, pag. 158) para atribuições espaciais dos hidrogênios dos carbonos metilênicos C-1, C-6, C-11, C-12, C-15, C-16, C-21 e C-22, e o mapa de contornos HMBC (Anexo 02, Figura 42, pag. 157) a fim de se observar as correlações dos hidrogênios e carbonos. Na Figura 09 (pag. 82) são mostradas algumas correlações observadas (ROESY). Para os hidrogênios de C-2 e C-7, não houve definição porque os sinais de ambos os hidrogênios encontram-se no mesmo valor de δ_{H} ($\delta_{\text{H-2}}$ 1,55 e $\delta_{\text{H-7}}$ 1,40, respectivamente). Todas as correlações observadas são mostradas na Tabela 10 (pag. 81).

Tabela 10 – Resumo dos dados de RMN do betulinato de metila (**153**)

	δ_H (400 MHz, CDCl ₃)	δ_C (400 MHz, CDCl ₃)	HMBC	ROESY
01	1,66 α , m 0,87 β , s	38,7	C2(² J), C5(³ J), C25(³ J)	H2 H2
02	1,55 m	27,4	C1(² J)	H3, H1 α , H1 β
03	3,18 dd, J= 4,7 Hz e 4,6 Hz	78,9	C1(³ J), C23(³ J), C24(³ J)	H1 α , H2, H5, H23
04	-	38,8	H2(³ J), H5(² J), H24(² J)	-
05	0,67 d, J= 8,68 Hz	55,3	C7(³ J), C24(³ J), C25(³ J)	H3, H6 α , H7, H9
06	1,55 β , m 1,40 α , m	18,3	C5(² J), C7(² J)	H25 H5, H7
07	1,40 m	34,5	C6(² J), C9(³ J)	H26
08	-	40,7	H6(³ J), H9(² J)	-
09	1,25 m	50,5	C12(³ J), C25(³ J), C26(³ J)	H11 α , H27
10	-	37,2	H5(² J), H6(³ J), H9(² J), H25(² J)	-
11	1,25 β , m 1,40 α , m	20,9	C9(² J), C12(² J)	H26 H9
12	1,03 β , m 1,66 α , m	25,5	C11(² J)	H13 H27
13	2,20 m	38,2	C11(³ J), C15(³ J), 27(³ J)	H19
14	-	42,4	H13(² J), H15(² J), H16(³ J), H26(³ J), H27(² J)	-
15	1,40 β , m 1,88 α , m	30,6	C16(² J), C27(³ J)	H13, H16 β H18
16	1,40 α , m 2,20 β , m	32,1	C15(² J), C22(³ J),	H15 α , H18 H21 β , H22 β , H27
17	-	56,5	H13(³ J), H19(³ J), H21(³ J), H22(² J)	-
18	3,00 m	46,9	C19(² J)	H16 α , H22 α , H30
19	1,55 m	49,5	C22(³ J), C30(³ J)	H13, H21 β
20	-	150,5	H21(³ J), H29a(² J), H29b(² J), H30(² J)	-
21	1,14 α , m 1,40 β , m	29,6	C19(² J), C22(² J),	H19, H22 β
22	1,40 β , m 1,88 α , m	36,9	C16(³ J), C21(² J)	H16 β H18, H21 α
23	0,91 s	27,9	C24(³ J)	H1 α , H2
24	0,75 s	15,3	C5(³ J), C23(³ J)	H1 β , H2, H25
25	0,82 s	15,9		H6 β , H24
26	0,96 s	16,1		H7, H11 β
27	0,96 s	14,7		H9, H12 α
28	-	176,6	H22(³ J)	-
29	4,59 a, s 4,73 b, s	109,5	C30(³ J)	H18, H19
30	1,66 m	19,3	H29a(³ J)	
1'	3,66 s	51,2	-	-

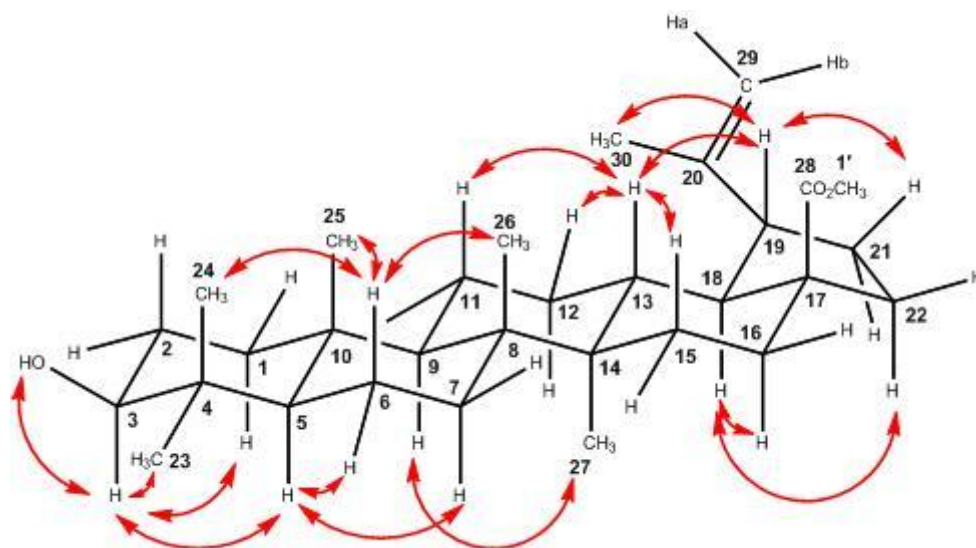


Figura 09 – Algumas correlações observadas no espectro ROESY do betulinato de metila (**153**)

4.1.2.3 - β -amirina (**154**)

No espectro no infravermelho da β -amirina (**154**) (Anexo 03, Figura 44, pag. 159) foram observadas bandas de absorção em 3296 cm^{-1} (estiramento de ligação O-H), 2954 , 1456 , 1390 , 1038 cm^{-1} (deformação de ligação C-H de natureza alifática e/ou alicíclica) e em 991 cm^{-1} (deformação angular de C-H de alqueno).

Duarte (2000), em sua tese de doutorado, fez um estudo detalhado de todos os dados obtidos por RMN da β -amirina. Com base nestas informações, será feita uma pequena discussão sobre os dados obtidos da amostra analisada neste trabalho.

O espectro de RMN de ^1H da β -amirina (Anexo 03, Figura 45 e 46, pag. 160) apresentou um tripleto em δ_{H} 5,18 que corresponde a um hidrogênio olefínico, o duplete duplo em δ_{H} 3,22, atribuído ao carbono carbinólico em C-3, simpletos em δ_{H} 0,79; δ_{H} 0,83; δ_{H} 0,87; δ_{H} 0,93; δ_{H} 0,95; δ_{H} 0,98 e δ_{H} 1,13 correspondentes a oito grupos metila, sendo que o sinal em δ_{H} 0,87, com base na sua integral, corresponde a seis hidrogênios.

A análise do espectro de RMN de ^{13}C (Anexo 03, Figura 47 e 48, pag. 161) indicou a presença de 30 carbonos que foram classificados como sendo oito CH_3 ,

dez CH₂, cinco CH e sete C, utilizando o subespectro DEPT-135 (Anexo 03, Figura 49, pag. 162).

O sinal de carbono em δ_c 145,2 (quaternário) foi atribuído ao C-13, o sinal de carbono em δ_c 121,7 (olefínico) foi atribuído ao C-12, e aquele em δ_c 79,0 foi atribuído ao C-3. O mapa de contornos HMQC (Anexo 03, Figura 50 e 51, pag. 162 e 163), permitiu atribuir todas as correlações δ_c e δ_H na molécula (Tabela 11, pag. 84). Com estes valores de hidrogênio e carbono como ponto de partida, procedeu-se então a análise do mapa de contornos HMBC (Anexo 03, Figura 52, pag. 163) a fim de se observar as demais correlações. A Tabela 11 (pag. 84) resume todos os dados de RMN obtidos para a β -amirina (**154**) e na Tabela 12 (pag. 85) mostra-se uma comparação entre os dados de RMN de ^1H e de ^{13}C experimentais com aqueles da literatura.

Utilizou-se, então, o mapa de contornos ROESY (Anexo 03, Figura 53, pag. 164) para as atribuições espaciais dos hidrogênios dos carbonos metilênicos: C-1 e C-2. Na Figura 10 são mostradas algumas correlações observadas.

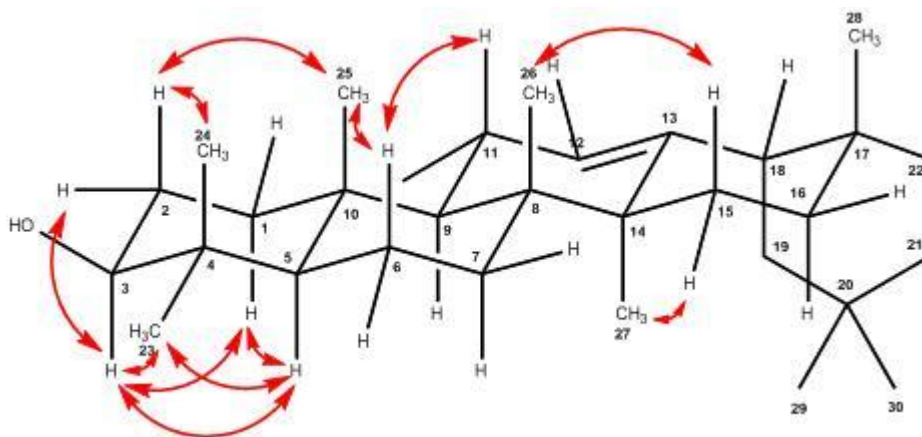


Figura 10 – Algumas correlações observadas no espectro ROESY da β -amirina (**154**)

Tabela 11 – Dados de RMN obtidos para β -amirina (**154**)

	δ_H (400 MHz, CDCl ₃)	δ_C (100 MHz, CDCl ₃)	HMBC	ROESY
01	0,97 β , m 1,65 α , m	38,6	C3, C24	H2 β , H25 H2 α , H3, H5, H23
02	0,73 α , m 1,65 β , m	26,9	C1 (^2J), C3	H23 H24, H25
03	3,22 dd, $J=5,0$ Hz e 4,5 Hz	79,0	C1 (^3J), C2 (^2J), C5 (^3J), C23(^3J), C24 (^3J)	H1 α , H2 α , H5, H23
04	-	38,7		-
05	0,73 m	55,2	C3, C23 (^3J), C24 (^3J), C25 (^3J)	H1 α , H3, H23
06	1,40 β , m 1,56 α , m	18,4		H25, H26 H23
07	1,35 α , m 1,50 β , m	32,6		H9
08	-	39,8		-
09	1,56 m	47,6	C7 (^3J), C11 (^2J), C26 (^3J)	H1 α , H7 α , H5
10	-	36,9		-
11	1,85 m	23,5	C9 (^2J)	H26
12	5,18 t, $J=3,5$ Hz	121,7	C10 (^2J)	H18
13	-	145,2	H11 (^3J), H15 (^3J)	-
14	-	41,7		-
15	0,97 β , m 1,10 α , m	26,1	C27 (^3J)	H26 H27
16	0,97 β , m 1,60 α , m	27,2	C18 (^3J), C28 (^3J)	
17	-	32,5		-
18	1,65 m	47,2	C19 (^2J), C28 (^3J)	H12, H16 α
19	0,97 m 1,58 m	46,8		
20	-	31,0		
21	1,10 m 1,32 m	34,7		
22	1,25 m 1,45 m	37,1		
23	0,98	28,1	C3 (^3J)	
24	0,79	15,5	C3 (^3J)	
25	0,93	15,5		
26	0,95	16,8		
27	1,13	26,0		
28	0,83	28,4		
29	0,87	33,3		
30	0,87	23,7		

Tabela 12 – Comparação dos deslocamentos químicos de RMN de ^{13}C e ^1H da literatura e experimentais obtidos para a β -amirina (**154**)

	δ_{C} (Duarte, 2000) (100 MHz, CDCl_3)	δ_{C} Experimental (100 MHz, CDCl_3)	δ_{H} (Duarte, 2000) (400 MHz, CDCl_3)	δ_{H} Experimental (400 MHz, CDCl_3)
01	38,6	38,6	1,59 1,66	0,97 α , m 1,65 β , m
02	26,9	26,9	1,98	0,73 α , m 1,65 β , m
03	79,0	79,0	3,21	3,22 dd, $J= 5,0 \text{ Hz e } 4,5 \text{ Hz}$
04	38,8	38,7	-	-
05	55,1	55,2	0,71	0,73 m
06	18,3	18,4	1,55 1,56	1,40 m 1,56 m
07	32,6	32,6	1,31 1,55	1,35 m 1,50 m
08	39,8	39,8	-	-
09	47,6	47,6	1,60	1,56 m
10	36,9	36,9	-	-
11	23,5	23,5	1,90	1,85 m
12	121,7	121,7	5,18	5,18 t, $J= 3,5 \text{ Hz}$
13	145,2	145,2	-	-
14	41,7	41,7	-	-
15	26,1	26,1	1,84 1,73	0,97 m 1,10 m
16	27,2	27,2	1,60 1,66	0,97 m 1,60 m
17	32,5	32,5	-	-
18	47,2	47,2	1,98	1,65 m
19	46,8	46,8	1,07 1,66	0,97 m 1,58 m
20	31,1	31,0	-	-
21	34,7	34,7	1,19 1,37	1,10 m 1,32 m
22	37,1	37,1	1,29 1,37	1,25 m 1,45 m
23	28,1	28,1	0,99	0,98
24	15,6	15,5	0,79	0,79
25	15,5	15,5	0,93	0,93
26	16,8	16,8	0,96	0,95
27	26,0	26,0	1,13	1,13
28	28,4	28,4	0,83	0,83
29	33,3	33,3	0,87	0,87
30	23,7	23,7	0,87	0,87

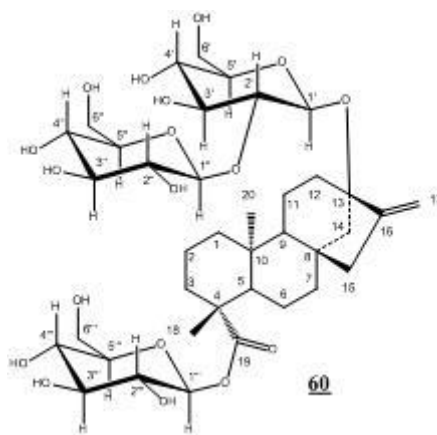
4.2 – Biotransformações

Os fungos utilizados nesta tese (*R. oryzae*, *R. stolonifer*, *B. bassiana*, *M. plumbeus*, *L. muscarinium* e *Thamnostylum* sp.) são relatados na literatura devido às suas capacidades de realizarem modificações estruturais em diversos substratos naturais ou sintéticos.

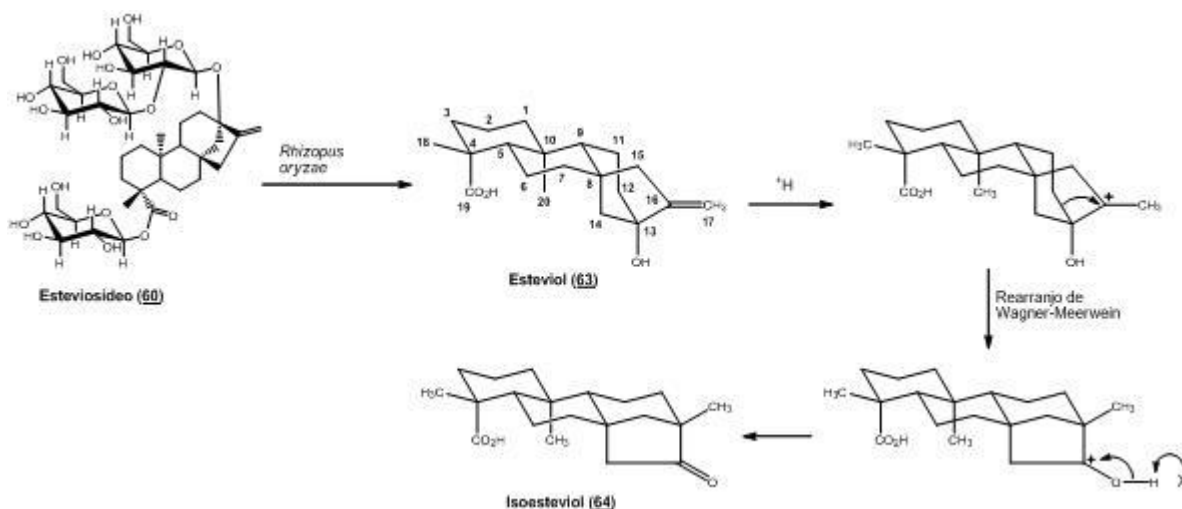
4.2.1 – Biotransformação do esteviosídeo (**60**)

4.2.1.1 – Biotransformação do esteviosídeo (**60**) por *Rhizopus oryzae* (LAB 16)

O esteviosídeo (**60**) foi incubado com *R. oryzae* (Lab 16) em duas condições diferentes. Porém, usando-se o meio de cultura **ML01** (primeira condição), após 24 h, observou-se a contaminação dos experimentos e somente a segunda condição pôde ser avaliada. Nesta, utilizou-se o meio de cultura **ML05** contendo 30 mg/mL de **60**, durante 5, 10, 15, 20, 25 e 30 dias.



Após o término do período de incubação, o micélio foi filtrado, os meios foram extraídos com acetato de etila e analisados por comparação em cromatografia em camada delgada com os padrões de esteviol (**63**) e isoesteviol (**64**), verificando-se a formação destas, como mostrado no Esquema 32 (Khaibullin *et al.*, 2009), além de outras substâncias.



Esquema 32 – Hidrólise do esteviosídeo (**60**) formando **63** e **64** (por rearranjo de **63** no meio, Khaibullin *et al.*, 2009)

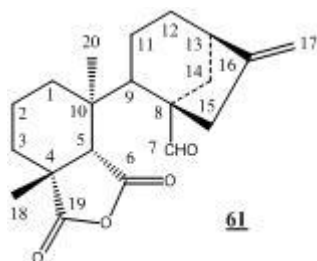
4.2.1.2 – Biotransformação do esteviosídeo (**60**) por *Beauveria bassiana* (LAB 12), *Rhizopus oryzae* (LAB 16) e *Rhizopus stolonifer* (LAB 22)

O esteviosídeo (**60**) foi incubado com *Beauveria bassiana*, *Rhizopus oryzae* e *Rhizopus stolonifer* utilizando-se o meio de cultura **ML05**, durante 5 dias, na tentativa de se comparar a ação destes fungos frente ao esteviosídeo. Após o término do período de incubação, os micélios foram filtrados, os meios foram extraídos com acetato de etila e analisados por cromatografia em camada delgada em comparação com os padrões de esteviol (**63**) e isoesteviol (**64**). A formação destas substâncias foi observada, porém, os perfis cromatográficos dos extratos se mostraram muito parecidos com o do experimento anterior, sugerindo assim que a separação em coluna cromatográfica se mostraria ineficiente, devido à complexidade dos extratos, não tendo sido efetuada.

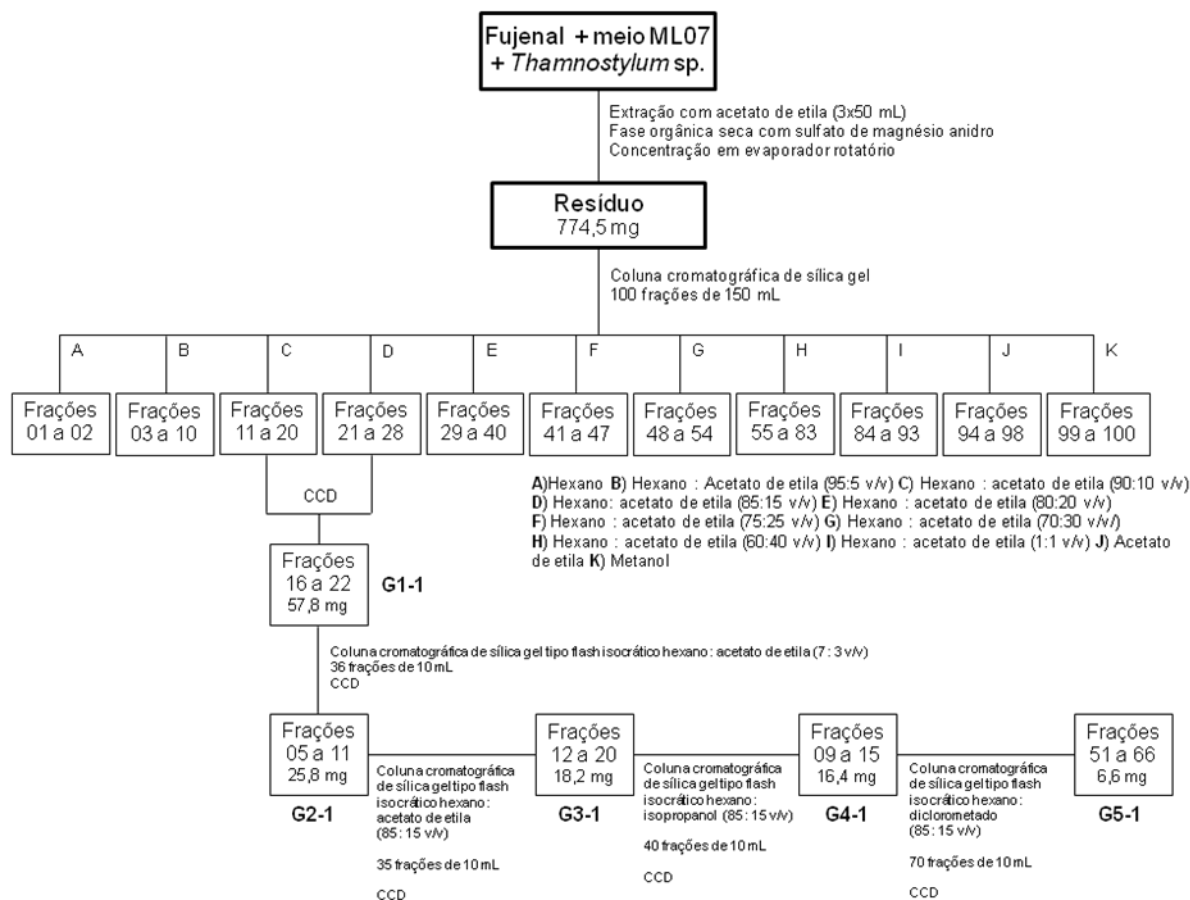
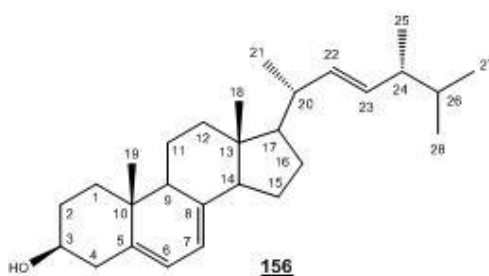
A análise por CCD destes experimentos mostrou que houve a formação das substâncias desejadas pela ação dos três fungos, demonstrando o potencial hidrolítico dos mesmos. Porém estes experimentos deverão ser retomados para uma otimização dos métodos de separação, com a utilização de técnicas cromatográficas mais sofisticadas como a cromatografia líquida de alta eficiência.

4.2.2 – Biotransformação do fujenal (**61**) por *Thamnostylum* sp. (LAB 32) no meio de cultura ML 07

O fujenal (**61**) foi incubado com *Thamnostylum* sp. utilizando o meio de cultura **ML07**, durante 15 dias. Após o término do período de incubação, o micélio foi filtrado e o meio extraído com acetato de etila. Por evaporação do solvente, obteve-se um resíduo, que foi cromatografado em coluna de sílica gel. O Esquema 33 (pag. 88) mostra o processo de extração do meio de cultura usado para a biotransformação do fujenal (**61**) e da separação em coluna cromatográfica do extrato bruto. A análise por CCD das frações obtidas indicou a presença de mais uma substância além do material de partida no grupo de frações **G1-1**, que foi submetida a sucessivas colunas cromatográficas de sílica gel do tipo “flash” até a obtenção da substância **G5-1** com um grau de pureza adequado para análise espectroscópica.



A análise dos espectros de RMN de ^{13}C obtidos para **G5-1** permitiu identificar a substância com sendo o esteróide ergosterol (**156**), cujos dados espectroscópicos estão resumidos na Tabela 13 (pag. 89).



Esquema 33 – Extração e separação cromatográfica do material proveniente da biotransformação do fujenal (**61**)

O ergosterol (**156**) é um fitoesterol presente na membrana celular dos fungos e está envolvido em inúmeras funções biológicas, como na regulação da fluidez da membrana, distribuição e atividade de proteínas integrantes da membrana e o controle do ciclo celular. Estes fatores fazem que o ergosterol seja essencial para o crescimento fúngico (Alcazar-Fuoli *et al.*, 2008). Da tentativa da biotransformação de **61** o ergosterol foi isolado, portanto, deve ser proveniente do metabolismo fúngico e não produto de modificação estrutural do substrato pelo fungo.

Tabela 13 – Dados de RMN de ^{13}C da literatura para o ergosterol e aqueles obtidos para **156**

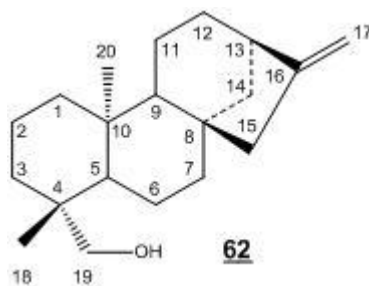
	δ_c Ergosterol (Soubias <i>et al.</i> , 2005) (125 MHz, 8,4:1,6 mol/mol DMPC-d ₅₄ /ergosterol) RMN em fase sólida	δ_c 156 (100 MHz, CDCl ₃)
01	38,3	39,1
02	31,1	31,9
03	69,1	70,5
04	40,0	38,4
05	141,1	141,3
06	119,0	119,6
07	117,0	116,3
08	139,2	139,8
09	45,9	46,0
10	36,9	37,0
11	20,8	22,7
12	39,3	39,1
13	42,4	40,1
14	54,4	54,5
15	23,1	23,0
16	28,2	28,3
17	55,6	55,7
18	12,0	12,0
19	15,6	16,3
20	40,9	40,4
21	21,5	21,1
22	135,7	135,5
23	131,8	132,0
24	43,2	42,8
25	32,8	32,0
26	17,7	17,6
27	19,4	19,9
28	21,5	21,1

4.2.3 – Biotransformação do *ent*-16-cauren-19-ol (**62**) por *Thamnostylum sp.* (LAB 32) no meio de cultura ML 07

O *ent*-16-cauren-19-ol (**62**) foi incubado com *Thamnostylum sp.* utilizando o meio de cultura **ML07**, durante 15 dias. Após o término do período de incubação, o micélio foi filtrado e o meio extraído com acetato de etila. Por evaporação do

solvente, obteve-se um resíduo (634,2 mg), que foi cromatografado em coluna de sílica gel, obtendo-se 117 frações.

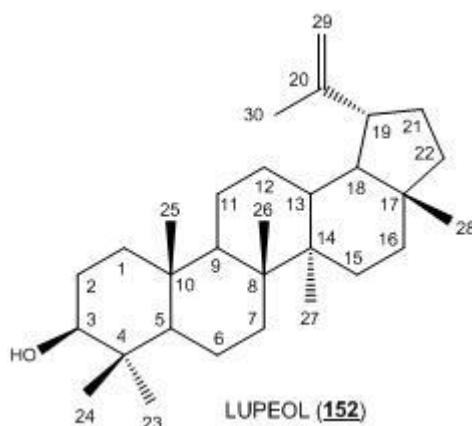
Da tentativa de biotransformação de **62** as frações obtidas da coluna cromatográfica observaram-se, por CCD, serem constituídas por misturas muito complexas e nenhum produto pode ser isolado.



4.2.4 - Biotransformação do lupeol (**152**)

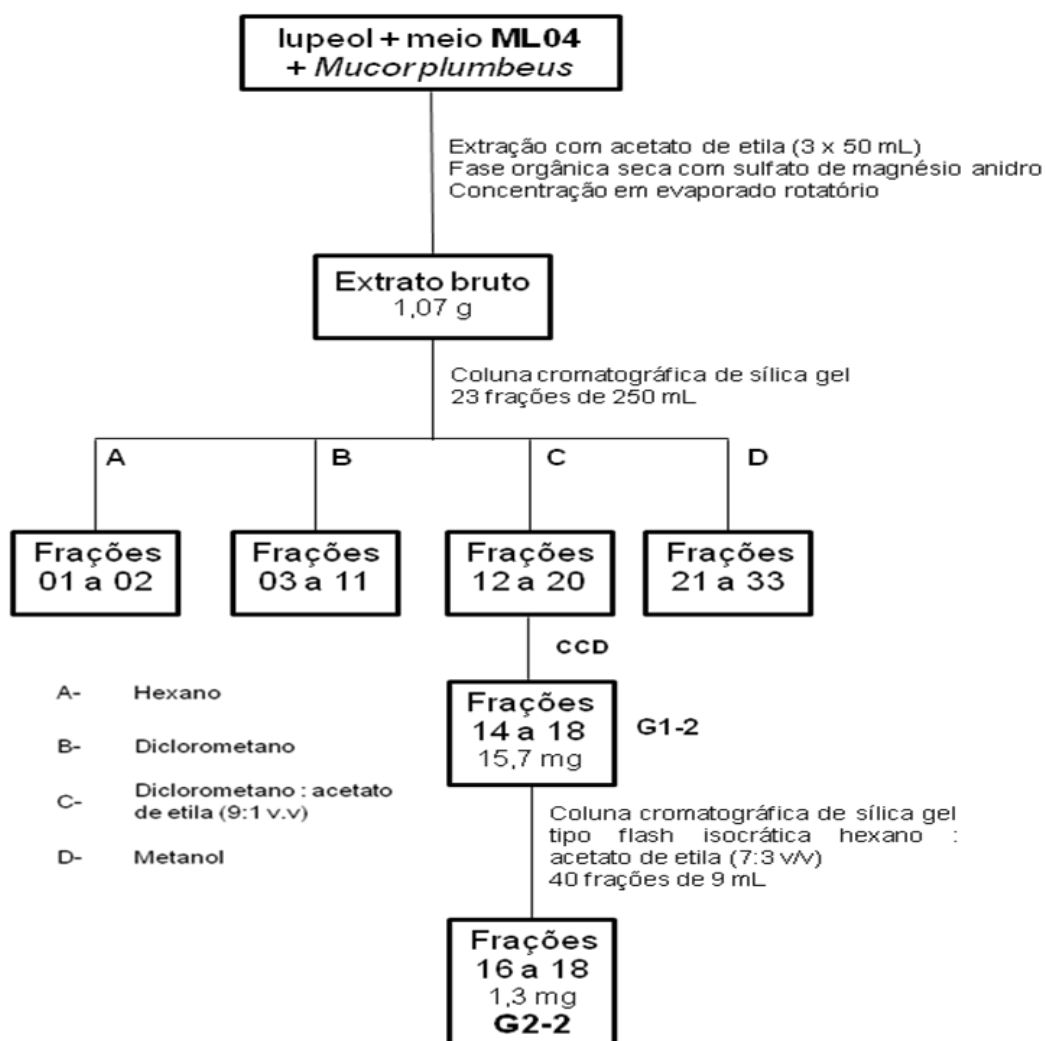
4.2.4.1 – Biotransformação do lupeol (**152**) por *Beauveria bassiana* (LAB 12) no meio de cultura ML01

O lupeol (**152**) foi incubado com *B. bassiana* utilizando o meio de cultura **ML01**, durante 15 dias. Após este período, o micélio foi filtrado, e o meio foi extraído com acetato de etila. Por evaporação do solvente, obteve-se um resíduo (874,7 mg), que foi analisado por cromatografia em camada delgada de sílica gel, e na tentativa de biotransformação não foi observada a modificação estrutural de **152**.



4.2.4.2 – Biotransformação do lupeol (**152**) por *Mucor plumbeus* (LAB 03) em meio de cultura específico ML04

O lupeol (**152**) foi incubado com *B. bassiana* utilizando o meio de cultura **ML04**, durante 15 dias. Após este período, o micélio foi filtrado, e o meio foi extraído com acetato de etila. Por evaporação do solvente, obteve-se um resíduo (1,07 g), que foi cromatografado em coluna de sílica gel. O Esquema 34 mostra o processo de extração do meio de cultura usado para a biotransformação do lupeol (**152**) e da separação em coluna cromatográfica do extrato bruto. A análise por CCD das frações obtidas que permitiu a obtenção de um grupo de frações **G1-2**, que foi submetida à outra coluna cromatográfica de sílica gel do tipo “flash” obtendo-se 1,3 mg de **G2-2**.



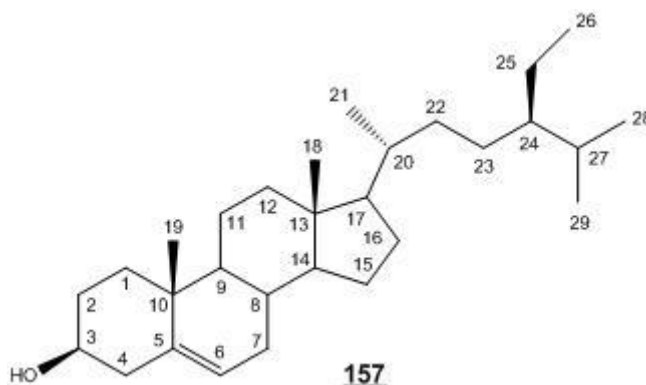
Esquema 34 – Extração e separação cromatográfica do material proveniente da biotransformação do Lupeol (**152**) no meio **ML04**

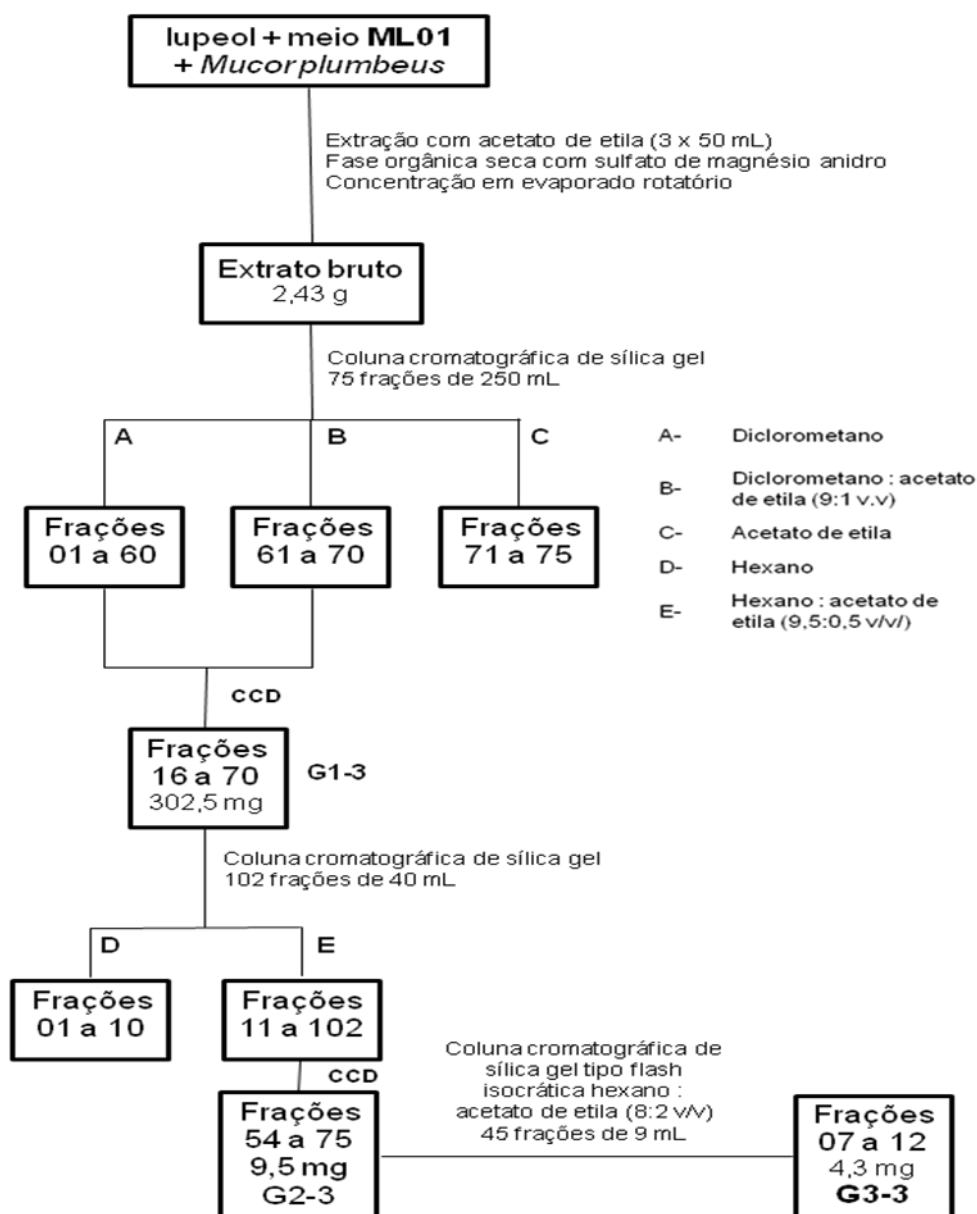
O espectro de RMN de ^1H obtido para **G2-2** da tentativa de biotransformação de **152** mostrou somente dois sinais um em δ_{H} 1,29 e outro em δ_{H} 7,26 (CDCl_3). O intenso sinal em δ_{H} 1,29, característico de grupos metilênicos presentes em ácidos graxos de cadeia longa, comumente produzida por fungos, impossibilitou o estudo dos espectros de RMN para a elucidação da substância obtida.

4.2.4.3 – Biotransformação do lupeol (**152**) por *Mucor plumbeus* (LAB 03) no meio de cultura ML01

O lupeol (**152**) foi incubado com *M. plumbeus* utilizando o meio de cultura **ML01**, durante 15 dias. Após o término do período de incubação, o micélio foi filtrado e o meio extraído com acetato de etila. Por evaporação do solvente, obteve-se um resíduo (2,43 g), que foi cromatografado em coluna de sílica gel. O Esquema 35 (pag. 93) mostra o processo de extração do meio de cultura usado para a biotransformação do lupeol (**152**) e da separação em coluna cromatográfica do extrato bruto. A análise por CCD das frações obtidas levou à combinação de frações 16-70 no grupo **G1-3**, que foi submetido a outra coluna cromatográfica de sílica gel, obtendo-se **G2-3**, que foi submetido a cromatografia de sílica gel tipo “flash” obtendo-se **G3-3**, contendo uma substância pura por CCD.

Os espectros de RMN obtidos para **G3-3** da tentativa de biotransformação de **152** permitiram identificar a substância com sendo o esteróide β -sitosterol (**157**) cujos dados estão resumidos na Tabela 14 (pag. 94).





Esquema 35 – Extração e separação cromatográfica do material proveniente da biotransformação do lupeol (152) no meio ML01

O β -sitosterol (157) é um fitoesterol que regula processos metabólicos das plantas e é muito estudado por apresentar atividades biológicas de interesse ao homem, sendo este relatado em diversos trabalhos fitoquímicos de grande relevância como uma substância presente em várias famílias de plantas. Alguns autores relatam a presença do β -sitosterol em fungos, como no *Cordyceps* sp. (Holliday & Cleaver, 2008), em fungos que causam podridão branca em madeira (Cabana *et al.*, 2007), no *Uncinula necator*, que é um patógeno da videira (Vistis

vinifera) (Debieu *et al.*, 1995) e no *Fomes durissimus* (*Phellinus durissimus*) (Gupta & Jain, 1984). Não foi possível concluir se o β -sitosterol isolado desta biotransformação foi obtido por uma modificação estrutural do lupeol com *M. plumbeus* ou se é um metabólito liberado pelo fungo no meio de cultura da reação.

