



UNESP – Universidade Estadual Paulista.

CAMPUS ARARAQUARA.

Instituto de Química.

Programa de Pós Graduação em Química.

DISSERTAÇÃO

2008

**Bioidroxilação de substratos orgânicos utilizando o fungo
endofítico *Curvularia* sp.**

Mestrando: Daniel Dias de Souza.

Orientador:

Angela Regina Araújo.

Henrique Celso Trevisan.

Agradecimentos

- Ao professor Henrique Celso Trevisan que Deus o tenha.
- A professora Angela Regina Araújo que muito me ajudou na realização dessa etapa.
- A minha mãe que muito me incentivou e apoiou durante minha caminhada nesta até aqui.
- A Amanda Piovesan Ucci e ao João Medeiros por todo apoio e compreensão.
- Ao Aluno Rafael pelas distrações nos dias entediantes.
- Ao Nivaldo e ao Flávio que muito me ajudaram nas análises.
- Ao Instituto de Química de Araraquara por determinar prazos.



Biohidroxilação de substratos orgânicos utilizando o fungo endofítico *Curvularia* sp.

Índice:

1. Introdução.	1
1.1 – Aspectos gerais do processo de biotransformação.	1
1.2. Fungos Endofíticos.	4
1.3. O gênero <i>Curvularia</i> .	6
1.4 – Substratos xenobióticos utilizados nos ensaios de biotransformação.	9
2. Objetivos.	13
3. Metodologia.	13
3.1. Materiais e métodos	14
3.2. Preparo do meio de cultura.	14
3.3. Biotransformações.	15
3.4. Pré-purificação das substâncias obtidas da biotransformação.	15
3.5. Análise dos padrões e produtos de biotransformação.	16
3.6. Fluxograma ilustrativo da metodologia.	17
4. Resultados e discussões	18
4.1. Meio de cultivo.	18
4.2. Tempo de ensaio dos substratos.	18
4.3. Rendimento das biotransformações.	18
4.4. Métodos para análise das biotransformações.	19
4.5. Análise dos produtos da biotransformação.	20
5. Conclusão.	35
6. Anexos.	37
Referências.	67

Relação dos anexos.

ANEXO I- Resultados da análise do Controle (Branco).	36
Figura 47. Cromatograma CG/EM do controle (branco).	36
ANEXO II- Resultados da análise da biotransformação do limoneno.	37
Figura 17. Cromatograma CLAE-uv do padrão do limoneno e do produto da BTF após 5 dias.	37
Figura 18. Cromatograma CG/EM do padrão do limoneno.	38
Figura 19. Cromatograma (CG/EM) para o extrato (5 dias) de BTF do limoneno	39
Figura 20. Espectro RMN ¹ H (500 MHz, CDCl ₃) do limoneno (padrão).	40
Figura 21. Cromatograma CG/EM da fração 11 do produto de BTF do limoneno em 5 dias.	41
Figura 22. Espectro RMN- ¹ H da fração 11 do produto de BTF do limoneno em 5 dias.	42
Figura 23. Ampliação do espectro RMN- ¹ H da fração 11 do produto de BTF do limoneno em 5 dias.	43
Figura 24. Espectro bidimensional (HMQC) da fração 11 do produto de BTF do limoneno em 5 dias.	44
Figura 25. Ampliação do espectro bidimensional (HMQC) da fração 11 do produto de BTF do limoneno em 5 dias.	45
Figura 26. Espectro bidimensional (HMBC) da fração 11 do produto de BTF do limoneno em 5 dias.	46
Figura 27. Ampliação do espectro bidimensional (HMBC) da fração 11 do produto de BTF do limoneno em 5 dias.	47
ANEXO III. Resultados da análise da biotransformação do mentol.	48
Figura 28. Cromatograma CLAE-UV para o padrão do mentol e do produto da BTF após 5 dias.	48

Figura 29. Cromatograma CG/EM do padrão do mentol.	49
Figura 30. Cromatograma CG/EM do extrato do mentol (5dias)	50
Figura 31. Espectro RMN ¹ H (500 MHz, CDCl ₃) do padrão mentol.	51
Figura 32. Cromatograma CG/EM da fração 25 do produto de BTF do mentol em 5 dias.	52
Figura 33. Espectro de RMN- ¹ H da fração 25 do produto de BTF do mentol em 5 dias.	53
Figura 34. Espectro de RMN- ¹³ C da fração 25 do produto de BTF do mentol em 5 dias.	54
Figura 35. Espectro bidimensional (COSY) da fração 25 do produto de BTF do mentol em 5 dias.	55
Figura 36. Espectro bidimensional (HMQC) da fração 25 do produto de BTF do mentol em 5 dias.	56
Figura 37. Espectro bidimensional (HMBC) da fração 25 do produto de BTF do mentol em 5 dias.	57
ANEXO IV. Resultados da análise da biotransformação da cânfora.	58
Figura 38. Cromatograma CLAE-UV – do padrão e do produto de BTF com 21 dias de ensaio.	58
Figura 39. Cromatograma CG/EM do padrão da cânfora.	59
Figura 40. Cromatograma CG/EM do extrato da cânfora (21 dias).	60
Figura 41. Espectro RMN ¹ H (500 MHz, CDCl ₃) do padrão cânfora.	61
Figura 42. Cromatograma CG/EM da fração 12 do produto de BTF da cânfora em 21 dias.	62
Figura 43. Espectro de RMN- ¹ H da fração 12 do produto de BTF da cânfora 21 dias de ensaio.	63
Figura 44. Espectro de RMN- ¹³ C da fração 12 do produto de BTF da cânfora 21 dias de ensaio.	64

Figura 45. Espectro bidimensional (HMQC) da fração 12 do produto de BTF da cânfora (21 dias de ensaio). 65

Figura 46. Espectro bidimensional (HMBC) da fração 12 do produto de BTF da cânfora (21 dias de ensaio). 66

Lista de tabelas.

Tabela 1. Rendimento das biotransformações dos substratos promissores durante a segunda etapa.	19
Tabela 2. Resultados da análise do controle/branco pela técnica de CG/EM.	19
Tabela 3. Resultado da análise por CLAE do limoneno e do produto biotransformado.	21
Tabela 4. Resultados da análise por CG/EM do produto de biotransformação do limoneno (5dias).	21
Tabela 5. Dados de RMN ¹ H e 1D e 2D (500 MHz, CDCl ₃) da fração 11 do BTF do D- limoneno.	24
Tabela 6. Comparação da fragmentação de massas da fração 11 do limoneno com dados obtidos da literatura.	25
Tabela 7. Resultado da análise por CLAE do mentol e do produto biotransformado.	26
Tabela 8. Resultados da análise por CG/EM do produto de biotransformação do mentol (5dias).	27
Tabela 9. Rendimentos obtidos na fase preparativa do produto da biotransformação do mentol.	28
Tabela 10. Dados de RMN ¹ H e RMN ¹³ C (500 MHz, CDCl ₃) da substância 11.	30
Tabela11. Comparação da fragmentação de massas da fração 25 do mentol com dados obtidos da literatura.	30
Tabela 12. Resultado da análise por CLAE da cânfora e do produto biotransformado.	31
Tabela 13. Resultados da análise por CG/EM do produto de biotransformação do cânfora (21 dias)	32

Tabela 14. Massas das frações obtidas com maior rendimento na separação da BTF da cânfora.	32
---	----

Lista de Figuras.

Figura 1. Produção da testosterona utilizando microrganismos.	2
Figura 2. Biotransformação da deoxicorticosterona.	3
Figura 3. Biohidroxilação do progesterona pelo fungo <i>Rhizopus arrhizus</i> .	3
Figura 4. Biotransformação do limoneno pelo fungo <i>Fusarium verticillioides</i>	4
Figura 5. Substâncias bioativas produzidas por fungos do gênero <i>Curvularia</i> .	6
Figura 6. Biotransformações pelo fungo <i>Curvularia lunata</i> .	7
Figura 7. Substâncias produzidas pelo fungo endofílico <i>Curvularia</i> (PAJ- 04).	8
Figura 8. Biotransformação do ácido abiético pelo fungo <i>Curvularia</i> sp.	9
Figura 9. Substratos escolhidos para investigação da biohidroxilação pelo fungo <i>Curvularia</i> sp.	9
Figura 10. Biotransformação do limoneno por culturas em meio líquido de <i>Penicillium digitatum</i> e <i>Corynespora cassiicola</i> .	12
Figura 11. Biotransformação do mentol por <i>Eucalyptus perriniana</i> .	12
Figura 12. Fluxograma ilustrativo da metodologia.	17
Figura 13. Substância 10 e as principais correlações observadas em HMBC.	24
Figura 14. Rota metabólica da conversão do limoneno por fungos filamentos, descrita por Van der Werf, 2000.	25
Figura 15. Substância 11 e as principais correlações em HMBC e COSY.	29
Figura 16. Possíveis produtos monohidroxilados presentes na fração 12 da cânfora BTF..	34

Resumo

Mestrando: Daniel Dias de Souza.

Dissertação: Biotransformação de substratos orgânicos utilizando o fungo *Curvularia* sp.

A biotransformação utilizando microorganismos é uma ferramenta útil para substituir uma reação química de difícil execução, sendo possível catalisar reação e enantioselectivamente uma extensa gama de substratos xenobióticos, sobretudo na produção de compostos de interesse comercial.

Nesta pesquisa foi utilizado como agente da biotransformação o fungo do gênero *Curvularia* isolado de uma planta endêmica do cerrado brasileiro (*Ocotea corimbosa*) pelo grupo NuBBE do Instituto de Química da UNESP de Araraquara.

O ensaio foi realizado em duas etapas, na primeira foi feita uma triagem sobre alguns substratos escolhidos com o objetivo de determinar quais substratos eram promissores para a ocorrência da biotransformação e o melhor tempo de ensaio para estes substratos. Na segunda etapa da pesquisa foram selecionados a canfora, o mentol e o limoneno como substratos promissores.

Os experimentos foram realizados com o intuito de avaliar a biotransformação de forma a verificar a presença de produtos biotransformados pelo fungo. Dessa forma foi realizada, em cada ensaio, uma etapa semipreparativa, onde os produtos da biotransformação foram analisados e identificados em mistura. As análises foram realizadas por CG-EM e RMN- ^1H e RMN- ^{13}C obtendo-se sempre um padrão para comparação.

Para o ensaio com o limoneno foi verificado a presença um derivado dihidroxilado (1,2 limoneno diol) atestando a capacidade do fungo em bioidroxilar substratos exógenos.

Para o mentol foi isolado e identificado um metabolito secundário inédito na literatura, que não havia sido isolado em trabalhos posteriores utilizando o fungo *Curvularia* sp.

Para a cânfora foi possível constatar, em mistura, a presença de derivados monohidroxilados do substrato de partida.

Esse foi o primeiro trabalho de biotransformação utilizando fungos isolados de uma planta endêmica do cerrado brasileiro, onde constatou-se a capacidade do fungo em bioidroxilar substratos orgânicos seja em insaturações (no caso do limoneno), seja em metilas livres de baixa reatividade (no caso da canfora e do ácido abiético no teste preliminar), sendo esta última necessário um tempo de ensaio maior.

Abstract

The biotransformation using microorganisms is a useful tool to substitute a chemical reaction of difficult execution, being been possible enantioselectiv to catalyze regal and an extensive xenobiotic substratum gamma, over all in the composite production of commercial interest. In this research fungi of isolated the *Curvularia* sort of an endemic plant of the Brazilian open pasture (*Ocootea corimbosa*) for the NuBBE group of the Institute of Chemistry of the UNESP of Araraquara was used as agent of the biotransformation. The assay was carried through in two stages, in the first one a selection on some substrata chosen with the objective was made to determine which substratct was promising for the occurrence of the biotransformation and optimum time of assay for these substract. In the second stage of the research they had been selected the camphor, menthol and the limonene as promising substract. The experiments had been carried through with intention to evaluate the biotransformaçã of form to verify the presence of products biotransformad for fungi. Of this form it was carried through, in each assay, a semipreparativ stage, where the products of the biotransformation had been analyzed and identified in mixture. The analyses had been carried through by CG-EM and RMN-H¹ and RMN-C¹³ getting itself always a standard for comparison. For the assay with the limonene one derivative was verified the dihydroxilation presence (1,2 limoneno diol) certifying the capacity of fungi in to biohydroxilation exogen substract. For menthol isolated and an unknown secondary metabolit in the literature was identified, that had not been isolated in posterior works using fungi *Curvularia* sp. For the camphor it was possible to evidence, in mixture, the presence of monohydroxilations derivatives of the departure substratum. This was the first work of biotransformation using fungis isolated of an endemic plant of the Brazilian open pasture, where it was constactation capacity of fungi in to biohydroxilation organic substract either in insaturations (in the case of the limonene), either in metil free of low reactivity (in the case of the camphor and the abiétic acid in the preliminary test), being this it finishes necessary a time of bigger assay.

Biohidroxilação de substratos orgânicos utilizando o fungo endofítico *Curvularia* sp.

1. Introdução.

1.1 – Aspectos gerais do processo de biotransformação.

Biotransformações são conversões químicas catalisadas por enzimas sobre substratos não naturais (SHAW ET AL., 2003), uma ferramenta importante na síntese orgânica, especialmente na obtenção de moléculas quirais por sínteses assimétricas ou resolução de racematos.

O procedimento mais comumente utilizado é feito através de células totais de microrganismos cultivados em meios apropriados, onde toda a maquinaria enzimática está disponível, o que pode gerar uma mistura de produtos biotransformados. As preparações enzimáticas incluem extratos enzimáticos de microrganismos, plantas, protozoários, insetos, entre outros. Pode-se ainda utilizar enzimas puras, isoladas de diferentes fontes, muitas delas disponíveis comercialmente. No entanto, essas últimas são bastante onerosas, uma vez que além da enzima, é necessário o uso de um ou mais cofatores para que a mesma seja ativa (FABER, 1997).

As biotransformações utilizando o metabolismo de microrganismos podem promover uma reação química, ou seja, modificar um princípio ativo (em geral compostos orgânicos) ou qualquer outra substância exógena. Um dos objetivos da biotransformação é substituir uma reação química convencional, geralmente de difícil execução, por uma via biológica de baixo custo e de fácil execução. As tecnologias envolvendo biotransformações com microrganismos avançam de forma acelerada, com ações cada vez mais específicas, que em geral as reações químicas não trazem por causa de sua baixa seletividade, portanto são úteis na catálise de centros de carbono não ativados, sendo capazes de catalizar régio e estereoseletivamente biotransformações em uma extensa gama de produtos orgânicos hidrofóbicos, naturais ou sintéticos (LEHMAN & STEWART, 2001). Dessa forma, apresenta algumas vantagens frente às reações químicas clássicas (CURRENT ORGANIC CHEMISTRY, 2001). É de fácil execução em condições moderadas [temperatura (37°C), pressão (1 atm) e pH (7,0)],

pode ser realizada na maioria dos laboratórios de química orgânica com equipamentos relativamente simples portanto, são métodos de baixo custo, além de ser considerada como química verde devido ao baixo impacto ambiental, uma vez que os microrganismos utilizados são renováveis, de fácil remoção e os produtos de extração facilmente recuperados (BILLS, 1995).

Historicamente as biotransformações têm sido investigadas desde os tempos de Pasteur e foram impulsionadas por grandes químicos e bioquímicos do século XIX. É interessante observar que, nessa época, era comum um mesmo cientista pesquisar temas inerentes à química e a bioquímica sem nenhuma distinção. Um exemplo dessa afirmação é a lista de processos catalíticos feita por Berzelius em 1838 (ROBERTS et al., 1995). Essas duas áreas da ciência percorreram junto um longo caminho e em algum momento no início do século XX elas se tornaram independentes. Hoje, após quase um século, os cientistas tomaram consciência de que existe na interface destas ciências, um mundo a ser ainda descoberto (MARSAIOLI et al., 2002).

O progresso no uso de enzimas e células integrais na Química Orgânica Sintética foi relativamente lento até os anos 50, quando o uso de microrganismos para modificar núcleos esteroidais foi estudado em laboratórios industriais e acadêmicos (HOLLAND, 1992).

Os estudos com esteróides podem ser referidos como marco histórico nessa área. Em 1937, Mamoli & Vercellone prepararam a testosterona a partir da deidroepiandrosterona, utilizando microrganismos (Figura 1). Este trabalho foi de grande importância, pois viabilizou o desenvolvimento da produção dos hormônios sintéticos (STOUDT, 1960).

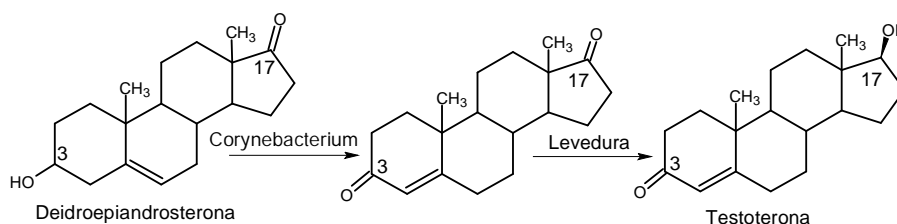


Figura 1. Biotransformação do progesterona utilizando microrganismos.

A biohidroxilação de substratos específicos tornou-se uma poderosa ferramenta para a fabricação de produtos de importância industrial, como os fármacos, destacando os estudos com esteróides a partir da década de 40. As transformações microbianas

tornaram-se muito importante e passaram a ter grande aplicação no desenvolvimento de drogas e intermediários na indústria farmacêutica (ZHI LI et al, 2003).

O mais notável trabalho desenvolvido foi o da produção da corticosterona, um derivado da cortisona (HENCH et al, 1949). O derivado foi produzido através da ação de microrganismos na deoxicorticosterona. Com a transformação microbiana foi possível funcionalizar o C-11 de forma muito mais simples que a proposta por síntese química (Figura 2). A corticosterona possui ação antiinflamatória e por isso esta metodologia teve aplicação industrial tanto pela Merck (1949), quanto pela Schering (1951) (CHARNEY & HERZOG, 1967).

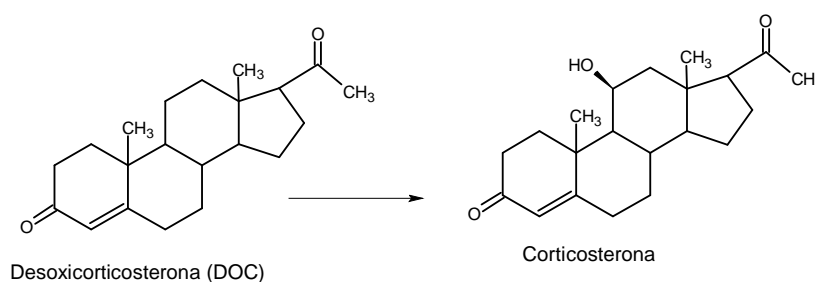


Figura 2. Biotransformação da deoxicorticosterona.

De forma semelhante em 1952, Peterson & Murray realizaram a biohidroxilação do grupo metileno do progesterona, realizando a bioconversão para 11- α -hidroxiprogesteronona pelo fungo **Rhizopus arrhizus** (Figura 3).

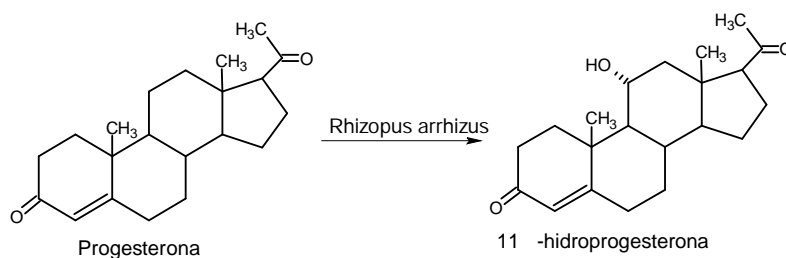


Figura 3. Biohidroxilação do progesterona pelo fungo **Rhizopus arrhizus**.

A biotransformação não se restringe apenas à produção de fármacos, tendo uma aplicação ampla tanto na área de cosméticos como alimentícia. Um exemplo dessa tecnologia é a estereificação de óleos e gorduras através de enzimas extraídas de microrganismos (lípsases) ou através da biotransformação utilizando células vivas de fungos. Industrialmente, a esterificação por lipase foi comercializada pela Unichema International para produção de ésteres de ácidos graxos de alto grau de pureza e

qualidade, como o isopropilmiristato, isopropilpalmitato e 2-etilexilpalmitato, que são ingredientes empregados na formulação de cremes, cosméticos e outros produtos de higiene. A empresa Amano, no Japão, selecionou uma lipase de **Penicillium cyclopium** para produção de emulsificantes, possuindo alta capacidade de síntese, produzindo 95% de monoglicerídeos sob condições de excesso de glicerol (1:15) durante 100 h numa temperatura de 40 °C (HEIZIR, et al, 2004).

A biotransformação utilizando células vivas de microrganismos tem sido utilizada na indústria e em estações de tratamento de esgotos como alternativa aos processos químicos de tratamento de efluentes. A tecnologia é simples e consiste na adição de bactérias específicas no efluente que, em condições adequadas, descontaminam, adsorvendo ou transformando os resíduos poluentes em produtos não tóxicos.

Outro exemplo de biotransformação envolvendo microrganismos está na indústria alimentícia. A indústria transforma material extraído do bagaço de frutas cítricas, o limoneno, em aromas de altos valores agregados, convertidos por microrganismos. O limoneno, principal componente do óleo da casca da laranja e limão, foi usado como substrato para a biotransformação pelo fungo **Fusarium verticillioides** (BRÁS & STRAPASSON, 2000), (Figura 4). Um derivado hidroxilado do limoneno foi isolado do caldo de cultura e caracterizado através de métodos espectrométricos como álcool perílico, uma substância que possui aplicações farmacêuticas.

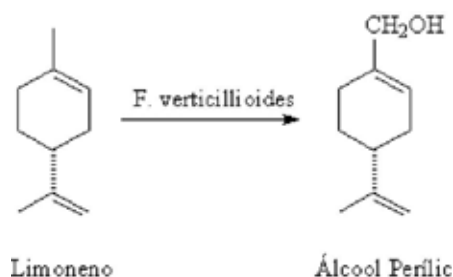


Figura 4. Biotransformação do limoneno pelo fungo **Fusarium verticillioides**

1.2. Fungos Endofíticos.

Fungos endofíticos são microrganismos que habitam o interior de plantas, sendo encontrados em órgãos e tecidos vegetais como as folhas, ramos e raízes. Podem habitar a planta por toda a vida sendo transmitidos, em alguns casos, para futuras gerações através da semente do hospedeiro (MELO & AZEVEDO, 1998). Alguns

destes fungos invadem e induzem efeitos severos e imediatos ao crescimento do hospedeiro. Outros são capazes de invadir, tomar conta ou neutralizar a defesa e persistir por anos, freqüentemente sem causar dano ao hospedeiro. Isto não exclui a possibilidade de se tornarem patogênicos quando o hospedeiro é estressado (ANDREWS & HIRANO, 1991; MELO & AZEVEDO, 1998). Assim, a natureza da associação entre fungos endofíticos e seus hospedeiros é diversa e varia de parasitismo a neutro ou simbiótico (CARROLL, 1988).

Qualquer espécie de planta vascular pode hospedar entre 10 e 100 diferentes espécies de fungos endofíticos, sendo que 2 a 5 podem ser específicos ao hospedeiro (são chamados de espécies dominantes) (GULLO, 1994).

Uma das propriedades mais importantes dos fungos é a sua capacidade metabólica de produzir grande variedade de moléculas bioativas. Os fungos são conhecidos pela produção de substâncias altamente tóxicas para mamíferos, conhecidas como micotoxinas, algumas consideradas carcinogênicas potentes. Tais substâncias incluem aflatoxinas, ocratoxinas, citreoviridinas, tricotecenos e fumonisinas, além de uma variedade de derivados indólicos tremorgênicos (MILLER & TRENHOLM, 1994). Por outro lado, fármacos importantes de uso clínico em várias patologias foram obtidos de fungos (MASUREKAR, 1992). Esta dicotomia de funções pode ser proveniente da grande diversidade química que os fungos produzem.