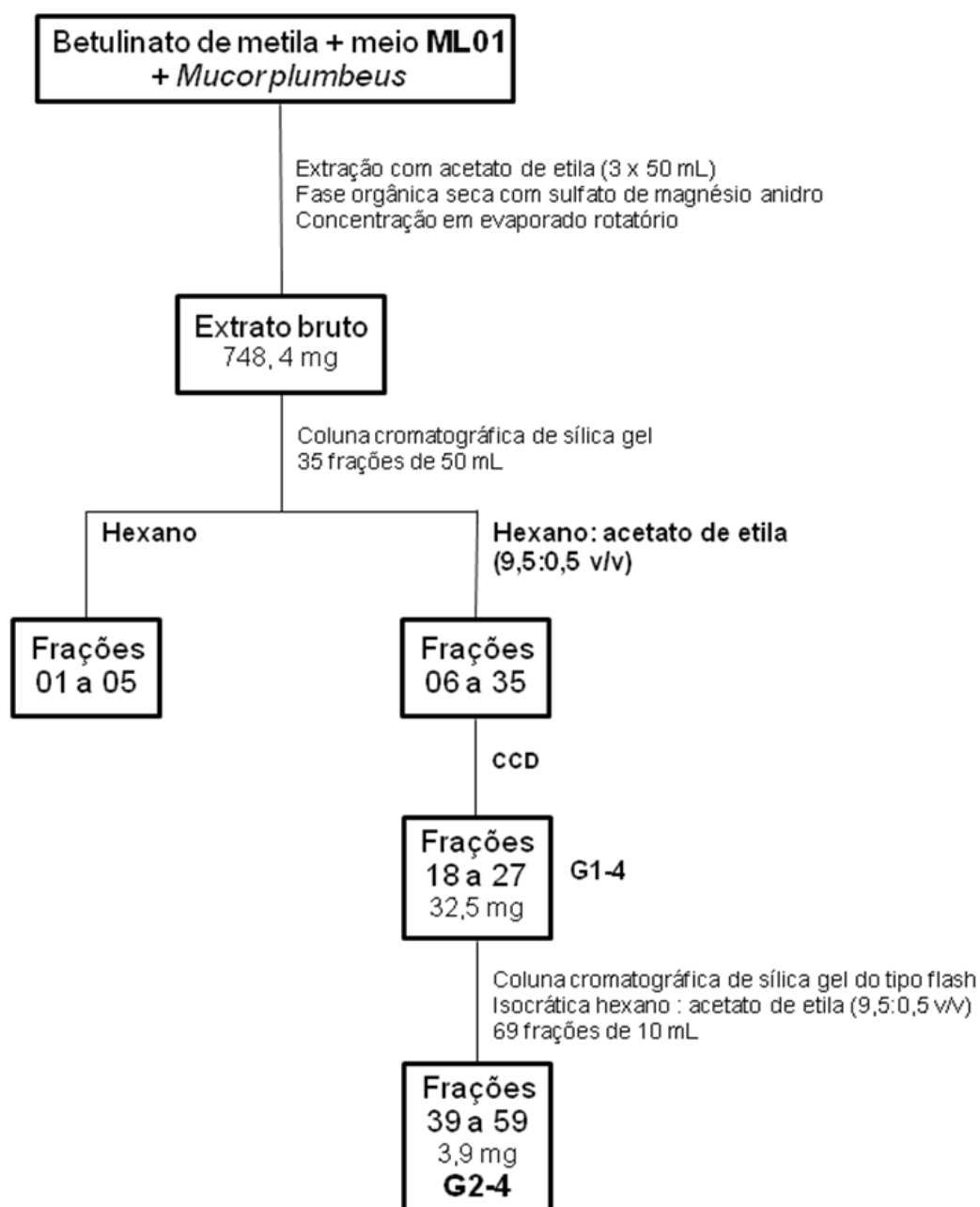
Tabela 14 – Dados de RMN de ^{13}C do β -sitosterol da literatura e aqueles obtidos para **157**

	δ_{C} β -sitosterol (Ferreira, 2006) (100 MHz, CDCl_3)	δ_{C} 157 (100 MHz, CDCl_3)
01	37,2	37,2
02	31,6	31,6
03	71,8	71,8
04	42,3	42,3
05	140,7	140,7
06	121,7	121,7
07	31,9	31,9
08	36,1	37,2
09	50,1	50,1
10	36,5	36,5
11	21,1	21,1
12	28,2	28,2
13	42,2	42,3
14	56,7	56,7
15	24,3	24,2
16	39,7	39,8
17	56,0	56,0
18	11,8	12,0
19	19,8	19,4
20	36,1	36,1
21	18,8	18,8
22	33,9	33,9
23	26,0	26,1
24	45,8	45,8
25	29,1	29,7
26	19,4	19,8
27	19,0	19,0
28	23,1	23,0
29	12,0	11,8

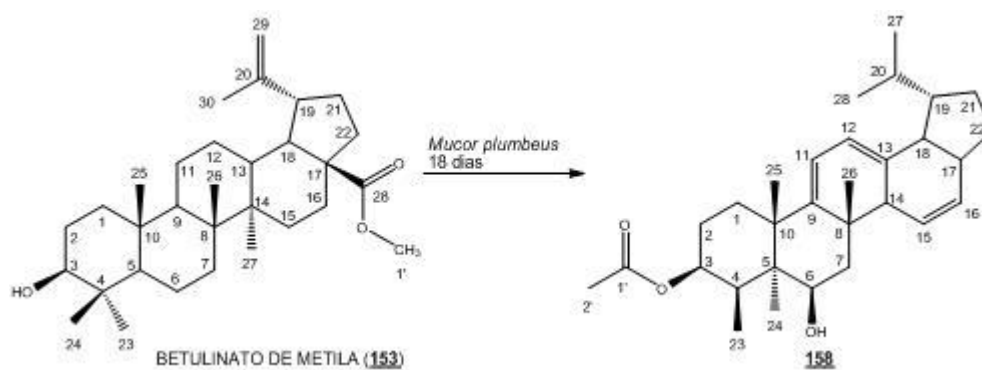
Tendo em vista que nenhum resultado satisfatório foi obtido a partir da incubação do lupeol, mesmo tendo sido utilizadas duas espécies fúngicas (*B. bassiana* e *M. plumbeus*) e, no caso de *M. plumbeus*, dois meios de cultura diferentes, este substrato não foi mais trabalhado. Diversos fatores podem ter contribuído para sua não-metabolização: a baixa solubilidade em água, o tamanho da molécula ou fatores espaciais que podem ter dificultado seu encaixe nos sítios enzimáticos das espécies testadas.

4.2.5– Biotransformação do betulinato de metila (**153**) por *Mucor plumbeus* (LAB 03) no meio de cultura ML01

O betulinato de metila (**153**) foi incubado com *M. plumbeus* utilizando o meio de cultura **ML01**, durante 18 dias. Após o término do período de incubação, o micélio foi filtrado e o meio extraído com acetato de etila. Por evaporação do solvente, obteve-se um resíduo (748,4 mg), que foi cromatografado em coluna de sílica gel, possibilitando o isolamento de **158** (Esquema 36 e 37 pag. 96).



Esquema 36 – Extração e separação cromatográfica do material proveniente da biotransformação do betulinato de metila (**146**) no meio **ML01**

Esquema 37 – Biotransformação de **153** por *Mucor plumbeus*

O produto **158** (acetato de (1S,5bS,7R,7aS,8R,9S,11aR)-7-hidroxi-1-isopropil-5b,7a,8,11a-tetrametil- 2, 3, 3a, 5a, 5b, 6, 7, 7a, 8, 9, 10, 11, 11a, 13b-tetradecahidro-1H- ciclopenta[a]chrisen-9-il) foi isolado como um óleo amarelado (3,9 mg, 1,72% de bioconversão) cujos seus espectros de RMN de ^1H (Anexo 04, Figura 54, 55 e 56, pag. 165 e 166) de ^{13}C (Anexo 04, Figura 57 e 58, pag. 167), subespectro DEPT-135 (Anexo 04, Figura 59 e 60, pag. 168) e os mapas de contorno HMQC (Anexo 04, Figura 61 e 62, pag. 169), HMBC (Anexo 04, Figura 63 e 64, pag. 170) e COSY (Anexo 04, Figura 65 e 66, pag. 171) foram analisados e os dados obtidos estão resumidos na Tabela 15 (pag. 98).

O estudo detalhado dos espectros de RMN permitiu propor uma estrutura para a substância **158**. Compararam-se os sinais dos espectros de RMN de ^{13}C do betulinato de metila (**153**) com o da substância **158**, tendo sido possível verificar que os sinais de carbono obtidos para **158** apresentaram alterações significativas em comparação com o material de partida. Foram encontrados 6 sinais de carbono na região de ligações duplas δ_{C} 115,5; 118,5; 130,4; 134,4; 138,7 e 155,7, indicando a presença de três ligações duplas na estrutura em C9 e C11, C12 e C13 e C15 e C16. Os sinais em δ_{C} 109,5 e 150,5 não foram observados em **158**, indicando uma redução da ligação dupla entre C20 e C29. O sinal em δ_{C} 69,4, indicou a presença de uma hidroxila, atribuída a C6. O sinal em δ_{C} 81,0 foi atribuído ao C3. A desproteção do sinal de C3 em relação a **153**, indicou a acetilação desta posição.

Os dados de RMN indicam um rearranjo de **153** para **158** onde houve a remoção de dois grupos metila e a migração de C24 de C4 para C5. O mapa de

contorno COSY mostra algumas correlações, como H19 com H18, H20 e H21, H15 com H14 e H16, H16 com H15 e H17, H11 com H12 (Figura 11, pag. 97).

O espectro de massas (Figura 12) da substância obtida apresentou um pico de m/z 452 correspondendo ao íon molecular, que corrobora com a estrutura proposta, que possui massa molecular calculada de 452,66. A Figura 13 mostra alguns possíveis fragmentos obtidos para **158**.

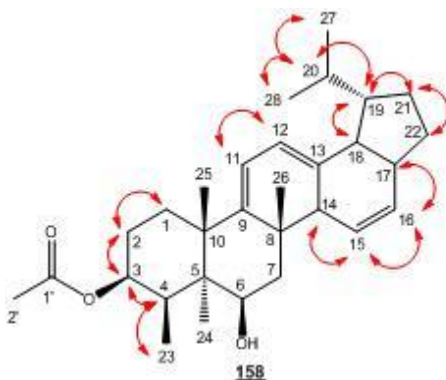


Figura 11 - Correlações observadas no mapa de contornos COSY para **158**

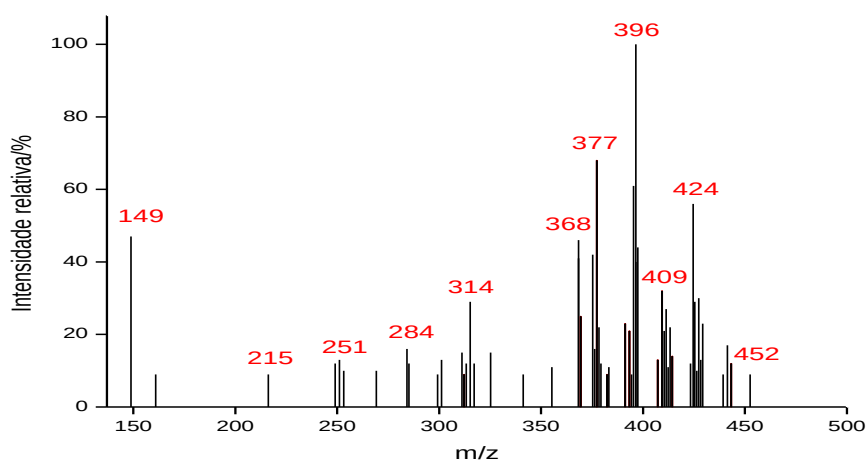


Figura 12 – Espectro de massas de **158**

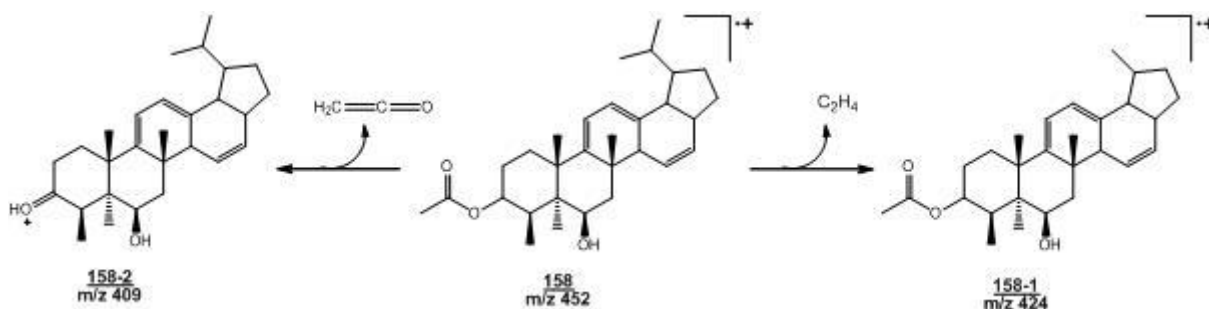


Figura 13 – Alguns possíveis fragmentos de **158**

Tabela 15 – Dados de RMN de ^1H e de ^{13}C obtidos para **153** e **158**

	δ_{C} 153 (100 MHz, CDCl_3)	δ_{C} 158 (100 MHz, CDCl_3)	δ_{H} 153 (400 MHz, CDCl_3)	δ_{H} 158 (400 MHz, CDCl_3)
01	38,7	38,0	1,66 α , m 0,87 β , s	1,18 s
02	27,4	28,6	1,55 m	1,17 s
03	78,9	81,0	3,18 dd, $J = 4,7 \text{ Hz e } 4,6 \text{ Hz}$	4,07 m
04	38,8	54,7	-	1,17 m
05	55,3	39,2	0,67 d, $J = 8,68 \text{ Hz}$	-
06	18,3	69,4	1,55 α , m 1,40 β , m	3,57 m
07	34,5	39,7	1,40 m	1,97
08	40,7	36,0	-	-
09	50,5	155,7*	1,25 m	-
10	37,2	43,3	-	-
11	20,9	115,5	1,25 α , m 1,40 β , m	5,51 m
12	25,5	118,5	1,03 β , m 1,66 α , m	5,50 m
13	38,2	138,7	2,20 m	-
14	42,4	53,4	-	1,83 m
15	30,6	134,4	1,40 β , m 1,88 α , m	5,14 m
16	32,1	130,4	1,40 β , m 2,20 α , m	5,14 m
17	56,5	41,8	-	1,79 m
18	46,9	45,2	3,00 m	1,87 m
19	49,5	39,4	1,55 m	1,97
20	150,5	32,0	-	1,41 m
21	29,6	20,0	1,14 α , m 1,40 β , m	1,97 1,57 m
22	36,9	30,9	1,40 α , m 1,88 β , m	1,17 m
23	27,9	15,2	0,91 s	0,87 m
24	15,3	11,0	0,75 s	0,56 s
25	16,1	16,5	0,96 s	0,85 s
26	15,9	20,0	0,82 s	0,95 s
27	14,7	18,9	0,96 s	0,76 m
28	176,6	18,6	-	0,76 m
29	109,5	-	4,59 a, s 4,73 b, s	-
30	19,3	-	1,66 m	-
1'	51,2	169,7*	3,66 s	-
2'		20,8		0,95 s

* sinais atribuídos pelo mapa de contornos HMBC

4.2.6 – Biotransformação da β -amirina (**154**) por *Lecanicillium muscarinium*

A β -amirina (**154**) foi incubada com *Lecanicillium muscarinium* utilizando o meio de cultura **ML06**, durante 15 dias. Após o término do período de incubação, o micélio foi filtrado e o meio extraído com acetato de etila. Por evaporação do

solvente, obteve-se um resíduo (1,23 g), que foi cromatografado em coluna de sílica gel. O Esquema 38 (pag. 100) mostra o processo de extração do meio de cultura usado para a biotransformação da β -amirina (**154**) e da separação em coluna cromatográfica do extrato bruto. A análise por CCD das frações obtidas indicou a presença de possíveis produtos no grupo de frações **G1-5**, que foi submetida a outra coluna cromatográfica de sílica gel obtendo-se 45,8 mg de **G2-5**, que foi submetido a uma coluna cromatográfica em alumina neutra obtendo-se **G3-5**. Este grupo ainda impuro, foi submetido a outra coluna cromatográfica de sílica gel obtendo-se **G4-5**.

O grupo de frações **G4-5** (13,9 mg) apresentava um único sinal quando analisado por cromatografia em camada delgada de sílica gel. Após a obtenção de seus espectros de RMN de ^1H (Anexo 05, Figura 68, 69 e 70, pag. 173 e 174) e de ^{13}C (Anexo 05, Figura 71, 72 e 73, pag. 174 e 175), subespectro DEPT 135 (Anexo 05, Figura 74 e 75, pag. 176) e os mapas de contornos HMQC (Anexo 05, Figura 76 e 77, pag. 177) HMBC (Anexo 05, Figura 78 e 79, pag. 178) e COSY (Anexo 05, Figura 80 e 81, pag. 179), estes foram analisados. O espectro de RMN de ^{13}C mostrou a presença de 60 sinais de carbono, indicando a presença de uma mistura, sendo submetida à análise por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas, tendo sido obtido o ionograma apresentado na Figura 14.

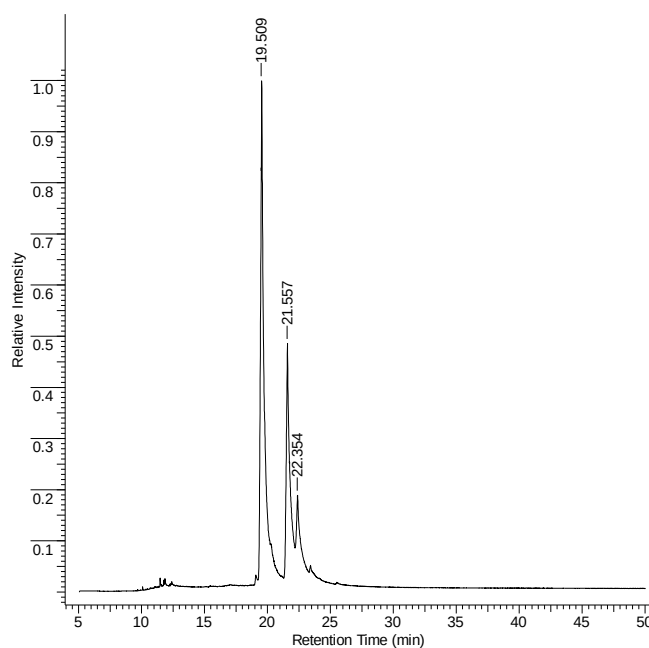
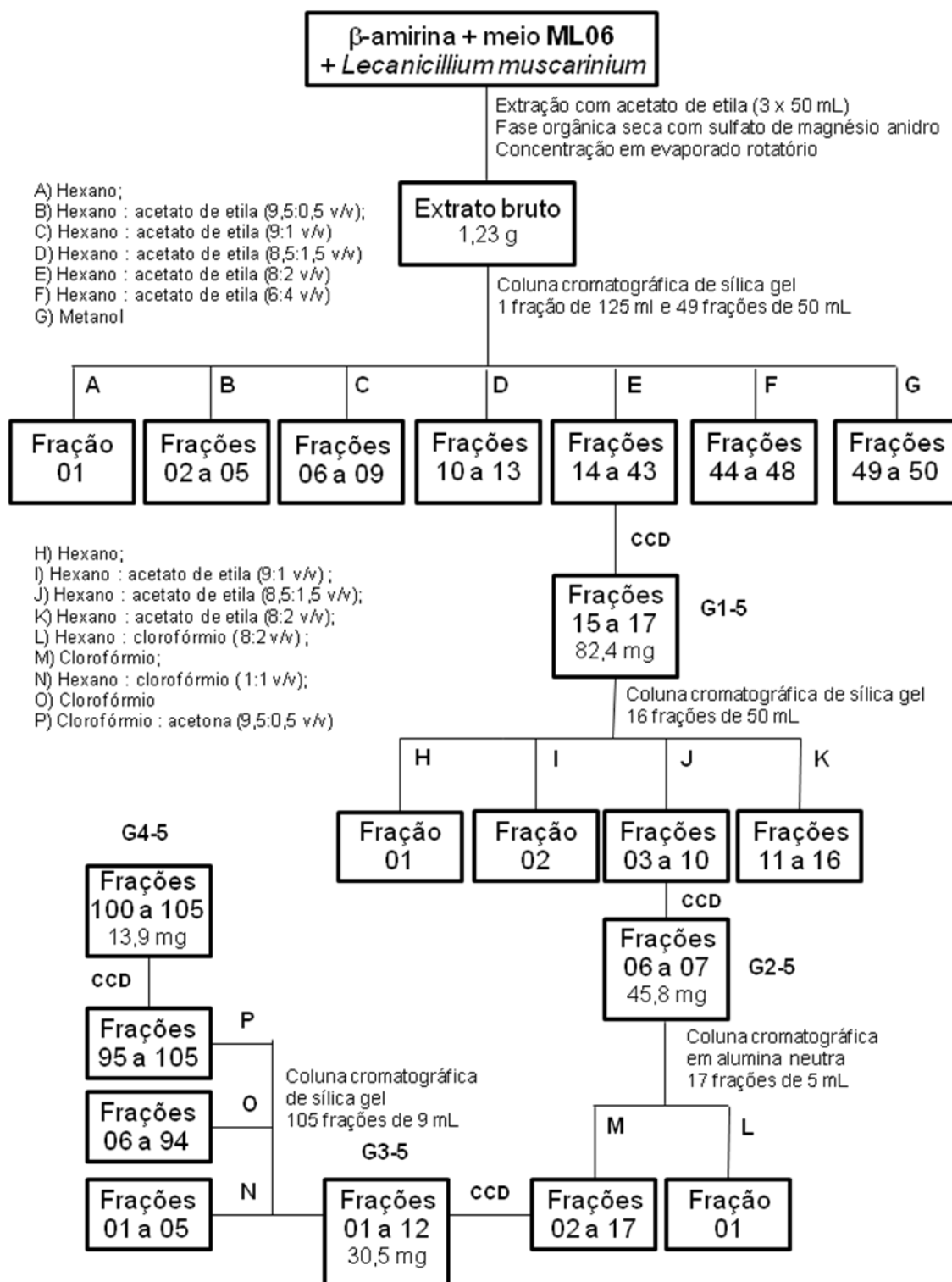


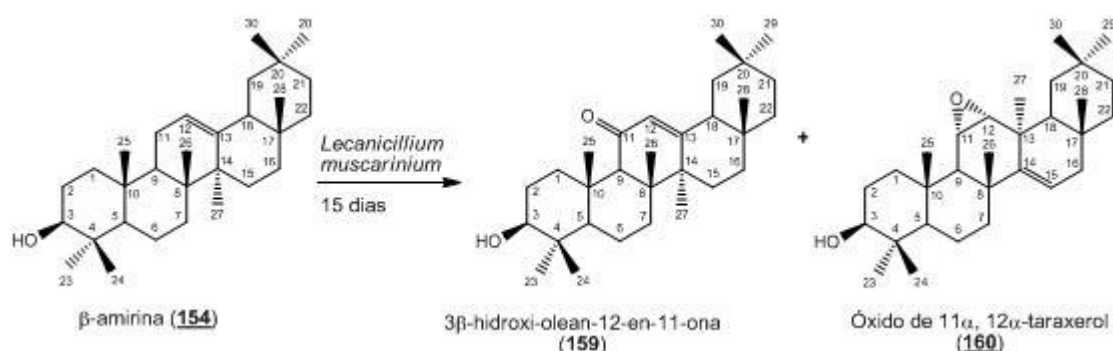
Figura 14- Ionograma da mistura das substâncias presentes no grupo G4-5



Esquema 38 – Extração e separação cromatográfica do material proveniente da biotransformação do β -amirina (154) no meio ML06

Pode-se observar no cromatograma a presença de dois picos majoritários nos tempos de retenção 19,509 e 21,557 min; o pico em 22,354 min foi atribuído a uma impureza contida na amostra. Dos picos em 19,509 e 21,557 min foram obtidos os

espectros de massas (Figuras 15 e 17, pag. 102), ambos apresentaram um pico com m/z 440, correspondente às massas moleculares das substâncias presentes, **159** e **160** (Esquema 39). As Figuras 16 e 18 (pag. 102 e 103) mostram alguns possíveis fragmentos propostos para **159** e **160**. Comparando-se a intensidade dos sinais do cromatograma com os do espectro de RMN de ^{13}C , sugeriu-se que a substância majoritária **160** corresponda ao sinal no tempo de retenção de 19,509 min e, a substância minoritária **159**, ao sinal em 21,557 min no cromatograma.



Esquema 39 – Biotransformação da **154** por *Lecanicillium muscarinum*

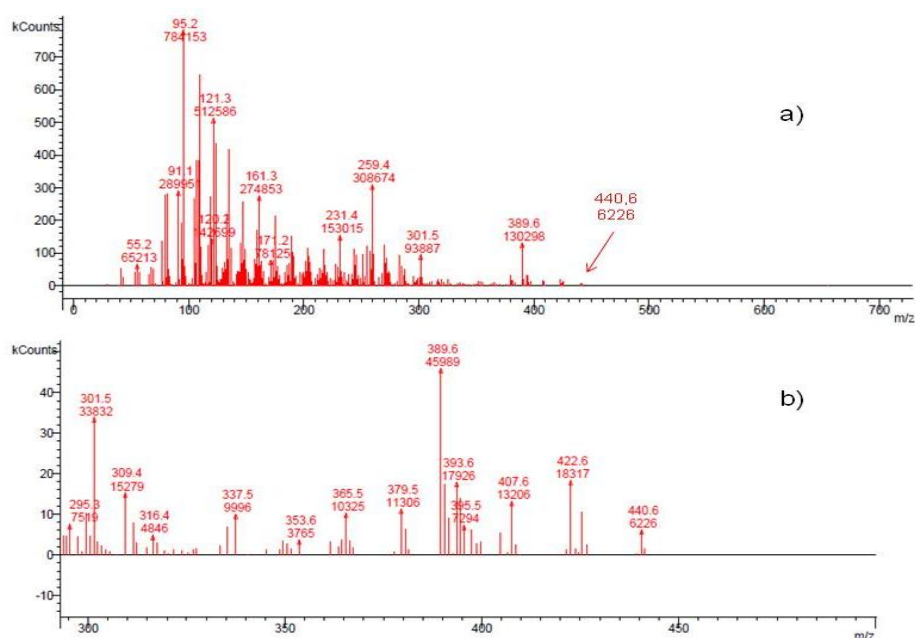


Figura 15 – Espectro de massas de 3 β -hidroxi-olean-12-en-11-ona (**159**), t_r = 21,557 min. a) espectro de massas completo. b) expansão do espectro de massas na região de 290 a 500 m/z

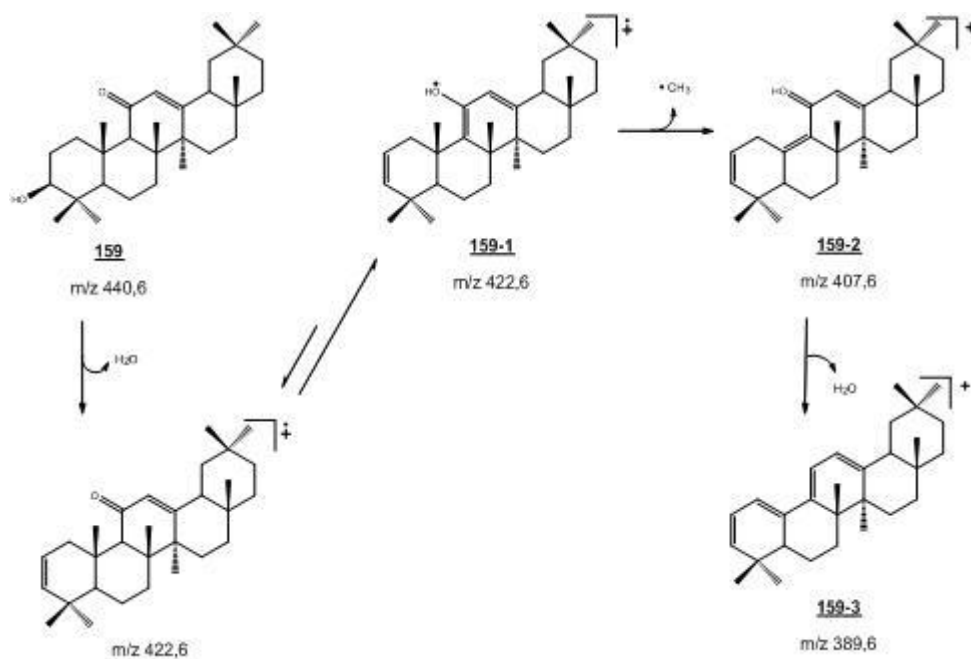


Figura 16 – Alguns possíveis fragmentos para **159** (Adaptado de Budzikienwicz *et al.*, 1964)

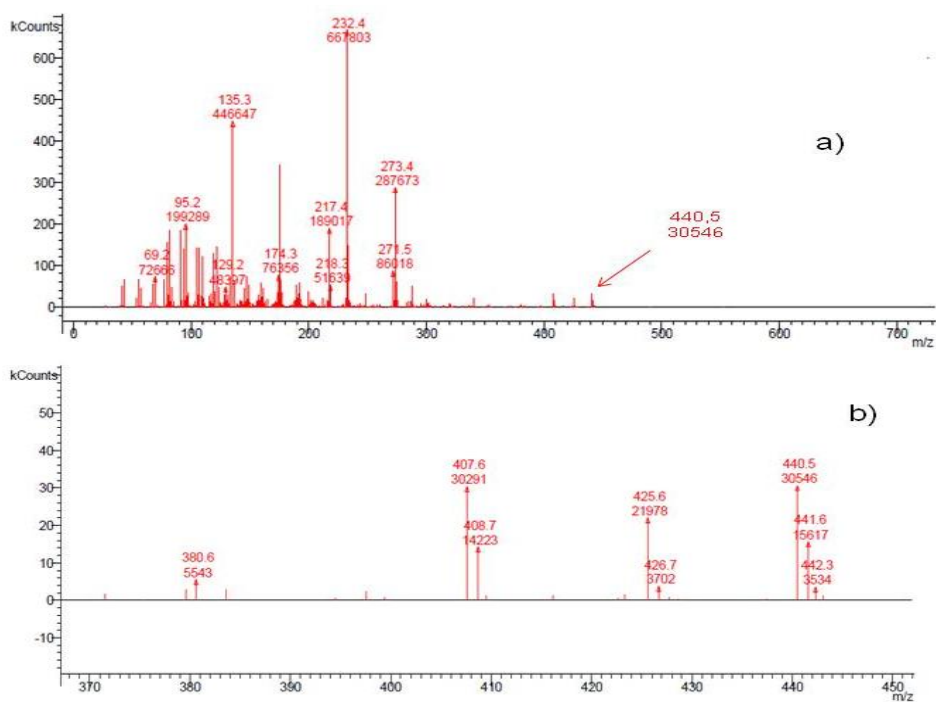


Figura 17 – Espectro de massas do óxido de 11 α ,12 α -taraxerol (**160**), t_r = 19,507 min . a) espectro de massas completo. b) expansão do espectro de massas na região de 350 a 470 m/z

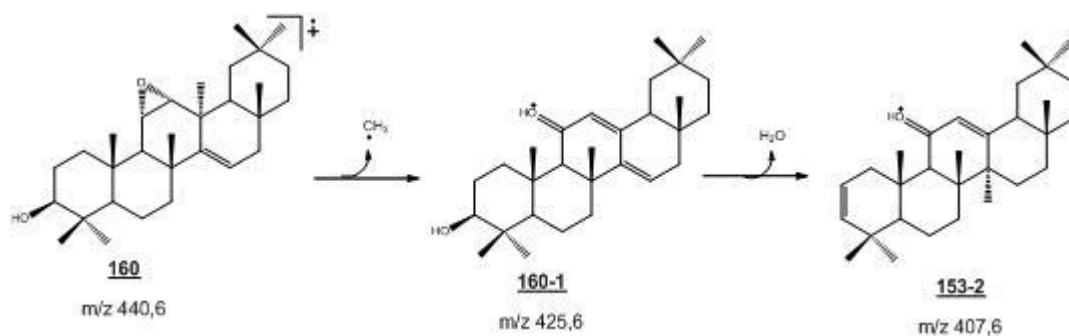
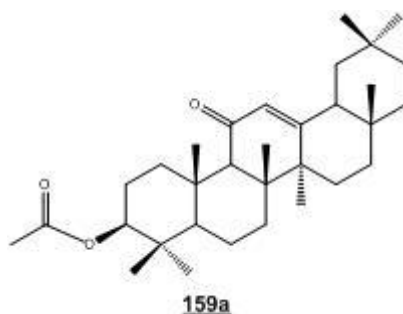


Figura 18 - Alguns possíveis fragmentos para **160**

No espectro no infravermelho do grupo de frações **G4-5** (Anexo 05, Figura 67, pag. 172) foram observadas bandas de absorção em 3504 cm^{-1} (estiramento de ligação O-H), 2964 cm^{-1} (estiramento de ligação C-H de natureza alifática e/ou alicíclica), 1741 cm^{-1} (deformação axial C=O), 1654 cm^{-1} (deformação axial C=C), 1463 e 1378 cm^{-1} (deformações de ligações C-H de natureza alifática e/ou alicíclica), 1257 cm^{-1} (deformação axial simétrica de anel epóxi), 1095 e 1027 (deformações de ligações C-H de natureza alifática e/ou alicíclica) e em 802 cm^{-1} (banda de 12μ de anel epóxi).

Comparando-se os sinais dos espectros de RMN de ^{13}C da β -amirina com aqueles da mistura, foi possível verificar que os sinais de carbono obtidos para a substância **159** não apresentaram alterações significativas em comparação ao material de partida, exceto pelo sinal do C11 ($\delta_{\text{C}}\ 23,5$ no material de partida) que não foi encontrado no espectro de RMN de ^{13}C da mistura (Anexo 05, Figura 71, 72 e 72, pag. 174 e 175). Por outro lado, foi encontrado um novo sinal ($\delta_{\text{C}}\ 200,2$) no espectro de RMN de ^{13}C da mistura, indicando a presença de uma carbonila na molécula, que foi atribuída ao C11, pois o sinal de H12 no material de partida era um tripleto ($J= 3,5\text{ Hz}$) e, para a substância **159**, o sinal observado foi um simpleto ($\delta_{\text{H}}\ 5,58$) (Anexo 05, Figura 68, 69 e 70, pag. 173 e 174), congruente com a ausência de hidrogênios em C11. Portanto, **159** foi identificado como 3 β -hidroxi-olean-12-en-11-ona e os dados de RMN desta substância estão em conformidade com os do derivado acetilado (**159a**) encontrado na literatura (Agrawal e Jain, 1992).



Quanto à substância **160**, o espectro de RMN de ^{13}C mostrou que o deslocamento químico dos carbonos pertencentes aos anéis A, B e E não foram significativamente deslocados. Na região dos sinais de ligação dupla, dois deslocamentos químicos foram observados, mas com valores bem diferentes daqueles observados para o material de partida, levando à conclusão de que uma ligação dupla estaria presente, mas não nos carbonos C12 e C13 como no material de partida. Os valores dos deslocamentos químicos destes dois novos carbonos sp^2 , δ_{C} 157,2 e δ_{C} 118,8, são característicos de triterpenos da classe dos taraxeranos, compostos que possuem uma ligação dupla entre os carbonos C14 e C15 e um grupo metila em C13 (Tanaka *et al.*, 1988). Desta forma, postulou-se que, para a formação da substância **160**, houve uma migração do grupo metila C27 de C14 para C13, o que foi corroborado pela correlação (^3J) observada no mapa de contornos HMBC (Anexo 05, Figura 78 e 79, pag. 181) entre C27 (δ_{C} 30,2) e H12 (δ_{H} 2,81), entre C13 (δ_{C} 36,6) e H27 (δ_{H} 0,86). Os sinais de carbono em δ_{C} 53,6 e 58,2 foram compatíveis com a presença de um epóxido em C11-C12. Estes dados levaram à proposta da estrutura da substância **160** como sendo o óxido de $11\alpha,12\alpha$ -taraxerol, que teria sido formado a partir de um rearranjo da β -amirina. Os dados de RMN para a substância **160** foram comparados com os encontrados na literatura (Tanaka & Matsunaga, 1988) mostrando total conformidade (Tabela 16, pag. 105). Os dados de RMN de ^1H das substâncias **159** e **160** estão resumidos na Tabela 17 (pag. 106).

As atribuições dos deslocamentos químicos de H e C da substância **160** foram corroboradas pelas correlações nos mapas de correlação HMQC (Anexo 05, figura 76 e 77, pag. 177), HMBC (Anexo 05, Figura 78 e 79, pag. 178), NOESY (Anexo 05, Figura 82 e 83, pag. 180) e COSY (Anexo 05, Figura 80 e 81, pag. 179). No mapa de contornos COSY foram observadas as correlações entre H11 e H12 (δ_{H} 3,12 e 2,81) e entre H11 e H9 (δ_{H} 3,12 e 0,96). Além disso, o mapa de contornos

NOESY mostrou proximidade espacial entre H11 e H12 e o grupo metila C26, mostrando assim que ambos, H11 e H12, estão na posição β . Também foram encontradas correlações no NOESY entre H1 e H11 e H26 e H11, correlações estas apresentadas na Figura 19.

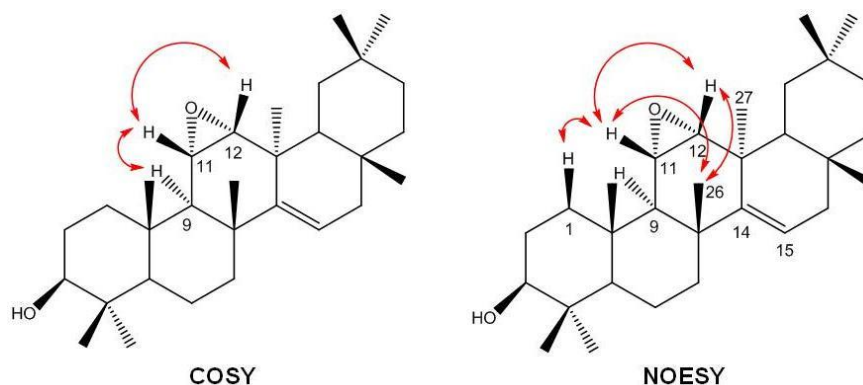


Figura 19 – Correlações observadas nos mapas de contornos COSY e NOESY para **160**

Tabela 16 - Comparação das atribuições de RMN de ^{13}C das substâncias **154**, **159** e **160** com dados da literatura

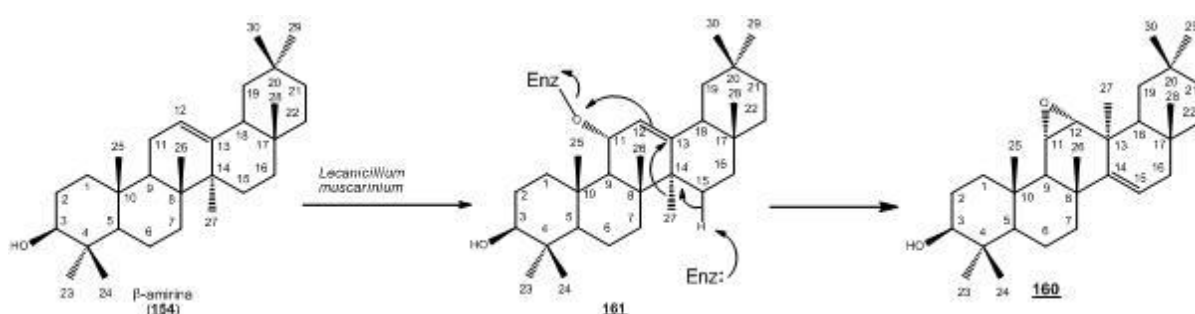
	δ_{C} 154 (100 MHz, CDCl_3)	δ_{C} 159 (100 MHz, CDCl_3)	δ_{C} 159a (Agrawal e Jain, 1992) (CDCl_3)	δ_{C} 160 (100 MHz, CDCl_3)	δ_{C} 160 (Tanaka e Matsunaga, 1988) (75,2 MHz, CDCl_3)
01	38,6	39,2	38,7	38,2	38,2
02	26,9	26,4	23,4	26,9	26,8
03	79,0	78,3	80,5	78,5	78,9
04	38,7	39,3	38,0	38,7	38,6
05	55,2	55,0	54,9	54,7	54,6
06	18,4	17,5	18,4	18,9	18,9
07	32,6	32,8	32,6	33,1	33,1
08	39,8	43,4	43,3	38,9	38,8
09	47,6	61,8	61,5	51,9	53,6
10	36,9	37,1	36,9	37,5	37,4
11	23,5	200,2	201,5	53,6	51,9
12	121,7	128,3	127,9	58,2	58,2
13	145,2	170,4	170,9	36,6	36,5
14	41,7	45,4	45,3	157,2	157,1
15	26,1	26,4	26,4	118,8	118,8
16	27,2	27,3	27,3	35,2	35,2
17	32,5	32,3	32,3	35,3	35,4
18	47,2	47,6	47,5	48,1	48,0
19	46,8	45,2	45,0	40,4	40,3
20	31,0	31,0	31,0	28,7	28,7
21	34,7	34,4	34,4	36,5	36,5
22	37,1	36,5	36,4	38,4	38,2
23	28,1	28,7	28,0	28,0	27,9
24	15,5	16,4	16,6	16,9	16,9
25	15,5	15,7	15,7	15,6	15,4
26	16,8	18,7	17,3	27,0	27,0
27	26,0	23,4	23,5	30,2	30,2
28	28,4	28,2	28,7	29,9	29,9
29	33,3	33,0	33,0	33,6	33,6
30	23,7	23,5	23,5	19,5	19,5

Observou-se uma inversão na atribuição dos carbonos C-9 e C-11 de **160** com relação à atribuição da literatura. A inversão apresentada se justifica pelos dados obtidos na análise do mapa de contornos HMQC, tendo sido confirmada pelos mapas de contornos COSY e ROESY, como mostra a Figura 19 (pag. 105).

Tabela 17 - Dados de RMN de ^1H da β -amirina (**154**) e dos produtos de biotransformação **159** e **160**

	δ_{H} 154 (400 MHz, CDCl_3)	δ_{H} 159 (400 MHz, CDCl_3)	δ_{H} 160 (400 MHz, CDCl_3)
01	0,97 1,65	0,98 s	1,25 1,87
02	0,73 1,65	0,96 s 1,71	1,08 1,73
03	3,22 dd ($J= 5,0 \text{ Hz}$ e $4,5 \text{ Hz}$)	3,25	3,25
04	-	-	-
05	0,73	0,70 s	0,76
06	1,40 1,56	0,84 s 1,61	1,50 1,62
07	1,35 1,50	0,90 1,25	0,90 1,02
08	-	-	-
09	1,56	2,34 s	0,96
10	-	-	-
11	1,85	-	3,12 t ($J= 5,2 \text{ Hz}$)
12	5,18 t ($J= 3,5 \text{ Hz}$)	5,58 s	2,81
13	-	-	-
14	-	-	-
15	0,97 1,10	0,96 s 1,18	5,55 dd ($J= 8,3 \text{ Hz}$ e $3,3 \text{ Hz}$)
16	0,97 1,60	1,02 s 1,66	1,13 1,49
17	-	-	-
18	1,65	2,13	1,22
19	0,97 1,58	1,08 s 1,69	1,31 2,08
20	-	-	-
21	1,10 1,32	1,16 1,35	1,18 1,50
22	1,25 1,45	1,13 1,49	1,73 2,00
23	0,98	0,99	1,08
24	0,79	1,13	1,08
25	0,93	0,84	0,84
26	0,95	1,67	1,02
27	1,13	1,35	0,86
28	0,83	1,02	0,99
29	0,87	1,29	1,03
30	0,87	0,92	0,86

Foi proposto um mecanismo para a formação da substância **160**, apresentado no Esquema 40, a partir de um rearranjo do esqueleto triterpênico, especialmente por ter sido isolada, da mesma reação, a substância **159**, na qual houve uma oxidação no carbono 11 realizada pelo fungo. A hidroxilação de C11 seria a rota de partida para a formação da substância **160**. A hidroxilação em C11 é muito comum em biotransformações com o fungo *L. muscarinum* (Hanson *et al.*, 1995). Nesta proposta, a formação da substância **160** partiria de uma hidroxilação em C11 por ação de uma primeira enzima levando a **161**. Uma segunda enzima capturaria um próton de C15, levando à formação de uma ligação dupla em C14-C15, induzindo a migração do grupo metila C27 de C14 para C13 que, concomitantemente, direcionaria os elétrons do orbital p de C12 para o oxigênio ligado ao C11, promovendo o desligamento da enzima do oxigênio, formando o epóxido. Este rearranjo oxidativo enzimático é semelhante ao descrito por Agata *et al.* (1965), que afirmam que este tipo de rearranjo molecular é “alimentado pela oxidação do C11”, sinteticamente promovida por aqueles autores.