Os fungos constituem o segundo maior grupo de espécies sobre a terra, perdendo apenas para os insetos. Estimativas sugerem que há aproximadamente 1,5 milhões de espécies diferentes de fungos, sendo que menos de 5% foram descritas (HAWKSWORTH, 2001). Assim, tem-se constatado nos últimos anos uma urgente necessidade em se estudar a química dos fungos, temendo-se a perda da biodiversidade (BALANDRIN et al., 1993). Muitas espécies de plantas superiores e insetos ameaçados de extinção estão associados com a flora específica dos fungos e, se estas perdas ocorrerem, poderão resultar no desaparecimento de espécies de fungos.

A busca de princípios bioativos em certos nichos de fungos vem sendo realizada pelas indústrias farmacêuticas de maneira randômica e aleatória (BILLS, 1995; MILLER, 2001). Entretanto, considerando-se que a produção de substâncias biologicamente ativas está associada ao seu habitat, a ecologia de fungos pode ser usada como um meio racional e útil para a busca de princípios bioativos. Dentre os medicamentos de maior repercussão terapêutica para doenças infecciosas destacam-se os antibióticos lactâmicos das classes de penicilina e cefalosporina, como os exemplos

mais conhecidos de produtos de fungos. Estes antibióticos ainda são os mais usados no mundo, devido à suas eficácias e as bem estabelecidas produções em larga escala. Recentemente, muitas substâncias com outras atividades farmacológicas foram produzidas a partir de metabólitos de fungos. Numerosos metabólitos de fungos vêm sendo descobertos como fármacos potenciais, incluindo aspercilina (com ação em doenças gastrointestinais) e papulacandinas (antifúngico), entre outros (MASUREKAR, 1992).

Entre os fungos endofíticos isolados podem-se destacar, pela importância neste projeto, os fungos do gênero *Curvularia*.

1.3. O gênero *Curvularia*.

O gênero *Curvularia* está classificado dentro da família Pleosporaceae, na classe dos Ascomycotas, sendo um fungo filamentosos. Caracterizados como fungos endofíticos, podem ser encontrados como patógenos de plantas e seres humanos (micoses, sinusites alérgicas e outros). Estudos do metabolismo destes fungos mostram uma extensa gama de subprodutos obtidos por isolamento. Antraquinonas e benzofenonas, compostos fenólicos e lactonas, são alguns exemplos de produtos obtidos do metabolismo secundário destes fungos (Figura 5). Dentre esses compostos alguns apresentam atividades biológicas, como por exemplo, a curvularia (antimicrobiana) e o ácido curvúlico (ativos contra bactérias gram-positiva e gram-negativa).

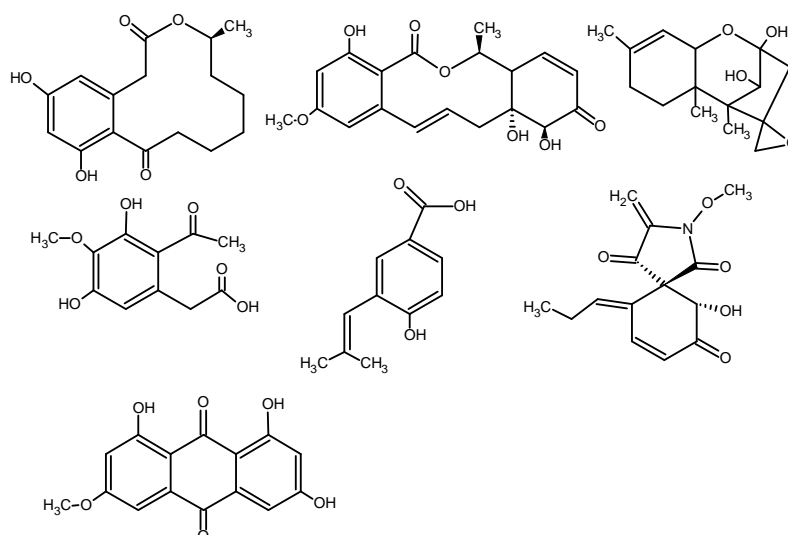


Figura 5. Substâncias bioativas produzidas por fungos do gênero *Curvularia*.

As principais espécies isoladas do gênero são: *Curvularia brachyspora*, *Curvularia clavata*, *Curvularia geniculata*, *Curvularia lunata*, *Curvularia pallescens*, *Curvularia senegalensis*, e *Curvularia verruculosa*. *Curvularia lunata* é a causa prevalente de doenças em humanos e animais (FERNANDEZ et al, 1999).

O fungo **Curvularia** produz colônias que crescem rapidamente em ágar, dextrose e batata a 25°C. A cor da colônia é branca a cinzento e adquire coloração marrom de azeitona ou preto quando amadurece (ST-GERMAIN & SUMMERBELL, 1996; HOOG et al, 2000).

Pesquisas recentes mostram que algumas espécies do gênero **Curvularia** são capazes de realizar o processo de biotransformação em substratos xenobióticos. Como exemplo pode-se citar o estudo da biorredução seletiva de duas cetonas monoterpênicas por **Curvularia lunata**. Esse microrganismo foi capaz de reduzir as cetonas (figura 6) nos respectivos álcoois (E) e (Z). Uma seletividade π -facial nas bio-reduções foi observada (ARRUDA et al, 2005).

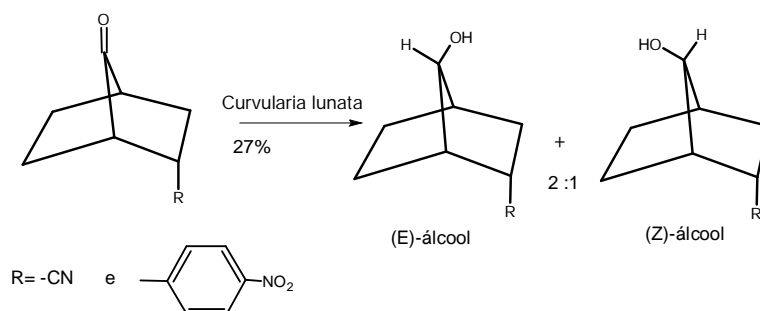


Figura 6. Biotransformações pelo fungo **Curvularia lunata**.

Estes resultados são animadores, revelando uma perspectiva favorável para o estudo da biotransformação envolvendo o gênero **Curvularia**.

O fungo utilizado neste trabalho foi isolado pelo Dr. Geraldo Humberto Silva no Departamento de Química Orgânica do Instituto de Química da Unesp de Araraquara, com o objetivo de explorar o potencial da biodiversidade brasileira sobretudo metabólitos de fungos endofíticos.

A cepa fúngica foi obtida de folhas saudáveis de **Ocootea corimbosa**, uma planta nativa do cerrado brasileiro conhecida como canela-preta, uma espécie rústica, adaptada a áreas abertas de terrenos arenosos e presta-se para o plantio em áreas degradadas. A identificação foi realizada pelo Prof. Dr. Ludwig H. Pflaming da Universidade Federal

de Lavras e encontra-se preservado sob o código MCMY-1314 sendo rotulado como PAJ-04.

O interesse em investigar o comportamento de fungos endofíticos de plantas, surge como complementação da pesquisa com metabólitos secundários de plantas nativas brasileiras. Suspeita-se que alguns metabólitos encontrados no metabolismo secundário da planta podem na verdade ser produtos ou derivados da biotransformação do próprio fungo. Portanto é primordial o entendimento do metabolismo secundário dos fungos endofíticos das plantas estudadas. O objetivo é comparar os metabólitos encontrados na planta com os metabólitos encontrados no fungo elucidando suas procedências, assim como investigar o comportamento do fungo sobre substratos xenobióticos similares aos produtos produzidos no metabolismo secundário da planta hospedeira.

Estudos químicos e biológicos realizados com o fungo endofítico *Curvularia* sp. conduziram ao isolamento de substância inéditas e bioativas (TELES, 2005) (Figura 7).

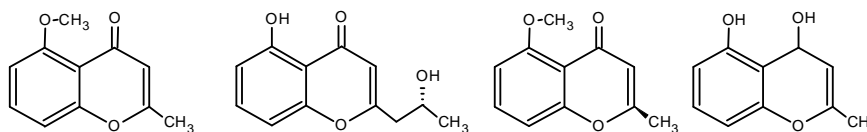


Figura 7. Substâncias produzidas pelo fungo endofílico *Curvularia* (PAJ- 04).

Estes resultados evidenciaram que *Curvularia* sp apresenta um potencial para produzir metabólitos hidroxilados. Esse fato associado ao isolamento de metabólitos secundários hidroxilados na planta hospedeira sugeriu que o fungo fosse capaz de realizar a biohidroxilações em substratos xenobióticos.

Em um teste preliminar de biotransformação do ácido abiético, por *Curvularia*, sp. realizado pelo Prof. Dr. Henrique Celso Trevisan, do Departamento de Tecnologia do Instituto de Química da Unesp de Araraquara, foi observado a biohidroxilação da metila da cadeia isopropílica em 30 dias de ensaio (Figura 8). Este fato despertou-nos o interesse na utilização de *Curvularia* sp. em processos de biotransformação em substratos xenobióticos.

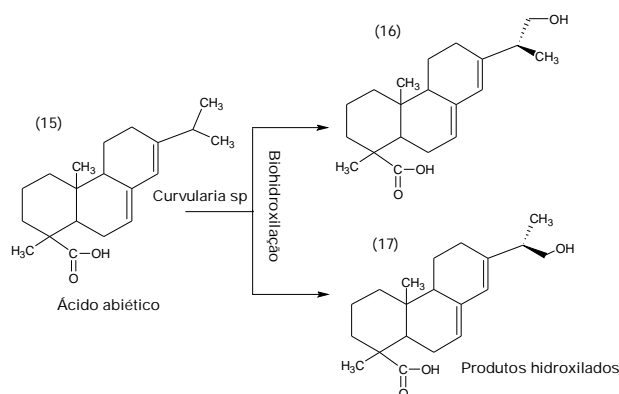


Figura 8. Biotransformação do ácido abiético pelo fungo *Curvularia* sp.

1.4 – Substratos xenobióticos utilizados nos ensaios de biotransformação.

Os substratos xenobióticos (figura 9) foram selecionados com base na similaridade do esqueleto de carbono dos metabólitos isolados da cepa fúngica de *Curvularia* sp. e da planta nativa e também devido ao interesse em estudar processos de biotransformação em compostos terpênicos, uma vez que os óleos essenciais são produzidos por plantas na qual fungos estão associados .

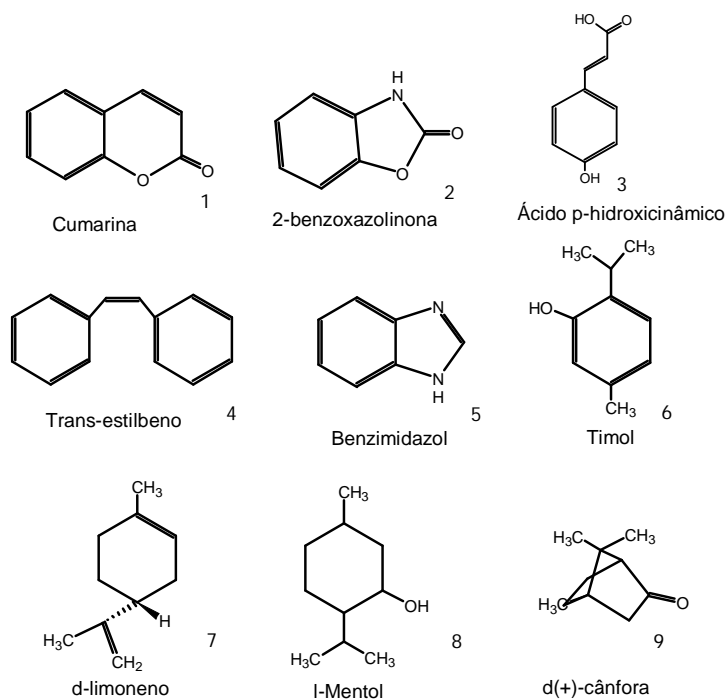


Figura 9. Substratos escolhidos para investigação da bihidroxilação pelo fungo *Curvularia* sp.