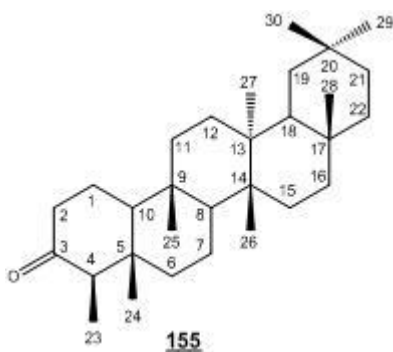
Esquema 40 – Proposta do mecanismo de formação da substância **160**

4.2.7 – Biotransformação da friedelina (**155**)

Um fator muito importante nos processos de biotransformação é a composição do meio de cultura, sendo um dos principais fatores responsáveis por alterações na produtividade. A presença de alguns co-substratos pode aumentar o desempenho das bioconversões realizadas pelos microrganismos (Bicas *et al.*, 2008). Assim, realizou-se a avaliação de quatro meios de cultura, para se determinar qual teria o melhor desempenho, levando a uma maior produtividade na biotransformação do substrato **155**. Os meios testados foram o **ML01**, **ML02**, **ML03**

e **ML04** que, em sua composição, possuem D-glicose como fonte de carbono. Como fonte de nitrogênio (necessário para o crescimento de microrganismos) foram usados peptona e extrato de levedura no meio de cultura **ML01**, nos meios de cultura **ML02** e **ML03** foi usado o licor de milho (*corn steep liquor*) em concentrações diferentes e, no meio de cultura **ML04**, foi usado o aminoácido asparagina e a vitamina tiamina. Nos meios de cultura **ML02**, **ML03** e **ML4** foram adicionados sais inorgânicos (cloreto de potássio, nitrato de sódio, sulfato de magnésio, sulfato ferroso, fosfato monobásico de potássio e tartarato de amônia).

A escolha pela utilização licor de milho (*corn steep liquor*) como fonte de nitrogênio nos meios de cultura **ML02** e **ML03** baseou-se no fato que van Zyl e colaboradores (2009) e Young e colaboradores (1997) relataram um aumento da produção de enzimas em microrganismos quando foi utilizado o licor de milho como componente dos meios de cultura. Outra vantagem é ser mais barato que a peptona e o extrato de levedura. Ghanem & Yusef (1992) relatam que aminoácidos, vitaminas e sais orgânicos podem influenciar na ativação de algumas enzimas, por sua ação como cofatores.

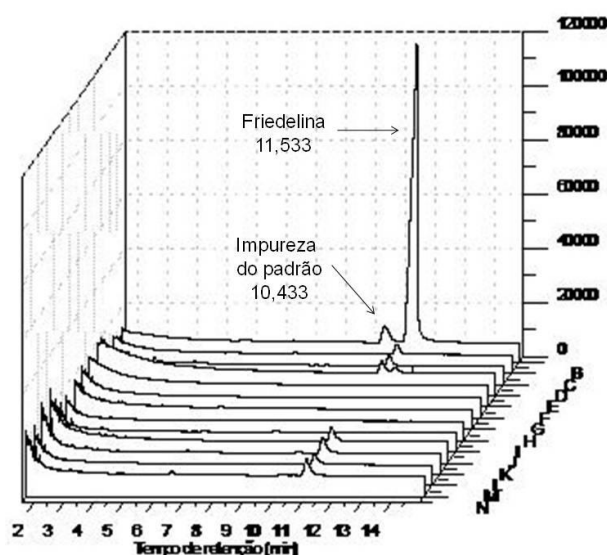


4.2.7.1 – Biotransformação da friedelina (**155**) por *Mucor plumbeus* (LAB 03) nos meios de cultura ML01, ML02, ML03 e ML04 monitorada por cromatografia gasosa

A friedelina (**155**) foi incubada com *Mucor plumbeus* utilizando os meios de cultura **ML01**, **ML02**, **ML03** e **ML04**, sendo realizados simultaneamente dois experimentos controle. O controle positivo constituiu-se do meio de cultura acrescido do substrato **155**, com o objetivo de certificar sua estabilidade nos meios de culturas

utilizados. O segundo controle, negativo, constituiu-se dos diferentes meios de cultura contendo o fungo, para se averiguar a interferências de possíveis metabólitos secundários produzidos por *M. plumbeus* nos experimentos. Os experimentos foram conduzidos por 14 dias, com amostragem após 3, 6, 10 e 14 dias de incubação. Nestas amostras, o meio líquido foi filtrado, extraído e os extratos foram analisados por cromatografia gasosa.

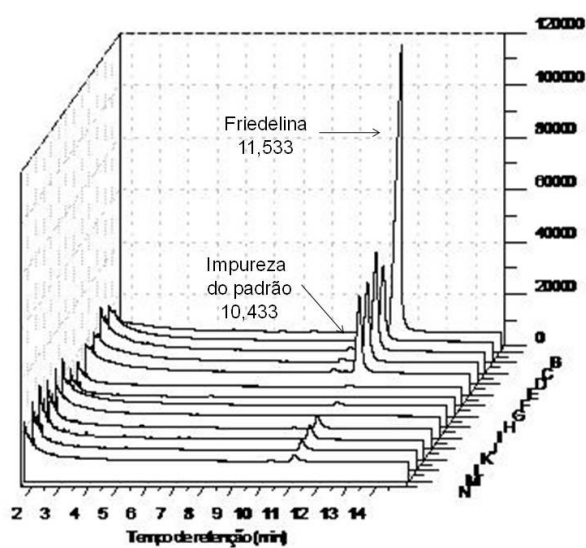
Os cromatogramas obtidos (Figuras 20, 21, 22 e 23, pag. 110 e 111) foram analisados. Um pico observado no tempo de retenção 1,433 minutos foi excluído por ser o pico do solvente e o pico em 10,433 minutos constitui-se de uma impureza do padrão. Pela comparação dos brancos positivos e negativos com as reações, observou-se que não houve nenhuma mudança no substrato (**155**) ao longo do tempo dos experimentos. Verificou-se também que o pico da friedelina nos brancos, com exceção do branco no meio **ML02**, era muito pequeno, sugerindo que as amostras estavam muito diluídas, tornando, assim difícil a visualização de algum produto formado pela reação da friedelina com o fungo *M. plumbeus* nos meios de cultura analisados.



Legenda:

- B) Friedelina padrão;
- C) Branco positivo com 3 dias;
- D) Branco positivo com 6 dias;
- E) Branco positivo com 10 dias;
- F) Branco positivo com 14 dias;
- G) Branco negativo com 3 dias;
- H) Branco negativo com 6 dias;
- I) Branco negativo com 10 dias;
- J) Branco negativo com 14 dias;
- K) Reação com 3 dias;
- L) Reação com 6 dias;
- M) Reação com 10 dias;
- N) Reação com 14 dias.

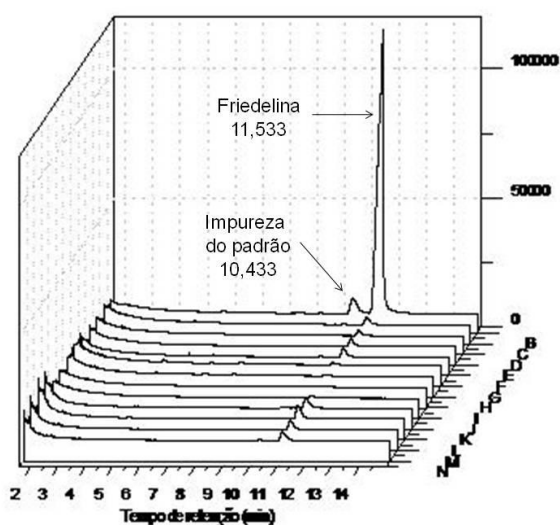
Figura 20 – Cromatogramas dos extratos resultantes da incubação de **155** com *Mucor plumbeus* no meio **ML01**



Legenda:

- B) Friedelina padrão;
- C) Branco positivo com 3 dias;
- D) Branco positivo com 6 dias;
- E) Branco positivo com 10 dias;
- F) Branco positivo com 14 dias;
- G) Branco negativo com 3 dias;
- H) Branco negativo com 6 dias;
- I) Branco negativo com 10 dias;
- J) Branco negativo com 14 dias;
- K) Reação com 3 dias;
- L) Reação com 6 dias;
- M) Reação com 10 dias;
- N) Reação com 14 dias.

Figura 21 – Cromatogramas dos extratos resultantes da incubação de **155** com *Mucor plumbeus* no meio **ML02**



Legenda:

- B) Friedelina padrão;
- C) Branco positivo com 3 dias;
- D) Branco positivo com 6 dias;
- E) Branco positivo com 10 dias;
- F) Branco positivo com 14 dias;
- G) Branco negativo com 3 dias;
- H) Branco negativo com 6 dias;
- I) Branco negativo com 10 dias;
- J) Branco negativo com 14 dias;
- K) Reação com 3 dias;
- L) Reação com 6 dias;
- M) Reação com 10 dias;
- N) Reação com 14 dias.

Figura 22 – Cromatogramas dos extratos resultantes da incubação de **155** com *Mucor plumbeus* no meio **ML03**

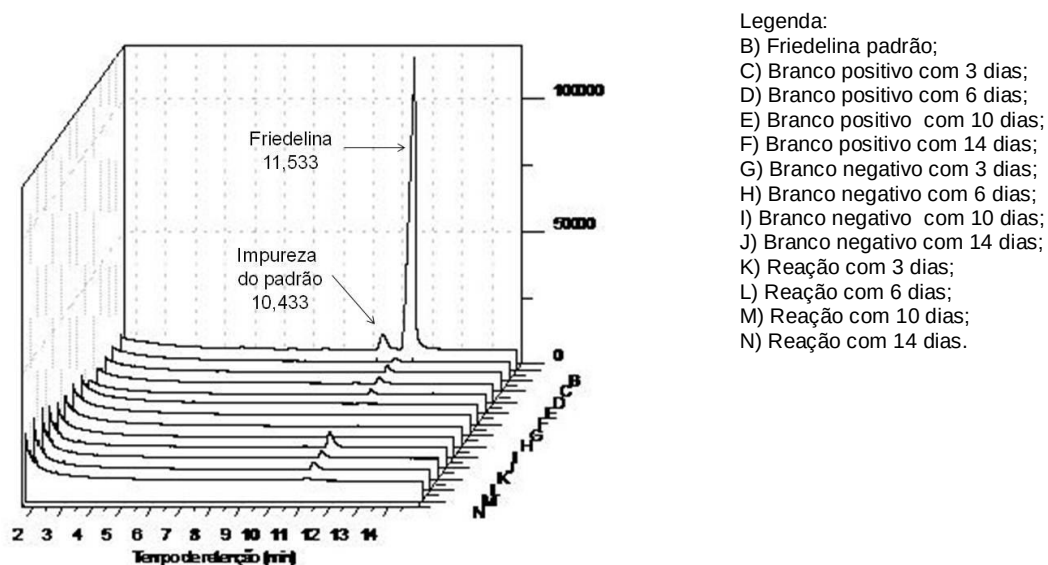


Figura 23 – Cromatogramas dos extratos resultantes da incubação de **155** com *Mucor plumbeus* no meio **ML04**

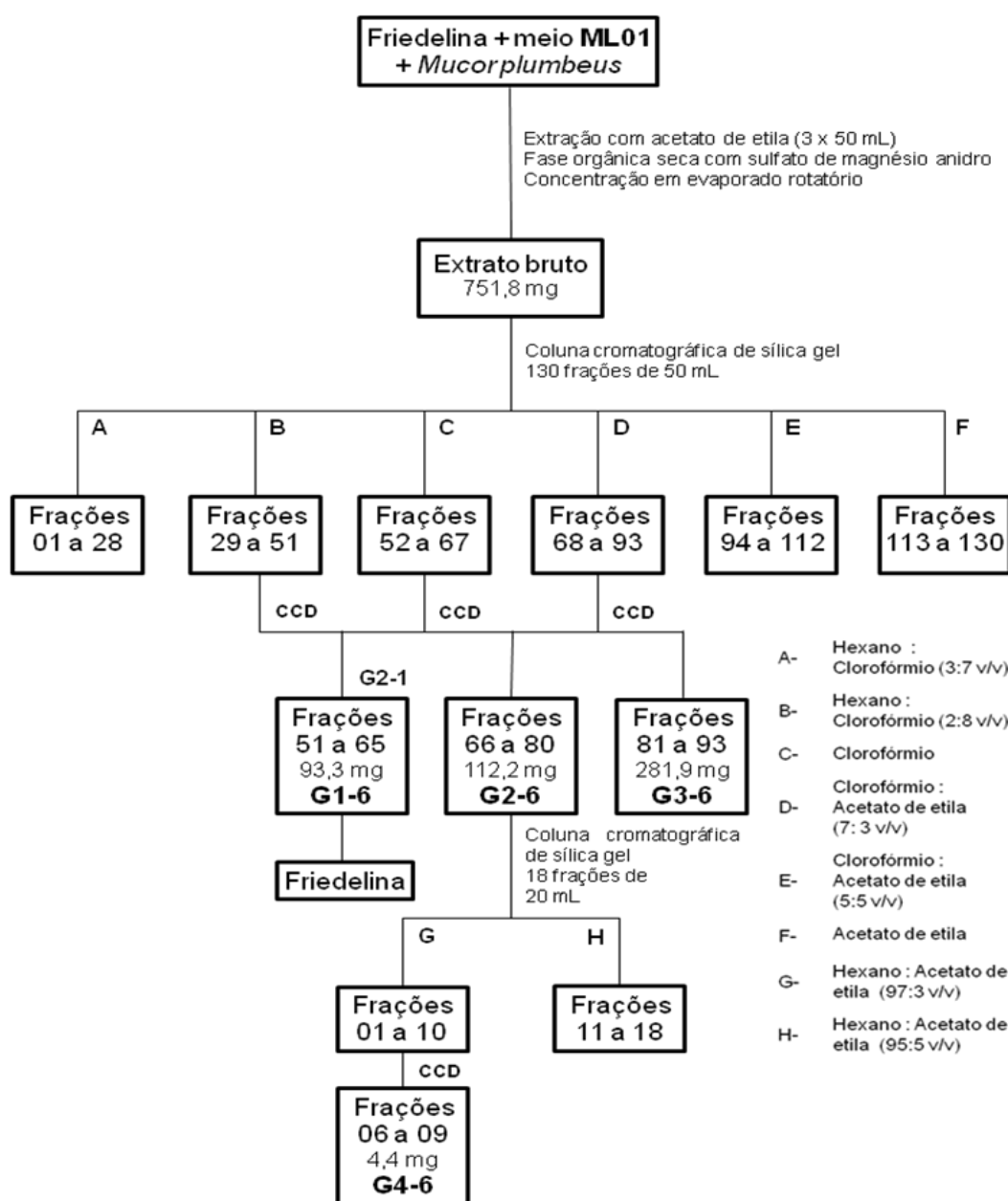
Os cromatogramas obtidos foram analisados, não tendo sido observada a presença de outros picos que correspondem a produtos da biotransformação da friedelina. Somente foram observados os picos referentes ao material de partida e a uma impureza do padrão. Repetiu-se o experimento com o meio de cultura **ML01** com um número maior de frascos na tentativa de obter-se produtos de biotransformação da friedelina com o fungo *M. plumbeus*, sendo este experimento relatado no item que se segue.

4.2.7.2 – Biotransformação da friedelina (**155**) por *Mucor plumbeus* (LAB 03) no meio de cultura ML 01

O Esquema 41 (pag. 112) mostra o processo de extração do meio de cultura usado neste experimento para a biotransformação da friedelina (**155**) e da separação em coluna cromatográfica do extrato bruto. A análise por CCD das frações obtidas permitiu a reunião de três grupos de frações. O grupo 1 foi identificado como sendo a friedelina (**155**) pela comparação em CCD com o material de partida. O grupo 2 foi submetido a outra coluna cromatográfica e, por comparação em CCD, foi reunido um novo grupo de frações (**G4-6**) pesando 4,4 mg, contendo uma substância de coloração levemente amarelada. O grupo 3 resultou em uma mistura de substâncias que não foram possíveis de serem separadas por cromatografia em coluna de sílica gel.

Os espectros de RMN de ^1H e de ^{13}C , subespectro DEPT-135 e os mapas de contornos HMQC de **G4-6**, foram obtidos e analisados.

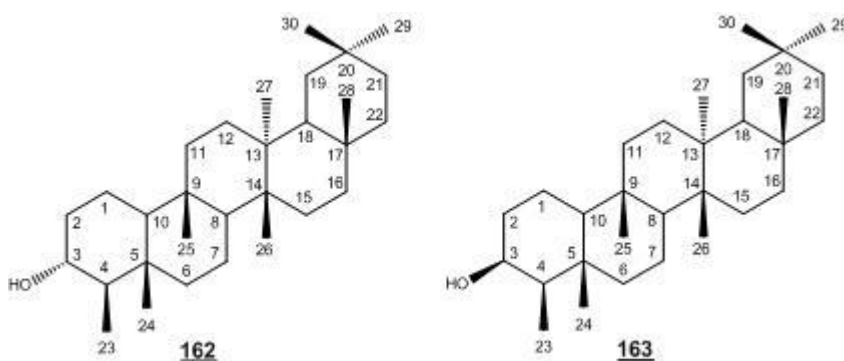
O espectro de RMN de ^1H de **G4-6** (Anexo 06, Figura 84, pag. 181) apresentou simpletos em δ_{H} 0,94; δ_{H} 0,96; δ_{H} 0,99 e δ_{H} 1,01 que foram atribuídos a grupos metila. Apresentou também um multiplete em δ_{H} 3,71 que foi atribuído ao hidrogênio H-3, indicando a redução da carbonila de **155**. O multiplete em δ_{H} 1,30 foi atribuído à presença de um contaminante alifático.



Esquema 41 – Extração e separação cromatográfica do material proveniente da biotransformação de

Pela análise do espectro de RMN de ^{13}C (Anexo 06, Figura 85, pag. 182) e seu subespectro DEPT-135 (Anexo 06, Figura 86, pag. 182) foi possível atribuir a maioria dos carbonos da molécula mostrando não ter havido alterações nos anéis B, C, D e E. Outras informações de grande relevância foram obtidas do espectro de RMN de ^{13}C , como o aparecimento do sinal em δ_{C} 72,7 evidenciando a presença de carbono hidroxilado. Não foi observado o sinal em δ_{C} 213, indicando que a carbonila de C-3 da friedelina pode ter sido reduzida. O sinal em δ_{C} 29,7 foi atribuído à presença de um contaminante alifático.

Com base nestas informações as duas substâncias possíveis de serem formadas pela biotransformação da friedelina (**155**) pelo fungo *M. plumbeus* seriam o 3α -friedelinol (**162**) e o 3β -friedelinol (**163**), substâncias já relatadas na literatura.



A comparação dos dados de RMN de ^{13}C de **G2-6** com dados relatados para o 3α -friedelinol (**162**) e 3β -friedelinol (**163**) (Duarte, 2000) (Tabela 18, pag. 114), indicou que **G4-6** era o 3β -friedelinol (**163**)

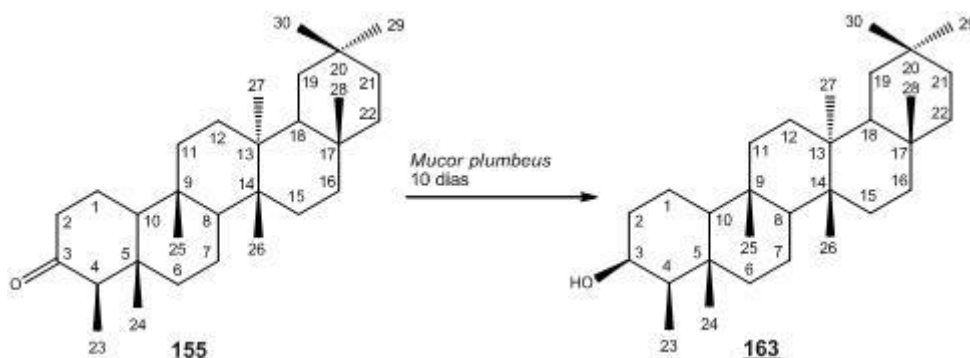


Tabela 18 – Comparação dos dados de RMN de ^{13}C da literatura de **162** e **163** com os dados experimentais obtidos para a substância **G4-6**

	δ_{C} 162 (Duarte, 2000) (100 MHz, CDCl_3 / $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$)	δ_{C} 163 (Duarte, 2000) (100 MHz, CDCl_3)	δ_{C} G4-6 (100 MHz, CDCl_3)
01	19,7	16,1	16,1
02	37,0	36,1	36,4
03	71,1	71,5	72,7
04	53,4	49,6	49,1
05	38,1	38,0	38,5
06	41,5	41,9	42,0
07	17,9	17,6	17,5*
08	53,0	53,2	53,2
09	37,0	37,1	37,8
10	60,2	61,6	61,3*
11	35,5	35,6	35,3
12	30,6	30,6	30,9
13	38,3	38,3	38,5
14	39,7	39,6	39,6
15	32,3	32,3	32,2
16	36,1	35,9	35,2
17	30,0	30,0	31,9
18	42,8	42,8	41,1*
19	35,3	35,3	35,2
20	28,1	28,7	29,0
21	32,8	32,8	32,6
22	39,2	39,2	39,2*
23	10,2	12,0	11,9
24	14,6	16,5	16,7
25	18,1	18,3	18,2
26	20,1	20,1	20,4
27	18,6	18,6	19,4
28	32,1	32,1	32,1
29	35,0	35,0	35,2
30	31,8	31,8	31,8

* Sinais atribuídos pelo mapa de contornos HMQC

Somente pela análise do mapa de contornos HMQC de **G4-6** (Anexo 06, Figura 87, pag. 183) foi possível atribuir os carbonos assinalados com asterisco na Tabela 18.

4.3. Biorremediação

Com o crescente interesse na utilização de biomassas de fungos para promover a biorremediação de metais a partir de soluções aquosas, sendo esta uma tecnologia inovadora e alternativa para a remoção destes poluentes, nosso grupo iniciou os estudos de biorremediação avaliando o potencial de oito espécies de *Penicillium* (*P. minioluteum*, *P. citrinum*, *P. janczewskii*, *P. funiculosum*, *P. pinophilum*, *P. sclerotiorum*, *P. janthinellum* e *P. brasilianum*) isolados de solo (Takahashi et al.,

2008) nos testes de biorremediação de metais. A escolha dos *Penicillium* para este estudo se deve pelo grande potencial que este gênero apresenta para remoção de metais (Ahluwalia, 2007).

Os metais utilizados neste estudo foram o níquel, cobre, lítio, cádmio, cobalto, chumbo e cromo. Os experimentos de biorremediação foram realizados utilizando as técnicas de células em crescimento (**growing cells**), que é a utilização da biomassa dos fungos em meio de cultura, o qual é essencial para garantir que as células possam manter um crescimento constante para obter-se uma remoção constante após múltiplos ciclos de biorremediação (Malik, 2004), e a de células em repouso (**resting cells**). Este segundo procedimento baseia-se na realização prévia do crescimento dos fungos em meio de cultura, sendo a biomassa filtrada e lavada para a remoção do meio. Esta biomassa é colocada em um meio sem a presença de aminoácidos e de micronutrientes essenciais para seu crescimento, sendo denominada de “células em repouso ou resting cells” (Brim *et al.*, 2006).

Primeiramente testou-se a concentração inibitória do crescimento para cada uma das oito espécies de *Penicillium* para se determinar qual a concentração máxima dos metais que poderia ser utilizada nos experimentos.

4.3.1 – Teste de concentração inibitória do crescimento de espécies de *Penicillium* por metais

O teste foi realizado com os fungos *P. minioluteum*, *P. citrinum*, *P. janczewskii*, *P. funiculosun*, *P. pinophilum*, *P. sclerotiorum*, *P. janthinellum* e *P. brasilianum* com o objetivo de se determinar quais seriam as concentrações ideais dos metais a serem utilizadas nos experimentos de biorremediação. Os resultados obtidos estão resumidos na Tabela 19 (pag. 118), onde estão apresentadas as concentrações inibitórias determinadas para cada uma das espécies testadas.

Com base nos resultados obtidos, decidiu-se utilizar a concentração de 100 µg/mL dos metais para a realização dos experimentos posteriores, pois esta concentração atenderia à maioria dos metais e fungos escolhidos para este trabalho.

Tabela 19 – Concentração inibitória dos metais sobre as oito espécies de *Penicillium*

	Ni	Cu	Li	Cd (µg/mL)	Co	Pb	Cr
<i>P. minioluteum</i>	50	250	50	50	50	> 500	50
<i>P. citrinum</i>	450	150	250	50	50	> 500	50
<i>P. janczewskii</i>	> 500	250	150	50	350	> 500	50
<i>P. funiculosun</i>	350	250	> 500	250	50	> 500	50
<i>P. pinophilum</i>	250	250	> 500	150	50	> 500	50
<i>P. sclerotiorum</i>	> 500	150	> 500	150	250	> 500	50
<i>P. janthinellum</i>	> 500	150	> 500	150	350	> 500	50
<i>P. brasilianum</i>	> 500	150	> 500	150	> 500	> 500	50

4.3.2 – Contagem dos esporos com a câmara de Neubauer

Prepararam-se 20 mL de soluções de esporos de cada um dos fungos utilizados na realização dos testes de biorremediação e para cada uma das soluções de esporos foi determinada a quantidade de esporos presentes em 1 mL com o auxílio de uma câmara de Neubauer. A contagem dos esporos foi realizada como descrito na parte experimental (pag. 58) e obtiveram-se as seguintes quantidades médias (QM) de esporos (Tabela 20).

Tabela 20 – Quantidade média de esporos obtidos pela contagem utilizando a câmara de Neubauer.

Fungo	Quantidade média (QM) de esporos na câmara
<i>P. minioluteum</i>	79,50± 7,23
<i>P. citrinum</i>	9,25 ±0,83
<i>P. janczewskii</i>	4,50± 2,29
<i>P. funiculosum</i>	17,00±2,45
<i>P. pinophilum</i>	2,75±0,83
<i>P. sclerotiorum</i>	24,00±5,52
<i>P. janthinellum</i>	23,25±12,25
<i>P. brasilianum</i>	62,50±4,55
<i>A. niger</i>	73,50±2,13

A quantidade de esporos por mL foi determinada utilizando a seguinte equação, $\text{esporos.mL}^{-1} = \left(\frac{QM}{2}\right) \times 10.000$ e os resultados obtidos estão na tabela 21 (pag. 117).

Tabela 21 – Quantidade de esporos por mL determinada para as oito espécies de *Penicillium* e para *A. niger*

Fungo	Esporos/mL
<i>P. minioluteum</i>	$3,98 \times 10^5$
<i>P. citrinum</i>	$4,63 \times 10^4$
<i>P. janczewskii</i>	$2,25 \times 10^4$
<i>P. funiculosum</i>	$8,50 \times 10^4$
<i>P. pinophilum</i>	$1,38 \times 10^4$
<i>P. sclerotiorum</i>	$1,20 \times 10^5$
<i>P. janthinellum</i>	$1,16 \times 10^5$
<i>P. brasilianum</i>	$3,13 \times 10^4$
<i>A. niger</i>	$3,67 \times 10^5$

4.3.3 - Biorremediação das misturas binárias de metais

Os testes de biorremediação de misturas binárias dos metais foram realizados para se determinar a capacidade dos fungos para removerem um metal presente em uma mistura. Este tipo de remoção por fungos em misturas binárias é relatado por Tsekovaa e colaboradores em 2007(a) quando utilizou o fungo *Penicillium cyclopium* na mistura binária de cobre e cobalto, mostrando que o fungo é mais específico para o cobalto. Ainda em 2007(b) Tsekovaa e colaboradores utilizaram o fungo *Penicillium brevicompactum* na mistura binária de cobre e cobalto, mostrando que este fungo foi mais seletivo para a remoção de cobre. Estes resultados relatados por Tsekovaa e colaboradores foram obtidos utilizando a técnica de células em repouso (**resting cells**). Sihan (2007) utilizou o fungo *Fusarium poae* na mistura binária de chumbo e cobre, utilizando a técnica de células em crescimento (**growing cells**). As biorremediações de misturas binárias vêm ganhando um grande destaque no meio acadêmico e vários trabalhos tem sido publicados utilizando, além de fungos, algas (Romera *et al.*, 2008 e Freitas *et al.*, 2008) e bactérias (Ziagova *et al.*, 2007 e Tunali *et al.*, 2006) como biorremediadores.

Nesta tese testaram-se oito espécies de *Penicillium* utilizando-se as duas técnicas: células em crescimento (**growing cells**) e a de células em repouso (**resting cells**) com misturas binárias de níquel e cobre, lítio e cádmio, cobalto e chumbo para avaliar o potencial de remoção de cada um dos fungos estudados.

4.3.3.1 – Biorremediação das misturas binárias dos metais níquel e cobre, lítio e cádmio, chumbo e cobalto usando células em crescimento (growing cells)

Foram preparados 35 frascos contendo o meio de cultura **ML08** nos quais 24 frascos foram separados para o teste de biorremediação dos metais (divididos em 3 grupos de 8 frascos), 8 frascos para a análise do branco negativo (meio+fungo) e 3 frascos para a análise do branco positivo (meio+metais). Nos frascos dos testes de biorremediação e naqueles contendo os brancos negativos foi adicionado 1 mL da solução de esporos de cada um dos fungos. Posteriormente adicionaram-se soluções estoque das misturas binárias nos frascos correspondentes, levando a uma concentração, em cada frasco, de 100 µg/mL de cada metal. O experimento foi realizado por um período de 72 horas, sendo monitorado a cada 24 h por absorção atômica e os resultados obtidos foram plotados em gráficos.

4.3.3.1.1 – Biorremediação da mistura binária dos metais níquel e cobre

Para os metais níquel e cobre verifica-se pelo Gráfico 03 (pag. 120) que os fungos utilizados no experimento não se mostraram muito seletivos para nenhum dos dois metais com porcentagens de remoção baixas. Após 24 horas, a porcentagem média de remoção do níquel foi de 14,67% e a do cobre de 10,54% e, após 48 horas, a porcentagem média da remoção do cobre passou para 12,01% e a do níquel caiu para 8,48.

Os fungos *P. minioluteum*, *P. citrinum*, *P. janczewskii* e *P. brasilianum* removeram cerca de 20% do níquel do meio. Já para a remoção do cobre, os fungos que se destacaram foram o *P. citrinum* e *P. sclerotiorum* que removeram 17,26% e 18,53% deste metal respectivamente.

4.3.3.1.2 – Biorremediação da mistura binária dos metais lítio e cádmio

Verificou-se pelo Gráfico 03 (pag. 120), que os fungos utilizados neste experimento mostraram-se ainda menos seletivos para Li e Cd do que para Ni e Cu, pois observou-se que, após 24 horas, a porcentagem média de remoção do lítio foi de 5,35% e a do cádmio foi de 7,59%. Com 48 horas não houve mudança significativa, sendo que a porcentagem média de remoção do lítio passou para 5,44% e a do cádmio para 6,46%.

Pequenos destaques foram observados para o fungo *P. minioluteum* que removeu 18,61% do lítio em 24 horas e de 9,43% em 48 horas, sendo estes os resultados mais expressivos para os experimentos nestas condições. Para o cádmio, os resultados mais interessantes foram obtidos com os fungos *P. pinophilum* e *P. janthinellum* que, com 48 horas, removeram 10,60% e 11,88%, respectivamente, de cádmio.

4.3.3.1.3 – Biorremediação da mistura binária dos metais cobalto e chumbo

Verificou-se que (Gráfico 03, pág. 120), neste caso, os fungos utilizados foram mais seletivos para a remoção do chumbo do que do cobalto, pois foram observadas porcentagens de remoção de até 50% de chumbo no tempo zero e, nos demais tempos, as porcentagens de remoção variaram entre 91 e 96%. Para o cobalto, a maior remoção foi de 20,75% após 72 horas de reação utilizando-se o fungo *P. brasilianum*.

Podem ser destacados resultados interessantes obtidos. O fungo *P. brasilianum* apresentou remoção crescente do chumbo (19,76 a 95,36%), assim como a espécie *P. janthinellum*, que teve remoção crescente chegando a 88,20% no decorrer do experimento. Já os fungos *P. pinophilum* e *P. sclerotiorum* não foram capazes de remover o chumbo do meio em quantidades superiores a 10%. Para o cobalto podem-se destacar os fungos *P. janthinellum* e *P. brasilianum*, que tiveram uma remoção de 14,18 a 20,75% do cobalto.

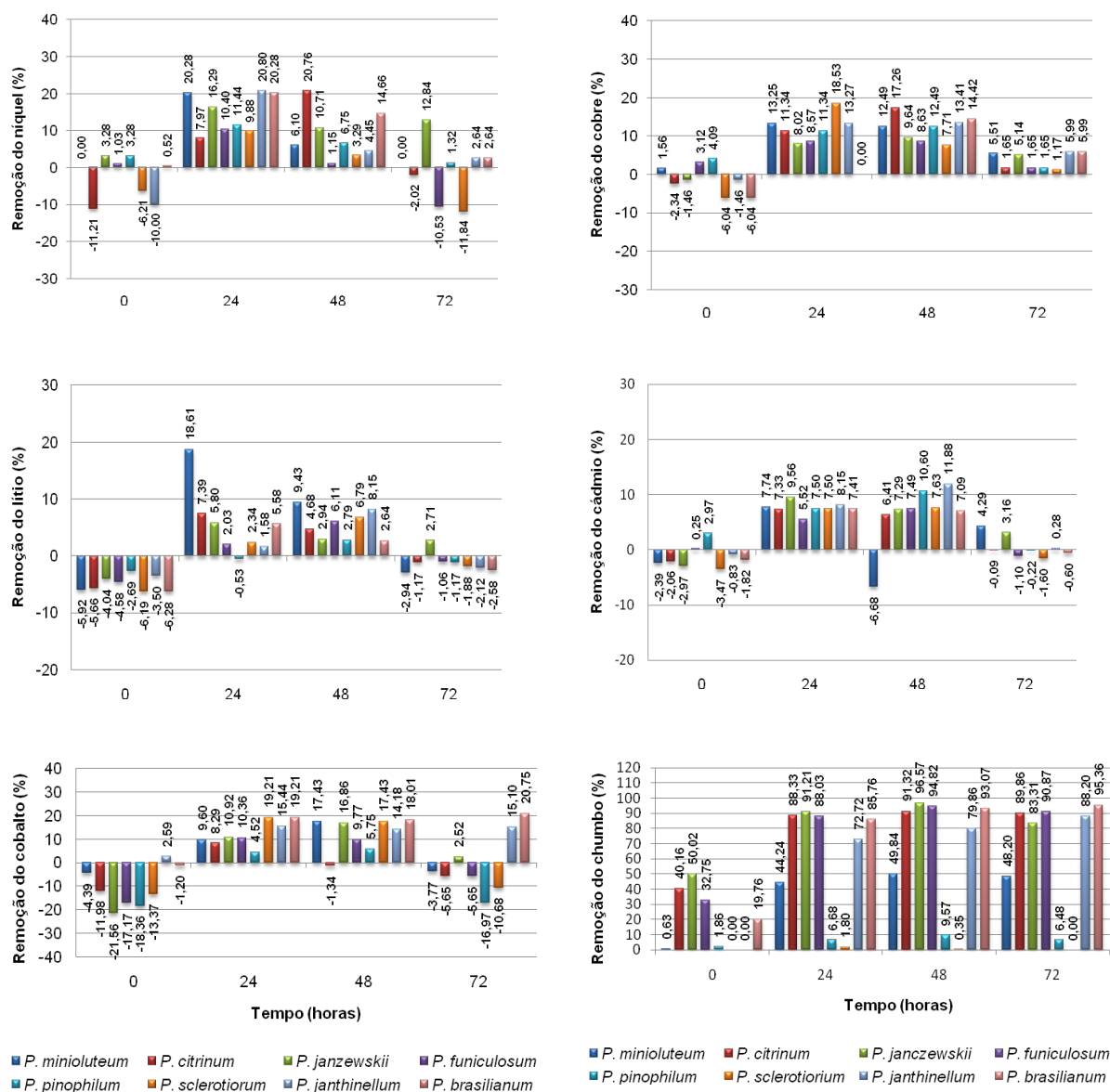


Gráfico 03 – Porcentagem de remoção do níquel, cobre, lítio, cádmio, cobalto e lítio por células em crescimento de oito espécies de *Penicillium* em relação ao tempo de incubação

Ao longo da condução destes experimentos observou-se que no frasco onde eram realizados os branco positivo para o cobalto e chumbo (meio+metal) houve a formação de um precipitado de coloração branca, provavelmente constituído por fosfato de chumbo, já que o meio de cultura utilizado para os experimentos continha fosfato de potássio dibásico. O chumbo precipita na presença de fosfato na forma de fosfato de chumbo devido ao Ks do fosfato formado, que é de $1,5 \times 10^{-32}$ (Vogel, 1981). Desta forma, o fosfato presente no meio estaria contribuindo para o aumento da remoção do chumbo do meio líquido.

Em todos os experimentos foi possível observar resultados negativos para as percentagens de remoção dos metais, isso pode ser devido ao fato de a reação ter sido realizada em meio de cultura, e os componentes deste podem interferir nos resultados. Desta forma, realizou-se então um experimento usando células em repouso, no qual não se usa meio de cultura.

4.3.3.2 – Biorremediação das misturas binárias dos metais níquel e cobre, lítio e cádmio, chumbo e cobalto usando células em repouso (resting cells)

Com a finalidade de eliminar interferentes presentes no meio de cultura foi realizado um experimento em água destilada estéril. Neste experimento, os fungos foram inoculados no meio de cultura adequado; após 48 horas os micélios dos fungos foram separados por filtração, lavados com água destilada estéril para uma completa remoção do meio de cultura no qual os fungos cresceram. Os micélios foram transferidos para novos frascos contendo agora contendo 200 mL de água destilada esterilizada em autoclave. As misturas contendo os metais foram adicionadas e o experimento foi monitorado por 2 horas, pois, sendo realizado em água, o tempo de sobrevivência dos fungos é pequeno, já que não houve o acréscimo de nutrientes ao meio de cultura para sua sobrevivência.

4.3.3.2.1 – Biorremediação da mistura binária dos metais níquel e cobre

Pode se observar no Gráfico 04 (pag. 123), onde os resultados da ação as oito espécies de *Penicillium* sobre níquel e cobre são apresentados, pode-se verificar que os fungos utilizados foram mais seletivos para o cobre do que para o níquel, tendo sido observada uma percentagem média de remoção de 17,94% no tempo zero, 21,67% após 1 hora e 22,37% após 2 horas de reação. Para o níquel, a percentagem média de remoção foi de 15,48% no tempo 0, diminuindo para 10,30% após 1 hora e 10,91% após 2 horas.

Alguns resultados interessantes foram obtidos para o cobre. Os fungos *P. citrinum*, *P. janczewsikii* e *P. funiculosum* apresentaram percentagens de remoção crescentes. O fungo *P. brasilianum* removeu acima de 20% e a percentagem de remoção deste metal por *P. sclerotiorum* variou entre 19,78 e 24,85%. Para o níquel, o fungo que apresentou a maior percentagem de remoção foi *P. sclerotiorum* (21,19%), sendo que os demais fungos não ultrapassaram 17% de remoção.

Observando-se mais atentamente o Gráfico 06 pode-se verificar que a diferença percentual de remoção de alguns fungos para o cobre é aproximadamente o dobro em comparação à do níquel, como por exemplo *P. minioluteum*, *P. citrinum*, *P. janczewskii* e *P. funiculosum*.

4.3.3.2.2 – Biorremediação da mistura binária dos metais lítio e cádmio

No Gráfico 04 (pag. 123), onde os resultados da ação das oito espécies de *Penicillium* sobre lítio e cádmio são apresentados, mostra que os fungos utilizados neste experimento são mais seletivos para o cádmio do que para o lítio, tendo sido observada uma porcentagem média de remoção do cádmio de 16,23% no tempo zero, 17,05% após 1 hora e 18,51% após 2 horas. Para o lítio, a porcentagem de remoção média foi de 4,73% no tempo zero, 4,79% após 1 hora e 6,17% após 2 horas de reação, sendo que as porcentagens de remoção para o cádmio foram de 3 a 4 vezes maiores que as do lítio.

Os fungos *P. minioluteum*, *P. citrinum* e *P. sclerotiorum* tiveram porcentagens de remoção acima de 20% para o cádmio. Para o lítio, o fungo *P. pinophilum* teve uma porcentagem de remoção 11,29% enquanto que, para os demais fungos, a porcentagem de remoção não passou de 10%.

4.3.3.2.3 – Biorremediação da mistura binária dos metais cobalto e chumbo

No Gráfico 04 (pag. 123) apresenta os resultados da ação das oito espécies de *Penicillium* sobre cobalto e chumbo, podendo ser verificado que os fungos utilizados foram mais seletivos para o chumbo do que para o cobalto foi observada uma porcentagem média de remoção do chumbo de 29,73% no tempo zero, 32,52% após 1 hora e 34,77% após 2 horas de reação. Para o cobalto, a porcentagem média de remoção foi de 4,34% no tempo zero, 4,75% após 1 hora e 10,90% após 2 horas de reação, sendo que as porcentagens de remoção para o chumbo foram de 3 a 7 vezes maiores do que as do cobalto.

O fungo *P. funiculosum*, após 2 horas, apresentou uma porcentagem de remoção de 41,80% de chumbo. Pode-se observar que sete dos oito fungos estudados apresentaram porcentagens de remoção acima de 20% em todos os tempos para o chumbo. Apenas o fungo *P. janthinellum* apresentou uma porcentagem de remoção de 16,22% no tempo zero. Para o cobalto, o fungo *P.*

citrinum apresentou uma porcentagem de remoção de 18,22%. Os demais fungos apresentaram valores inferiores a 14% de remoção.

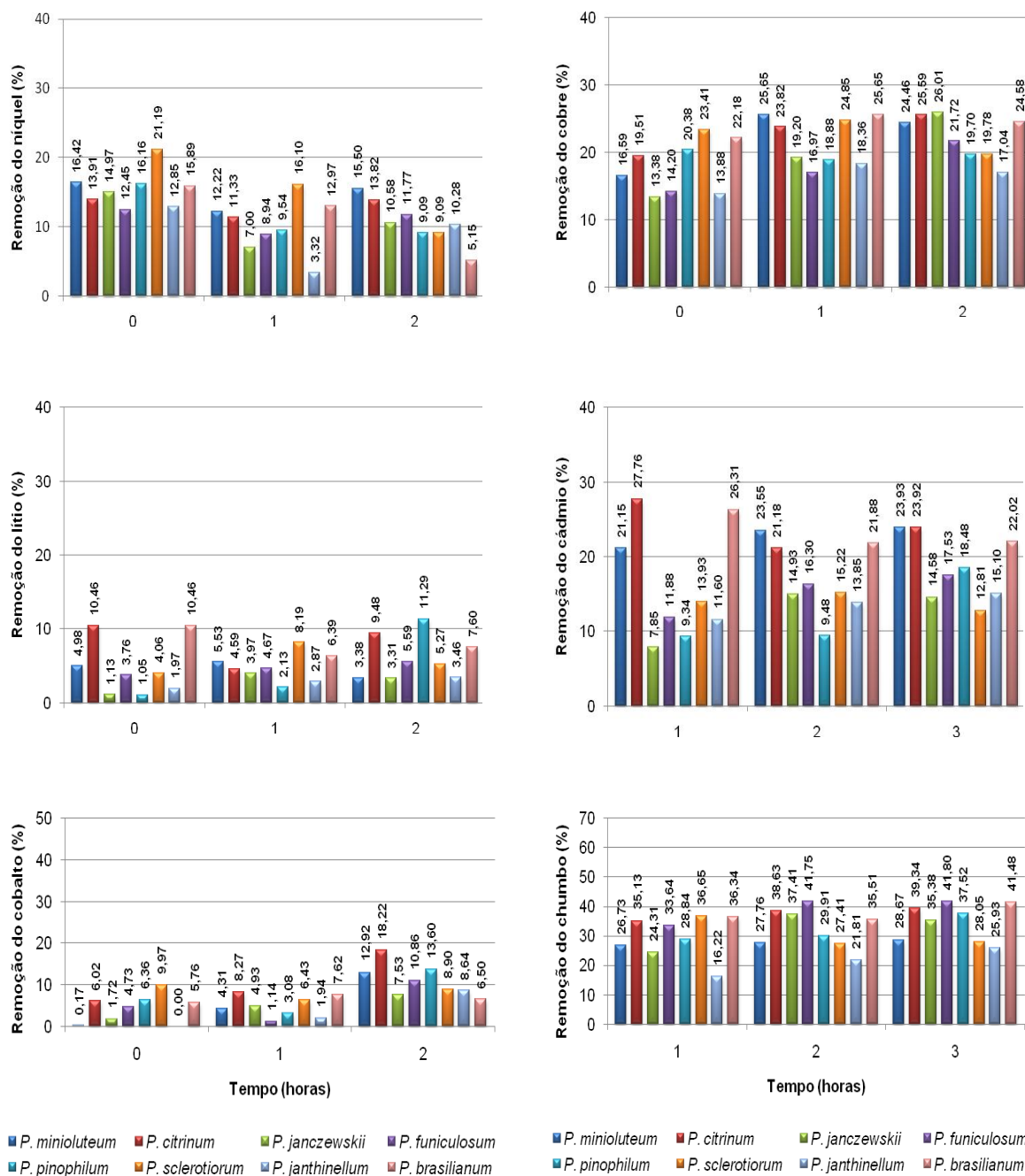


Gráfico 04 – Porcentagem de remoção do níquel, cobre, lítio, cádmio, cobalto e lítio por células em repouso de oito espécies de *Penicillium*

A comparação dos resultados obtidos para as duas metodologias, mostrou um melhor desempenho para os testes realizados com a segunda técnica (células em repouso), sendo verificado um aumento da porcentagem de remoção dos metais e de seletividade para um determinado metal presente na mistura.

Observando-se mais atentamente os resultados, pode-se verificar uma diferença significativa nos testes para a mistura binária de níquel e cobre em ambas as metodologias, a segunda técnica mostrou-se mais seletiva para o cobre, podendo-se verificar que há uma diferença na remoção de 20% de uma técnica para outra, quando comparados os melhores resultados de cada teste.

Nos experimentos realizados para a mistura binária de lítio e cádmio, pode-se verificar uma maior seletividade dos fungos pelo cádmio, quando utilizada a técnica de células em repouso. O fungo *P. minioluteum*, com relação ao lítio, utilizando células em crescimento, apresentou uma porcentagem de remoção de 18,61% após 24 horas de reação, sendo o melhor resultado obtido para o lítio em ambos os testes.

Nos experimentos realizados para a mistura binária de cobalto e chumbo, pode-se verificar que nas duas técnicas os fungos foram seletivos para o chumbo. Para o cobalto, os resultados obtidos são muito parecidos em ambos os testes. Pode-se destacar o fungo *P. funiculosum* que, após 2 horas, removeu 41,80% de chumbo, melhor resultado obtido. Já os resultados obtidos para o chumbo quando realizado com células em crescimento, não forneceu resultados conclusivos, pelo fato de se ter observado a formação de um precipitado branco, indicando a presença de fosfato de chumbo.

P. funiculosum foi alvo de estudo por Kartal e colaboradores, em 2006, para remoção de cobre, cromo e arsênio em solução, utilizando a técnica de células em crescimento. Após 10 dias relataram uma remoção de 90,00% do cobre. Nossos experimentos realizados com células em crescimento do *P. funiculosum* apresentaram uma porcentagem de remoção de somente 8,63% após 48 horas de reação; quando realizado com células em repouso a porcentagem de remoção foi de 21,72% após 2 horas. A literatura sugere, portanto, a viabilidade de se ampliar os presentes experimentos para um monitoramento da remoção dos metais por um maior período de tempo.

Entre as oito espécies de *Penicillium* testadas, pode-se destacar o *P. brasilianum* que apresentou porcentagens de remoção variando de 22,02 a 41,48% para os metais cobre, cádmio e chumbo em todos os tempos da reação com células em repouso. *P. citrinum* apresentou porcentagens de remoção variando de 19,51 a

35,13% para os metais cobre, cádmio e chumbo em todos os tempos da reação com células em repouso.

Estes resultados corroboram para o grande interesse no estudo de espécies de *Penicillium* como biorremediadores de metais pesados. Fan e colaboradores (2008) relataram estudos com *P. simplicissimum* e citaram outros estudos realizados com os *P. notatum*, *P. chrysogenum* e *P. austurianum* como potenciais biomassas para a remoção de metais pesados.

Moore e colaboradores (2008) relataram o aumento da utilização e da popularidade de bioprocessos como a biosorção para o tratamento biológico de águas contaminadas com metais, como a utilização de biomassas como biosorventes, sendo que resultados notáveis tem sido obtidos com soluções de um único metal e com misturas binárias.

A principal vantagem da biosorção é de ser um processo barato e de bons resultados, podendo utilizar-se de biomassas obtidas de processos industriais, principalmente de resíduos agrícolas. Os resultados da biosorção são comparáveis com os alcançados utilizando-se resinas de troca iônica (Romera *et al.*, 2008)

4.3.4 - Biorremediação do cromo hexavalente

Foram preparados oito frascos contendo o meio de cultura **ML07** nos quais sete frascos foram usados para o teste de biorremediação do metal e um frasco para a análise do branco positivo (meio+metal). Nos frascos dos testes de biorremediação foram adicionados 1 mL da solução de esporos do fungo *Aspergillus niger*.

Após 48 horas de incubação do fungo no meio de cultura (células em crescimento ou growing cells), adicionaram-se 5 mL das soluções estoque, levando à concentração em cada de 100 mg/L em cada frasco. O experimento foi realizado por um período de 12 horas; nos tempos (em horas): 0, 2, 4, 6, 8, 10 e 12 foram retiradas alíquotas para serem analisadas por espectrofotometria no ultravioleta visível e os resultados obtidos foram plotados no Gráfico 05 (pag. 126).

4.3.4.1 - Biorremediação do cromo por *Aspergillus niger* usando células em crescimento (growing cells)

O Gráfico 05, apresenta as porcentagens de remoção de cromo do meio por *A. niger*. O melhor resultado ocorreu após 8 horas de reação (34,38% de remoção).

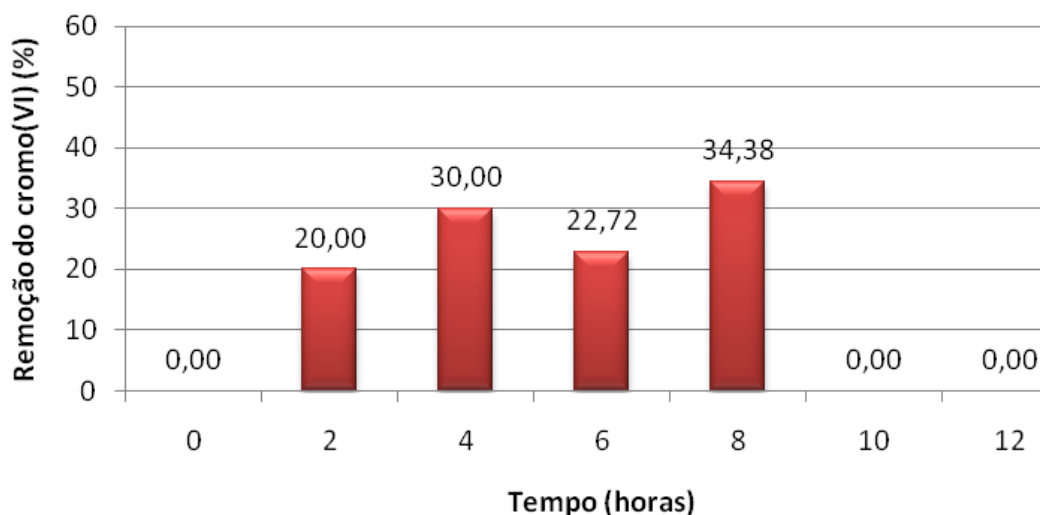


Gráfico 05 – Porcentagem de remoção do cromo (VI) por células em crescimento de *A. niger*

Após 10 e 12 horas de contato com o cromo, o fungo já não é mais capaz de remover o metal como mostra o Gráfico 06 (pag. 127) e a concentração do metal aumenta no meio de cultura neste período de tempo. Isso pode ser devido a uma diminuição do metabolismo pela intoxicação do fungo, por desativação enzimática, ou pela desorção do metal do micélio do fungo. Observou-se também que o branco positivo, contendo o meio de cultura e o metal, estava interferindo ou seja, reduzindo a concentração do metal no branco. Entretanto, foi possível observar que o fungo conseguiu remover maior quantidade de metal do que o branco.

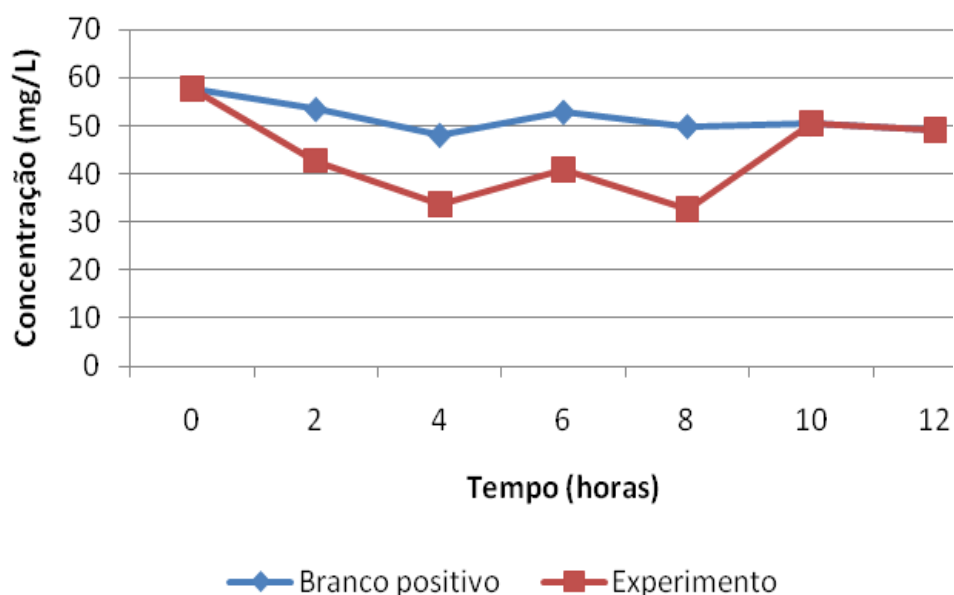


Gráfico 06 – Variação da concentração do cromo (VI) no decorrer do tempo

4.3.4.2 - Biorremediação do cromo por *Aspergillus niger* e oito espécies de *Penicillium* usando células em repouso (resting cells)

Com a finalidade de se eliminar interferentes presentes no meio de cultura foi realizado um experimento em água destilada estéril. Neste experimento, os fungos foram inoculados no meio de cultura. E após 48 horas os micélios dos fungos foram separados por filtração e transferidos para novos frascos contendo água destilada esterilizada onde foram adicionados os metais em solução. O experimento foi monitorado por 2 horas, sendo retiradas alíquotas para serem analisadas por espectrofotometria no ultravioleta visível.

O Gráfico 07 (pag. 128), onde se apresentam as porcentagens de cromo removidas pelas espécies fúngicas estudadas do meio, mostra que os fungos *P. minioluteum*, *P. citrinum* e *P. sclerotiorum* não foram capazes de remover o metal nestas condições. *P. janczewskii* removeu 7,67% do metal logo após sua adição ao meio, enquanto *P. funiculosum*, em 1 hora, removeu somente 1,39% do metal. Quatro espécies apresentaram atividade em todos os tempos analisados, *P. pinophilum*, *P. janthinellum*, *A. niger* e *P. brasilianum*, sendo o melhor resultado obtido para *P. pinophilum* que, em 1 hora, removeu 53,66% do cromo no meio, apresentando uma atividade superior ao do *A. niger*, que é um fungo referência no

experimento, sendo relatado por possuir potencial de remoção de até 91% do cromo (Kumar *et al.*, 2008).

Ao se comparar o comportamento do fungo *A. niger* nos dois experimentos pode-se observar que com 2 horas de reação, o comportamento do fungo é muito parecido, pois em meio de cultura a remoção foi de 20% e, em água, de 24,73%.

O resultado obtido para o fungo *P. pinophilum* é de relevância para a otimização de processo de remoção do cromo em grande escala, devendo ser aprimorado.

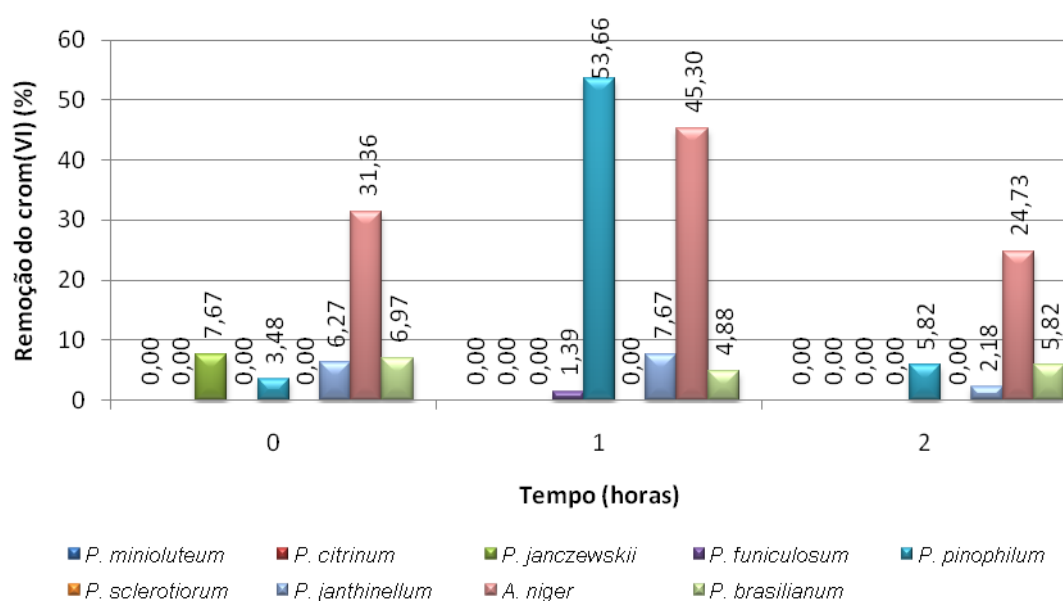


Gráfico 07 – Porcentagem de remoção do cromo (VI) em água.

Capítulo V

Conclusões

Alguns resultados interessantes foram alcançados neste trabalho. Foram identificados microrganismos e substratos cujas reações de biotransformação e biorremediação podem ser otimizadas.

Foi feita uma intensiva análise dos espectros de RMN de ^1H e de ^{13}C das substâncias lupeol (**152**), betulinato de metila (**153**) e β -amirina (**154**) para detalhamento dos dados espectroscópicos, possibilitando atribuir todos os deslocamentos químicos dos hidrogênios e carbonos das substâncias, informações que serviram de subsídio para a elucidação estrutural de produtos obtidos de biotransformações.

O fungo *Rhizopus arrhizus*, nos testes realizados, mostrou-se capaz de hidrolisar o esteviosídeo (**60**), processo de interesse para a obtenção das agliconas **63** e **64**, visando à biotransformação desta para o desenvolvimento de novos fármacos.

O fungo *Thamnostihlulum* sp. mostrou ser incapaz de biotransformar os substratos fujenal (**61**) e *ent*-16-kauren-19-ol (**62**).

O substrato lupeol (**152**) foi submetido à biotransformação com os fungos *Beauveria bassiana*, que mostrou-se incapaz de biotransformá-lo. Com o *Mucor plumbeus*, foi isolado o β -sitosterol (**157**), que, porém, parece ser somente um metabólito fúngico liberado no meio de cultura.

O fungo *Mucor plumbeus* mostrou ser capaz de biotransformar o betulinato de metila (**153**), tendo sido isolada a substância nomeada de acetato de (1S,5bS,7R,7aS,8R,9S,11aR)-7-hidroxi-1-isopropil-5b,7a,8,11a-tetrametil- 2, 3, 3a, 5a, 5b, 6, 7, 7a, 8, 9, 10, 11, 11a, 13b- tetradecahidro-1H- ciclopenta[a]chrisen-9-il (**158**) nesta reação, embora com pequeno rendimento.

O fungo *Lecanicillium muscarinium* mostrou ser eficiente para a biotransformação do substrato β -amirina (**154**). Foram isolados como produtos as substâncias 3 β -hidroxi-olean-12-en-11-ona (**159**) e o óxido de 11 α ,12 α -taraxerol (**160**), sendo estas, pela primeira vez, obtidas como produtos de biotransformação.

O fungo *Mucor plumbeus* mostrou ser capaz de biotransformar seletivamente o substrato friedelina (**155**) em 3 β -friedelinol (**163**), porém com um rendimento de apenas 1,83 %.

O teste de concentração inibitória do crescimento mostrou que os fungos do gênero *Penicillium* utilizados neste trabalho são tolerantes a concentrações acima de 50 $\mu\text{g/mL}$ dos metais níquel, cobre, lítio, cádmio, cobalto, chumbo e cromo, indicando que estes fungos têm um potencial para processos de biorremediação.

Os testes de biorremediação realizados com células em crescimento não apresentaram resultados satisfatórios, não sendo detectada seletividade a um dos metais presentes nas misturas binárias e tendo sido notada a interferência do meio de cultura na remoção dos metais.

Os testes de biorremediação realizados com células em repouso apresentaram resultados interessantes, sendo observada a seletividade dos fungos para o cobre, cádmio e chumbo. O chumbo foi o metal mais removido, atingindo até 41,80% pelo fungo *P. funiculosum* em um período de apenas duas horas de reação, tendo-se uma excelente perspectiva de um aumento na porcentagem de remoção ao se aumentar o tempo de biorremediação.

A biorremediação do cromo por *Aspergillus niger* utilizando células em crescimento, levou a uma redução de 34,38 % da concentração de cromo em 8 horas de reação. O mesmo teste foi realizado com células em repouso do fungo *A. niger* e oito espécies de *Penicillium*, tendo-se alcançado 53,6% de remoção em 1 hora com o fungo *P. pinophilum*. *A. niger* removeu, neste mesmo tempo, 45,3% do cromo hexavalente do meio, acenando para um processo promissor para utilização na indústria.

Capítulo VI

Referências bibliográficas

- AÇIKEL, Ü. E ALP, T.; A study on the inhibition kinetics of bioaccumulation of Cu(II) and Ni(II) ions using *Rhizopus delemar*. *Journal of Hazardous Material*, **168**(2-3), 1449-1458, **2009**;
- AGATA, I.; COREY, E.J.; HORTMANN, A.G.; KLEIN, J.; PROSKOW, S. E URSPRUNG, J.J. ; Oxidative Rearrangements of Pentacyclic Triterpenes. A Method for the Synthesis of Certain Naturally Occuring Triterpenes from α - and β - Amyrin. *Journal of Organic Chemistry*, **30**(16), 1698-1710, **1965**;
- AGRAWAL, P. E JAIN, D.C.; ¹³C NMR Spectroscopy of oleanane triterpenoids. *Progress in NMR Spectroscopy*, **24**, 1-90, **1992**;
- AHMAD, I.; ZAFAR, S. E AHMAD, F.; Heavy metal biosorption potential of *Aspergillus* and *Rhizopus* sp. isolated from wastewater treated soli. *Journal of Applied Sciences & Enviromental Management*, **9**(1), 123-126, **2005**;
- AHLUWALIA, S.S. E GOYAL, D.; Microbial and plant derived biomass for removal of heavy metal from wastewater. *Bioresource Technology*, **98**, 2243-2257, **2007**;
- AKAR, T. E TUNALI, S.; Biosorption characteristics of *Aspergillus flavus* biomass for removal of Pb(II) and Cu(II) ions form an aqueous solution. *Bioresource Technology*, **97**, 1780-1787, **2006**;
- AKIHISA, T.; HAMASAKI, Y.; TOKUDA, H.; UKIYA, M.; KIMURA, Y. E NISHINO, H.; Microbial transformation of isoesteviol and inhibitory effects on Epstein-Barr virus activation of the transformation products. *Journal of Natural Products*, **67**, 407-410, **2004**;
- ALAM, M.; HANSON, J.R. E SARAH, F.Y.; The bio-transformation of some 6-substituted *ent*-kaur-16-ene by *Gibberella fujikuroi*. *Phytochemistry*, **30**(3), 807-809, **1991**;
- ALCAZAR-FUOLI, L.; MELLADO, E.; GARCIA-EFFRON, G.; LOPEZ, J.F.; GRIMALT, J.O.; CUENCA-ESTRELLA, J.M. E RODRIGUEZ-TUDELA, J.L.; Ergosterol biosynthesis pathway in *Aspergillus fumigatus*. *Steroids*, **73**, 339-347, **2008**;
- ALEU, J.; Biotransformations by *Botrytis* species. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, **13**, 77-93, **2001**;
- ALOYSIUS, R.; KARIM, M.I.A. E ARIFF, A.B.; The mechanism of cadmium removal from aqueous solution by nommetabolizing free and immobilized live biomass of *Rhizopus oligosporus*. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, **15**, 571-578, **1999**;
- AMEZCUA-ALLIERI, M.A.; LEAD, J.R. E RODRÍGUEZ-VÁZQUEZ, R.; Changes of chromium behavior in soil during phenanthrene removal by *Penicillium frequentans*. *Bio Metals*, **18**, 23-29, **2005**;

- ANTHONSEN, T.; CHANTHARASAKUL, S. E NORGES, T.H.; Isolation of *ent*-16-kauren-19-oic acid and *ent*-16-kauren-19-ol from *Abrotanella nivigena*. *Acta Chemica Scandinavica*, **25**(5), 1925-1927, **1971**;
- ARAGÃO, G.F.; CARNEIRO, L.M.V.; JUNIOR, A.P.F.; VIEIRA, L.C.; BANDEIRA, P.N.; LEMOS, T.L.G. E VIANA, G.S.; A possible mechanism for anxiolytic and antidepressant effects of alpha- and – beta-amyrin from *Protium heptaphyllum* (Aubl.) March. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, **85**, 827-834, **2006**;
- ARAL, H. E VECCHIO-SADUS, A.; Toxicity of lithium to humans and the environment – A literature review. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **70**, 340-356, **2008**;
- ARANDA, G.; EL KORTBI, M.S. E LELLEMAND, J.Y.; Microbial transformation of diterpenes: Hydroxylation of sclareol, manool and derivatives by *Mucor plumbeus*. *Tetrahedron*, **47**(39), 8339-8350, **1991**;
- ARANTES, S.F.; HANSON, J.R. E HITCHCOCK, P.B.; The hydroxylation of the sesquiterpenoid valerianol by *Mucor plumbeus*. *Phytochemistry*, **52**, 1063-1067, **1999**;
- ARIAS, J.M.; GARCIA-GRANADOS, A.; MARTINEZ, A. E ONORATO, E.; Microbial transformation of tetracyclic diterpenes: conversion of kauranols and kauranones by *Rhizopus nigricans*. *Journal of Natural Products*, **47**(1), 59-63, **1984**;
- BAI, R.S. E ABRAHAM, T.E.; Studies on enhancement of Cr(VI) biosorption by chemically modified biomass of *Rhizopus nigricans*. *Water Research*, **36**, 1224-1236, **2002**;
- BASTOS, D.Z.L.; PIMENTEL, I.C.; JESUS, D.A. E OLIVEIRA, B.H.; Biotransformation of betulinic and betulonic acids by fungi. *Phytochemistry*, **68**, 834-839, **2007**;
- BENSASSON, C.S.; CHEVOLOT, Y.; HANSON, J.R. E QUINTON, J.; The microbiological hydroxylation of 4 β -hydroxy-4 α -methyl-5 α -androstanes by *Cephalosporium aphidicola*. *Phytochemistry*, **50**, 25-30, **1999**;
- BHAINSA, K.C. E D'SOUZA, S.F.; Removal of copper ions by filamentous fungus, *Rhizopus oryzae* from aqueous solution. *Bioresource Technology*, **99**, 3829-3835, **2008**;
- BICAS, J.L.; BARROS, F.F.C.; WAGNER, R.; GODOY, H.R. E PASTORE, G.M.; Optimization of *R*-(+)- α -terpineol production by the biotransformation of *R*-(+)-limonene. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, **35**, 1061-1070, **2008**;
- BOAVENTURA, M.A.D.; OLIVEIRA, A.B.; HANSON, J.R.; HITCHCOCK, P.B. E TAKAHASHI, J.A.; The biotransformation of methyl *ent*-15-oxokaur-16-en-19-oate by *Rhizopus stolonifer* and *Mucor plumbeus*. *Phytochemistry*, **40**(6), 1667-1669, **1995**;

- BOONKAEWWAN, C.; AO, M.; TOSKULKAO, C. E RAO, M.C.; Specific immunomodulatory and secretory activities of stevioside and steviol in intestinal cells. *Journal Agricultural and Food Chemistry*, **56** (10), 3777–3784, **2008**;
- BORGES, K.B.; BORGES, W.S.; DURAN-PATRÓN, R.; PUPPO, M.T.; BONATO, P.S. E COLLADO, I.G.; Stereoselective biotransformations using fungi as biocatalysts. *Tetrahedron: Asymmetry*, **20**, 385-397, **2009**;
- BRIM, H.; OSBORNE, J.P.; KOSTANDARITHES, H.M.; FREDRICKSON, J.K.; WACKETT, L.P. E DALY M.J.; *Deinococcus radiodurans* engineered for complete toluene degradation facilitates Cr(VI) reduction. *Microbiology*, **152**, 2460-2477, **2006**;
- BUDZIKIEWICZ, H.; DJERASSI, C. E WILLIAMS, D.H.; Structural elucidation of natural products by mass spectrometry, Volume II: steroids, terpenoids, sugar and miscellaneous classes. Holden-Day, Inc. **1964**;
- CABANA, H.; JONES, J.P. E AGATHOS, S.N.; Elimination of endocrine disrupting chemicals using white rot fungi and their lignin modifying enzymes: a reviews. *Engineering in Life Sciences*, **7**(5), 429-456, **2007**;
- CHANG, S.F.; YANG, L.M.; HSU, F.L.; HSU, J.Y. LIAW, J.H. E LIN, S.J.; Transformation of steviol-16 α ,17-epoxide by *Streptomyces griseus* and *Cunninghamella bainieri*. *Journal of Natural Products*, **69**, 1450-1455, **2006**;
- CHANG, S.F.; YANG, L.M.; LO, C.H.; LIAW, J.H.; WANG, L.H. E LIN, S.J.; Microbial transformation of isosteviol and bioactivities against the glucocorticoid/androgen response elements. *Journal of Natural Products*, **71**, 87-92, **2008**;
- CHATTERJEE, P.; KOUZI, S.A.; PESSUTO, J.M. E HAMANN, M.T.; Biotransformation of the antimelanoma agent belunici acid by *Bacillus megaterium* ATCC 13368. *Applied and Environmental Microbiology*, **66**(9), 3850-3855, **2000**;
- CHEN, A.R.M.; RUDDOCK, P.L.D.; LAMM, A.S.; REYNOLDS, W.F. E REESE, P.B.; Stemodane and stemarane diterpenoid hydroxylation by *Mucor plumbeus* and *Whetzelinia sclerotiorum*. *Pytochemistry*, **66**, 1898-1902, **2005**;
- CHENG, Z.H.; YU, B.Y.; CORDELL, G.A. E QIU, S.X.; Biotransformation of quinovic acid glycosides by microbes: direct conversion of the ursane to the oleanane triterpene skeleton by *Nocardia* sp. NRRL 5646. *Organic Letters*, **6**(18), 3163-3165, **2004**;
- CHOUDHARY, M.I.; BATOOL, I.; KHAN, S.N.; SULTANA, N.; SHAH, S.A.A. E RAHMAN, A.U.; Microbial transformation of oleanic acid by *fusarium lini* and α -glucosidase inhibitory activity of its transformed products. *Natural Product Research, Part A: Structure and Synthesis*, **22**(6), 489-494, **2008**;

CHOUDHARY, M.I.; RANJIT, R.; RAHMAN, A.; DEVKOTA, K.P.; MUSHARRAF, S.G. E SHRESTHA, T.M.; Hydroxylation of the sesterterpene leucosceptrine by fungus *Rhizopus stolonifer*. *Phytochemistry*, **67**, 439-443, **2006a**;

CHOUDHARY, M.I.; SIDDIQUI, Z.A.; NAWAZ, S.A. A RAHMAN, A.; Microbial transformation and butyrylcholinesterase inhibitory activity of (-)-caryophyllene oxide and its derivatives. *Journal of Natural Products*, **69**(10), 1429-1434, **2006b**;

CHOUDHARY, M.I.; SULTAN, S.; KHAN, M.T.H. A RAHMAN, A.; Microbial transformation of 17 α -ethynyl- and 17 α -ethylsteroids, and tyrosinase inhibitory activity of transformed products. *Steroids*, **70**, 798-802, **2005**;

COLLINS, D.O.; RUDDOCK, P.L.D.; GRASSE, J.C.; REYNOLDS, W.F. E REESE, P.B.; Microbial transformation of cadina-4,10(15)-dien-3-one, aromadendr-1(10)-en-9-one and methyl ursolate by *Mucor Plumbeus* ATCC 4740. *Phytochemistry*, **59**, 479-488, **2002**;

DEBIEU, D.; CORIO-COSTET, M.F.; STEVA, H.; MALOSSE, C. E LEROUX, P.; Sterol composition of the vine powdery mildew fungus, *Uncinula necator*: comparison of triadimenol-sensitive and resistant strains. *Phytochemistry*, **99**(2), 293-300, **1995**;

DEMAIN, A.L. E ADRIO, J.L.; Contributions of microorganisms to industrial biology. *Molecular Biotechnology*, **38**, 41-55, **2008**;

DIAS, M.A.; LACERDA, I.C.A.; PIMENTEL, P.F.; CASTRO, H.F. E ROSA, C.A.; Removal of heavy metal by an *Aspergillus terreus* strain immobilized in a polyurethane matrix. *Letters in Applied Microbiology*, **34**, 46-50, **2002**;

DUARTE, L.P.; Estudo químico, estrutural e da atividade antibacteriana de triterpenos pentacíclicos isolados dos galhos e raízes de *Austroplenckia populnea*, Belo Horizonte: Departamento de Química do Instituto de Ciências Exatas, Tese de doutorado, **2000**;

DURSUN, A.Y.; USLU, G.; CUCI, U. E AKSU, Z.; Bioaccumulation of copper (II), lead (II) and chromium (VI) by growing *Aspergillus niger*. *Process Biochemistry*, **38**, 1647-1651, **2003**;

FAN, T.; LIU, Y.; FENG, B.; ZENG, G.; YANG, C.; ZHOU, M.; ZHOU, H.; TAN, Z. E WANG, X.; Biosorption of cadmium(II), zinc(II) and lead(II) by *Penicillium simplicissimum* isotherms, kinetics and thermodynamics. *Journal of Hazardous Materials*, **160**, 655-661, **2008**;

FARYAL, F.; LODHI, A. E HAMEED, A.; Isolation, characterization and biosorption of zinc by indigenous fungal strains *Aspergillus fumigates* RH05 and *Aspergillus flavus* RH07. *Pakistan Journal of Botany*, **38**(4), 817-832, **2006**;

FERREIRA, A.A.; Estudo químico biomonitorado de *Ipomoea cairica* (L.) Sweet. (Convolvulaceae), Belo Horizonte: Departamento de Química do Instituto de Ciências Exatas, Tese de doutorado, **2006**;

FRAGA, B.M.; ALVAREZ, L. E SUÁREZ, S.; Biotransformation of the diterpenes epicandicandiol e candicandiol by *Mucor plumbeus*. *Journal of Natural Products*, **66**, 327-331, **2003**;

FRAGA, B.M.; BRESSA, C.; GONZÁLEZ, P.; GUILLERMO, R.; HERNÁNDEZ, M.G. E SUÁREZ, S.; The microbiological transformation of 7 α -hydroxy-*ent*-kaur-16-ene derivates by *Gibberella fujikuroi*. *Phytochemistry*, **68**, 1557-1563, **2007**;

FRAGA, B.M.; GONZÁLEZ, P.; GUILLERMO, R.; HERNÁNDEZ, M.G. E PERALES, A.; The chemical and microbiological preparation of 15-oxo-gibberellin derivates. *Tetrahedron*, **51**(36), 10053-10064, **1995**;

FRAGA, B.M.; GONZÁLEZ, P.; HERNÁNDEZ, M.G. E SUÁREZ, S.; Biotransformation of 7-oxo-*ent*-kaur-16-ene derivates by *Gibberella fujikuroi*. *Tetrahedron*, **61**, 5623-5632, **2005**;

FRAGA, B.M.; GUILLERMO, R. E HERNÁNDEZ, M.G.; The microbiological transformation of two 15 β -hydroxy-*ent*-kaurene diterpenes by *Gibberella fujikuroi*. *Journal of Natural Products*, **67**(1), 64-69, **2004**;

FRAGA, B.M.; HERNÁNDEZ, M.G. E GONZÁLEZ, P.; Biotransformation of two *ent*-15 β -hydroxy-kaur-16-ene derivates by *Gibberella fujikuroi*. *Phytochemistry*, **31**(11), 3845-3849, **1992**;

FRAGA, B.M.; HERNÁNDEZ, M.G. E GUILLERMO, R.; The biotransformation of two 3,15-oxygenate *ent*-kaurane derivatives by *Gibberella fujikuroi*, *Journal of Natural Products*, **59**, 952-957, **1996**;

FRAGA, B.M.; HERNÁNDEZ, M.G.; ARTEGA, J.M. E SUÁREZ, S.; The microbiological transformation of the diterpenes dehydroabietanol and teideadiol by *Mucor plumbeus*. *Phytochemistry*, **63**, 663-668, **2003**;

FRAGA, B.M.; HERNÁNDEZ, M.G.; DIAZ, C.E.; GONZÁLEZ, P. E GUILLERMO, R.; The microbial transformation of some *ent*-15 β -hydroxykauranes by *Gibberella fujikuroi*. *Phytochemistry*, **27**(10), 3131-3136, **1988**;

FRAGA, B.M.; HERNÁNDEZ, M.G.; GONZÁLEZ, P.; LÓPEZ, M. E SUÁREZ, S.; Biotransformation of the diterpene ribenone by *Mucor plumbeus*. *Tetrahedron*, **57**, 761-770, **2001**;

FRAGA, B.M.; HERNÁNDEZ, M.G.; RODRIGUEZ, M.D.; DIAZ, C.E. E GONZÁLEZ, P.; Transformation of *ent*-kaur-15-enes by *Gibberella fujikuroi*. *Phytochemistry*, **26**(7), 1931-1934, **1987**;

FREITAS, A.M.M.; MARTINS, R.J.E.; DELERUE-MATOS, C.M. E BOAVENTURA, R.A.R.; Removal of Cd(II), Zn(II) and Pb(II) from aqueous solutions by brown marine macro algae: Kinetic modeling. *Journal Hazardous Materials*, **153**, 493-501, **2008**;

FUKUDA, T.; ISHINO, Y.; OGAWA, A.; TSUTSUMI, K. E MORITA, H.; Cr(VI) reduction from contaminated soils by *Aspergillus* sp. N2 and *Penicillium* sp. N3 isolated from chromium deposits. *The Journal of General and Applied Microbiology*, **54**(5), 295-303, **2008**;

GALUN, M.; GALUN, E.; SIEGEL, B.Z.; KELLER, P.; LEHR, H. E SIEGEL, S.M.; Removal of metal ions from aqueous solutions by *Penicillium* biomass: Kinetic and uptake parameters. *Water, Air and Soil pollution*, **33**, 359-371, **1987**;

GARCIA-GRANADOS, A.; MARTINEZ, A.; ORTIZ, A.; ONORATO, M.E. E ARIAS, J.M.; Microbial transformation of tetracyclic diterpenes conversion of *ent*-kaurenones by *Curvularia* and *Rhizopus* strains. *Journal of Natural Products*, **53**(2), 441-450, **1990**;

GASPAR-MARQUES, C.; SIMÕES, M.F.; VALDEIRA, M.L. E RODRÍGUEZ, B.; Terpenoids and phenolics from *Plectranthus strigosus*, bioactivity screening. *Natural Product Research*, **22**(2), 167-177, **2008**;

GHANEM, K.M. E YUSEF H.H.; Some nutritional requirements of a mixed culture transforming Reichstein's compound S into prednisolone. *Canadian Journal of Microbiology*, **38**, 753-757, **1992**;

GHISALBERTI, E.L.; The biological activity of natural occurring kaurane diterpenes. *Fitoterapia*, **68**(4), 303-325, **1997**;

GIRI, A., DHINGRA, V., GIRI, C.C., SINGH, A., WARD, O.P. E NARASU, M.L.; Biotransformations using plant cells, organ cultures e enzymes systems: currents trends and future prospects. *Biotechnology Advances*, **19**, 175-199, **2001**;

GUPTA, S.K. E JAIN, A.C.; Occurrence of β -sitosterol in a fungus *Fomes durissimus*. *Indian Journal of Chemistry, Section B: Organic chemistry including medicinal chemistry*, **23B**(6), 585, **1984**;

HAI-FENG, Z.; GUO-QING, H.; JING, L.; HUI, R.; QI-HE, C.; QIANG, Z.; JIN-LING, W. E HONG-BO, Z.; Production of gastrodim through biotransformation of p-2-hydroxybenzyl alcohol by cultured cells of *Armillaria luteo-virens* Sacc. *Enzyme and Microbial Technology*, **43**, 25-30, **2008**;

HANSON, J. R.; JARVIS, A. G.; LABORET, F. E TAKAHASHI, J. A. ; The incubation of 3-alfa,16-beta-dihydroxyaphidicolane with *Cephalosporium aphidicola*. *Phytochemistry*, **38**(1), 73-75, **1995**;

HANSON, J.R. E FRAGA, B.M.; Fujenal, a diterpenoid saga of neighbouring group participation. *Phytochemistry*, **69**, 2104-2109, **2008**;