Alguns desses substratos xenobióticos tais como: cumarina (1), benzoxazolinona (2), estilbeno (4) e o benzimidazol (5), possuem um anel aromático condensado, são cadeias policíclicas semelhantes às encontradas nos metabólitos secundários do fungo. No entanto existe o interesse econômico no estudo de biotransformação utilizando óleos essenciais tais como a cânfora, mentol e limoneno.

Os óleos essenciais são produtos naturais de alto valor agregado precursores de processos industriais nos setores de aromas, fragrâncias, cosméticos e farmacêuticos.

A maioria dos compostos de aroma usados no mundo utiliza processos químicos para sua obtenção. Entretanto, observa-se uma nova tendência em países desenvolvidos, como a Alemanha, onde 70% de todos os compostos de aroma utilizados em alimentos são 'naturais' (DEMYTTENAERE et al, 2001). Diferentemente dos processos químicos, que requerem temperaturas e pressões extremas, as conversões microbianas ocorrem sob condições brandas e, em alguns exemplos, os produtos são formados estereosseletivamente (CHATTERJEE & BHATTACHARYYA, 2001). Como a maioria dos terpenos e terpenóides possuem enantiômeros com atividades biológicas distintas, a biotransformação permite a sua produção de forma régio e enantioselectiva. Um estudo patentário mostra o crescimento do número de patentes na área farmacêutica e cosmética onde óleos essenciais e derivados são utilizados, entre elas 8,37% em áreas onde a tecnologia de biotransformação é aplicada (SILVA et al, 2006).

Limoneno (7).

O Limoneno (IUPAC: 1-metil-4-isopropenilciclohex-1-eno) é uma substância química, orgânica, natural, pertencente a família dos terpenos, classe dos monoterpenos, de fórmula molecular $C_{10}H_{16}$, encontrado em frutas cítricas (casca principalmente de limões e laranjas), volátil, por isso responsável pelo cheiro que essas frutas apresentam.

Estudos de biotransformação por fungos utilizando como substrato o limoneno para a produção de terpenos têm sido realizados por diversos pesquisadores (DEMYTTENAERE et al, 2001). O interesse no limoneno provém do fato de que uma extensa gama de compostos com importância medicinal e comercial possui o mesmo esqueleto de carbono desse substrato. Além do álcool perílico pode-se citar o carveol, a carvona e o α -terpineol, utilizado em fragrâncias.

A introdução regiospecífica de grupos hidroxilas no limoneno via reações químicas se torna difícil devido às propriedades eletrônicas do grupo metileno (posições

1,2 e 8,9) e metil (7 e 10). Por essa razão as reações químicas clássicas produzem uma mistura de produtos o que não é interessante sinteticamente.

O fungo **Penicillium digitatum** isolado da casca da laranja (MUKHERJEE et al ,1973) mostrou a capacidade de converter o limoneno em **trans**-limoneno-1,2-diol. Fungos endógenos isolados da raiz de laranjeiras também possuem a capacidade de converter o limoneno para α -terpineol (MATTISON et al, 1971).

A conversão do d-limoneno pelo fungo **P. digitatum** foi examinada com detalhes por Tan & Day, 1998. Os autores mostram a conversão do limoneno em α -terpineol sendo iniciada pela monooxigenase P-450 (epoxidação da dupla 8,9) e subsequente clivagem redutiva do epóxido para formar o α -terpineol. A enzima P-450 monooxigenase está presente em uma extensa gama de seres vivos, sobretudo nos microrganismos. Essa enzima possui a capacidade de catalisar região e estereoespecificamente biohidroxilações em substratos orgânicos, principalmente terpenos. Draczynska (1987) verificou que o fungo **Armillareira melleae** biotransforma o d-Limoneno em α -terpineol e limoneno-1,2-diol, enquanto que pelo **Corynerpora cassicola** apresenta melhores resultados por realizar biotransformação seletiva, produzindo quase que exclusivamente, limoneno-1,2-diol (DEMYTTENAERE ET AL, 2001).

A seletividade dos fungos durante o biotransformação é o verdadeiro interesse nesses estudos. A Figura 10 ilustra esse fato mostrando os principais produtos obtidos da biotransformação utilizando os fungos **Corynespora cassicola** e **Penicillium digitatum** (DEMYTTENAERE et AL, 2001). É possível notar a alta seletividade desses fungos durante a biohidroxilação com rendimentos próximos a 50%. No primeiro caso o fungo realizou a **trans**-diidroxilação da dupla do anel nas posições 1 e 6 com 48,6% de rendimento, enquanto no segundo caso houve a hidroxilação da dupla da posição 8 em 67,2 %.

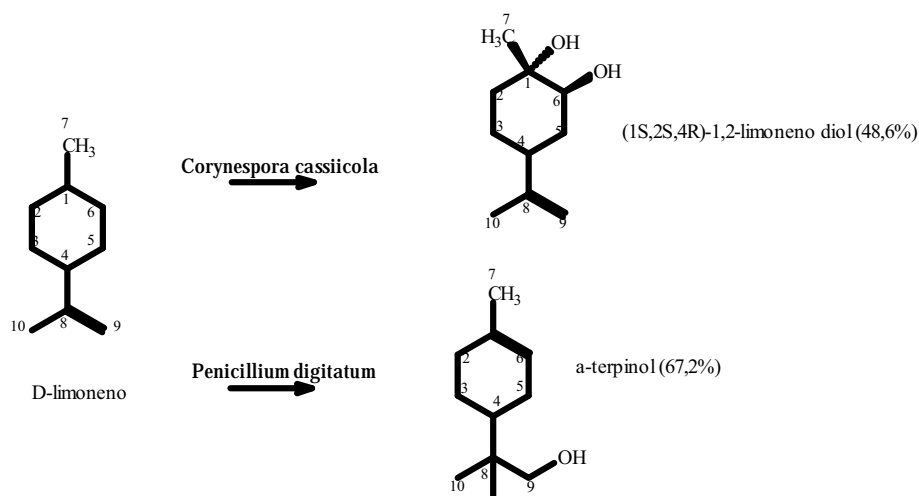


Figura 10. Biotransformação do d-limoneno por culturas em meio líquido de *Penicillium digitatum* e *Corynespora cassiicola*.

Mentol (8).

O Mentol é composto orgânico de fórmula molecular $C_{10}H_{20}O$, produzido sinteticamente ou obtido através da extração natural do óleo da menta (*Mentha arvensis*). Possui atividades anestésicas e é usado para aliviar irritação da garganta e dores musculares. O mentol também é utilizado como aromas na área de alimentos, na área de cosméticos e em produtos de higiene mostrando-se um produto comercial de relativa importância.

Em experimentos realizados com o mentol (FURUYA et al, 1989), com cultura de *Eucalyptus perriniana* foi observado a biohidroxilação do substrato em pontos específicos da molécula (Figura 11).

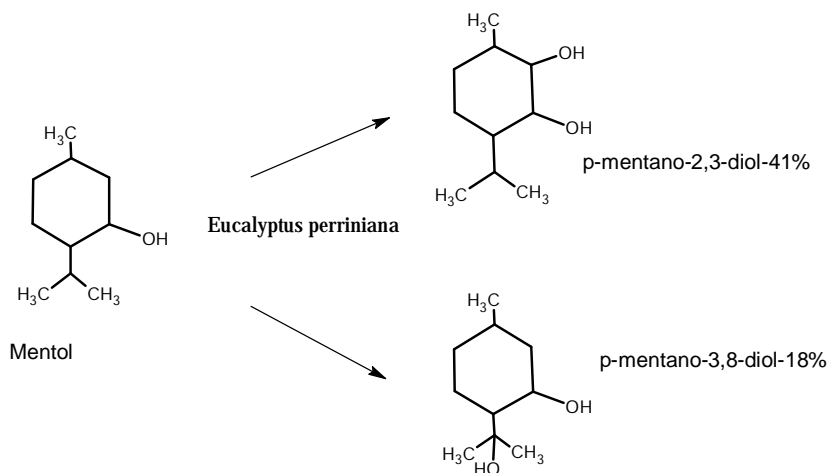


Figura 11. Biotransformação do mentol por *Eucalyptus perriniana*.

Em 2002, foi realizado um estudo da biotransformação do mentol utilizando fungos patógenos **Rhizoctonia solani** (MIYAZAWA et al, 2002). O produto de maior rendimento obtido foi o (-)-(1S,3R,4S,6S)-6-hidroximentol indicando que o l-mentol sofreu uma biohidroxilação seletiva.

Cânfora (9).

A cânfora é um produto de largo emprego industrial e medicinal, pode ser extraído de plantas e também obtido por via sintética. Sua fórmula molecular é $C_{10}H_{16}O$, tendo três grupos metilenos (posição 8,9 e 10) cuja modificação via reação química é de difícil execução devido à baixa reatividade desses grupos.

Ensaio de biotransformação com a cânfora (MITSUO et al, 2004) utilizando bactérias de intestino de larvas (**Spodoptera litura**) mostrou que o produto foi biotransformado em (1R,7R)-(+)-8-hidroxicanfora com alto grau de rendimento, foi possível constatar a introdução regioespecífica do grupo hidroxila em um carbono não ativado.

2. Objetivos.

- Avaliar o potencial do fungo endofítico **Curvularia** sp. como catalisador de biohidroxilações em substratos xenobióticos;
- Otimizar o tempo de incubação para as biotransformações dos diferentes substratos;
- Identificar, em mistura, os produtos obtidos no processo de biotransformação;
- Avaliar a seletividade das biohidroxilações catalisadas por **Curvularia** sp.

3. Metodologia.

Para melhor entendimento deste trabalho, estaremos especificando alguns dos termos utilizados:

Branco e/ou controle: extrato bruto obtido do meio fermentativo líquido em CDB de **Curvularia** sp.;

Substrato e/ou reagentes: material de partida a ser submetido ao processo de biotransformação, no caso timol, mentol, cânfora, limoneno, cumarina, estilbeno, ácido **trans**-hidroxicinâmico, benzimidazol e benzoxazolina.

3.1. Materiais e métodos

Equipamentos:

- Capela de fluxo laminar.
- Evaporador rotatório sobre pressão reduzida da Buchi.
- Balança analítica (Explorer Ohaus Corporation, d=0,1mg Tem. 10°C/40°C).
- Mesa agitadora com termostato (New Brunswick Scientific Edison, N.J, USA)
- CLAE-UV: Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, Varian Pro Star com detector UV-Vis, coluna analítica Phenomenex (luna 5µ Phenil-Hexil) com suporte C-18 (250 x 4,60 mm, 5 um) e coluna semi-preparativa Silica gel Aldrich.
- CG-MS: Cromatografia Gasosa acoplada com Espectrometria de Massas foram realizadas em um cromatógrafo da Varian CP-3800, Varian Saturn 2000 GC/MS).
- RMN-¹H e ¹³C: Ressonância Magnética Nuclear de ¹H e ¹³C e técnicas em duas dimensões (homo e heteronuclear), solvente CDCl₃, foram registrados no espectrômetro Bruker AC-200-F e Varian AS-500-OXFORD operando a 200 e 500 MHz para o núcleo de ¹H e 125 MHz para o núcleo de ¹³C, sendo utilizado TMS ou o CDCl₃ como referência interna.

3.2. Preparo do meio de cultura.

Meio sólido: Preparo utilizando meio BDA (batata-dextrose-ágar) Difco na concentração de 39 g/L. O meio foi solubilizado em água quente e a seguir foi colocado em placas de Petri esterilizadas, deixadas em repouso por aproximadamente 15 min., até resfriamento e solidificação.

Meio líquido: O meio líquido foi preparado utilizando CBD (caldo de batata e dextrose) da Difco e água destilada na concentração de 24g/L.