- HAWARI, A.H. E MULLIGAN, C.N.; Biosorption of lead (II), cadmium (II), copper (II) and nickel (II) by anaerobic granular biomass. *Bioresource Technology*, **97**, 692-700, **2006**;
- HOLAN, Z.R. E VOLSKY, B.; Accumulation of cadmium, lead, and nickel by fungal and wood biosorbents. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, **53**(2), 133-146, **1995**;
- HOLLIDAY J. E CLEAVER, M.; Medicinal value of the caterpillar fungi species of the genus *Cordyceps* (Fr.) link (Ascomucetes). A review. *Internacional Journal of Medicinal Mushrooms*, **10**(3), 219-234, **2008**;
- HSU, F.L.; HOU, C.C.; YANG, L.M.; CHENG, J.T.; CHI, T.C.; LIU, P.C. E LIN. S.J.; Microbial transformation of isoesteviol. *Journal of Natural Products*, **65**, 273-277, **2002**;
- HU, S.H.; GENAIN, G. E AZERAD, R.; Microbial transformation of steroids: Contribution to 14 α -hydroxylations. *Steroids*, **60**, 337-352, **1995**;
- IANIS, M.; TSEKOVA, K. E VASILEVA, S.; Copper biosorption by *Penicillium cyclopium*: equilibrium and modeling study. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, **20**(1), 195-201, **2006**;
- JÚNIOR, L.M.B.; MACEDO, G.R.; DUARTE, M.M.L.; SILVA, E.P. E LOBATO, A.K.C.L.; Biosorption of cadmium using the fungus *Aspergillus niger*. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, **20**(3), doi 10.1590/S0104-66322003000300003, **2003**;
- KARTAL, S.N.; KAKITANI, T. E IMAMURA, Y.; Bioremediation fo CCA-C treated wood by *Aspergillus niger* fermentation. *Holz Roh Werkst*, **62**, 64-68, **2004**;
- KARTAL, S.N.; KATSUMARA, N. E IMANURA Y.; Removal of copper, chromium, and arsenic from CCA-treated wood by organic acids released by mold and staining fungi. *Forest Products Journal*, **56**(9), 33-37, **2006**;
- KARUNASAGAR, D.; ARUNACHALAM, J.; RASHMI, K.; LATHA, J.N.L. E MOHAN, P.M.; Biosorption of inorganic and methyl mercury by biosorbent from *Aspergillus niger*. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, **19**, 291-295, **2003**;
- KHAIBULLIN, R.N.; STROBYKINA, I.Y.; KATAEV, V.E.; LODOCHNIKOVA, O.A.; GUBAIDULLIN, A.T. AND MUSIN, R.Z.; New Synthesis of Diterpenoid (16S)-Dihydrosteviol. *Russian Journal of General Chemistry*, **79**(5), 967-971, **2009**;
- KIRAN, I.; AKAR, T.; GORGULU, A. E KAZAZ, C.; Biotransformation of racemic diisophorone by *Cephalosporium aphidicola* and *Neurospora crassa*. *Biotechnology Letters*, **27**, 1007-1010, **2005**;

KUMAR, R.; BISHNOI, N.R. E BISHNOI K.; Biosorption of chromium(VI) from aqueous solution and electroplating wastewater using fungal biomass. *Chemical Engineering Journal*, **135**, 202-28, **2008**;

LAMM, A.S.; CHEN, A.R.M.; REYNOLDS, W.F. E REESE, P.B.; Steroid hydroxylation by *Whetzelinia sclerotiorum*, *Phanerochaete chrysosporium* and *Mucor plumbeus*. *Steroids*, **72**, 713-722, **2007**;

LEITÃO, A.L.; Pontential of *Penicillium* species in the bioremediation field. *Internation Journal of Environmental Research and Public Health*, **6**, 1393-1417, **2009**;

LENARDÃO, E.F.; FREITAG, R.A.; DABDOUB, M.J.; BATISTA, A.C.F. E SILVEIRA, C.C.; “Green chemistry” - Os 12 princípios da química verde e sua inserção nas atividades de ensino e pesquisa. *Química Nova*, **26**(1), 123-129, **2003**;

LERESCHE, J.E. E MEYER, H.P.; Chemocatalysis and biocatalysis (Biotransformation): Some thoughts of a chemist and of a biotechnologist. *Organic Process Research & Development*, **10**(3), 572 -580, **2006**;

LIU, Y.G; FAN, T.; ZENG, G.M.; LI, X.; TONG, Q.; YE, F.; ZHOU, M.; XU, W.H. E HUANG, Y.E.; Removal of cadmium and zinc ions from aqueous solution by living *Aspergillus niger*. *Transactions of Nonferrous Metals Society of Chine*, **16**, 681-686, **2006**;

MALIK, A.; Metal bioremediation through growing cells. *Enviroment International*, **30**, 261-278, **2004**;

MARTIN, G.D.A.; REYNOLDS, W.F. E REESE, P.B.; Investigation of the importance of the C-2 oxygen function in the transformation of stemodin analogues by *Rhizopus oryzae*. *Phytochemistry*, **65**, 701-710, **2004**;

MENDIL, D.; TUZEN, M. E SOYLAK, M.; A biosorption system for metal ions on *Penicillium italicum* – loaded on sepabeads SP 70 prior to flame atomic absorption spectrometric determinations. *Journal of Hazardous Materials*, **152**, 1171-1178, **2008**;

MIGID, H.M.A.; AZAB, Y.A. E IBRAHIM, W.M.; Use of plant genotoxicity bioassay for efficiency of algal biofilters in bioremediation of toxic industrial effluent. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **66**, 57-67, **2007**;

MOITEIRO, C.; CURTO, M.J.M.; MOHAMED, N.; BAILÉN, M.; MARTÍNEZ-DIAZ, R. E GONZÁLEZ-COLOMA, A.; Biovalorization of friedelane triterpenes derived from cork processing industry byproducts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **54**, 3566-3571, **2006**;

MOORE, B.A.; DUNCAN, J.R. E BURGESS, J.E.; Fungal bioaccumulation of copper, nickel, gold and platinum. *Minerals Engineering*, **21**, 55-60, **2008**;

NAGY, V.; TŐKE, E.R.; KEONG, L.C., SZATZKER, G.; IBRAHIM, D.; O, I.C.; SZAKÁCS, G. E POPPE, L.; Kinetic resolutions with novel highly enantioselective fungal lipases produced by solid state fermentation. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, **39**, 141-148, **2006**;

NARIN, I.; KARS, A. AND SOYLAK, M.; A novel solid phase extraction procedure on Amberlite XAD-1180 for speciation of Cr(III), Cr(VI) and total chromium in environmental and pharmaceutical samples. *Journal of Hazardous Materials*, **150**, 453-458, **2008**;

NIU, H.; XU, X.S.; WANG, J.H. E VOLESKY, B.; Removal of lead from aqueous solutions by *Penicillium* biomass. *Biotechnology and Bioengineering*, **42**(6), 785-787, **1993**;

OLIVEIRA, A.B.; HANSON, J.R. E TAKAHASHI, J.A.; The biotransformation of *ent*-15-oxokaur-16-en-19-oic acid and its methyl ester by *Cephalosporium aphidicola*. *Phytochemistry*, **40**(2), 439-442, **1995**;

OLIVEIRA, B.H E STRAPASSON, R.A.; Biotransformation of isosteviol by *Fusarium verticilloides*. *Phytochemistry*, **43**(2), 393-395, **1996**;

OLIVEIRA, B.H.; FILHO, J.D.S. E LEAL, P.C.; Biotransformations of steviol derivatives by *Aspergillus niger* and *Fusarium moniliforme*. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, **16**(2), 210-213, **2005**;

OLIVEIRA, B.H.; PACKER, J.F.; CHIMELLI, M. E JESUS, D.A.; Enzymatic modification of stevioside by cell-free extract of *Gibberella fujikuroi*. *Journal of Biotechnology*, **131**, 92-96, **2007**;

OLIVEIRA, B.H.; SANTOS, M.C. E LEAL, P.C.; Biotransformation of the diterpenoid, isosteviol, by *Aspergillus niger*, *Penicillium chrysogenum*, *Rhizopus arrhizus*. *Phytochemistry*, **51**, 737-741, **1999**;

ORTEGA, R.; BRESSON, C.; FRAYSSE, A.; SANDRE, C.; DEVÈS, G.; GOMBERT, C.; TABARANT, M.; BLEUET, P.; SEZNEC, H.; SIMIONOVICIF, A.; MORETTO, P. E MOULIN, C.; Cobalt distribution in ceratinocyte cells indicates nuclear and perinuclear accumulation and interaction with magnesium and zinc homeostasis. *Toxicology Letters*, **188**, 26-32, **2009**;

PAL, A.; GHOSH, S. E PAUL, A.K.; Biosorption of cobalt by fungi from serpentine soil of Andaman. *Bioresource Technology*, **97**, 1253-1258, **2006**;

PATEL, R.N.; Synthesis of chiral pharmaceutical intermediates by biocatalysis; *Coordination Chemistry Reviews*, **252**, 659-701, **2008**;

- PAZOUKI, M.; KEYANPOUR-RAD, M.; SHAFIC, S. E SHAHHOSCINI, S.; Efficiency of *Penicillium chrysogenum* PTCC 5037 in reducing low concentration of chromium hexavalent in a chromium electroplating pant wastewater. *Bioresource Technology*, **98**, 2116-2122, **2007**;
- PEZZUTO, J.M.; COMPADRE, C.M.; SWANSON, S.M.; NANAYAKKARA, N.P.D. E KINGHORN, A.D.; Metabolically activated steviol, the aglycone of stevioside is mutagenic. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, **82**, 2478-2482, **1985**;
- POGGIO, L.; VRŠČAJ, B.; SCHULIN, R.; HEPERLE, E. E MARSAN, F.A.; Metal pollution and human bioaccessibility of topsoils in Grugliasco (Italy). *Environmental Pollution*, **157**, 680-689, **2009**;
- PRAKSHAM, R.S.; MERRIE, J.S.; SHEELA, R.; SASWATHI, N. E RAMAKRISHNA, S.V.; Biosorption of chromium VI by free and immobilized *Rhizopus arrhizus*. *Enviromental Pollution*, **104**, 421-427, **1999**;
- PRASENJIT, B. E SUMATHI, S.; Uptake of chromium by *Aspegillus foetidus*. *Journal of Material Cycles and Waste Management*, **7**, 88-92, **2005**;
- PREETHA, B. E VIRUTHAGIRI, T.; Biosorption of zinc (II) by *Rhizopus arrhizus*: equilibrium and kinetic modeling. *African Journal of Biotechnology*, **4**(6), 506-508, **2005**;
- QAZILBASH, A.A.; FARYAL, R.; TABASUM,A.; LODHI, A.; SHAMAD, S. E HAMEED, A.; Comparative analysis of oven-dried and non-growing strains of *Aspergillus niger* for the removal of lead under laboratory conditions. *International Journal of Botany*, **2**(2), 137-145, **2006**;
- QIAN, L.W.; ZHANG, J.; LIU, J.H. E YU, B.Y.; Direct microbial-catalyzed asymmetric α -hydroxylation of betulonic acid by *Nocardia* sp. NRLL 5646, *Tetrahedron Letters*, **50**, 2193-2195, **2009**;
- REN, W.X.; LI, P.J.; GENG, Y. E LI, X.J.; Biological leaching of heavy metal from a contaminated soil by *Aspergillus niger*. *Journal of Hazardous Materials*, **167**(1-3), 164-169, **2009**;
- ROJAS, M.C.; URRUTIA, O.; CRUZ, C.; GASKIN, P.; TYDZYNSKI, B. E HEDEN, P.; Kaurenolides and fujenoic acids are side products of gibberillin P450-1 monooxygenase in *Gibberella fujikuroi*. *Phytochemistry*, **65**, 821-830, **2004**;
- ROMERA, E.; GONZÁLEZ, F.; BALLESTER, A.; BLÁZQUEZ, M.L. E MUÑOZ, J.;A.; Biosorption of Cd, Ni and Zn with mixtures of different. types of algae. *Environmental Engineering Science*, **25**(7), 999-1008, **2008**;
- SALVI, N.E. E CHATTOPADHYAY, S.; Asymmetric reduction of 3-aryl-3-keto esters using *Rhizopus* species. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **14**, 4918-4922, **2006**;

SAY, R.; YILMAZ, N. E DENIZLI, A.; Removal of chromium (VI) ions from synthetic solutions by the fungus *Penicillium purpurogenum*. *Engineering in Life Sciences*, **4**(3), 276-280, **2004**;

SAY, R.; YILMAZ, N. E DENIZLI, A.; Removal of heavy metal ions using the fungus *Penicillium canescens*. *Adsorption Science & Technology*, **21**(7), 643-650, **2003**;

SHERWIN, P.F. E COATES, R.M.; Stereospecificity of the oxidation of *ent*-kauren-19-ol to *ent*-kauranal by a microsomal enzyme preparation from *Marah macrocarpus*. *Chemical Communications*, **17**, 1013-1014, **1982**;

SHIRANE, N.; HASHIMOTO, Y.; UEDA, K.; TAKENAKA, H. E KATOH, K.; Ring-A cleavage of 3-oxo-olean-12-en-28-oic acid by the fungus *Chaetomium longirostre*, *Phytochemistry*, **43**(1), 99-104, **1996**;

SIHAN, A.A.; Removal of lead and copper by some filamentous fungi isolated from Riyadh region. *World Journal of Agriculture Sciences*, **3**(4), 458-467, **2007**;

SILVA, E.A.; TAKAHASHI, J.A.; BOAVENTURA, M.A.D. E OLIVEIRA, A.B.; The biotransformation of *ent*-kaur-16-en-19-oic acid by *Rhizopus stolonifer*. *Phytochemistry*, **52**, 397-400, **1999**;

SILVA, E.A.; TAKAHASHI, J.A. E OLIVEIRA, A.B.; An interesting backbone rearrangement and novel derivatives from the biotransformation of trachyloban-19-oic acid by *Rhizopus stolonifer*. *Journal of Brazilian Chemical Society*, **13**(1), 101-105, **2002**;

SINGH, A.; SHARMA, O.P.; DAWRA, R.K.; KANWAR, S.S.; E MAHATO, S.B.; Biotransformation of lantadene A (22 β -angeloyloxy-3-oxoolean-12-en-28-oic acid), the pentacyclic triterpenoid, by *Alcaligenes faecalis*. *Biodegradation*, **10**, 373-381, **1999**;

SKOWRONSKI, T.; PIRSZEL, J. E PAWLIK-SKOWROSKA, B.; Heavy metal removal by the waste biomass of *Penicillium chrysogenum*. *Water Quality Research Journal of Canada*, **36**(4), 793-803, **2001**;

SOUZA, J.I.; SCHOENLEIN-CRUSIUS, I.H.; PIRES-ZOTTARELLI, C.L.A. E SCHOENLEIN, N.C.; Bioabsorção de cobre, manganês e cádmio por biomassas de *Saprolegnia subterrânea* (Dissmann) R. L. Seym. e *Pythium torulosum* Coker & P. Patt. (Oomycetes). *Acta Botanica Brasilica*, **22**(1), 217-223, **2008**;

SOUBIAS, O.; JOLIBOIS, F.; MASSOU, S.; MILON, A. E RÉAL V.; Determination of the orientation and dynamics of ergosterol in model membranes using uniform ¹³C labeling and dynamically averaged ¹³C chemical shift anisotropies as experimental restraints. *Biophysical Journal*, **89**, 1120-1131, **2005**;

SRIVASTAVA, S. E THAKUR, I.S.; Biosorption potency of *Aspergillus niger* form removal of chromium (VI). *Current Microbiology*, **53**, 232-237, **2006**;

SU, H.; WANG, Z. E TAN, T.; Adsorption of Ni^{2+} on the surface of molecularly imprinted absorbent from *Penicillium chrysogenum* mycelium. *Biotechnology Letters*, **25**, 949-953, **2003**;

SUBUDHI, E. E KAR, R.N.; *Rhizopus arrhizus* – An efficient fungus for copper effluent treatment. *International Journal of Integrative Biology*, **2**(3), 166-171, **2008**;

TAKAHASHI, J.A.; CASTRO, M.C.M.; SOUZA, G.G.; LUCAS, E.M.F.; BRACARENSE, A.A.P.; ABREU, L.M.; MARRIEL, I.E.; OLIVEIRA, M.S.; FLOREANO, M.B. E OLIVEIRA, T.S. Isolation and screening of fungal species isolated from Brazilian cerrado soil for antibacterial activity against *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium*, *Streptococcus pyogenes* and *Listeria monocytogenes*. *Journal Mycologie Médicale*, **18**, 198-204, **2008**;

TAN, T. E CHENG, P.; Biosorption of metal ions with *Penicillium chrysogenum*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, **104**(2), 119-128, **2003**;

TANAKA, R. E MATSUNAGA, S.; Triterpene constituents from *Euphobia supine*. *Phytochemistry*, **27**(11), 3579-3584, **1988**;

TOLSTIKOVA, T.G.; SOROKIN, I.V.; TOLSTIKOV, G.A.; TOLSTIKOV, A.G. E FLEKHTER, O.B.; Biological activity and pharmacological prospects of lupine terpenoids: I. Natural lupine derivatives. *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, **32**(2), 37-49, **2006**;

TOWNSLEY, C.C. E ROSS, I.S.; Copper biosorption by *Penicillium cyclopium*: equilibrium and modeling. *Microbes*, **44**, 125-135, **1985**;

TSEKOVA, K.; IANIS, M. E GANEVA, S.; Biosorption of binary mixtures of copper and cobalt by *Penicillium cyclopium* biomassas. *Dokladi na B"lgarskata akademiâ na naukite*, **60**(1), 63-70, **2007a**;

TSEKOVA, K.; IANISA, M. DENCHEVAA, V. E GANEVAB, S.; Biosorption of binary mixtures of copper and cobalt by *Penicillium brevicompactum*. *Zeitschrift für Naturforschung*, **62c**, 261-264, **2007b**;

TSEZOS, M. E VOLESKY, B.; Biosorption of uranium and thorium. *Biotechnology and Bioengineering*, **23**, 583-604, **1981**;

TUNALI, S.; ÇABUK, A. E AKAR, T.; Removal of lead and copper ions from aqueous solutions by bacterial strain isolated from soil. *Chemical Engineering Journal*, **115**, 203-211, **2006**;

VAN ZYL, P.L.; MOODLEY, V.; ROSE, S.H.; ROTH, R.L. E VAN ZYL W.H.; Production of the *Aspergillus aculeatus* endo-1,4- β -mannanase in *A. niger*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, **36**, 611-617, **2009**;

VARGA, J.; PÉTERI, Z.; TÁBORI, K.; TÉREN, J. E VÁGVÖLGYI, C.; Degradation of ochratoxin A and other mycotoxins by *Rhizopus* isolates. *International Journal of Food Microbiology*, **99**, 321-328, **2005**;

VICCINI, G. Otimização da produção de esporos do fungo *Clonostachys rósea* – Um biopesticida para a cultura do morangueiro. Curitiba: Universidade Federal do Paraná, Dissertação de mestrado em Ciências Bioquímica, **2004**;

VIEIRA, H.S.; TAKAHASHI, J.A. E BOAVENTURA, M.A.D.; Biotransformation of methyl *ent*-17-hydroxy-16 β -kauran-19-oate by *Rhizopus stolonifer*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **53**, 601-604, **2000**;

VIEIRA, H.S.; TAKAHASHI, J.A. E BOAVENTURA, M.A.D.; Novel derivatives of *ent*-17,19-dihydroxy-16 β H-kaurane obtained by biotransformation with *Verticillium lecanii*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **50**, 3704-3707, **2002**;

VOGEL, A.R.; Química Analítica Qualitativa, 5ª edição, Editora Mestre Jou, **1981**;

WAHLBERG, I. E ENZELL, C.R.; *Ent*-16-kauran-19-ol from coffee. *Phytochemistry*, **14**(7), 1677, **1975**;

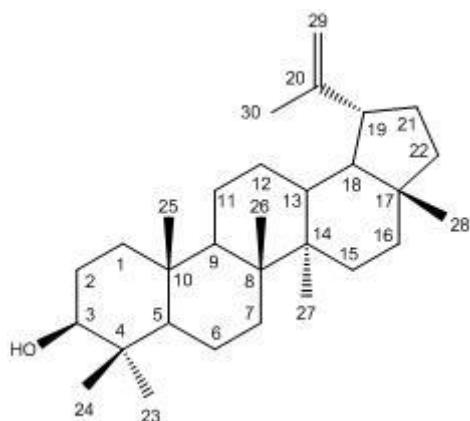
YANG, L.M.; HSU, F.L.; CHANG, S.F.; CHENG, J.T.; HSU, J.Y.; HSU, C.Y.; LIU, P.C. E LIN, S.J.; Microbial metabolism of steviol and steviol-16 α ,17-epoxide. *Phytochemistry*, **68**, 562-570, **2007**;

YOUNG, D.M.; KITTS, C.L.; UNKEFER, P.J. E OGDEN, K.L.; Biological breakdown of RDX in slurry reactors proceeds with multiple kinetically distinguishable paths. *Biotechnology and bioengineering*, **56**(3), 258-267, **1997**;

ZHANG, J.; CHENG, Z.H.; YU, B.Y.; CORDELL, G.A. E QIU, S.X.; Novel biotransformation of pentacyclic triterpenoid acids by *Nocardia* sp. NRRL 5646, *Tetrahedron Letters*, **46**, 2337-2340, **2005**;

ZIAGOVA, M.; DIMITRIADIS, G.; ASLANIDOU, D.; PAPAIOANNOU, X.; TZANNETAKI, E.L. E KYRIAKIDES, M.L.; Comparative study of Cd(II) and Cr(II) biosorption on *Staphylococcus xylosus* and *Pseudomonas* sp. in single and binary mixtures. *Bioresource Technology*, **98**, 2859-2865, **2007**.

Anexos

ANEXO 01 – LUPEOL (**152**)

Massa molar: 426,3862 g/mol

Fórmula molecular: $C_{30}H_{50}O$

Faixa de fusão: 203-205 °C

IV (ν máx., KBr, cm^{-1}): 3324, 2945, 1645, 1645, 1456, 1380, 1038, 887.

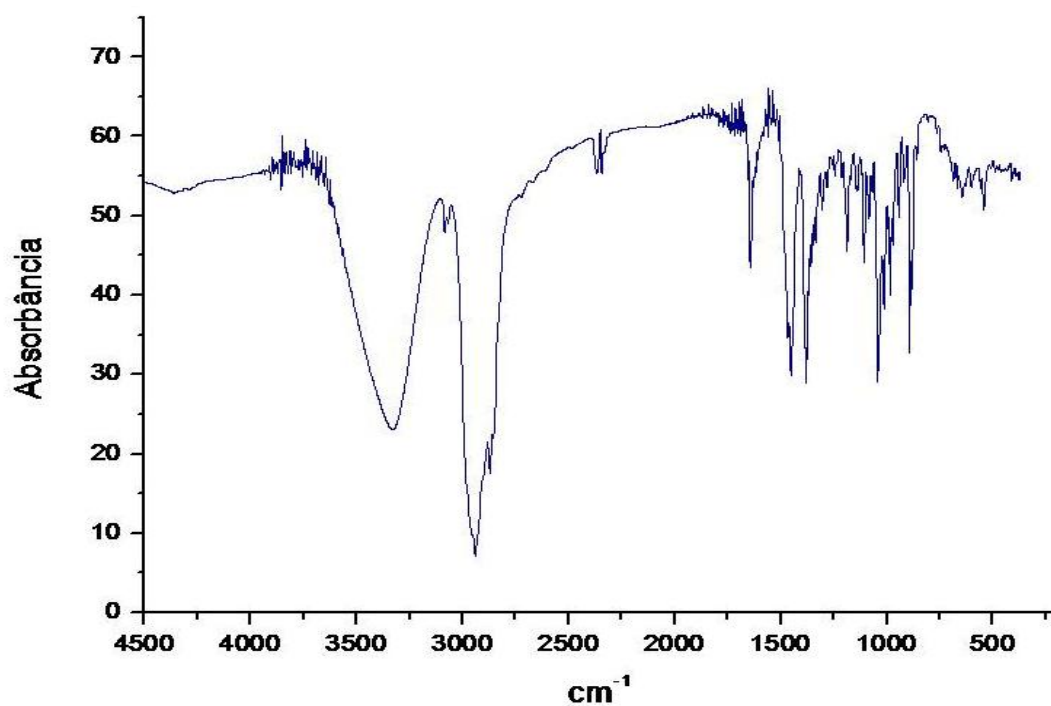


Figura 24 - Espectro no infravermelho do lupeol (**152**) (KBr)

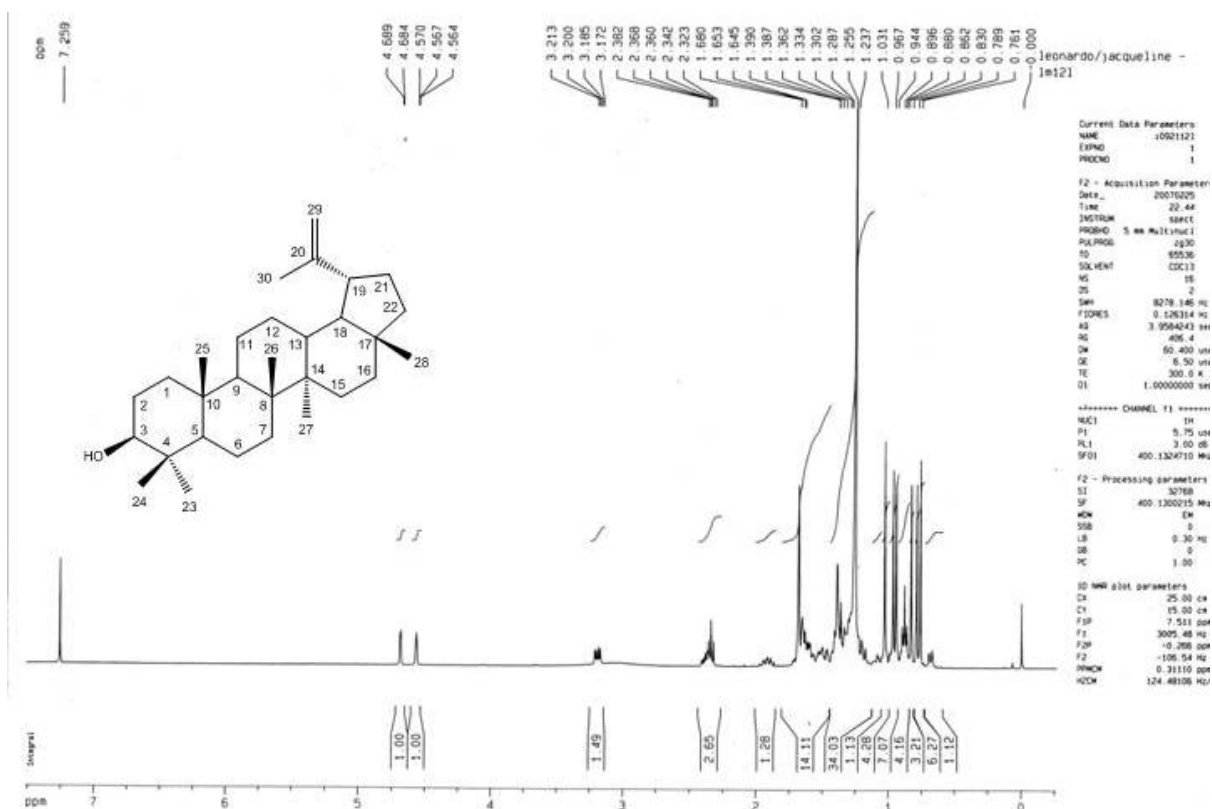


Figura 25 – Espectro de RMN de ^1H do lupeol (**152**) (400 MHz, CDCl_3)

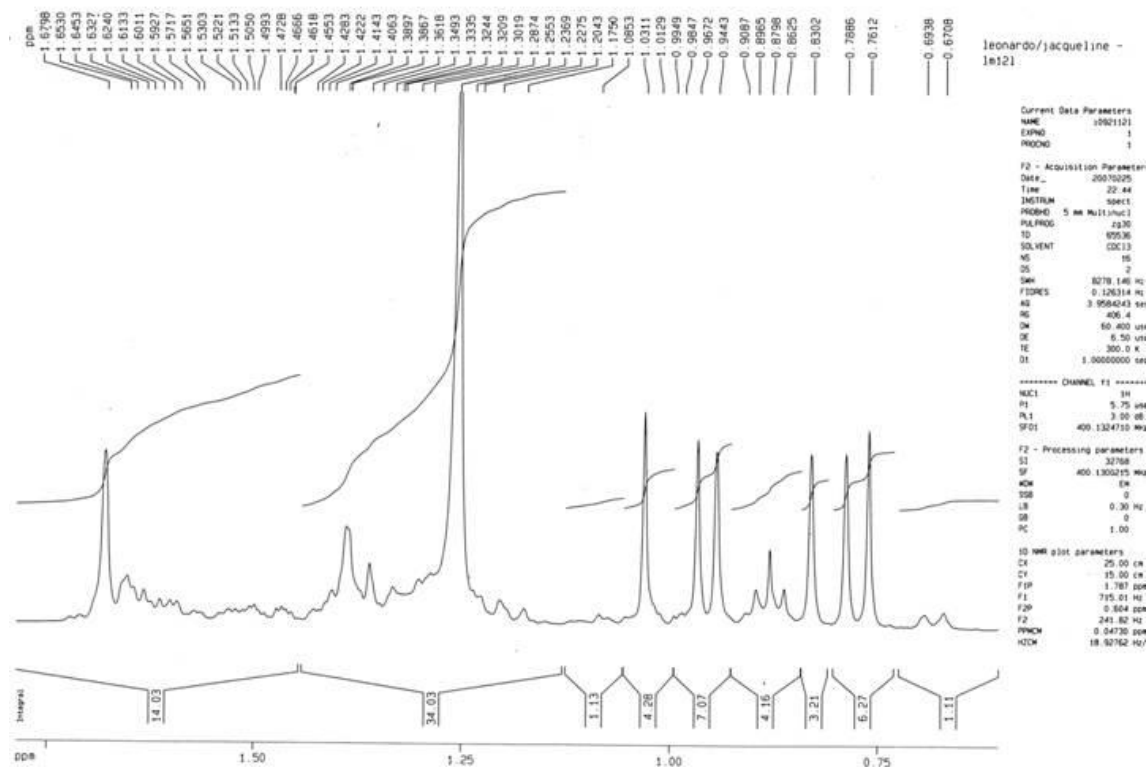
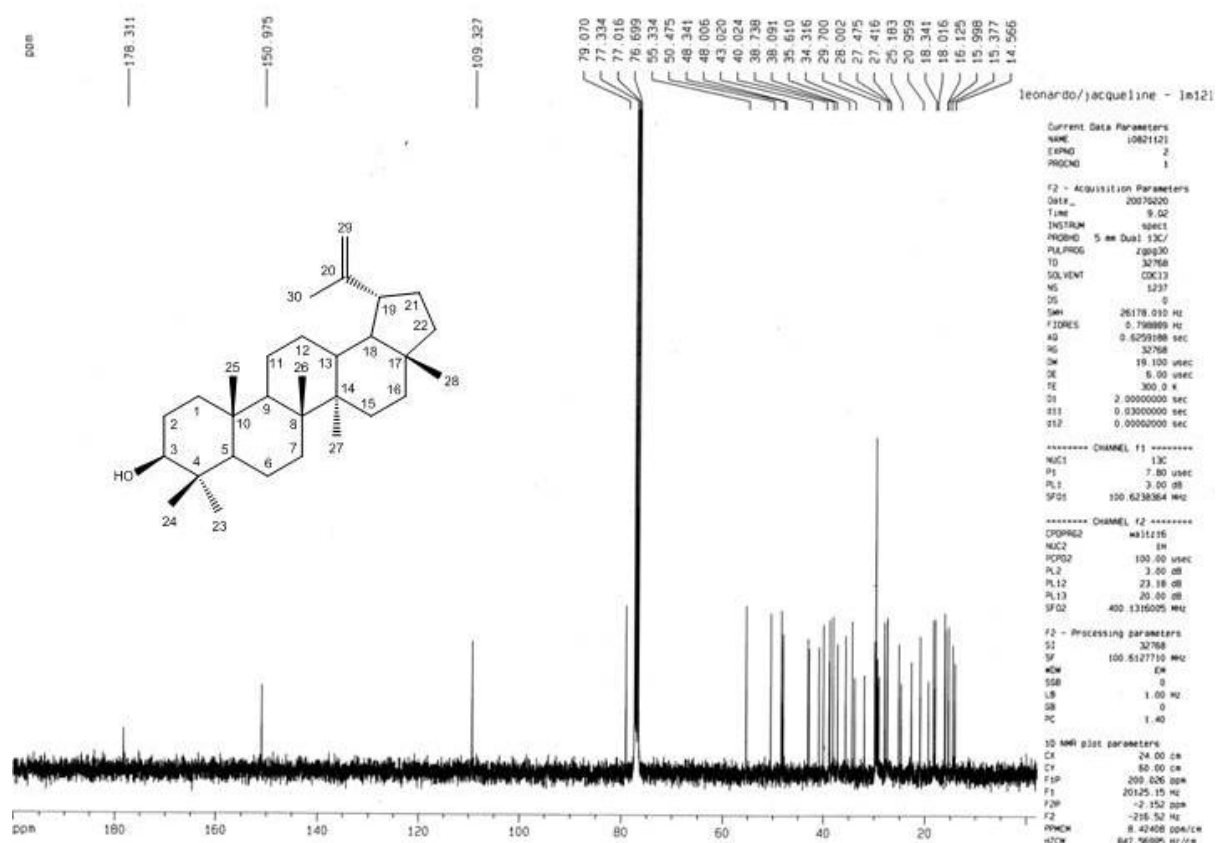
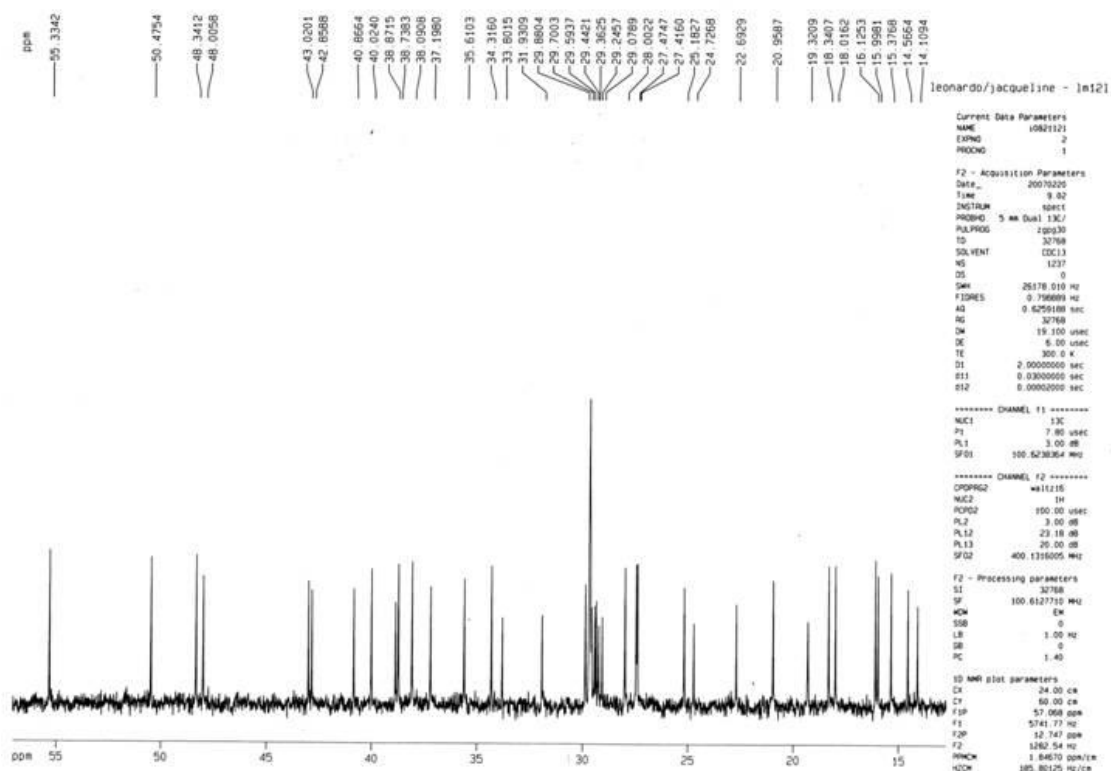


Figura 26 – Ampliação do espectro de RMN de ^1H do lupeol (**152**) (400 MHz, CDCl_3)

Figura 27 – Espectro de RMN de ^{13}C do lupeol (**152**) (100 MHz, CDCl_3)Figura 28 – Ampliação do espectro de RMN de ^{13}C do lupeol (**152**) (100 MHz, CDCl_3)

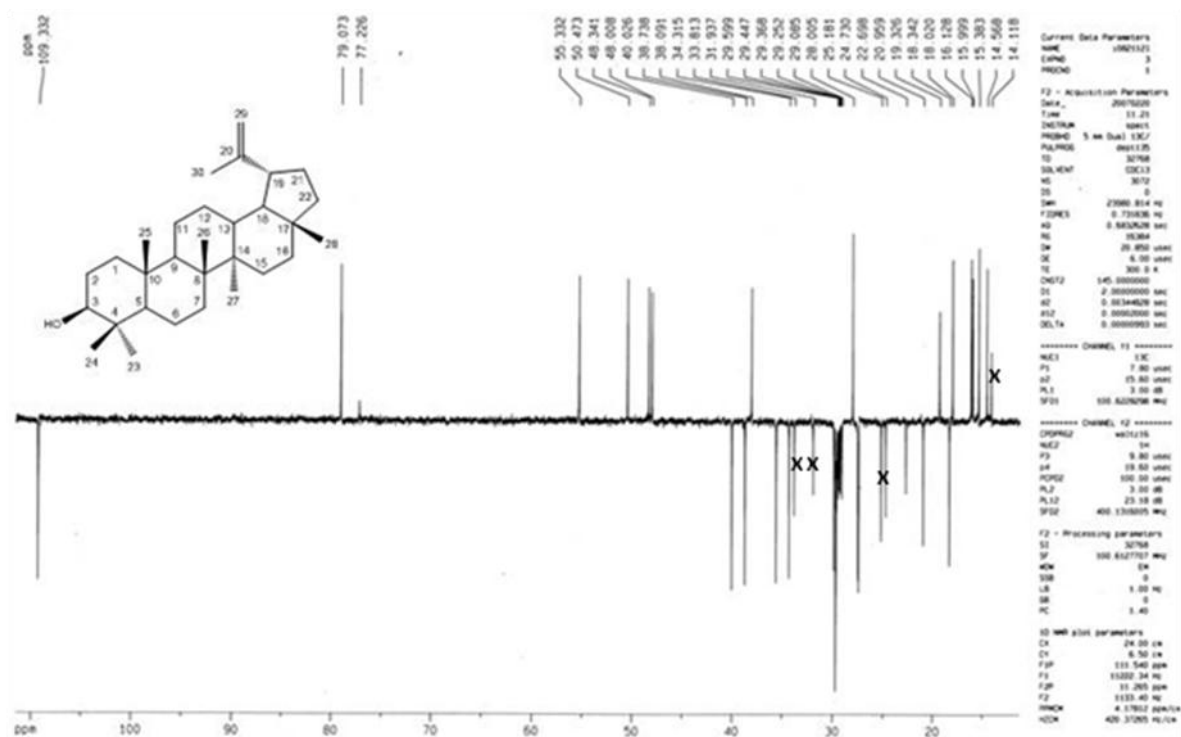


Figura 29 – Subespectro DEPT-135 do lupeol (**152**) (x sinais excluídos) (100 MHz, CDCl_3)

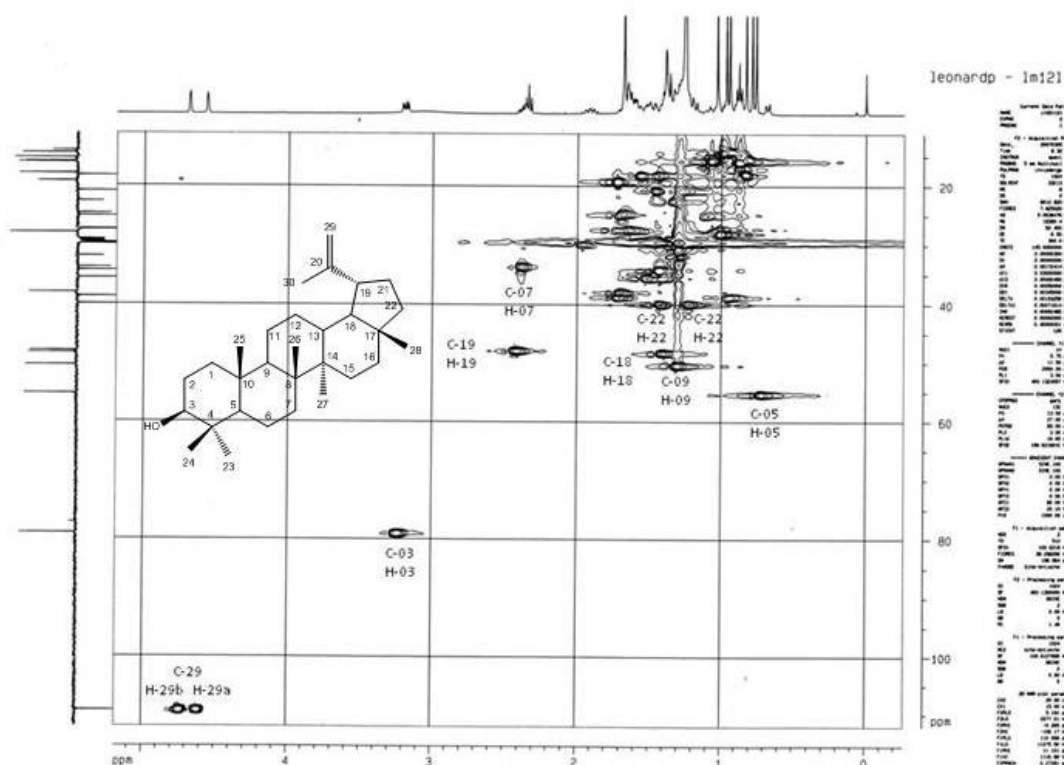


Figura 30 – Mapa de contornos HMBC do lupeol (**152**) (400 MHz, CDCl_3)

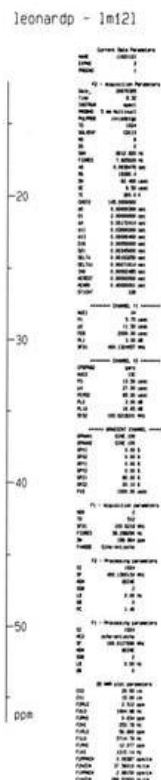


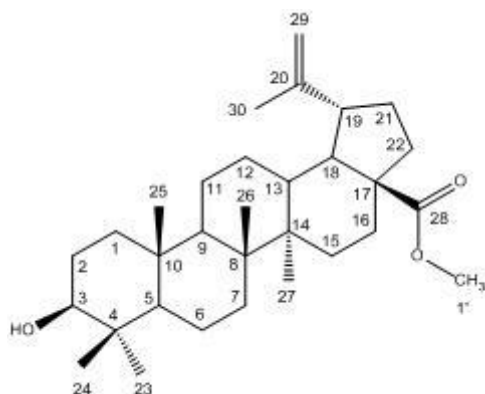
Figura 31 – Expansão do mapa de contornos HMQC do lupeol (**152**) (400 MHz, CDCl_3)



Figura 32 – Mapa de contornos HMBC do lupeol (**152**) (400 MHz, CDCl₃)



Figura 33 – Mapa de contornos ROESY do lupeol (**152**) (400 MHz, CDCl₃)

ANEXO 02 - BETULINATO DE METILA (**153**)

Massa molar: 470,3760 g/mol

Fórmula molecular: $C_{31}H_{50}O_3$

Faixa de fusão: 217-220 °C

IV (ν máx., KBr, cm^{-1}): 3535, 3077, 2964, 1703, 1645, 1450, 1283, 1169, 1045, 878

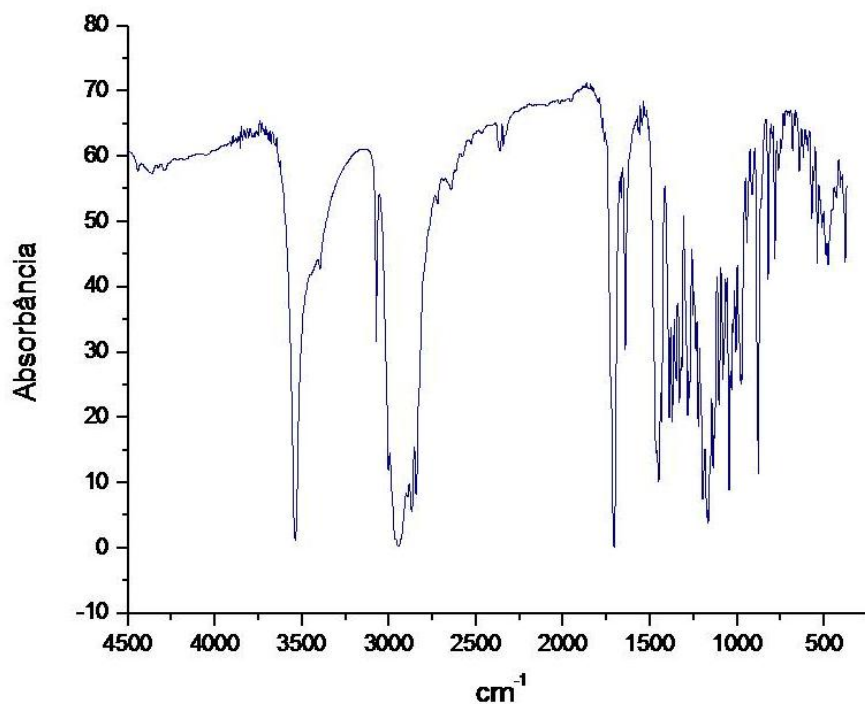


Figura 34 - Espectro no Infravermelho do betulinato de metila (**153**) (KBr)

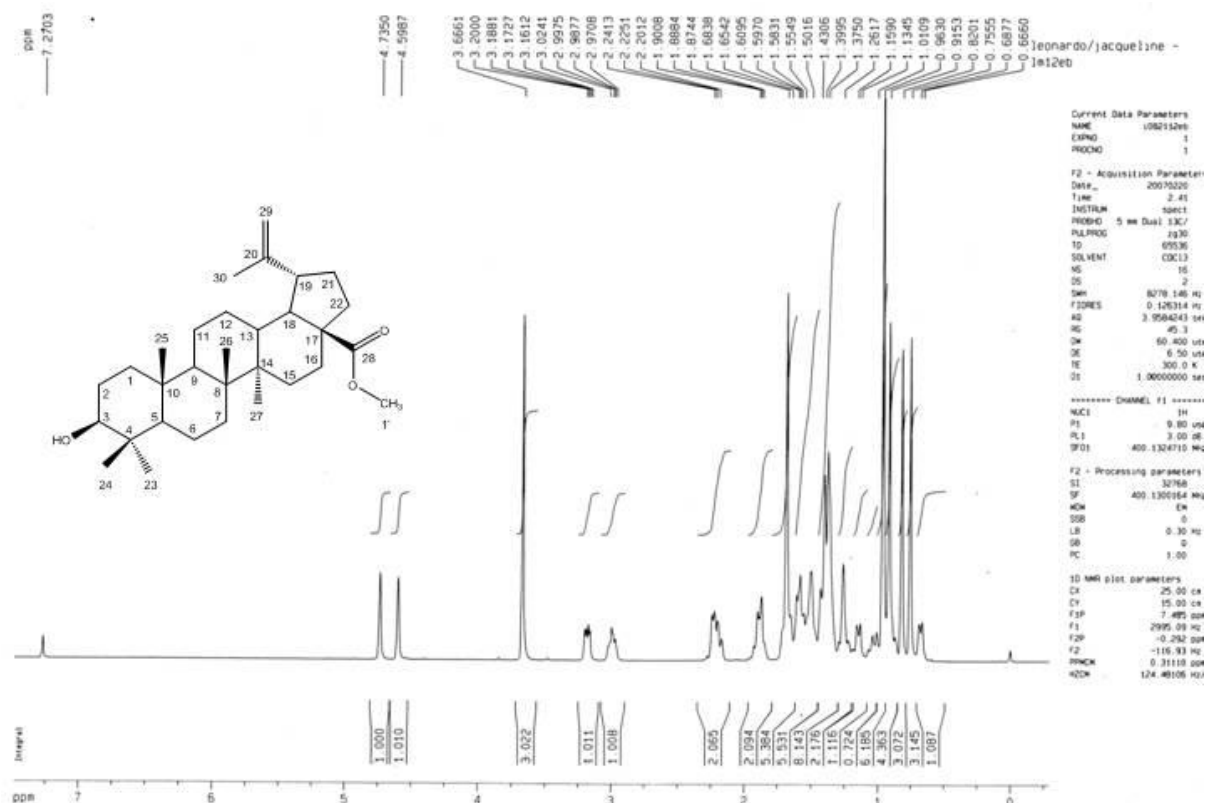


Figura 35 - Espectro de RMN de ^1H do betulinato de metila (**153**) (400 MHz, CDCl_3)

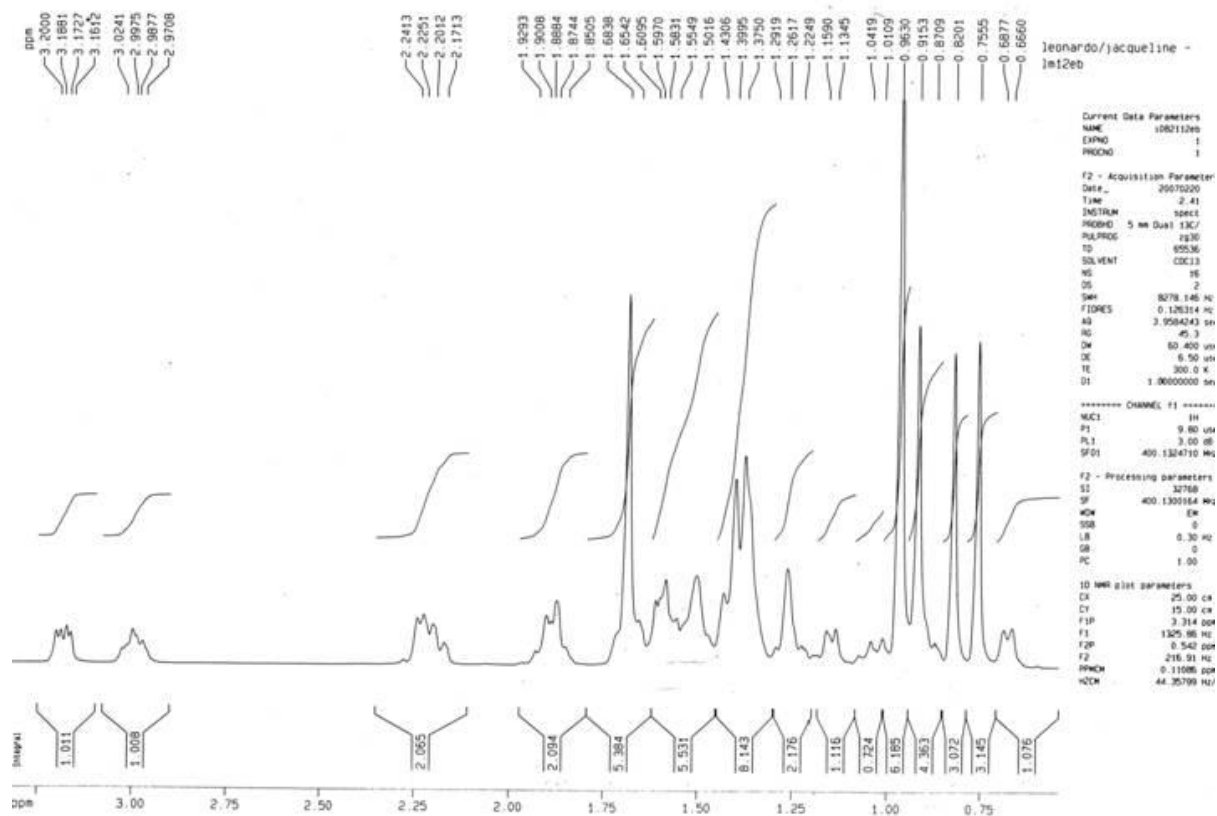


Figura 36 – Ampliação do espectro de RMN de ^1H do betulinato de metila (**153**) (400 MHz, CDCl_3)



Figura 37 - Espectro de RMN de ^{13}C do betulinato de metila (**153**) (100 MHz, CDCl_3)

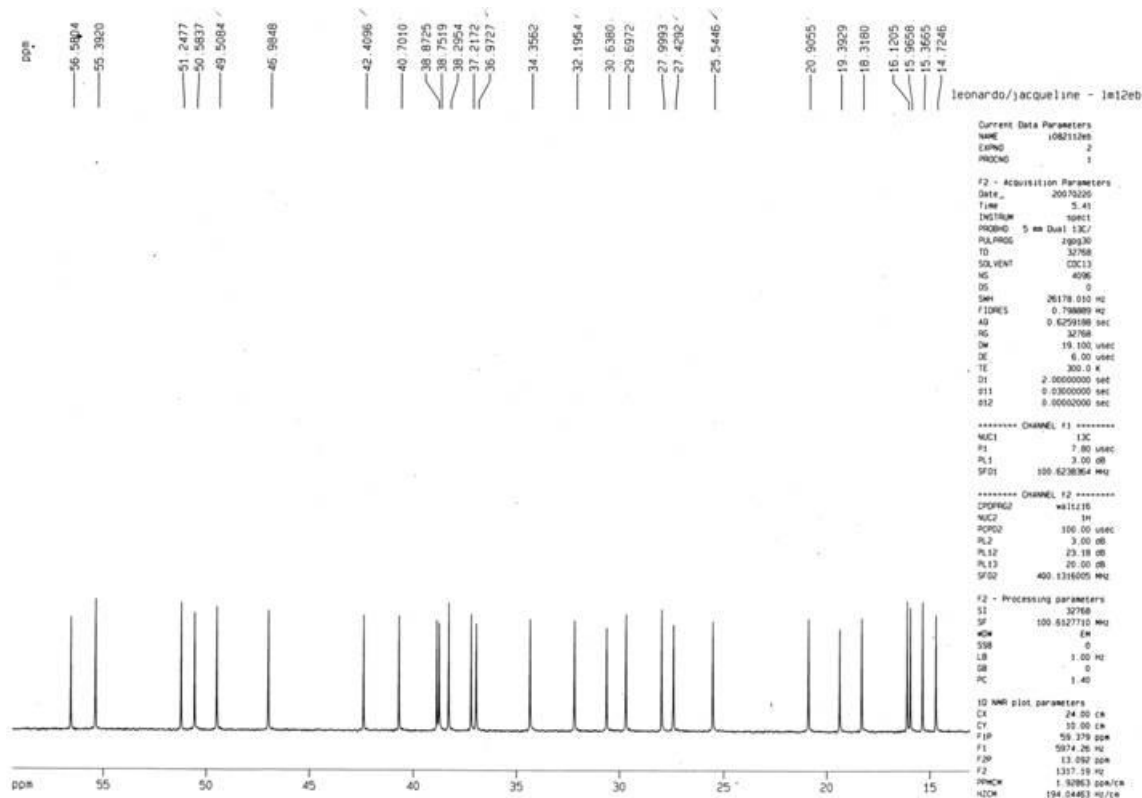
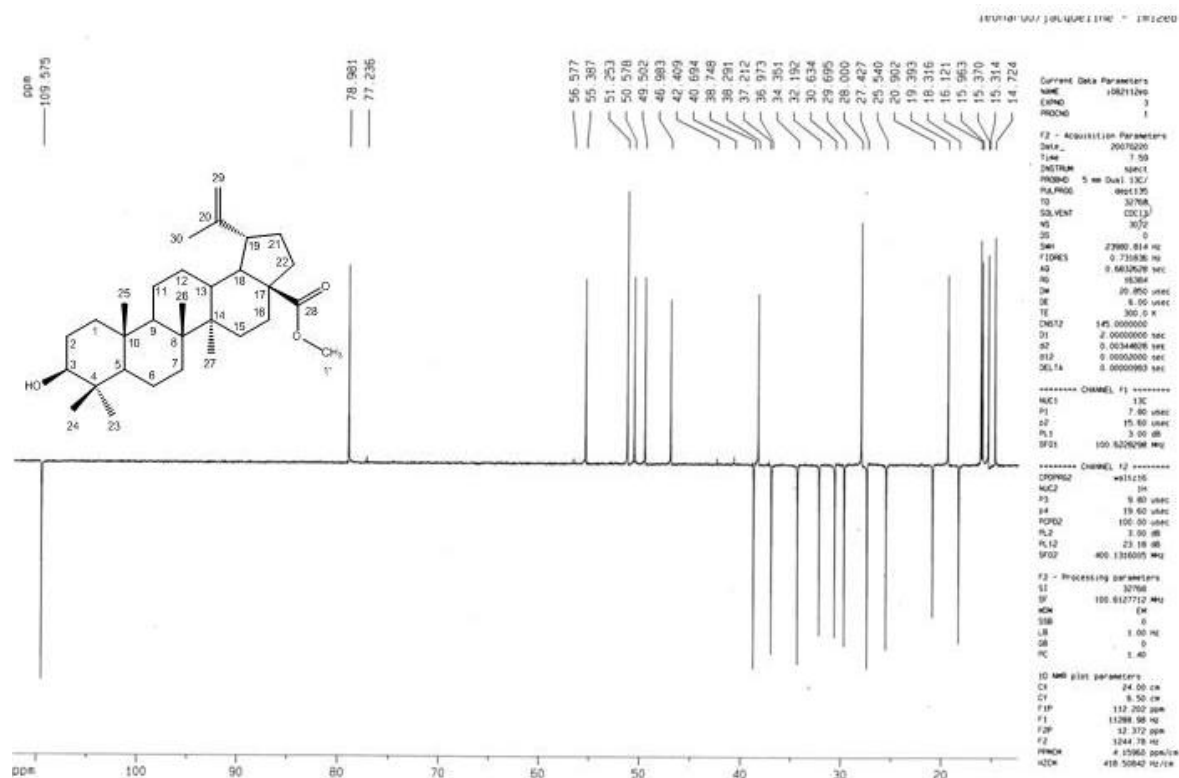
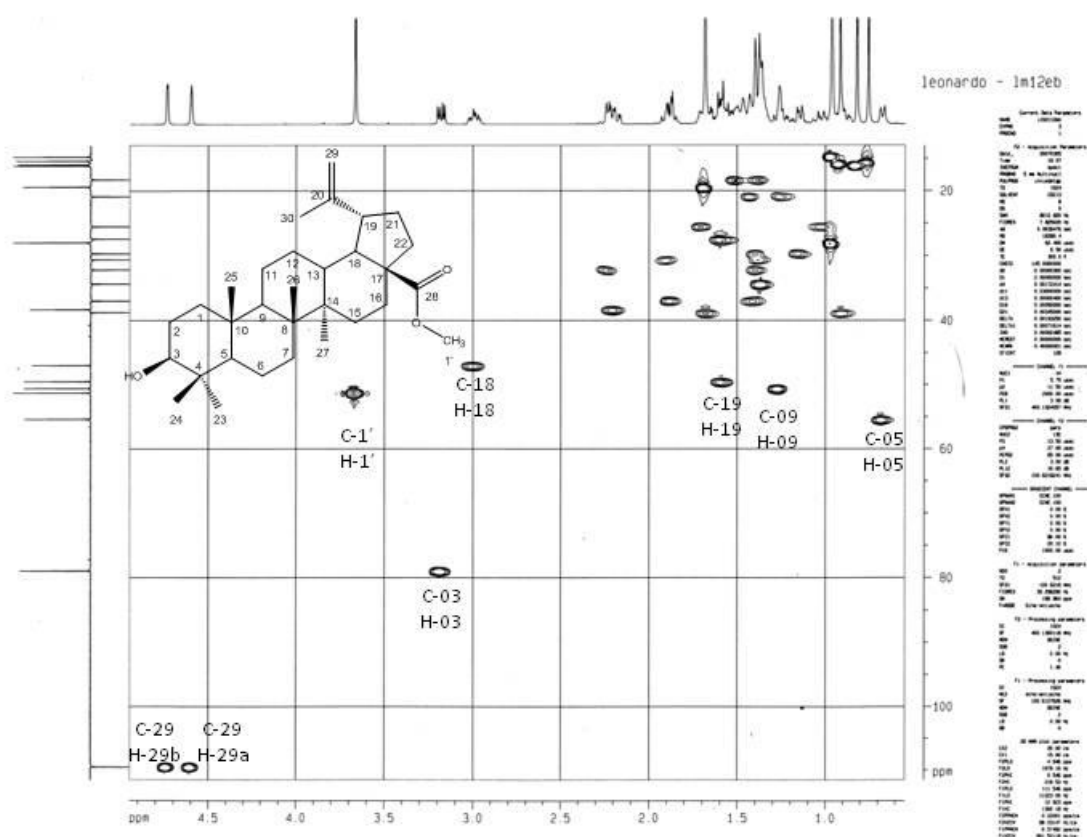


Figura 38 - Ampliação do espectro de RMN de ^{13}C do betulinato de metila (**153**) (100 MHz, CDCl_3)

Figura 39 - Subespectro DEPT-135 do betulinato de metila (**153**) (100 MHz, CDCl₃)Figura 40 - Mapa de contornos HMBC do betulinato de metila (**153**) (400 MHz, CDCl₃)

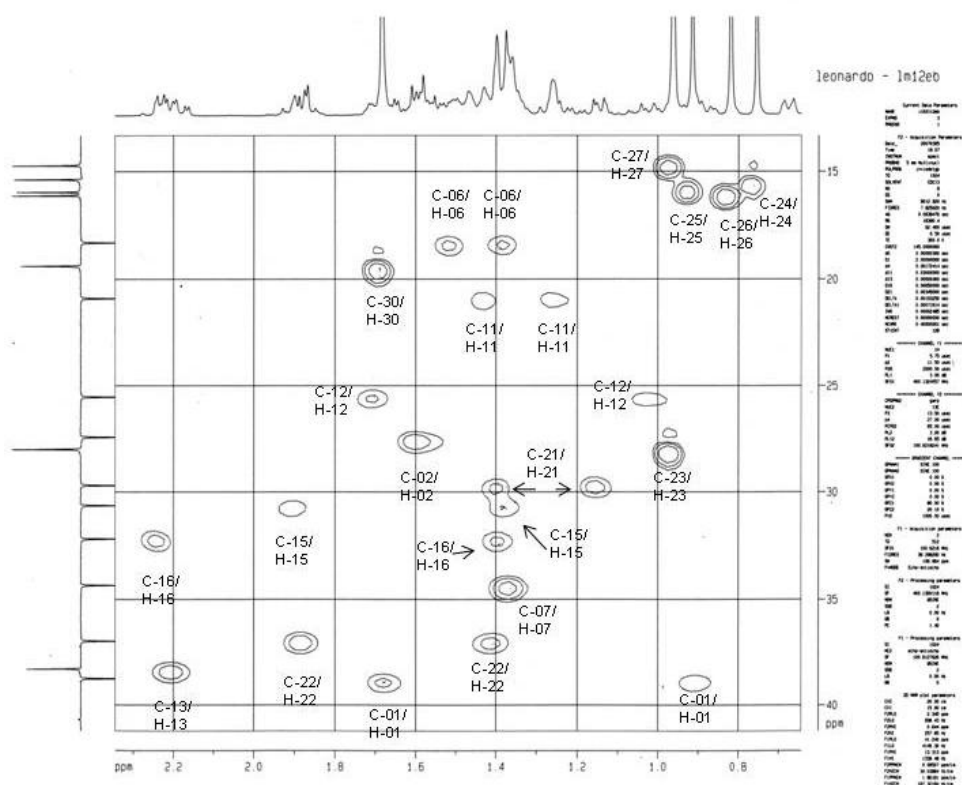


Figura 41 – Expansão do mapa de contornos HMQC do betulinato de metila (**153**) (400 MHz, CDCl_3)

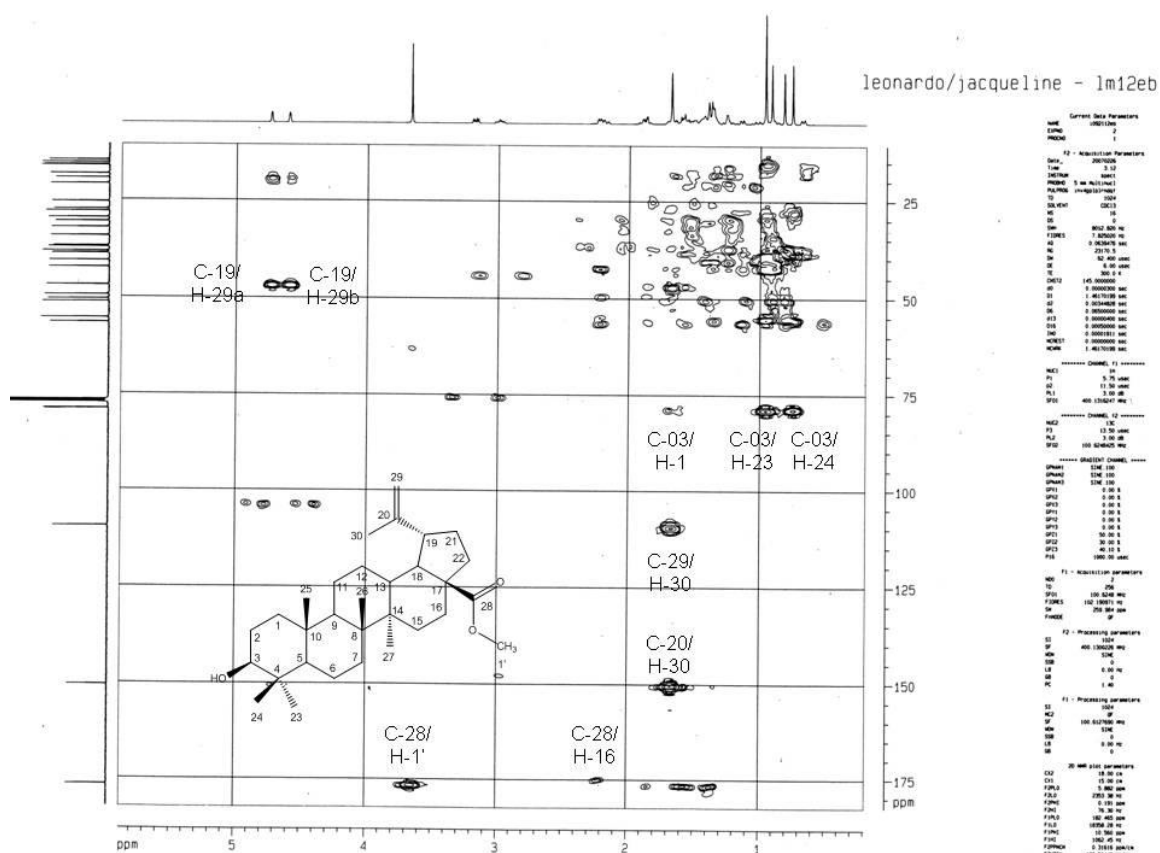
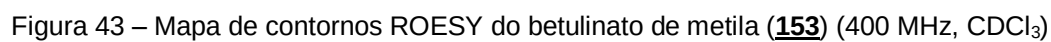
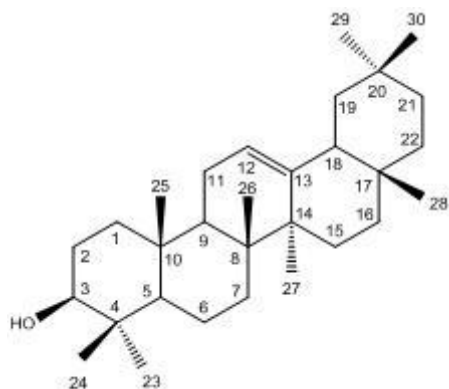


Figura 42 – Mapa de contornos HMBC do betulinato de metila (**153**) (400 MHz, CDCl_3)



ANEXO 03 - β -amirina (**154**)

Massa molar: 426,3862 g/mol

Fórmula molecular: $C_{30}H_{50}O$

Faixa de fusão: 185-190 °C

IV (ν máx., KBr, cm^{-1}): 3296, 2954, 1456, 1390, 1038, 991

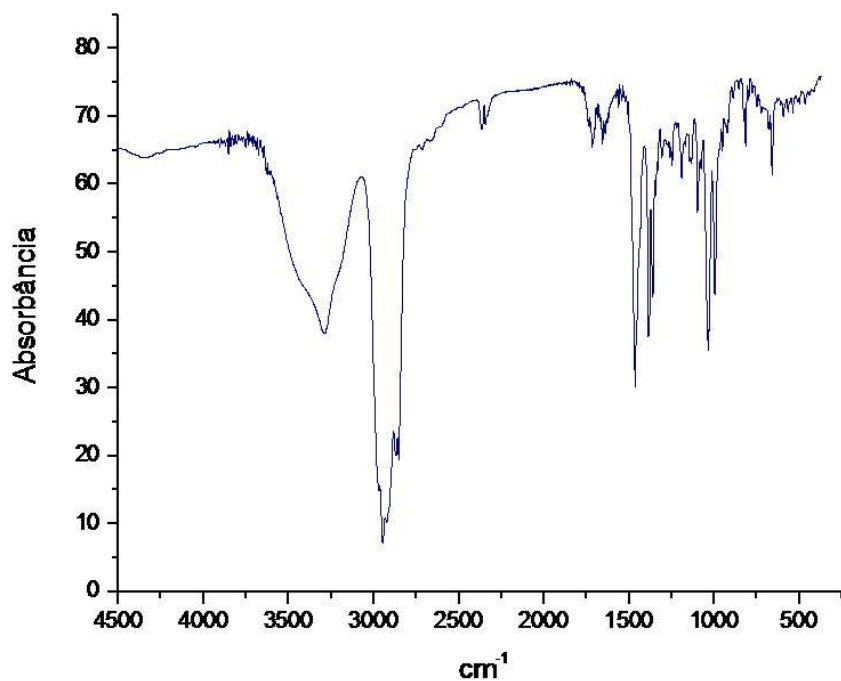


Figura 44 - Espectro no Infravermelho da β -amirina (**154**) (KBr)

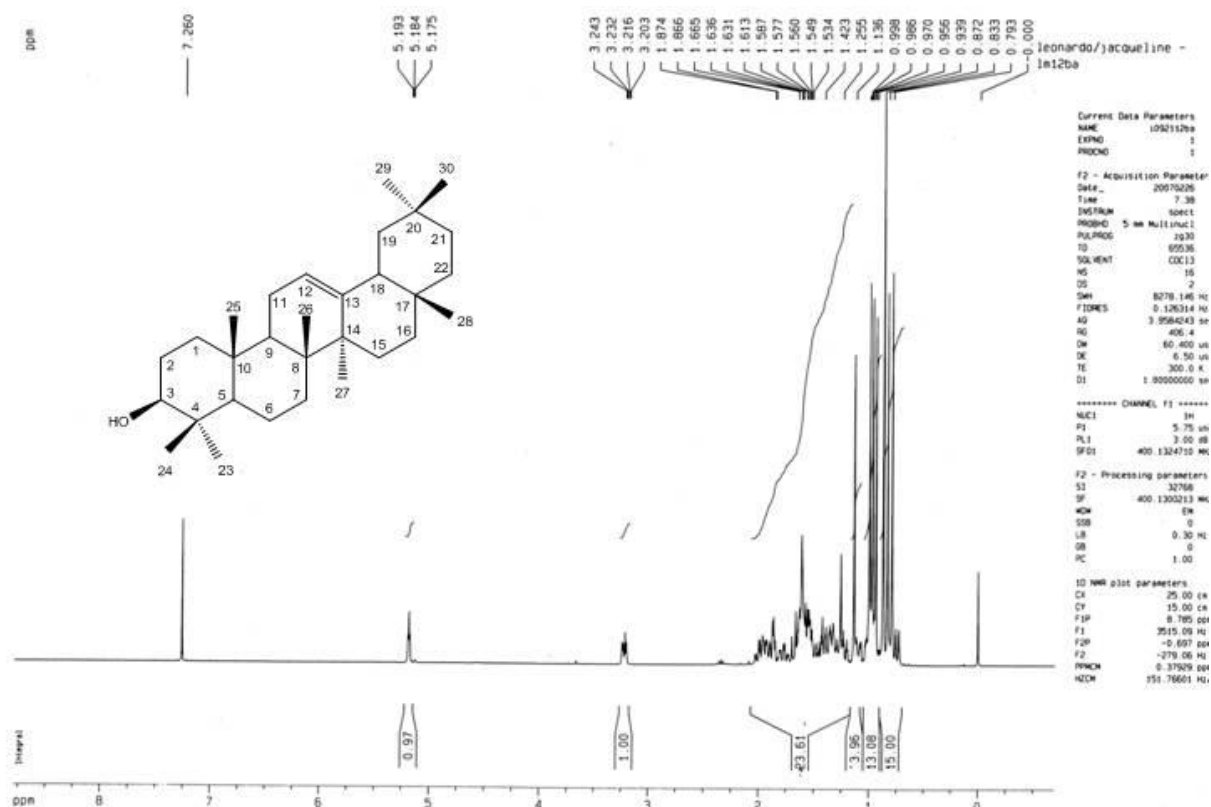


Figura 45 - Espectro de RMN de ^1H da β -amirina (**154**) (400 MHz, CDCl_3)

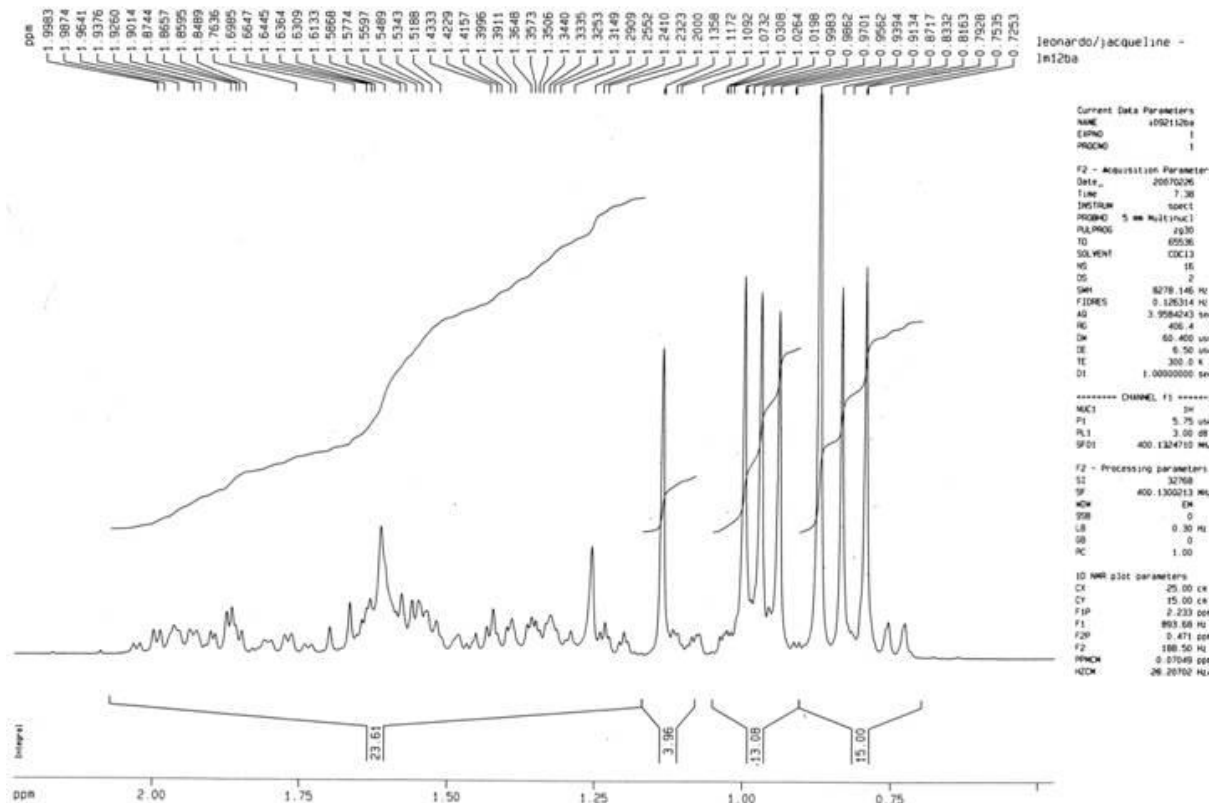


Figura 46 - Ampliação do espectro de RMN de ^1H da β -amirina (**154**) (400 MHz, CDCl_3)

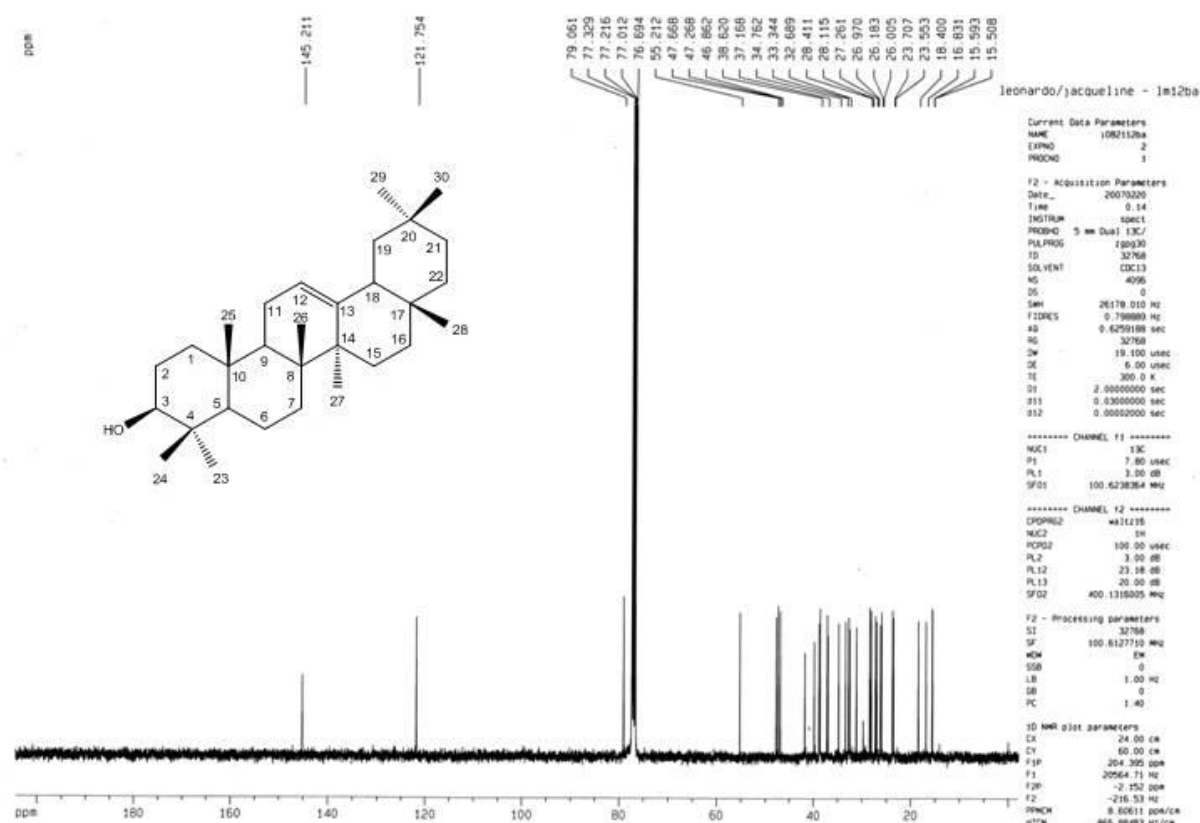


Figura 47 - Espectro de RMN de ^{13}C da β -amirina (**154**) (100 MHz, CDCl_3)

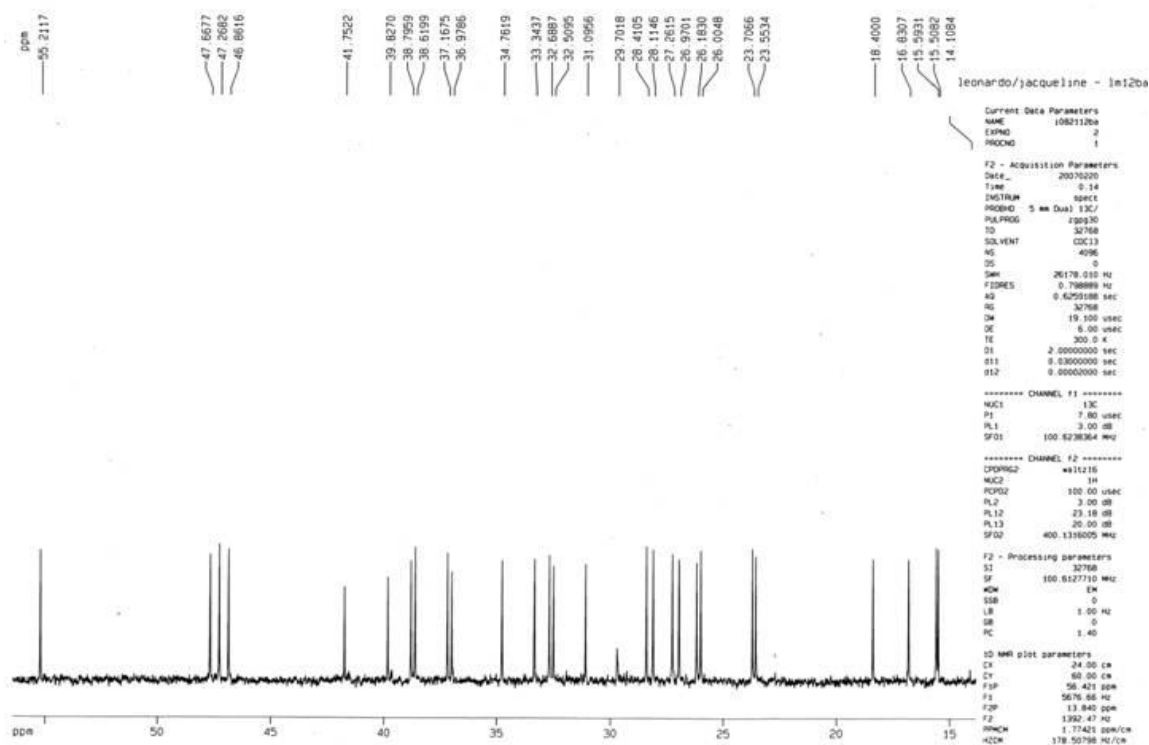
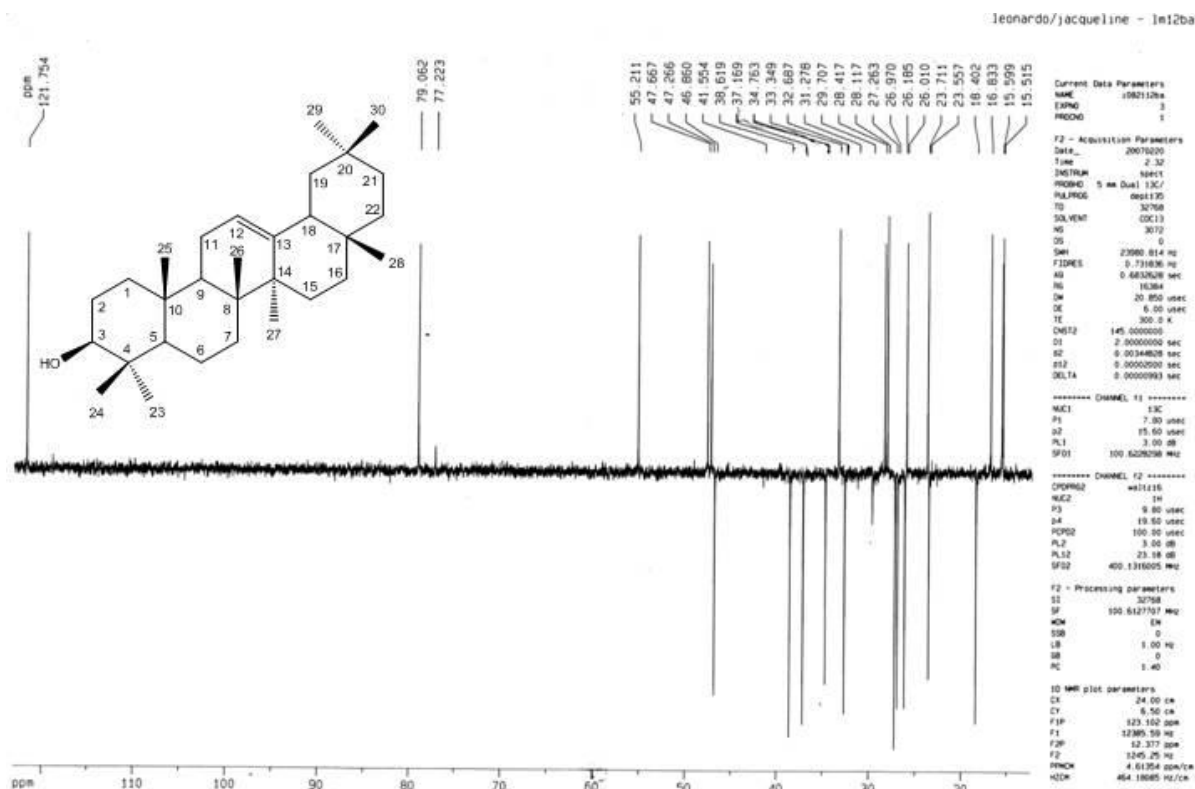
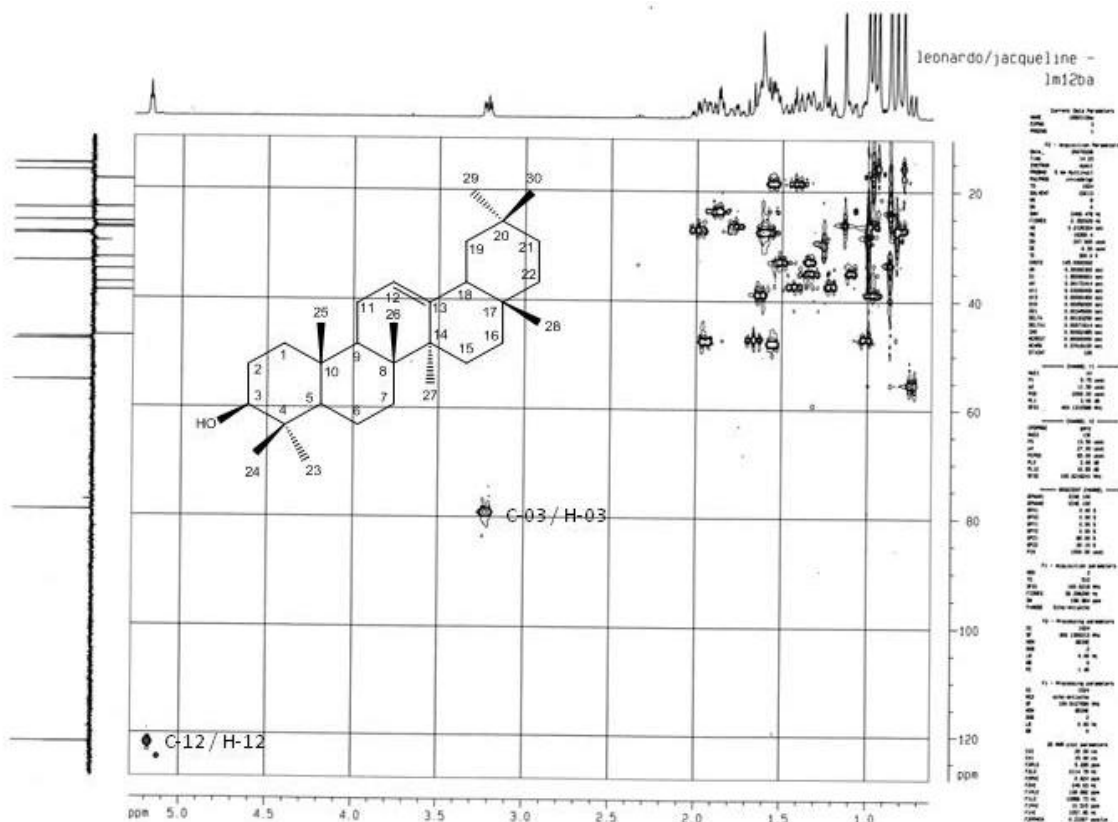