Inoculação das placas com o fungo endofítico *Curvularia* sp.: Para crescimento do fungo *Curvularia* sp., as placas contendo o meio sólido BDA foram inoculadas com esporos do fungo e colocadas em estufa a temperatura de 25°C por uma semana.

3.3. Biotransformações.

Triagem.

Foi realizada uma triagem das biotransformações utilizando os nove substratos selecionados. Os ensaios com cada substrato foram realizados em três períodos diferentes (uma duas e três semanas respectivamente) com o intuito de determinar quais substratos eram promissores e qual melhor tempo de ensaio para cada substrato.

Para os substratos: Estilbeno, Cumarina, Ácido Hidroxicinâmico, Benzoxazolinona e benzimidazol a biotransformação não ocorreu, enquanto que o timol mostrou-se tóxico ao fungo inibindo seu crescimento e desenvolvimento.

Os substratos que apresentaram resultados nas biotransformações foram o limoneno, mentol e cânfora.

Biotransformação.

Os substratos selecionados no processo de triagem: limoneno, mentol e cânfora foram submetidos a um novo processo de biotransformação, utilizando-se frascos de Erlenmeyer de 500 mL. Em cada frasco o fungo endofítico *Curvularia* sp. foi inoculado em 150 mL de meio líquido CDB que foi mantido sob agitação constante a uma temperatura de 25°C por uma semana. A seguir, 150 mg do substrato foram adicionados ao meio, que ficou sob agitação constante a 150 rpm e temperatura de 25°C por uma semana. O período de ensaio foi estabelecido em 5 dias para o limoneno e mentol e três semanas para a cânfora.

Após o período de incubação, o meio da biotransformação foi filtrado à vácuo para separação do caldo do micélio. O caldo foi extraído com 50 mL de AcOEt, por três vezes, incluindo a lavagem do micélio, totalizando 150 mL de extrato orgânico. O solvente foi evaporado e a seguir o bruto reacional colocado em secadores com sílica para eliminação total do solvente e água remanescente. O conteúdo (extrato bruto) seco foi pesado.

3.4. Pré-purificação das substâncias obtidas da biotransformação.

Para uma pré purificação e identificação dos produtos no extrato, 100 mg de cada extrato seco oriundos da biotransformação do limoneno (7), mentol (8) e cânfora (9) foram dissolvidas em 1 mL de acetonitrila e submetidos a uma prévia separação em

CLAE, através de uma única injeção, utilizando uma coluna semipreparativa com o seguinte sistema de eluente:

Método: Gradiente exploratório, $\lambda = 225$ nm.

0-10 min - ACN:H₂O (15:85 V/V); 10-20 min- ACN:H₂O (50:50 V/V); 20-30 min- ACN:H₂O (100:0 V/V).

O método utilizado para a separação foi estabelecido após alguns testes em coluna analítica, optando-se pelo método em que se obteve a melhor separação dos picos com maior absorbância no UV.

Foram coletadas frações referentes aos picos registrados no cromatograma durante a corrida do solvente e identificadas pelo tempo de retenção (TR). As frações coletadas de cada pico foram extraídas com éter etílico, colocados em frascos previamente pesados, evaporados em capela com o mínimo fluxo de ar e calculados os rendimentos.

3.5. Análise dos padrões e produtos de biotransformação.

As análises dos produtos nos extratos foram realizadas utilizando a técnica de CLAE-UV e CG-MS, obtendo-se sempre um padrão dos compostos de partida (Substrato) e um branco (Controle).

Na fase preparativa o bruto reacional da biotransformação de cada extrato foi separado em CLAE-UV utilizando coluna semipreparativa. As frações de interesse, que apresentaram maior rendimento foram analisadas por CG-MS, RMN-¹H e RMN-¹³C e experimentos bidimensionais (COSY, HMBC e HMQC).

3.6. Fluxograma ilustrativo da metodologia.

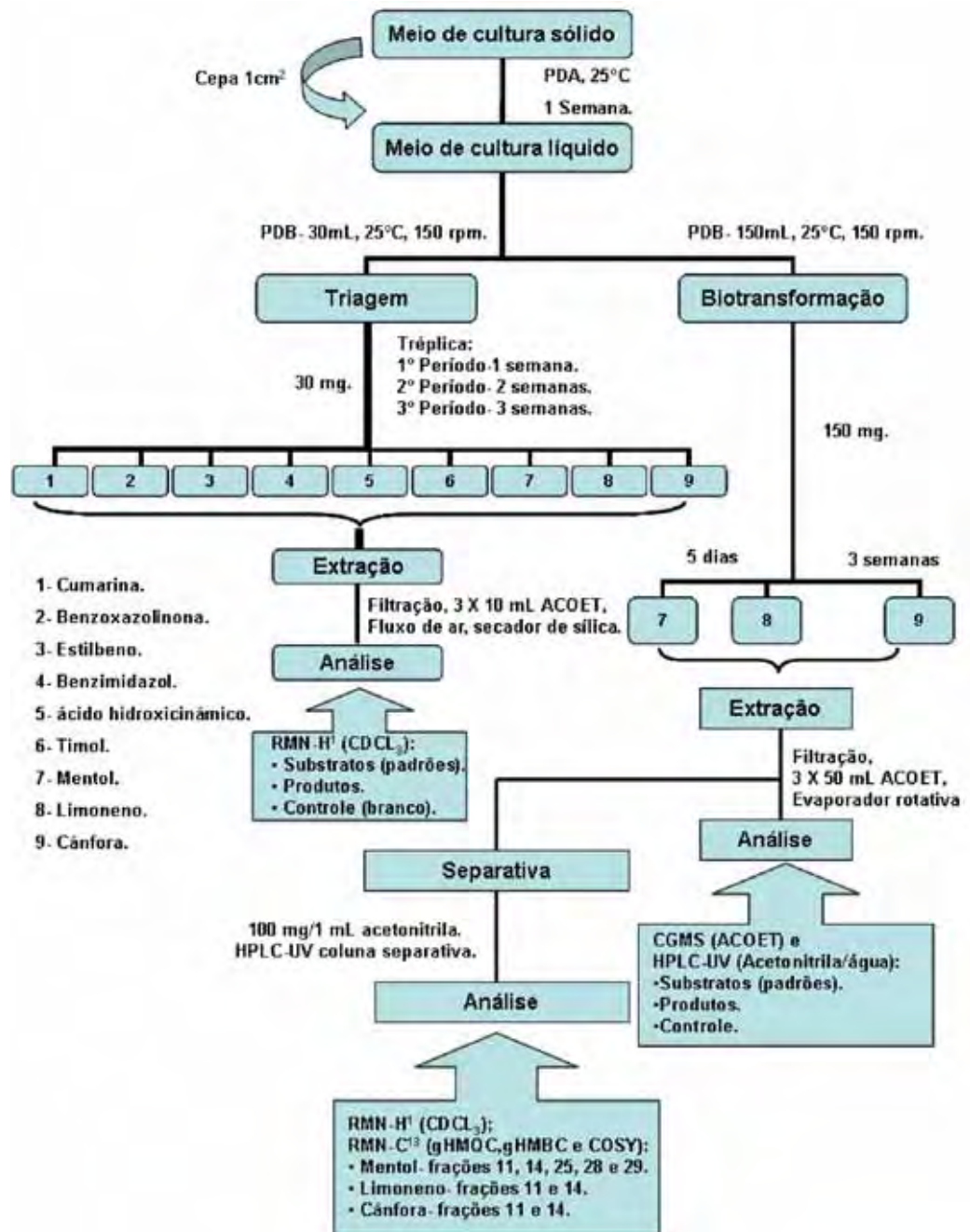


Figura 12. Fluxograma ilustrativo da metodologia.

4. Resultados e discussões.

4.1. Meio de cultivo.

A escolha do método de crescimento de células em cultura líquida, para a realização das biotransformações, foi baseada em estudos de Clark, 1994 e col. onde é relatado que o sistema reacional aquoso é mais compatível com enzimas de microrganismos e células vivas em crescimento, pois são de fácil cultivo e tendem a metabolizar (biotransformar) rapidamente os substratos orgânicos exógenos (substrato e/ou composto de partida).

De acordo com a literatura o fungo *Curvularia* produz colônias que crescem rapidamente em ágar, dextrose e batata a 25°C o que justifica a escolha do meio de cultivo (ST-GERMAIN & SUMMERBELL, 1996; HOOG et al, 2000).

4.2. Tempo de ensaio dos substratos

Durante a etapa de triagem foi estabelecido experimentalmente que o tempo de ensaio para o limoneno (7) e para o mentol (8) seria de 5 dias. Para o limoneno esse período de ensaio foi suficiente para se verificar a biotransformação de toda massa de substrato inserida. Para o mentol verificou-se que apenas uma parte foi metabolizada e o aumento do tempo de biotransformação não tornou o ensaio mais eficiente. No caso da cânfora (9) foi estabelecido experimentalmente o período de três semanas para o início de biotransformação do substrato de partida.

A literatura relata (DEMYTTENAERE et al, 2001; DUETZ et al, 2003; FURUYA et al, 1989) que para ensaios de biotransformação com microrganismos utilizando mentol e limoneno como substratos xenobióticos, o tempo de biotransformação é relativamente rápido, variando de 2 a 7 dias de exposição ao fungo, o que permite inferir que o período de 5 dias é o suficiente para o início da biotransformação.

4.3. Rendimento das biotransformações.

Substrato	Tempo de cultivo	Massa de substrato inserida (mg)	Rendimento bruto (mg) (massa do substrato + massa produzida pelo fungo)	Rendimento bruto (%)	Rendimento líquido (%) (massa do substrato - massa produzida pelo fungo)
Limoneno(1)	5 dias	150	103,8	69,2	62,3
Mentol(2)	5 dias	150	121,9	81,3	74,5
Cânfora(3)	3 semanas	150	103,4	68,9	62,2
Controle	5 dias	-----	10,2	-----	-

Tabela 1. Rendimento das biotransformações dos substratos promissores durante a segunda etapa.

4.4. Métodos para análise das biotransformações.

A análise prévia das biotransformações foi realizada utilizando-se CLAE-UV para se verificar o consumo dos substratos pelo fungo e a formação de novas substâncias. A análise não se mostrou quantitativa para o experimento, por ser uma técnica que depende da absorvância dos substratos, dos metabólitos e de derivados biotransformados, os resultados não foram satisfatórios em termos de análise. No entanto, a evidência de que os substratos foram consumidos atesta a biotransformação, uma vez que a massa recuperada foi alta.

Para se obter informações mais precisas sobre as substâncias presentes nos extratos, foram realizadas análises por CG-MS dos substratos (padrões) e do controle (branco) com a finalidade de identificá-los no extrato bruto.

Análise do controle por CG/MS.

O cromatograma obtido por cromatografia gasosa (Anexo I, fig. 30, pg. 37) evidenciou as substâncias voláteis produzidas pelo fungo e as possíveis substâncias biotransformadas. Os principais picos estão demonstrados na tabela 2.

Controle/branco	
Tempo de retenção (TR) –min.	kCounts
4,8	4,2
5,2	5,7
6,7	4,0
12,4	4,0
14,7	5,7

Tabela 2. Resultados da análise do controle/branco pela técnica de CG/MS.

A fragmentação de massas para o composto correspondente ao pico em 12,4 minutos está registrada na figura. Esses dados serão importantes para indicar quais produtos provém do fungo (metabólito) ou da biotransformação.

4.5. Análise dos produtos da biotransformação.

Limoneno (7).

Análise por CLAE

Foram realizadas injeções em CLAE-UV do substrato para obtenção de um padrão e dos produtos da biotransformação do limoneno a 225 nm (Anexo II, Fig. 17, pg. 38) para se avaliar a biotransformação do substrato. O comprimento de onda na região do UV foi determinado como 225 nm após uma varredura no espectro do d-limoneno em espectrofotômetro de UV. Nesta análise foi observado que o padrão d-limoneno, não apresentou pureza suficiente para ser analisado com precisão por esta técnica. Através da comparação do cromatograma de CLAE-UV do padrão, do produto de BTF (cinco dias) e da injeção do misto dos dois, foi possível confirmar que o substrato foi consumido pelo fungo.

O padrão apresentou vários picos correspondentes às impurezas em pequena quantidade (não observadas em RMN¹H) do d-limoneno. Dois desses picos apresentaram maior absorção no comprimento de onda selecionado, com tempo de retenção na coluna de 10,4 min e 20,1 min. A análise dos extratos de BTF revelou o desaparecimento desses picos característicos do cromatograma do d-limoneno, o que infere que o substrato tenha sido totalmente biotransformado. O aparecimento de um pico com tempo de retenção de 6,1 min e intensidade de 1,36 AU, indicou a presença de uma nova substância com alta absorbância e de caráter polar, provavelmente, a presença de um composto biohidroxilado por este fungo. A tabela 3 mostra os principais picos obtidos por CLAE do padrão e do extrato biotransformado.

CLAE-Uv 225nm.			ACN/H ₂ O ISO-70			Tempo- 30 min		
Limoneno padrão			Extrato biotransformado (5dias)					
Picos (TR-min)	Absorbância (mAu)	P/F	Picos (TR-min)	Absorbância(mAu)	P/F			
2,7	100	F	3,0	965	F			
5,3	135	F	6,1	1360	P			
10,4	165	*F	10,4- ausente	-				
20,1	110	*F	20,1- ausente	-				

P= pico principal ; F= picos filhos (secundários) ; *F= picos tomados como padrão.

Tabela 3. Resultado da análise por CLAE do limoneno e do produto biotransformado.

Análise por CG-MS.

Considerando as colocações acima, que o d-limoneno apresenta volatilidade suficiente para ser analisado por CG e objetivando obter informações complementares sobre os produtos de biotransformação, optamos por utilizar a técnica de cromatografia gasosa com fragmentação de massas (CG-MS) para avaliar o produto de BTF do limoneno.

O cromatograma por CG do d-limoneno (Anexo II, Figura 18, pg. 38) mostrou um único pico com tempo de retenção (TR) de 6,0 min e a respectiva fragmentação de massa, própria deste composto.

A análise do cromatograma (CG) do produto de BTF do d-limoneno (Anexo II, fig. 19 pg. 40) revelou a ausência do substrato indicando que a BTF do limoneno ocorreu completamente. Foi visualizada também, a presença de outros picos (não observados por CLAE) atribuídos aos metabólitos produzidos pelo fungo e produtos de BTF. A tabela 4 mostra o tempo de retenção dos picos obtidos pela análise por CG.

Padrão-TR= 6,0min	
Produto biotransformado do limoneno (5dias).	
Tempo de retenção (TR) - min.	kCounts
5,2*	5,8
10,7	5,4
12,4*	5,2
14,4*	5,8

*picos relativo a metabólitos encontrados no cromatograma do controle/branco

Tabela 4. Resultados da análise por CG/MS do produto de biotransformação do limoneno (5dias).

Três picos com TR = 5,2; 12,4 e 14,6 minutos, em comparação com o cromatograma do controle/branco, revelam serem metabólitos do fungo.

A fragmentação de massas de todos os picos foi avaliada e observou-se que o pico com TR (tempo de retenção) 10,7 min apresentou o íon molecular igual a 152. Análise do espectro de massas da substância responsável por este pico evidenciou a presença de picos filhos 121, 93, 79, característicos da perda da metila, isopropileno, respectivamente. Estudo teórico dos possíveis produtos formados por BTF do limoneno sugeriu a presença de um derivado dihidroxilado do limoneno, o que aliado a um trabalho publicado por Blair e col (2007), sugere tratar-se de 1,2-limonenodiol. Esta observação despertou o interesse na avaliação dos experimento de RMN bidimensionais da fração 11 discutidas a seguir.

Semi-purificação por CLAE, dos produtos obtidos no processo de BTF do d-limoneno.

Tendo em vista as colocações acima, optamos por uma tentativa de separação destas substâncias. Análise por cromatografia em camada delgada de sílica gel (CCDC) usando diversos eluentes evidenciou que a separação por cromatografia em coluna (CC) ou mesmo por cromatografia em camada delgada preparativa (CCDP) seria inviável, devida a pequena separação das manchas. Deste modo, optamos por uma tentativa de separação usando CLAE no modo reverso, semipreparativo.

A massa de 100 mg de extrato do bruto reacional foi submetido à CLAE em escala semi-preparativa e forneceu 33 frações com um tempo total de 35 min da corrida do solvente. Algumas frações foram analisadas por CG/MS. Somente a fração 11 (13,2 mg, 13,2%) foi selecionada para análise por RMN, pois apresentou rendimento apreciável e uma mistura com um produto majoritário, além de apresentar absorção no UV (visualizado durante a etapa semi-preparativa).

A análise por CG-MS da fração 11 (Anexo II, Fig. 21, pg. 42) mostrou uma mistura, no entanto com a presença de um composto majoritário. Tal observação também ocorreu com a análise dos espectros de RMN¹H e ¹³C (uni e bidimensionais) (Anexo II, Fig. 21-27, pg. 42-48).

A análise dos espectros de RMN ¹H e ¹³C, evidenciou a presença de dois carbonos olefínicos em δ_C 109 (δ_H 4,67, sl, H-9) e 150 (C-10), o que aliado às correlações observadas nos experimentos bidimensionais, de H-9 \leftrightarrow C-10/C-4, nos

permitiram afirmar que a ligação dupla em C-8 e C-9 não sofreu reações. Por outro lado, a visualização de dois carbonos carbinólicos em δ 67,0 e 74,0 (δ_H 3,58) aliado à ausência do sinal do hidrogênio olefínico em δ_H 5,3 ppm do padrão do limoneno (Anexo II, fig. 20, pg 41), sugeriu a dihidroxilação em C-1 e C-2.

Os dados colocados acima, aliados aos observados em CG-MS, onde foi observado um pico com tempo de retenção de 12,1 minutos e com fragmentação característica de derivados de limoneno 1,2 dihidroxilados, nos permitiu concluir, após comparação com os dados obtidos na literatura (SciFinder), que a substância observada na fração 11 trata-se do (10) 1,2-limoneno diol (figura 13). As tabelas 5 e 6 (pg 23) ilustram as comparações utilizadas para confirmar a presença do produto hidroxilado.

Quanto à estereoquímica relativa desta não é possível fazer qualquer aferição por estarmos trabalhando com uma pequena mistura. Considerando que a fração 11 foi a que apresentou maior rendimento, podemos sugerir que o fungo endofítico mostrou preferência de hidroxilação no anel ao invés das metilas.

Um detalhado levantamento bibliográfico nos conduziu ao trabalho de Demyttenaere et al (2001), onde o 1,2-limonenodiol foi obtido pela transformação do limoneno pelo fungo *Corynespora cassicola*.

De acordo com o review “Biotransformation of limonene by bacteria, fungi, yeast, and plants” (DUETZ et al, 2003) o 1,2-limonenodiol foi isolado na biotransformação do limoneno por diversos microrganismos. Demyttenaere et al (2001), em seus estudos com biotransformação do limoneno com mais de 60 fungos verificou que apenas com *Corynespora cassicola* obteve-se um rendimento satisfatório (48%) na biotransformação em seu derivado dihidroxilado. O rendimento obtido da biotransformação do limoneno provocada pelo *Curvularia* sp. não foi alto como verificado nos estudos de Demyttenaere, no entanto pode ser considerado satisfatório (13%), uma vez que as condições de cultivo, crescimento e desenvolvimento do fungo ainda não foram otimizadas.

Este é o primeiro relato da obtenção desta substância como produto de biotransformação com fungo endofítico *Curvularia* sp isolado de uma espécie vegetal *Ocotea corimbosa*, endêmica de região de cerrado brasileiro.

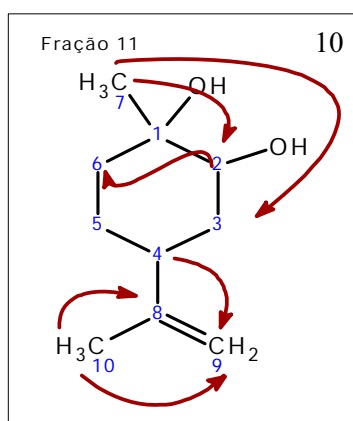


Figura 13. Substância 10 e as principais correlações observadas em HMBC.

H	$^1\text{H}-\delta$ (ppm); Mult. (Hz)		$^{13}\text{C}-\delta$ (ppm); HMQC (δ)		HMBC(δ)
	10	(Blair, 2007)	10	(Blair, 2007)	10
1	-----	-----	67	71,9	-----
2	3,58 (m)	3,67	74	73,7	$^3\text{J}-27$; $^3\text{J}-30,5$
3	1,38 (m)	1,95-1,50 (6H, m)	33	34,1	$^4\text{J}-27$
5	1,26 (m)		31	28,2	-----
6	1,5 (m)		30	34,4	$^3\text{J}-74$
4	1,98 (m)	2,40-2,23 m	37,5	37,5	$^3\text{J}-109$
7	1,2 (s)	1,26 (s)	27	24,5	$^3\text{J}-74$; $^4\text{J}-33$
8	-----	-----	150	149,1	-----
9	4,67 (s)	4,71 (m)	109	108,9	$^3\text{J}-37,5$; $^3\text{J}-21$
10	1,67 (s)	1,73 (s)	21	21,2	$^2\text{J}-150$; $^3\text{J}-109$
OH	3,15		-----		
			--		

Tabela 5. Dados de RMN ^1H e 1D e 2D (500 MHz, CDCl_3) da fração 11 do BTF do D- limoneno.

minoritário obtido através de biotransformação com linhagens de bactérias (VAN DER WERF et al, 1999). Uma linhagem de *Cladosporium* sp também se mostrou capaz de atacar a ligação 1,2 resultando em *cis*- e *trans*-diol como produtos principais, gerando concentrações finais de 0,2 e 1,5 g/L, respectivamente, após 4 dias de fermentação. Abraham et al. produziram o mesmo composto utilizando uma linhagem de fungo filamentosos, *Corynespora cassiicola*.

b) Mentol (8).

Foi constatado através da varredura em espectrofotômetro que o mentol apresenta seu máximo de absorção no UV a 200nm. Esse comprimento de onda foi selecionado para a análise desse substrato com a segurança de não sofrer influência do solvente. Mesmo assim a análise do mentol não foi muito efetiva utilizando a técnica de CLAE-UV devido ao fato do reagente utilizado apresentar outros picos com absorção, provavelmente devido às impurezas, impossibilitando sua identificação no cromatograma. Dessa forma, a análise em CLAE-UV (Anexo III, Fig. 28, pg. 49) foi útil para visualizar a formação de um novo produto com absorbância maior (com grandeza na ordem de 2,5 AU com tempo de retenção igual a 3,1 min) quando comparada ao cromatograma do mentol (picos com intensidade na ordem de 5 mAu) conforme mostra a tabela 7 a seguir.

CLAE-Uv 200nm.			Acetonitrila/água. ISO-70			Tempo- 30 min		
Mentol padrão			Extrato biotransformado (5dias)					
Picos (TR-min)	Absorbância (mAu)	P/F	Picos (TR-min)	Absorbância(mAu)	P/F			
1,8	3,5	F	3,0	2500	P			
2,2	3,5	F	3,2	1250	F			
2,7	3,8	F	4,3	750	F			
3,8	3,0	F	4,9	700	F			
5,1	5,3	F						
8,2	3,8	F						

P= pico principal ; F= picos filhos (secundários) ; *F= picos tomados como padrão.

Tabela 7. Resultado da análise por CLAE do mentol e do produto biotransformado.

Deste modo, optamos por avaliar a biotransformação por CG-MS (Anexo III, Fig. 29 e 30, pg. 50 e 51), onde foi observado um único pico e fragmentação referente

ao mentol. Esta observação permitiu nos certificarmos que as impurezas observadas em CLAE se encontram em pequeníssima quantidade.

A análise por cromatografia gasosa para o mentol (Anexo III, Fig. 29, pg. 50) revelou o pico característico do padrão com tempo de retenção igual a 8,34 min, a fragmentação de massa do padrão esta expressa na Figura.