Figura 48 – Ampliação do espectro de RMN de ^{13}C da β -amirina (**154**) (100 MHz, CDCl_3)

Figura 49 – Subespectro DEPT-135 da β-amirina (**154**) (100 MHz, CDCl₃)Figura 50 – Mapa de contornos HMBC da β-amirina (**154**) (100 MHz, CDCl₃)

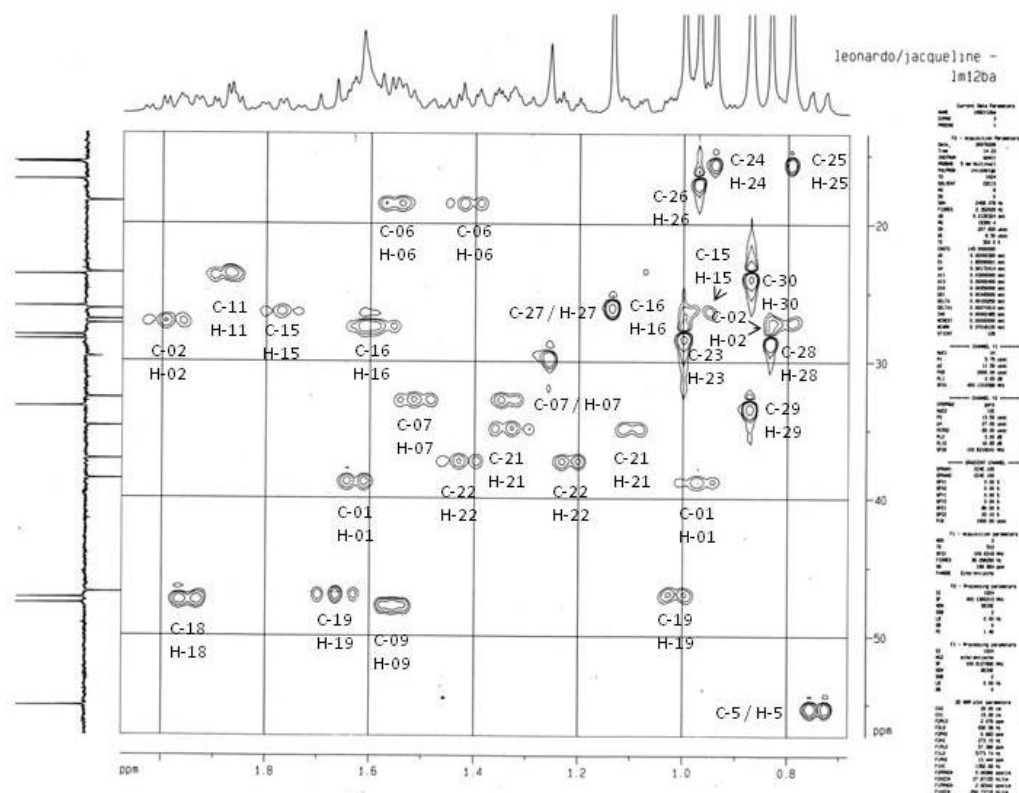


Figura 51 – Expansão do mapa de contornos HMQC da β -amirina (**154**) (400 MHz, CDCl_3)

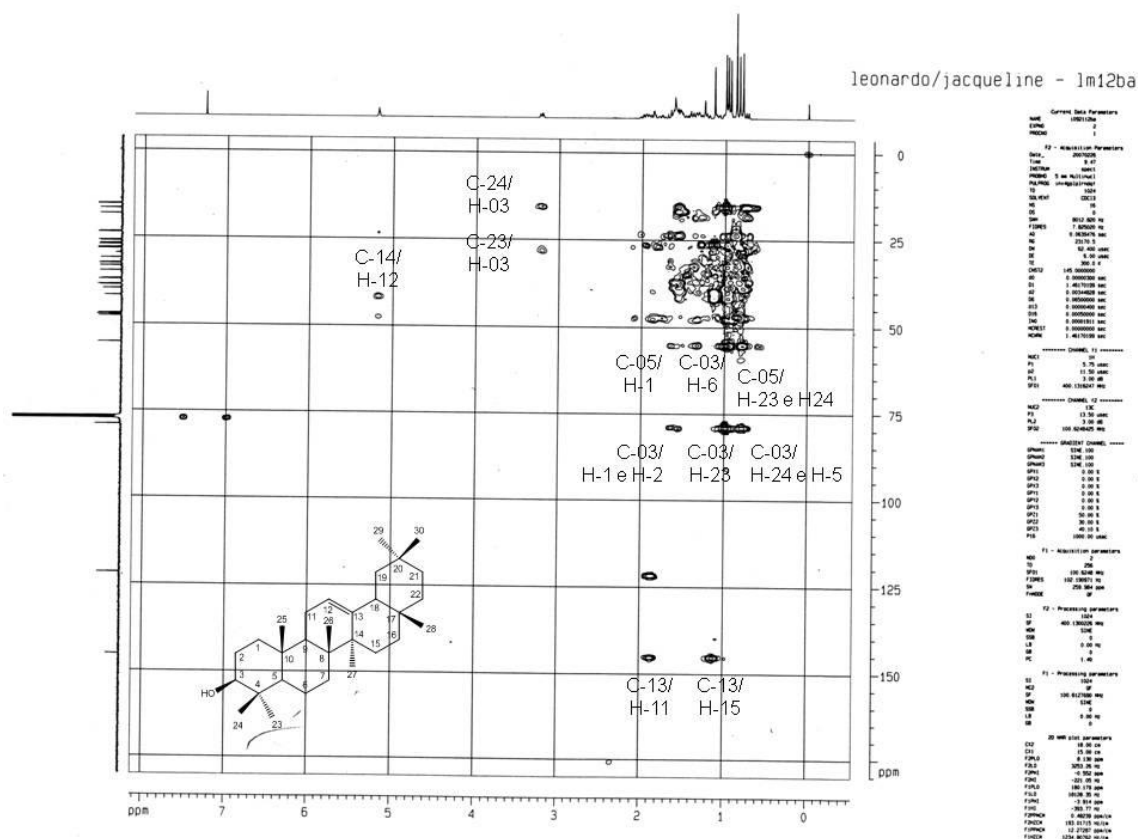
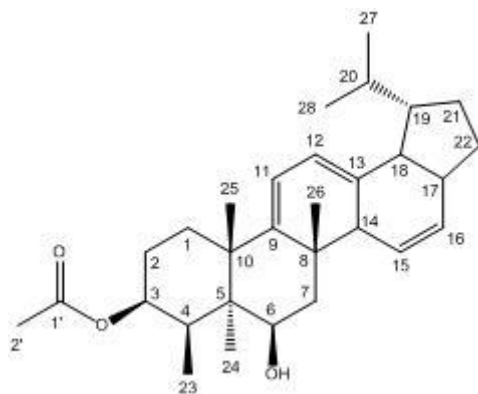


Figura 52 – Mapa de contornos HMBC da β -amirina (**154**) (400 MHz, CDCl_3)



Figura 53 – Mapa de contornos ROESY da β -amirina (**154**) (400 MHz, CDCl_3)

ANEXO 04 - Acetato de (1S,5bS,7R,7aS,8R,9S,11aR)-7-hidroxi-1-isopropil-5b,7a,8,11a-tetrametil- 2, 3, 3a, 5a, 5b, 6, 7, 7a, 8, 9, 10, 11, 11a, 13b-tetradecahidro-1H- ciclopenta[a]chrisen-9-il (**158**)



Massa molar: 452,6686 g/mol

Fórmula molecular: $C_{30}H_{44}O_3$

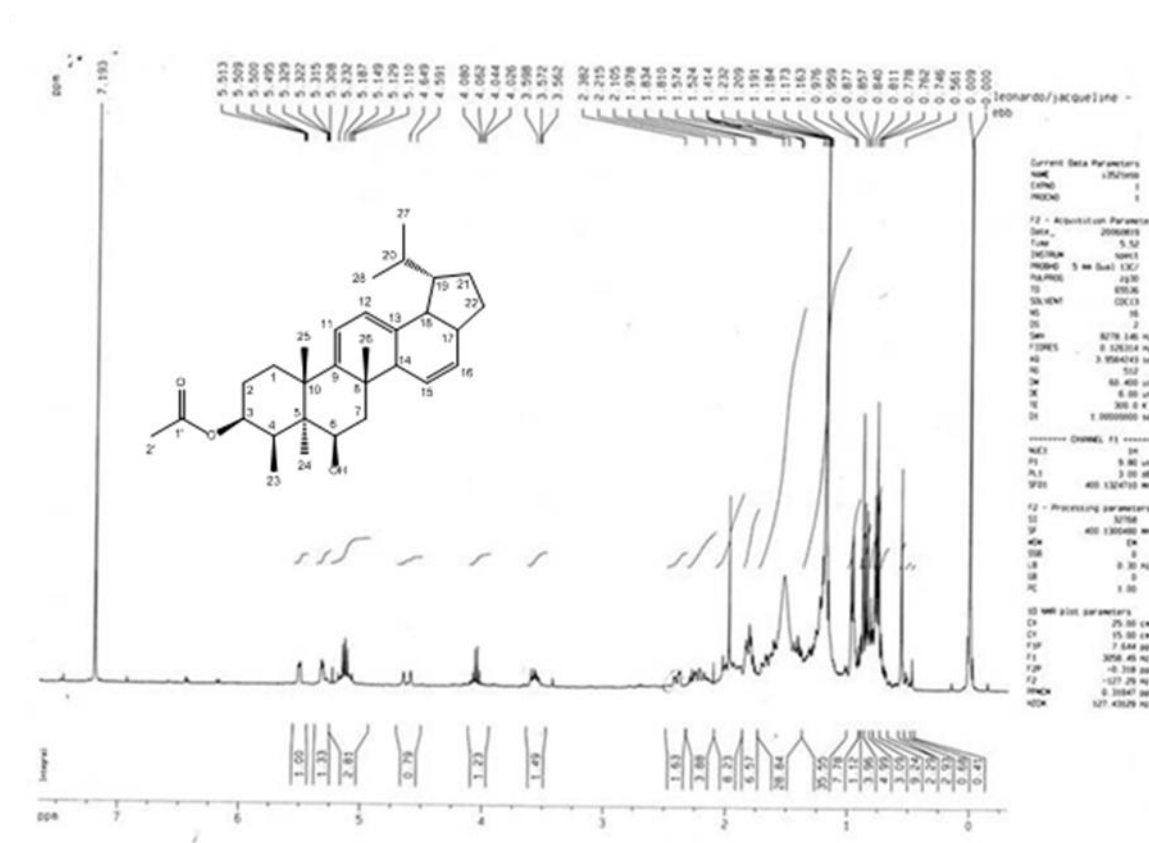


Figura 54 - Espectro de RMN de ^1H de **158** (400 MHz, $CDCl_3$)



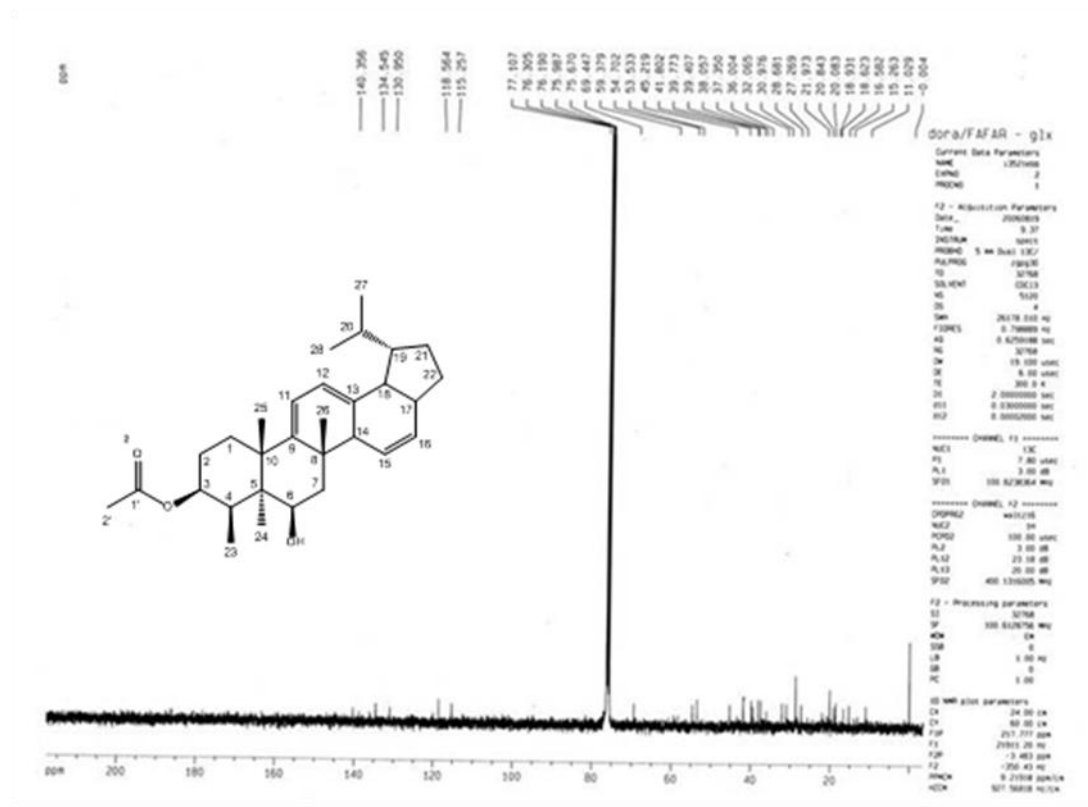


Figura 57 - Espectro de RMN de ^{13}C de **158** (100 MHz, CDCl₃)

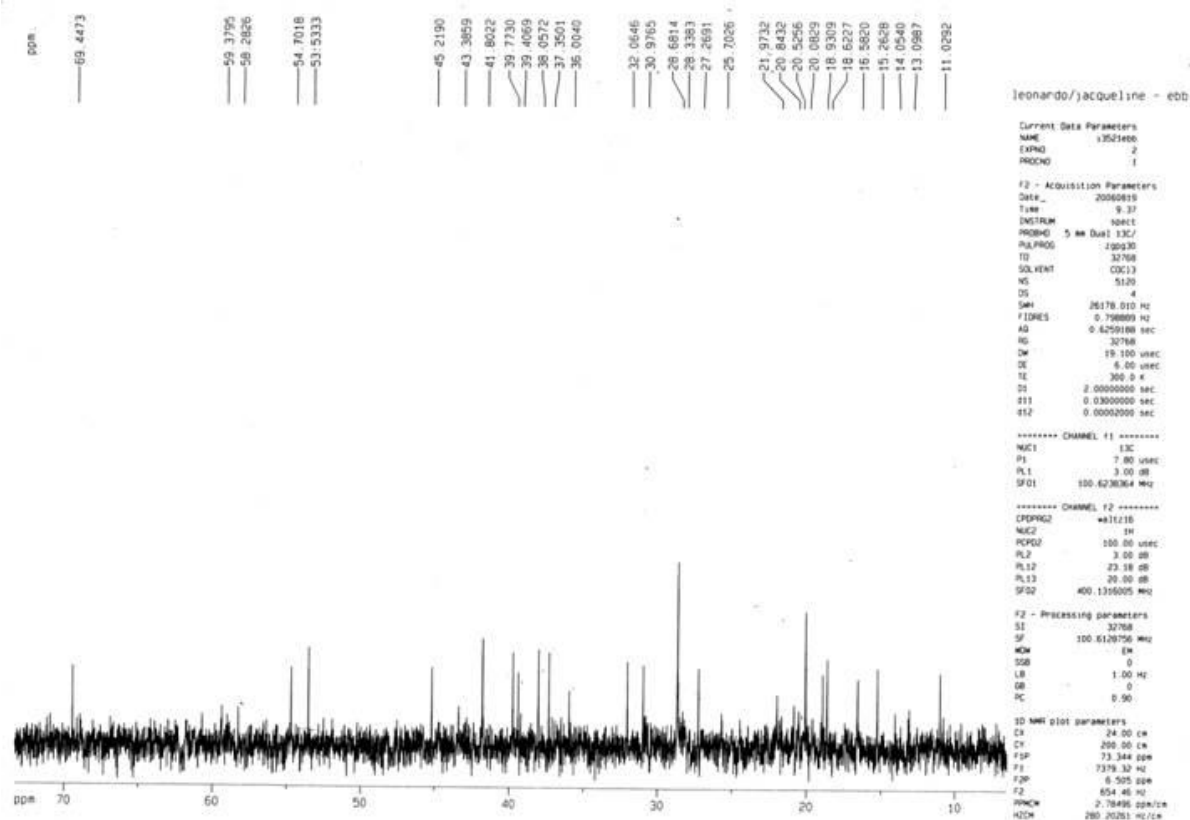
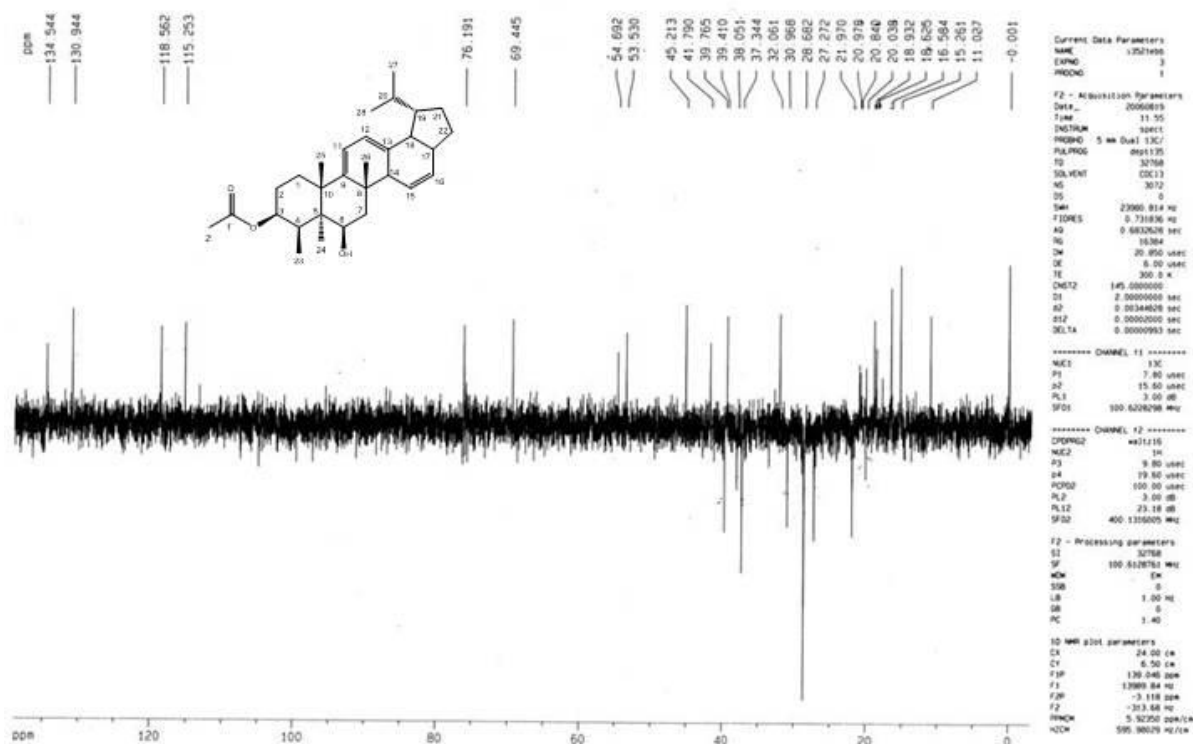
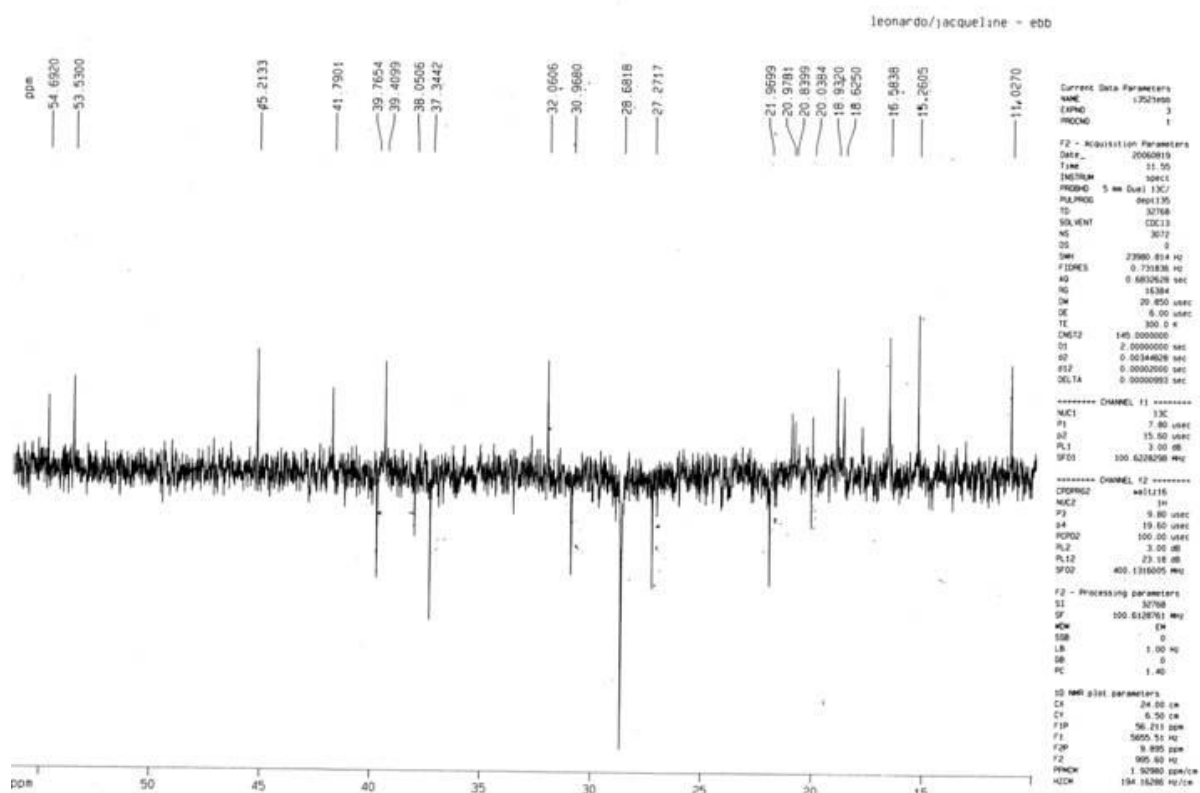


Figura 58 – Ampliação do espectro de RMN de ^{13}C de **158** (100 MHz, CDCl₃)

Figura 59 - Subespectro DEPT-135 de **158** (100 MHz, CDCl₃)Figura 60 – Ampliação do subespectro DEPT-135 de **158** (100 MHz, CDCl₃)

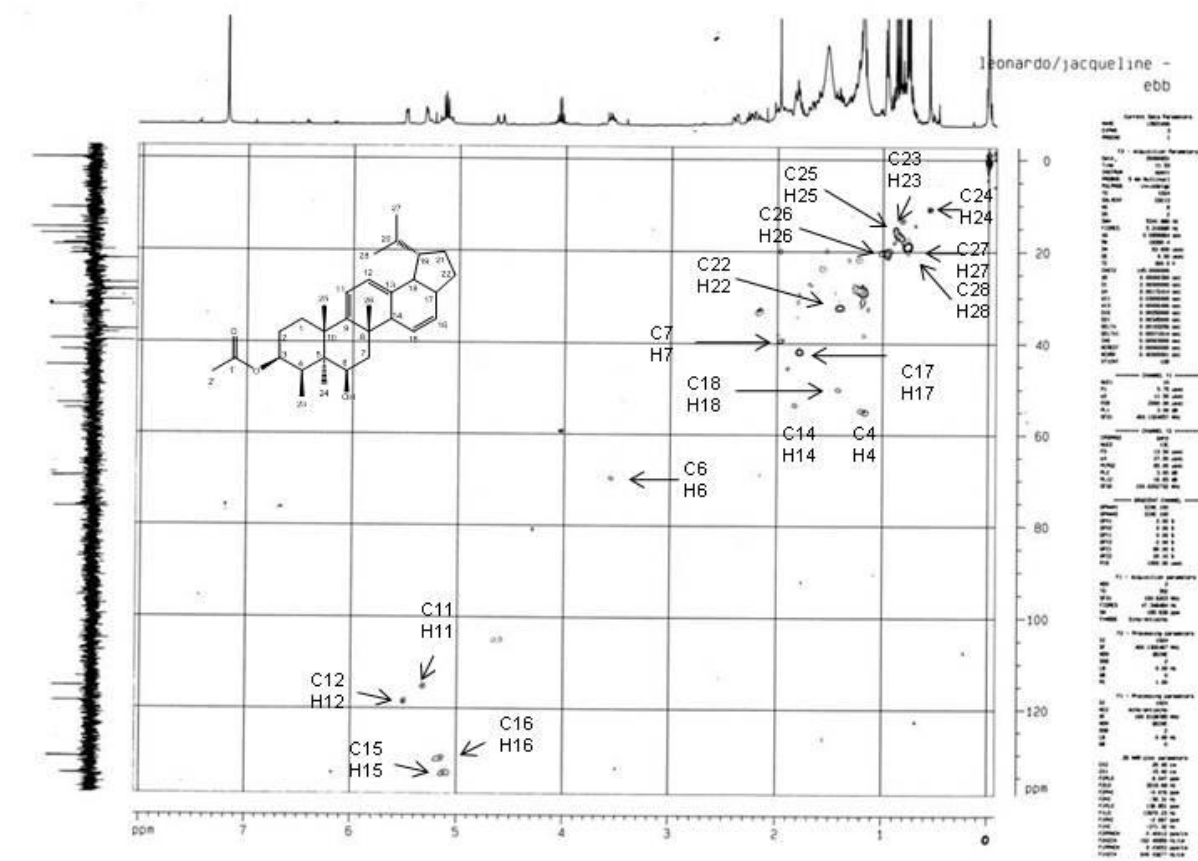


Figura 61 – Mapa de contornos HMQC de **158** (400 MHz, CDCl₃)

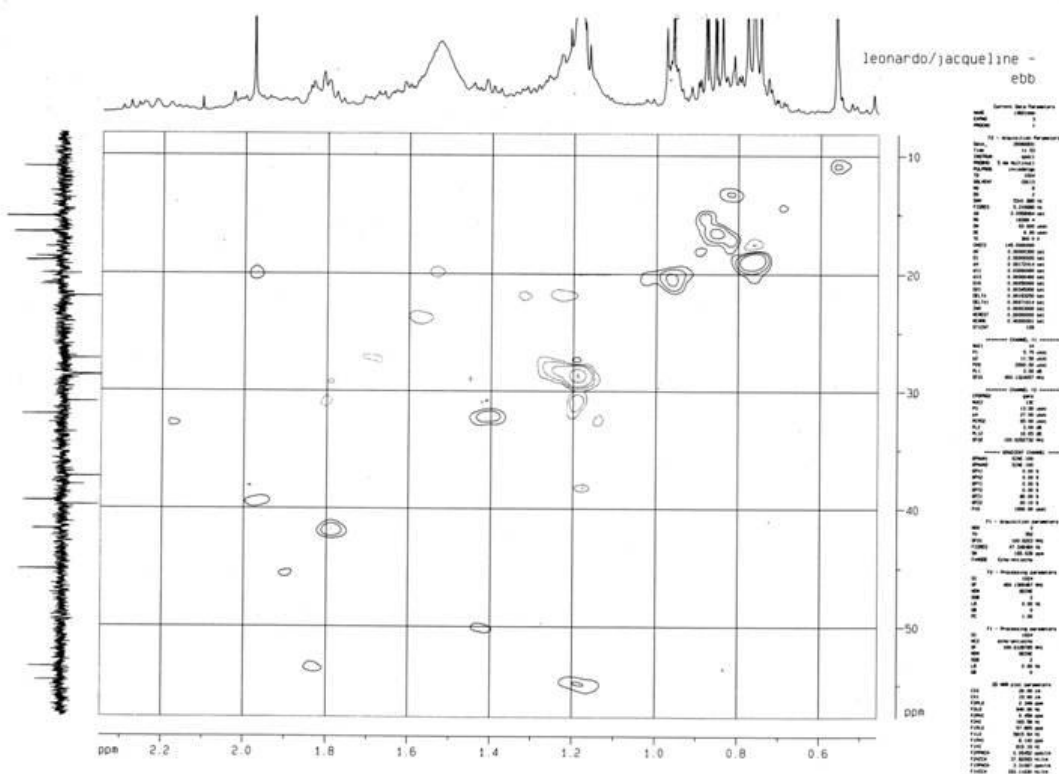
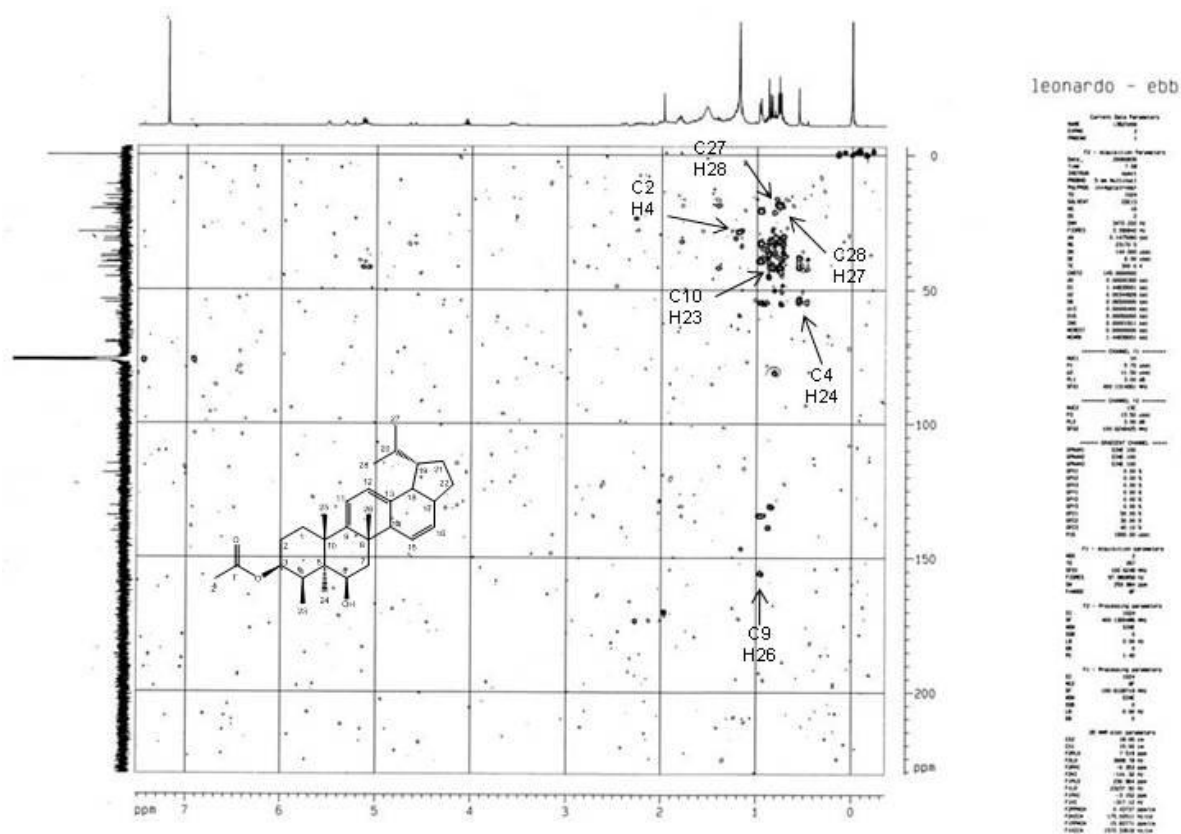
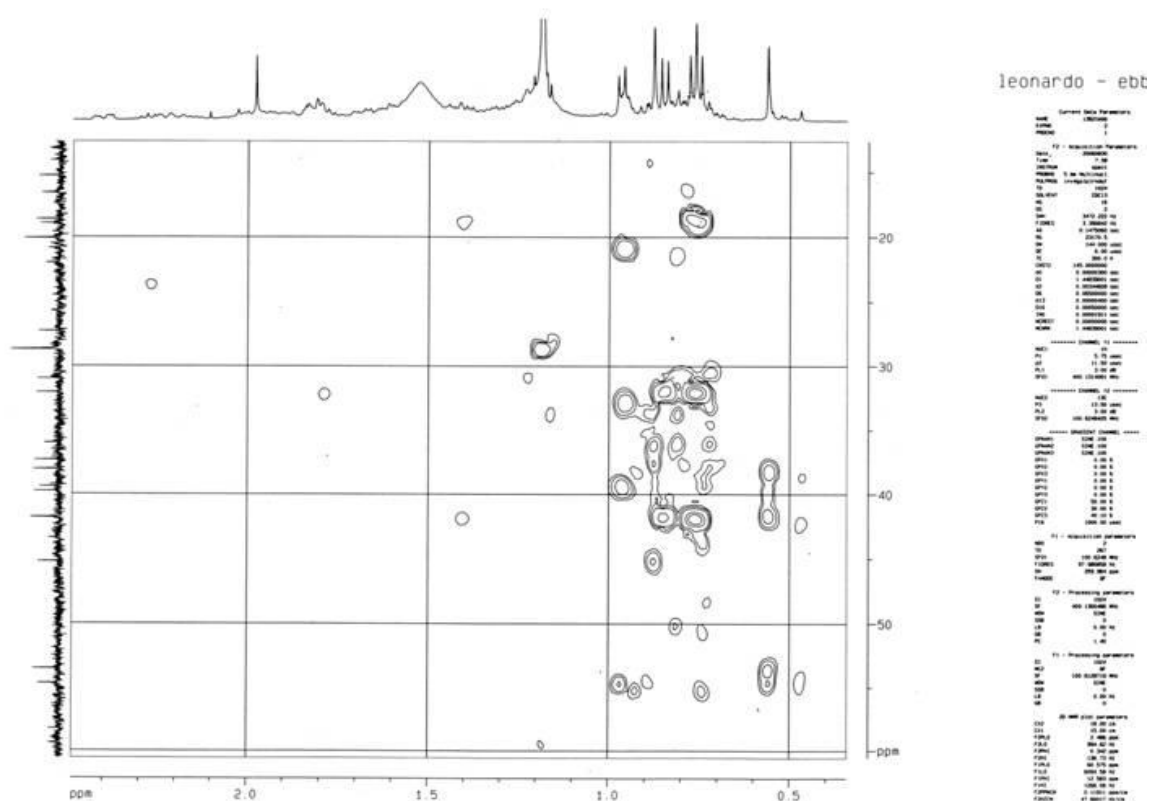
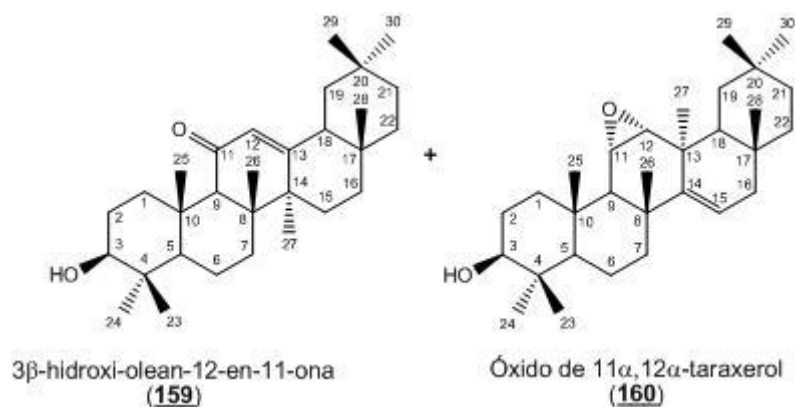


Figura 62 – Mapa de contornos HMQC de **158** (400 MHz, CDCl₃)

Figura 63 – Mapa de contornos HMBC de **158** (400 MHz, CDCl₃)Figura 64 – Ampliação do mapa de contornos HMBC de **158** (400 MHz, CDCl₃)



ANEXO 05 - 3 β -hidroxi-olean-12-en-11-ona (**159**) e óxido 11 α ,12 α -taraxerol (**160**)

Massa molar: 440,7009 g/mol

Fórmula molecular: C₃₀H₄₈O₃

IV (ν máx., KBr, cm⁻¹): 3504, 2964, 1741, 1645, 1463, 1378, 1257, 1095, 1027, 802

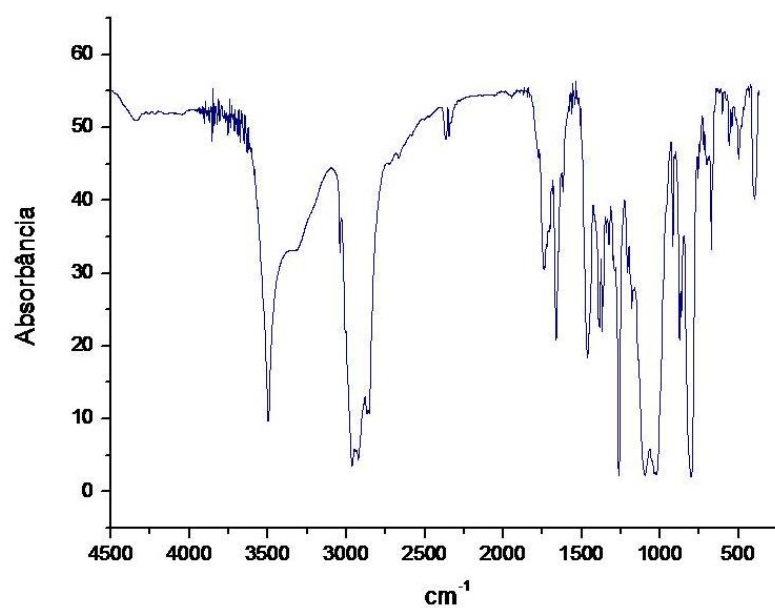
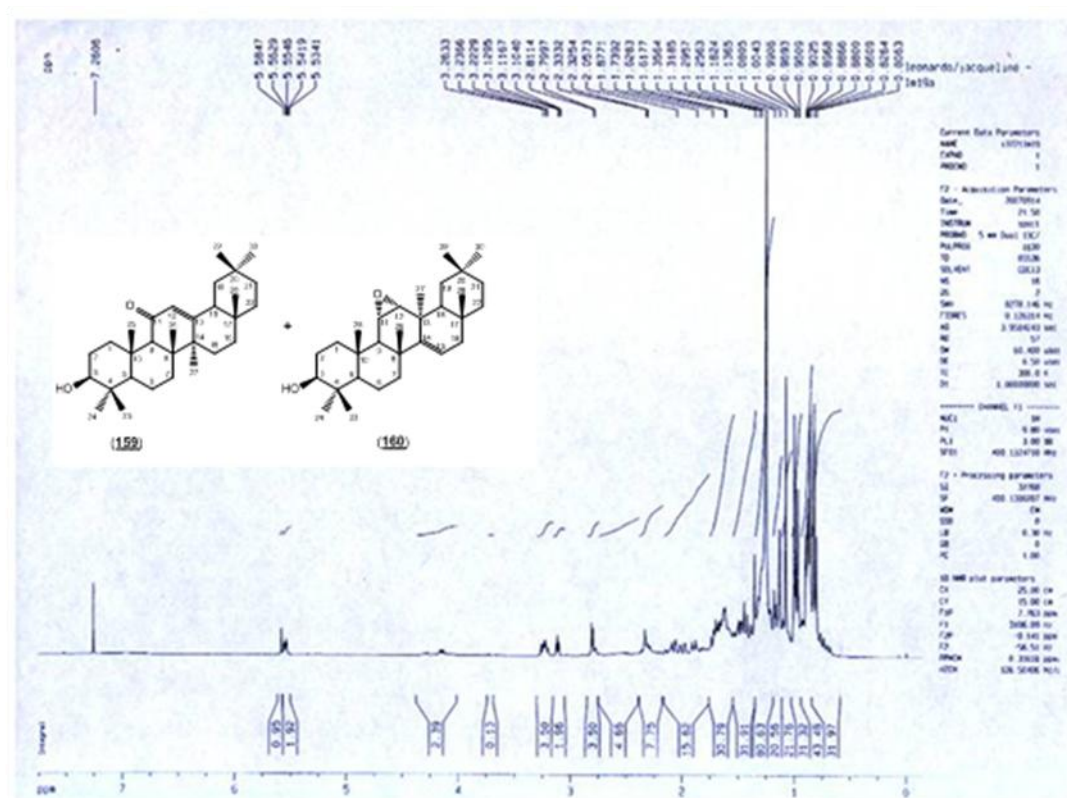