Comparando o cromatograma do padrão com o controle (Anexo I, Fig. 47, pg. 37) e o da biotransformação (Anexo III, Figura 30, pg. 51) foi possível verificar os picos mais intensos relativo às substâncias que estão em maior quantidade no extrato. Os picos mais intensos estão demonstrados na tabela 8 (pg 27). O pico com tempo de retenção 2,7 min encontra-se no cromatograma do controle, porém com baixa intensidade revelando estar em pequena quantidade em relação às demais substâncias presentes no metabolismo do fungo. A presença de picos mais intensos que o controle deve ocorrer por dois motivos: A formação de produtos biotransformados ou metabólitos obtidos pela indução do mentol no metabolismo do fungo.

A presença do pico relativo ao mentol no extrato (8,3 min) sugere que o substrato não foi totalmente transformado e que a previsão, na primeira etapa, do período de cinco dias de ensaio foi insuficiente para uma quantidade maior de substrato utilizada na segunda etapa. Outro ensaio aumentando o tempo de cultivo para duas semanas foi realizado, no entanto a análise do cromatograma sugeriu, pela intensidade dos picos observados, que o perfil do cromatograma foi parecido com o de 5 dias, não tornando mais eficiente a biotransformação.

Padrão-TR= 6,0min	
Produto biotransformado do mentol (5dias).	
Tempo de retenção (TR) –min.	kCounts
2,7*	45
3,8	12
8,3	25
17,3	16,5
19	20,5
*picos relativo a metabólitos encontrados no cromatograma do controle/branco	

Tabela 8. Resultados da análise por CG/MS do produto de biotransformação do mentol (5dias).

Análise dos produtos obtidos da BTF na etapa semi-preparativa.

Observada a formação de subprodutos no processo de BTF do mentol, optamos por uma tentativa de purificação destes compostos. Sendo assim, o bruto reacional foi submetido a uma coluna semi-preparativa por CLAE, usando acetonitrila/água como eluentes. Foram coletadas 35 frações em 35 min de corrida. Foram selecionadas para análise as frações que apresentaram alta absorção no UV e melhores rendimentos como mostra a tabela 9.

Massa inserida (mg)	Rendimento da separação (mg)	Rendimento da separação (%)
100	93	93
Fração	Rendimento (mg)	Rendimento (%)
11	10,0	10
25	4,0	4
28	16,7	16,7
29	14,3	14,3

Tabela 9. Rendimentos obtidos na fase preparativa do produto da biotransformação do mentol.

Apesar dos melhores rendimentos observados nas frações 28 e 29, constatou-se por CG-MS, a presença do substrato de partida (mentol), que não sofreu biotransformação.

A fração 11 apesar de apresentar uma massa significativa, no espectro de RMN¹H evidenciou uma mistura complexa, inviabilizando a análise.

O cromatograma obtido por CG-MS (Anexo III, fig. 32, pg. 53) da fração 25 indicou a presença de uma única substância, com a respectiva fragmentação. Análise dos espectros de RMN¹H e ¹³C uni e bidimensionais (Anexo III, Fig. 31-37, pg. 52-58) desta fração, nos permitiu identificar a presença de um metabólito (11) produzido por *Curvularia* SP (figura 15), que não foi isolado no trabalho de doutorado do Dr. Helder Lopes Teles (Figura 5, pg. 7).

Elucidação estrutural da substância 11 identificada na fração 25 do produto da biotransformação do mentol.

O espectro de RMN de ¹H de **11** (Anexo III, fig. 33 pg. 54) a 500 MHz apresentou um conjunto de sinais em δ_H 6,36 (dd, J = 7,5 e 0,5 Hz), δ_H 6,43 (dd, J = 7,5 e 1,0 Hz) e δ_H 7,28 (t, J = 7,5 Hz) integrados para 1H cada e acoplados em sistema

orto/meta, orto, e orto/meta sugeriram a presença de anel aromático tri-substituído, sendo atribuídos a H-6, H-8 e H-7, respectivamente. O espectro apresentou outro conjunto de sinais em δ 4,51 (m), δ 2,68 (dd, $J = 17,0$ e $12,5$ Hz), δ 2,61 (dd, $J = 17,0$ e $3,5$ Hz) e δ 1,44 (d, $J = 6,5$ Hz) atribuídos a H-2, H-3a, H-3b e H-11, respectivamente, constituindo o segundo anel do sistema benzopirânico.

Análise do espectro de RMN¹³C (Anexo III, fig. 34, pg. 55) a 125 MHz apresentou três sinais de mesma proporção em δ 107,3; δ 109,2 e δ 138,2 atribuídos aos carbonos aromáticos C-6, C-8 e C-7, respectivamente. Sinais em δ 20,8; δ 43,9 e δ 73,8 foram atribuídos a metila C-11, ao carbono C-3, α à carbonila, e ao carbono carbinólico C-2, constituintes do sistema alifático do anel pirânico. Valores de δ de C-10 e C-9 confirmaram a posição da hidroxila em C-5.

O valor de J do hidrogênio diastereoisotópico H-3a (δ 2,61) evidenciou duas constantes características de acoplamentos geminal (17,0 Hz) e vicinal axial-axial (17,0 Hz), enquanto H-3b (δ 2,61) apresentou constante geminal (17,0 Hz) e vicinal axial-equatorial (12,5 Hz), possibilitando o estabelecimento da configuração relativa da molécula: H-3a (axial), H-3b (equatorial), H-2 (axial) e CH₃-11(axial).

O experimento COSY-2D (Anexo III, Fig. 35, pg. 57) possibilitou confirmar o sistema de spins H-2, H-3a, H-3b e H-11. Experimentos de RMN ¹H e ¹³C uni e bi-dimensional HMQC, HMBC, e COSY ilustrado na figura 15, foram fundamentais para a elucidação estrutural.

Comparação dos dados espectrais (WU, et al., 1999) com os obtidos (Tabela 10, pg. 29), permitiram a identificação estrutural de **11** como sendo o 5-hidroxi-2-metil-benzopiran-4-ona.

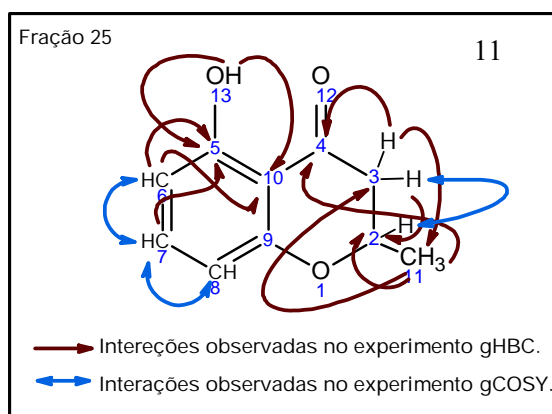


Figura 15. Substância 11 e as principais correlações em HMBC e COSY.

H/C	H (ppm); Mult. (Hz)		COSY	HMBC	HMQC	
		Lit. Gray, 1999				Lit Gray , 1999
2	4,51 (m)	4,56 (m)	2,66	-	73,8	73,8
3a	2,61 (dd)	2,63 (dd)	4,52; 1,47	73,8; 20,8; 198,5	43,9	43,8
3b	2,68 (dd, 17,0; 12,5)	2,73 (dd, 17,0; 3,5)				
4	-	-	-	-	198,5	198,5
5	-	-	-	-	107,3	108
6	6,36 (dd; 8,0; 1,0)	6,41 (dd; 8,0; 1,0)			162,1	162,1
7	7,28 (t; 8,5)	7,33 (dd; 8,0; 1,0)	7,28	162; 108,1	109,2	107,3
8	6,43 (dd; 8,0; 1,0)	6,48 (dd; 8,0; 1,0)	6,36	162,1	138,2	138, 2
9	-	-	-	-	108,1	109,1
10	-	-	-	-	162,1	161,7
11	1,47 (d; 7,0)	1,50 (d, 7,0)	2,66	73,8; 43,9; 198,5	20,8	20,8
OH	11,62 (s)	11,7 (s)	-	162,1; 107,3	-	

Tabela 10. Dados de RMN¹H e RMN¹³C (500 MHz, CDCl₃) da substância 11.

A comparação com os valores de fragmentação de massas de 11 (Anexo III, Fig. 32, pg. 53) com os valores obtidos da literatura confirmaram a substância com MM = 78 u (tabela 11)

2,3-diidro-4,5-hidroxi-2-metil-H-1-4-Benzopirano, (8CI,9CI) (GRAY, 1999)		Fração 25 do mentol (11)	
EM/IE m/z	Intensidade rel. (%)	EM/IE m/z	Intensidade rel. (%)
178	100	178 [M ⁺]	92
163	67	163 (M-Me) ⁺	44
136	77	136 [M-CH ₂ CO] ⁺	100
108	89	108[M-MeCHCHCO]	58
80	13	80	10
52	18	52	10

Tabela 11. Comparação da fragmentação de massas da fração 11 do limoneno com dados obtidos da literatura.

d) Cânfora (9).

Avaliação do produto de biotransformação da cânfora por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

Após varredura em espectrofotômetro de UV a cânfora e os produtos de BTF foram analisados por CLAE-UV em comprimento de onda de 200 nm. Nesse comprimento de onda ocorreu o máximo de absorção dos compostos com pouca influência do solvente utilizado (acetonitrila). Para a cânfora (Anexo IV, Fig. 38, pg. 59), foi registrado um sinal com tempo de retenção de 6,9 min e intensidade de 270 mAU. Para o bruto da BTF, no período de três semanas, ocorreu a formação de um produto com alta absorbância no UV com intensidade de 230 mAU e TR de 3,1 min, muito embora a presença do pico relativo à cânfora, indica nem toda cânfora tenha sido biotransformada.

Da avaliação do misto (padrão + bruto de BTF), comprovou-se que houve o aumento do pico relativo à cânfora e a diminuição do pico do produto formado (3,1min), evidenciando a presença de um produto diferente da cânfora.

CLAE-Uv 200nm.			Acetonitrila/água. ISO-70			Tempo- 30 min		
Cânfora padrão			Extrato biotransformado (5dias)					
Picos (TR-min)	Absorbância (mAu)	P/F	Picos (TR-min)	Absorbância (mAu)	P/F			
6,9	270	P	3,1	200	P			
			6,3	100	F			
			6,9	250	P			
P= pico principal ; F= picos filhos (secundários) ; *F= picos tomados como padrão.								

Tabela 12. Resultado da análise por CLAE da cânfora e do produto biotransformado.

Avaliação do produto de biotransformação da cânfora por cromatografia gasosa (CG)

O cromatograma obtido por CG para a cânfora (padrão), com suas respectivas fragmentações de massas está representado no (Anexo IV Fig. 39, pg. 60) e evidencia um sinal relativo à cânfora com tempo de retenção de 8,0 min, 30 kcouts.

Avaliação do cromatograma por CG do bruto da BTF (Anexo IV, fig. 40, pg. 61) mostrou que a cânfora não foi totalmente metabolizada, assim como foi visualizado por CLAE. Foi visualizada também, a presença de outras substâncias na amostra que podem ser derivados biotransformados da cânfora. O produto com retenção em 10,7 minutos despertou interesse de investigação por estar em maior quantidade em relação às outras substâncias formadas e possuir menor volatilidade quando comparado com o substrato de partida, possivelmente devido à biohidroxilação provocada pelo fungo. A comparação com o cromatograma de CG do controle permitiu prever que a substância com tempo de retenção de 5,1 min e intensidade 6 kcounts, tratava-se de um metabólito do fungo.

Padrão-TR= 6,0min	
Produto biotransformado do limoneno (5dias).	
Tempo de retenção (TR) –min.	kCounts
5,1*	6,0
8,0	31
10,7	6,0
11,1	4,5
*pico relativo a metabólitos encontrados no cromatograma do controle/branco	

Tabela 13. Resultados da análise por CG/MS do produto de biotransformação do mentol (5dias).

Análise dos produtos da biotransformação da cânfora na etapa preparativa.