Figura 67 – Espectro no infravermelho de 3 β -hidroxi-olean-12-en-11-ona (**159**) e do óxido de 11 α ,12 α -taraxerol (**160**) (KBr)



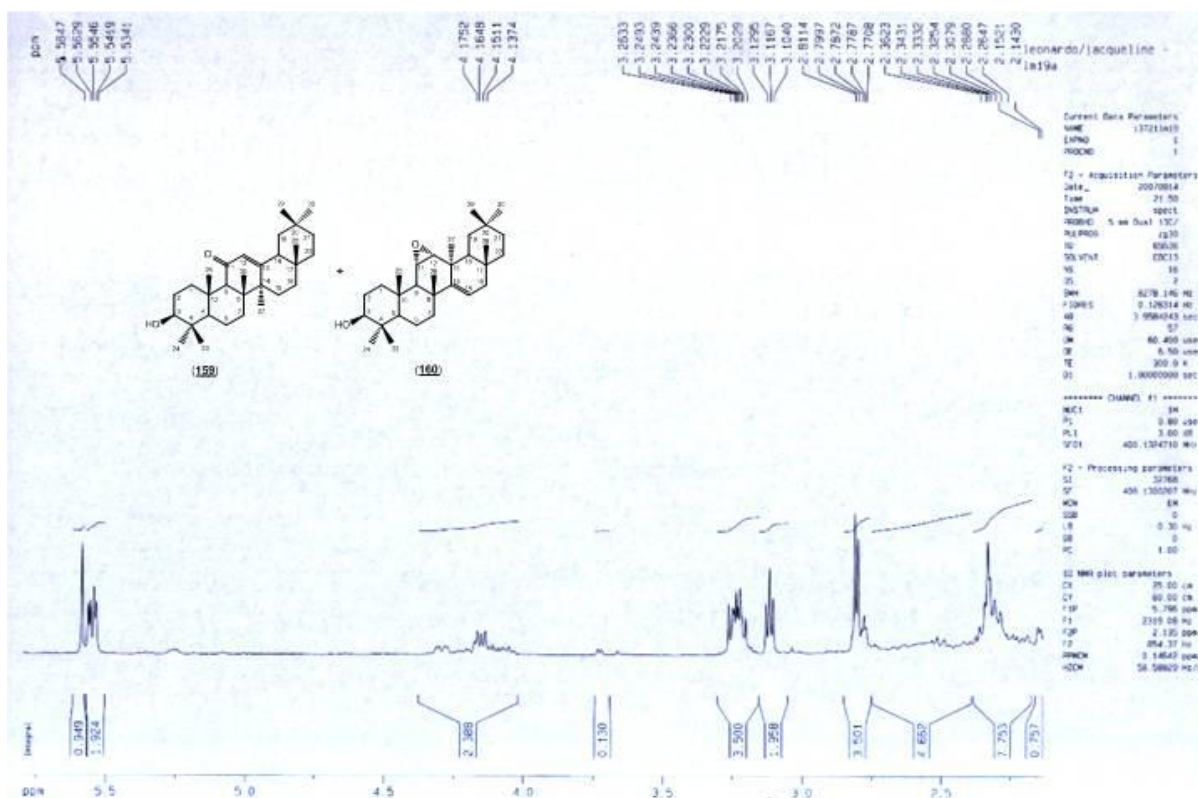


Figura 70 – Ampliação do espectro de RMN de ^1H de 3 β -hidroxi-olean-12-en-11-ona (**159**) e do óxido de 11 α ,12 α -taraxerol (**160**) (400 MHz, CDCl_3)

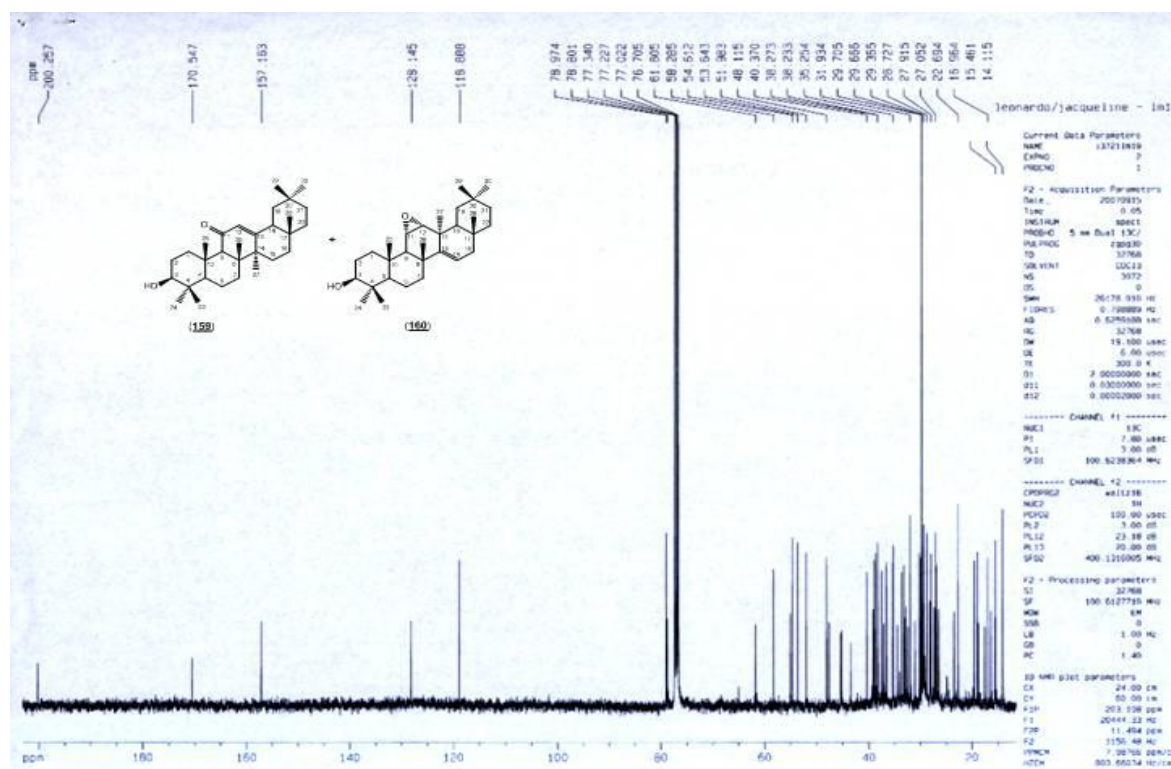
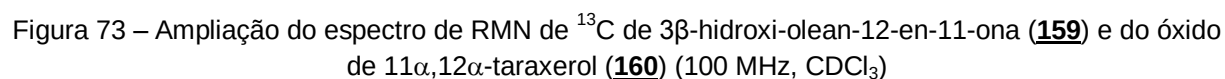
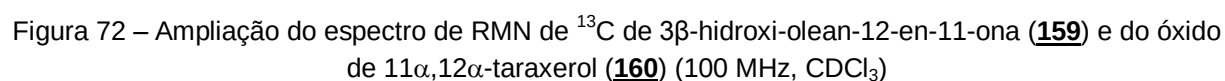


Figura 71 – Espectro de RMN de ^{13}C de 3 β -hidroxi-olean-12-en-11-ona (**159**) e do óxido de 11 α ,12 α -taraxerol (**160**) (100 MHz, CDCl_3)



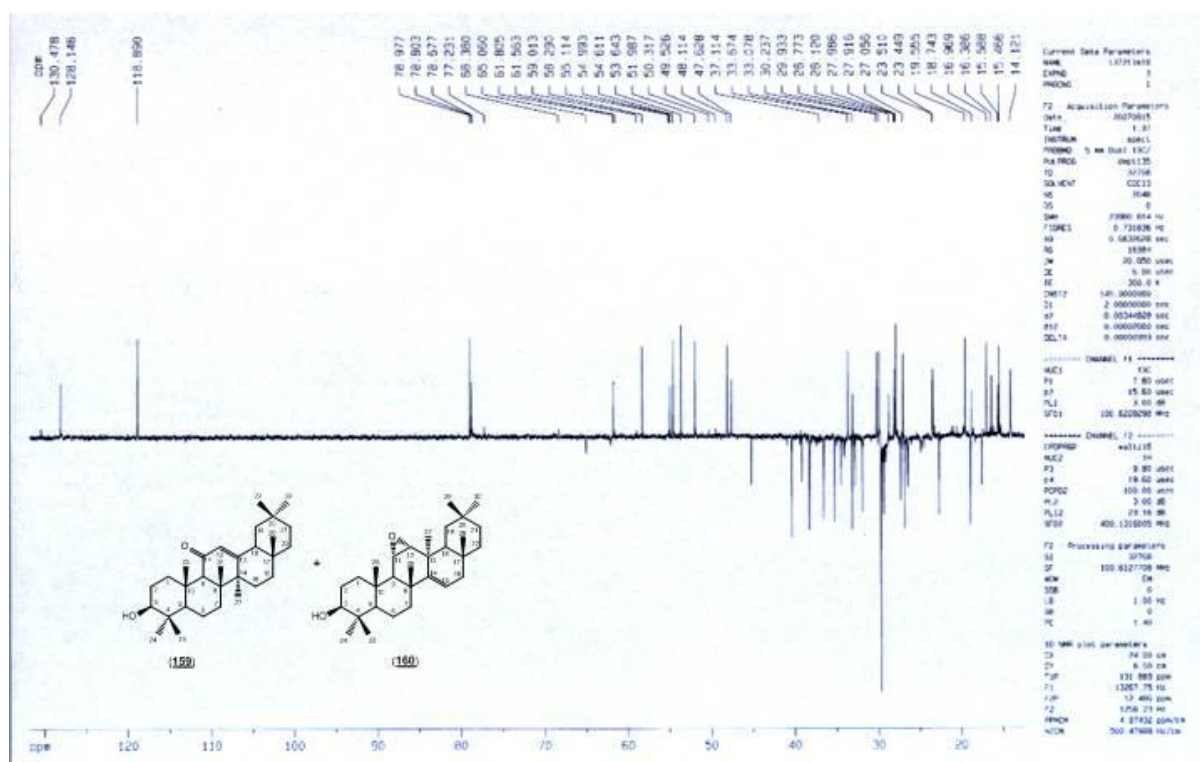


Figura 74 – Subespectro DEPT-135 de 3β-hidroxi-olean-12-en-11-ona (**159**) e do óxido de 11α,12α-taraxerol (**160**) (100 MHz, CDCl₃)

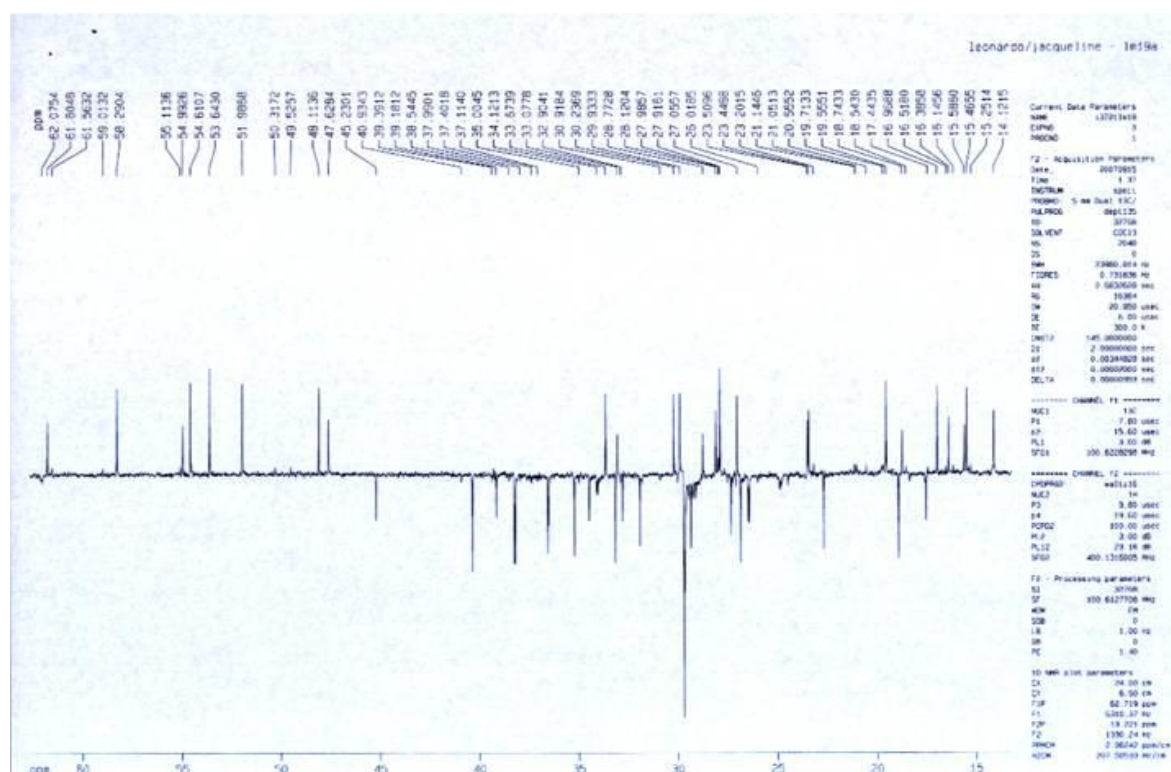


Figura 75 – Ampliação do subespectro DEPT-135 de 3β-hidroxi-olean-12-en-11-ona (**159**) e do óxido de 11α,12α-taraxerol (**160**) (100 MHz, CDCl₃)

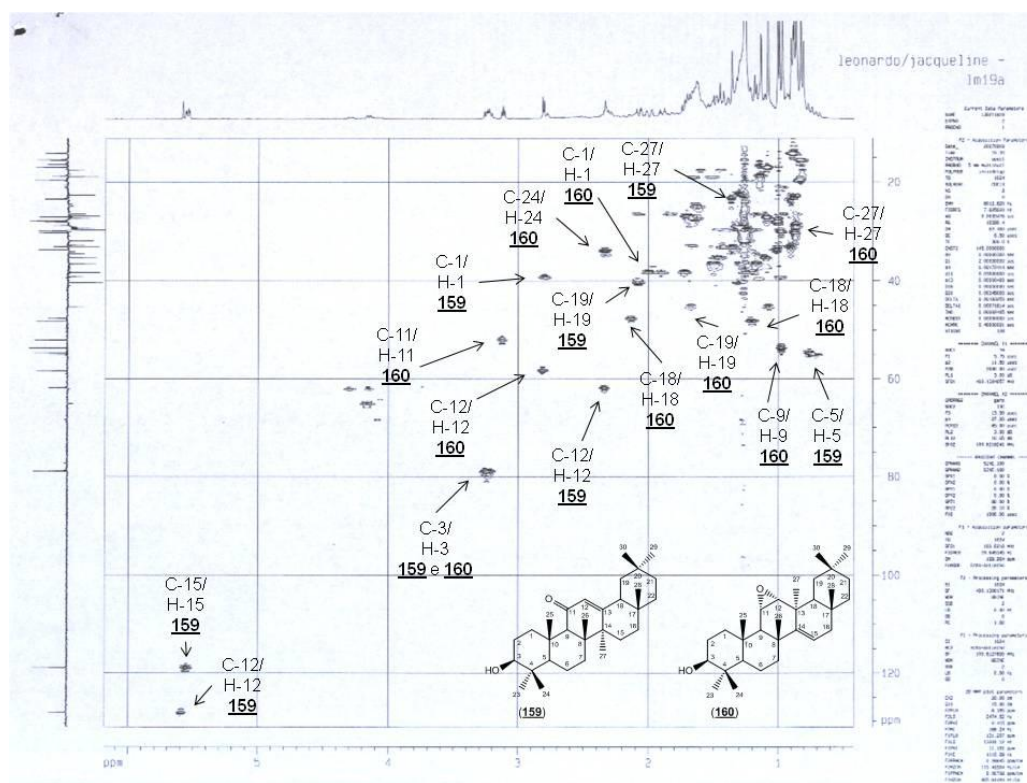


Figura 76 – Mapa de contornos HMQC de 3β-hidroxi-olean-12-en-11-ona (**159**) e do óxido de 11α,12α-taraxerol (**160**) (400 MHz, CDCl_3)

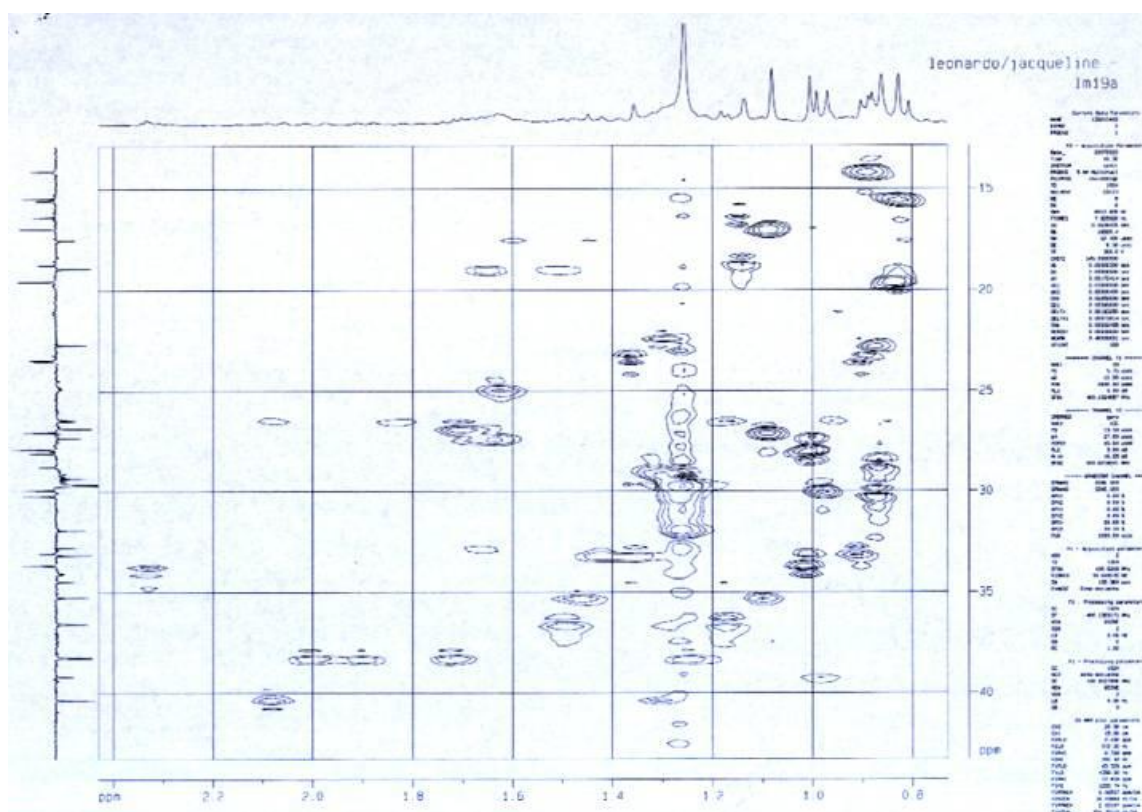
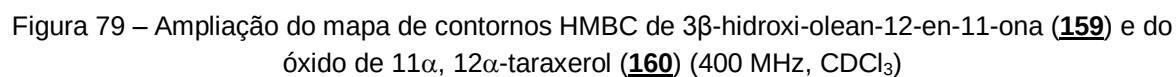
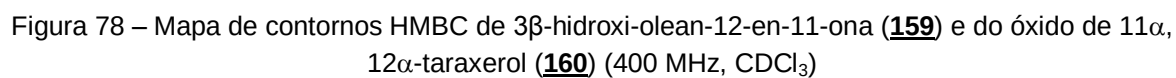


Figura 77 – Ampliação do mapa de contornos HMQC de 3β-hidroxi-olean-12-en-11-ona (**159**) e do óxido de 11α,12α-taraxerol (**160**) (400 MHz, CDCl_3)



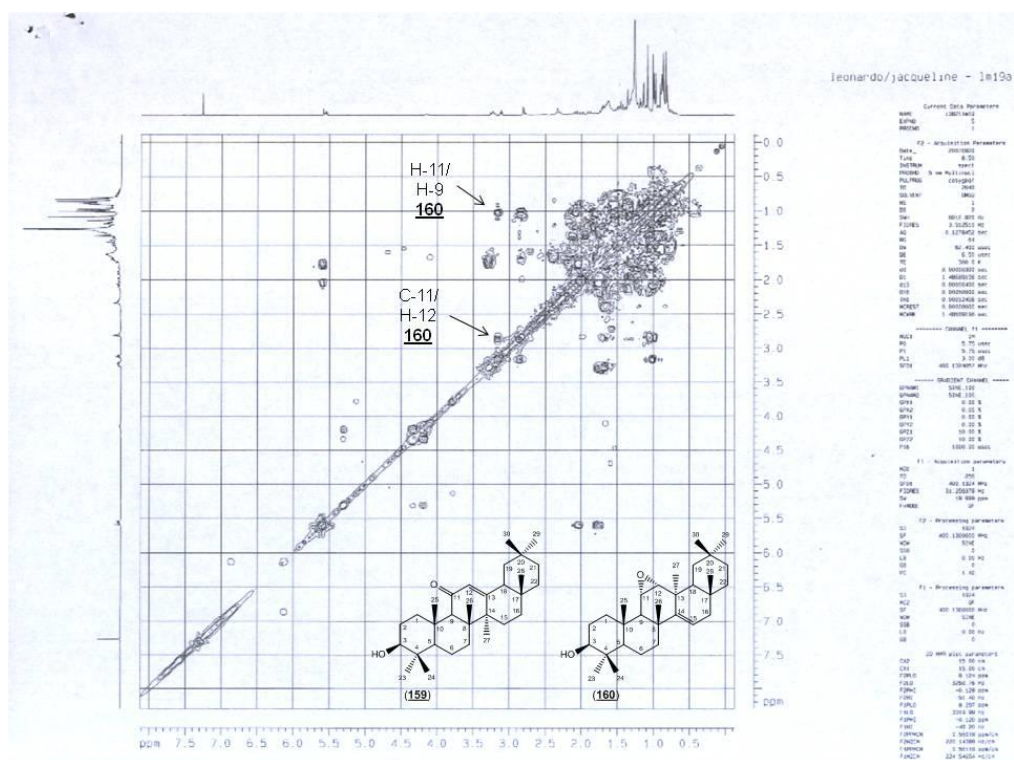


Figura 80 – Mapa de contornos COSY de 3 β -hidroxi-olean-12-en-11-ona (**159**) e do óxido de 11 α ,12 α -taraxerol (**160**) (400 MHz, CDCl₃)

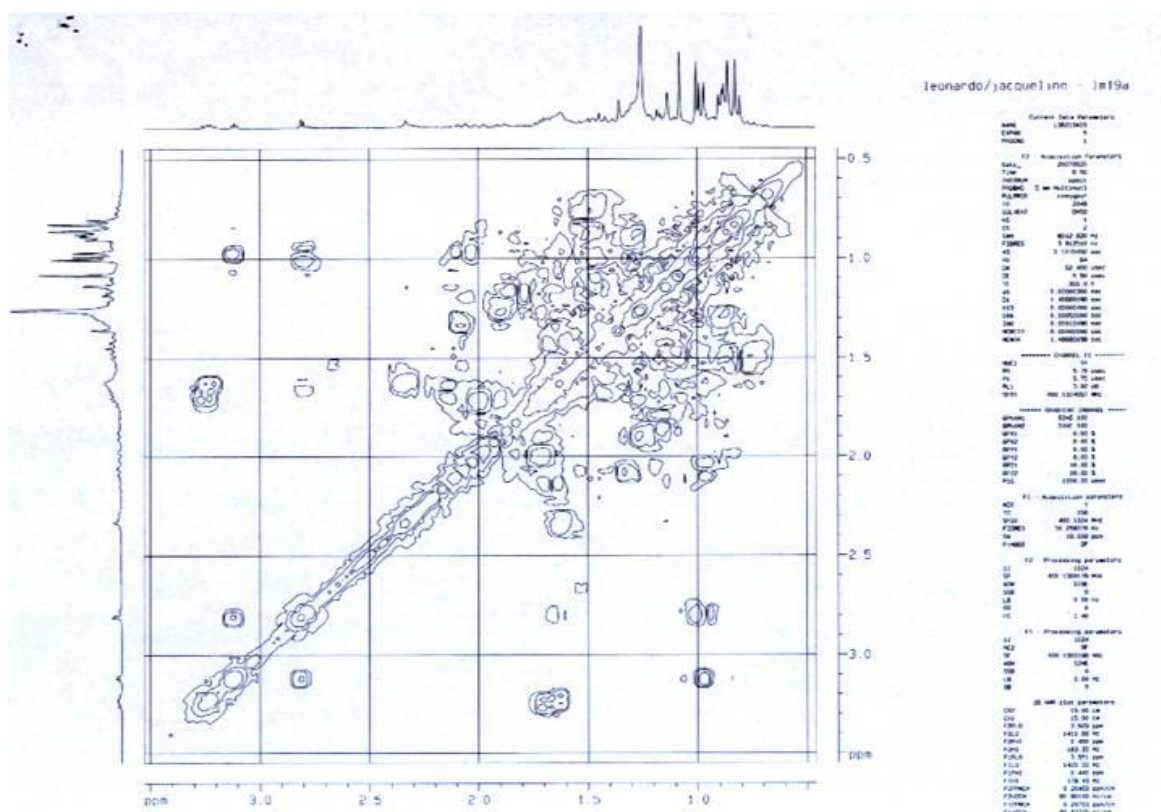


Figura 81 – Ampliação do mapa de contornos COSY de 3 β -hidroxi-olean-12-en-11-ona (**159**) e do óxido de 11 α ,12 α -taraxerol (**160**) (400 MHz, CDCl₃)

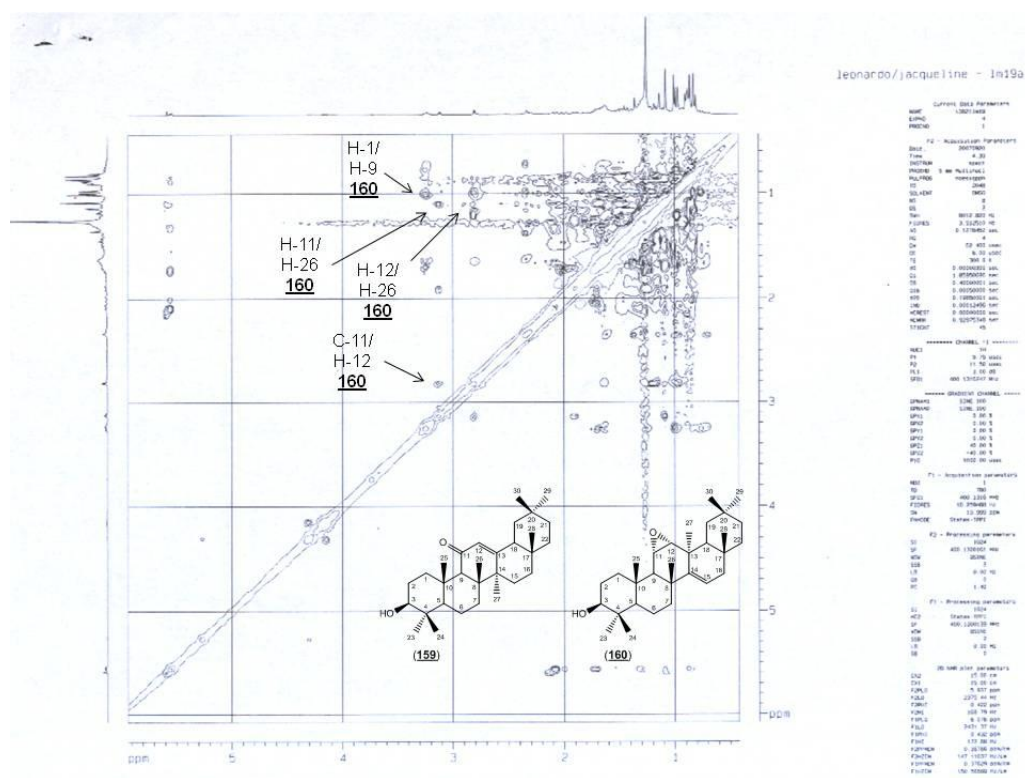


Figura 82 – Mapa de contornos NOESY de 3β-hidroxi-olean-12-en-11-ona (**159**) e do óxido de 11α,12α-taraxerol (**160**) (400 MHz, CDCl₃)

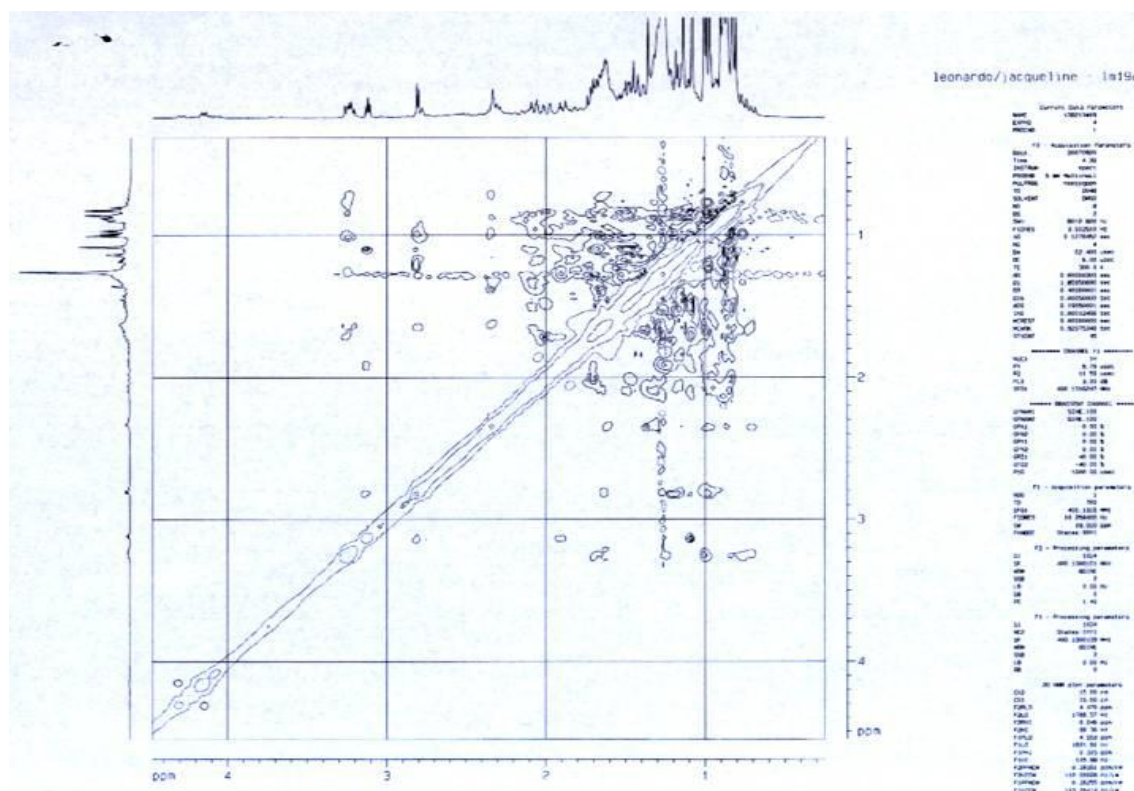


Figura 83 – Mapa de contornos NOESY de 3β-hidroxi-olean-12-en-11-ona (**159**) e do óxido de 11α,12α-taraxerol (**160**) (400 MHz, CDCl₃)

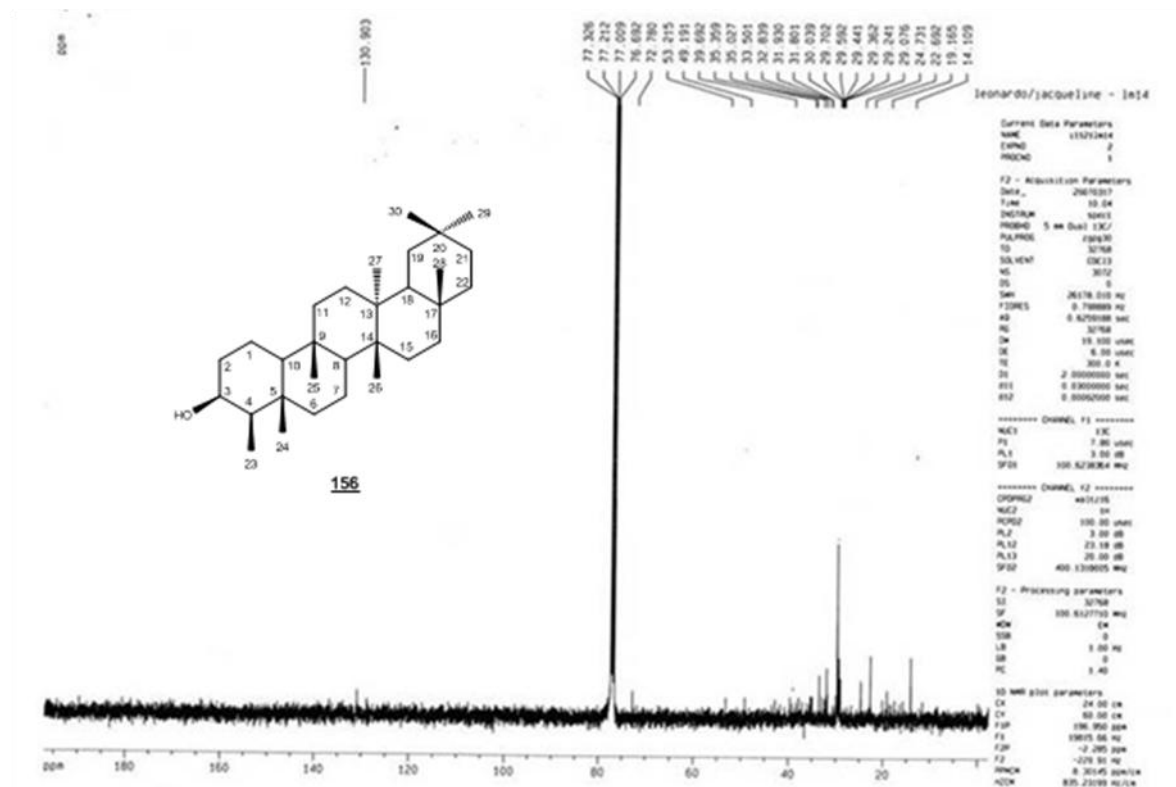


Figura 85 – Espectro de RMN de ^{13}C de 3 β -friedelinol (**156**) (100 MHz, CDCl_3)

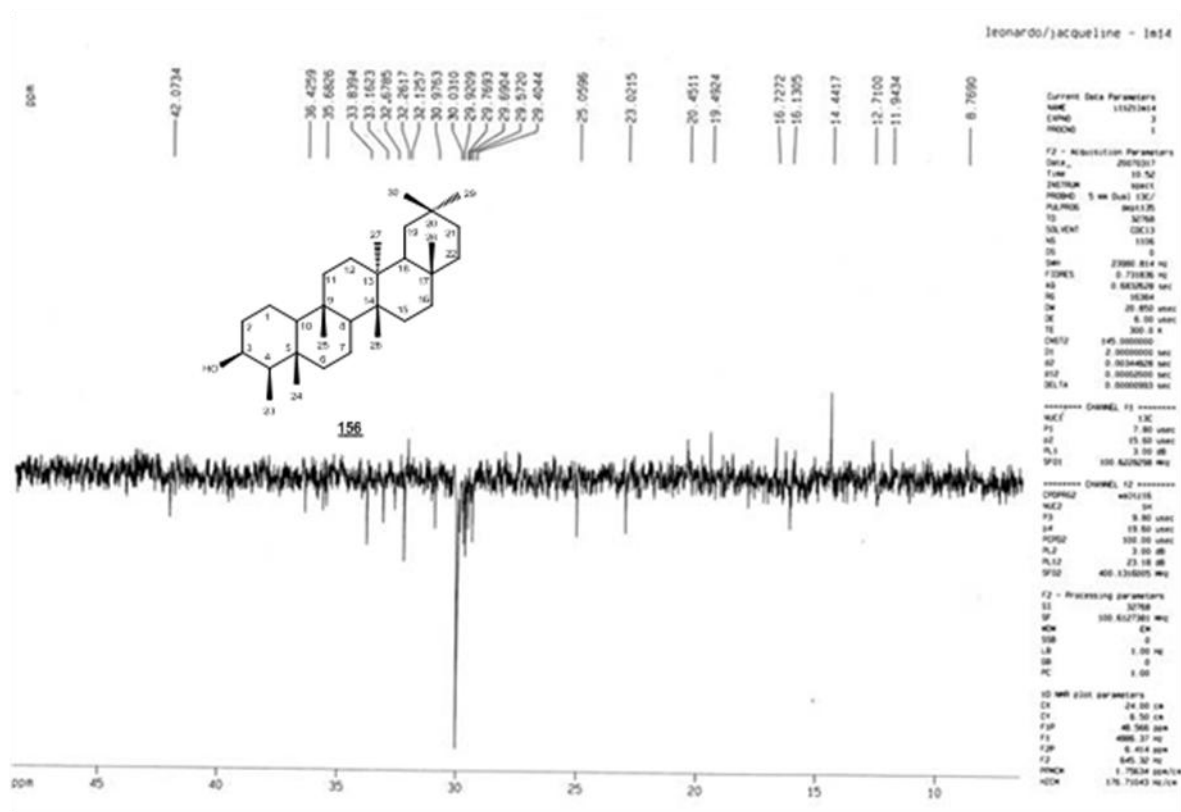


Figura 86 – Subespectro DEPT 135 de 3 β -friedelinol (**156**) (100 MHz, CDCl_3)

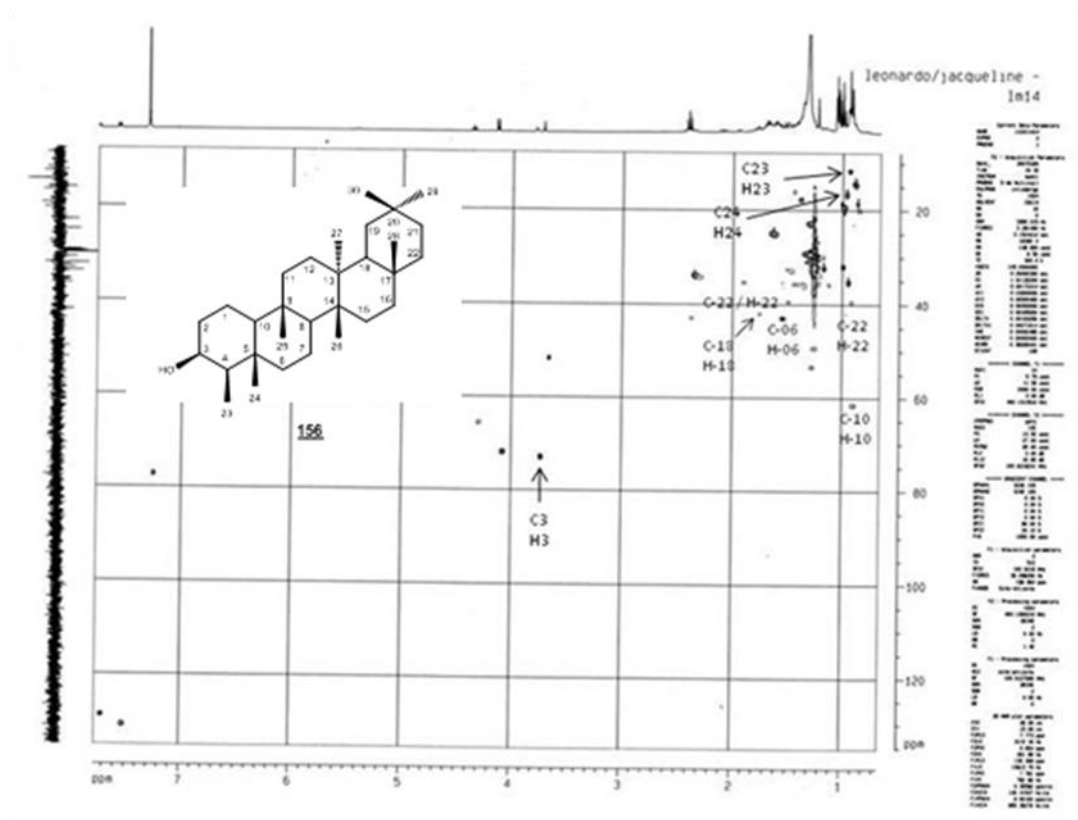


Figura 87 – Mapa de contornos HMQC de 3β-friedelinol (**156**) (400 MHz, CDCl₃)