O bruto reacional foi submetido a uma coluna semi preparativa por CLAE, usando acetonitrila/água como eluentes, fornecendo 32 frações em 35 min de corrida. Foram selecionadas para análise as frações que apresentaram alta absorção no UV e melhores rendimentos (tabela 14)

Massa inserida (mg)	Rendimento da separação (mg)	Rendimento da separação (%)
100	60,4	60,4
Fração	Rendimento (mg)	Rendimento (%)
11	2,7	2,7
12	4,7	4,7
16	16,7	16,7

Tabela 14. Massas das frações obtidas com maior rendimento na separação da BTF da cânfora.

Análise da fração 11

Esta fração após análise por RMN¹H evidenciou uma mistura complexa de difícil separação sendo descartada de análises.

Análise da fração 16

Análise por CG/MS da fração 16 evidenciou tratar-se da cânfora que não sofreu biotransformação.

Análise da fração 12

O cromatograma obtido em CG-MS da fração 12 (Anexo IV, fig. 42, pg. 63) mostrou a presença de três substâncias, em quantidades praticamente iguais, o que demonstrou que a separação em CLAE não foi efetiva, muito provavelmente devido às semelhantes polaridades. Considerando a dificuldade em separar estas substâncias e que o objetivo deste trabalho é o de avaliar o potencial de biotransformação de *Curvularia* sp, optamos por analisar os espectros de RMN¹H e ¹³C uni e bidimensionais da fração 12 em mistura. Uma avaliação detalhada do espectro de RMN¹³C da fração 12 (Anexo IV, fig. 44, pg. 65) evidenciou, na região de carbonila de cetona sinais em δ_C 201,3; 217,7 e 218,3 mostrando que não houve a redução desta função. Na região de carbonos carbinólicos, três outros sinais em 69,6; 74,6 e 75,0 sugerindo a formação de três substâncias hidroxiladas, derivadas da cânfora. Estas observações, aliadas aos espectros de massas obtidos pelo CG-MS onde foram visualizados três espectros com íon molecular em 168 uma, e ao mapa de contorno do experimento bidimensional de HMQC (Anexo IV, fig. 45, pg. 66) permitiram sugerir que as hidroxilações ocorreram nos metilenos posicionados em C-8, C-9 e C-10 como ilustra a figura a seguir.

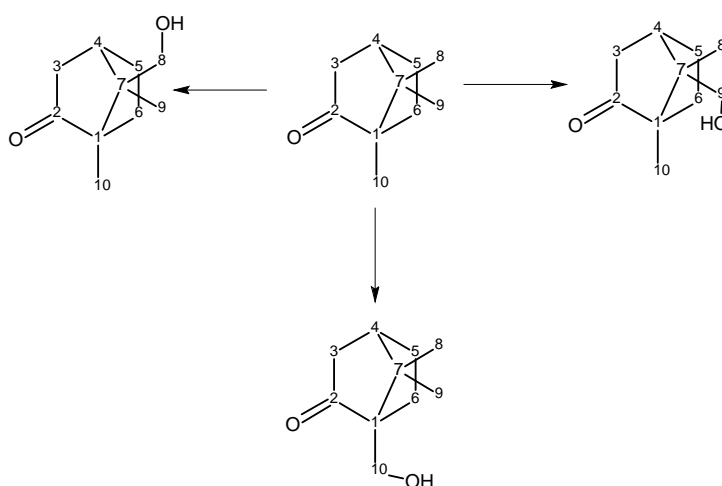


Figura 16. Produtos monohidroxilados presentes na fração 12 da cânfora BTF.

A comparação com dados obtidos na literatura de fragmentação de massas e de RMN-¹³C, mostrados abaixo, de um derivado monohidroxilado da cânfora com o espectro de RMN-¹³C (Anexo IV, fig. 44, pg. 65) e da fragmentação de massas da fração 12 (Anexo IV, fig. 42, pg. 63) confirmou esta suposição, pois os três produtos presentes na fração apresentaram fragmentação característica do produto monohidroxilado.

Dados obtidos da literatura de derivados monohidroxilados da cânfora (TORI et. al, 1964).

(1R,7R)-(+)-8-hidroxicânfora

EI-MS, m/z (intensidade rel.) 168 [M]⁺ (9), 153 [M-CH₃]⁺ (1), 137 [M-CH₂OH]⁺ (12), 109 (18), 108 (37), 95 (100), 91 (10), 79 (15), 67 (22), 55 (16), 43 (27), 41 (27);

RMN¹³C (CDCl₃) δ 10,1 (q, C-10), 14,9 (q, C-9), 26,6 (t, C-5), 29,7 (t, C-6), 39,4 (d, C-4), 42,9 (t, C-3), 51,3 (s, C-7), 57,4 (s, C-1), **64,7 (t, C-8)**, **218,4 (s, C-2)**.

A avaliação desse ensaio demonstrou que o fungo realizou a biohidroxilação nos grupos metílenos de baixa reatividade da cânfora, o que permite sugerir que o fungo foi seletivo. Esta evidência aliada ao resultado do ensaio preliminar da biotransformação do ácido abiético em 30 dias, permitiu sugerir que o fungo realizou a biohidroxilação dos grupos metílenos de substratos exógenos com um período maior de ensaio, sendo o mínimo verificado em 3 semanas.

5. Conclusão

A etapa de triagem forneceu um diagnóstico sobre quais substratos foram promissores e qual o tempo ideal para a ocorrência da biotransformação. Para os substratos: cumarina (1), benzoxazolinona (2), ácido **trans**-hidroxicinâmico (3), estilbeno (4), e benzimidazol (5) e não houve modificações nos espectros após os processos de BTFs. Sendo assim, pode-se sugerir que estes substratos não são susceptíveis a BTF com o fungo endofítico *Curvularia* sp durante os períodos de ensaio (1, 2 e 3 semanas). Este resultado está coerente com a estabilidade apresentada por estas substâncias, onde não se constata a presença de sítios ativos.

O tempo de BTF, para o limoneno (7) e mentol (8) utilizado na segunda etapa foi estabelecido como sendo 5 dias, período condizente com aquele verificado na literatura.

Para a cânfora (9) foi determinado o tempo de três semanas de cultivo. Quanto ao timol (6), foi observado que este apresenta toxicidade a *Curvularia* sp., inibindo seu crescimento e desenvolvimento.

Na segunda fase da pesquisa as análises dos produtos da biotransformação dos substratos tidos como promissores, objetivaram determinar a quantidade de produtos formados e avaliar se houve a produção de possíveis derivados dos substratos ou metabólitos do fungo.

Na etapa preparativa, após uma semiseparação dos compostos, as análises objetivaram elucidar as estruturas de produtos presentes nas frações, na forma de mistura. Os dados de RMN permitiram identificar substâncias em mistura e compará-las com a literatura.

Através da análise dos resultados conclui-se dizer que o fungo *Curvularia* sp. possui a capacidade de realizar a biohidroxilações no limoneno, e cânfora. Foi possível verificar produtos hidroxilados nos extratos das biotransformações, sendo que para o limoneno constatou-se que a modificação provocada pelo fungo foi consideravelmente seletiva em um período curto de ensaio.

No caso do ensaio com a cânfora, a fração 12 mesmo estando em mistura elucidou a presença de três compostos monohidroxilados nas posições 8, 9 e 10 correspondentes as metilas livres do substrato. Este fato associado aos resultados obtidos do ensaio preliminar com ácido abiético (15) (figura 8), no qual também foi constatado a biohidroxilação na metila livre do substrato com 30 dias de ensaio, permite sugerir que o fungo realiza a biohidroxilação das metilas livres, pouco reativas, em um período de tempo maior (3-5 semanas) quando comparado à biohidroxilação na insaturação do anel do limoneno (5 dias).

Durante este trabalho, também foi isolado a substância 11 (fração 25 do ensaio com o mentol), um metabólito inédito que não foi isolada no trabalho de doutorado do Dr. Helder Lopes Teles.

Este é o primeiro relato da obtenção de produtos biotransformados por um fungo endofítico *Curvularia* sp. isolado de uma espécie vegetal, *Ocotea corimbosa*, endêmica de região de cerrado brasileiro.

6. Anexos

ANEXO I- Resultados da análise do Controle (Branco).

- CG/MS.

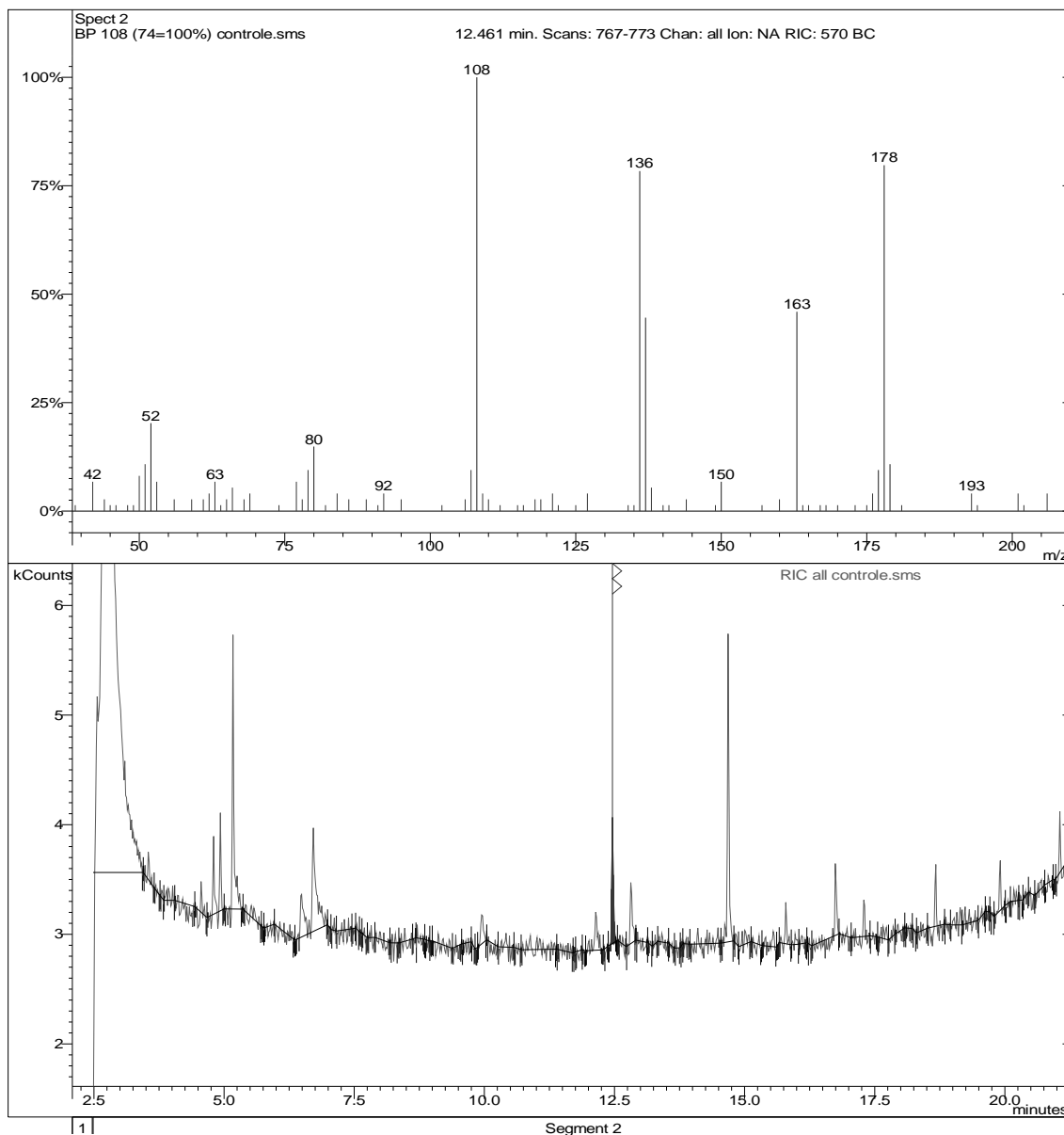


Figura 47. Cromatograma CG/MS do controle (branco).

ANEXO II- Resultados da análise da biotransformação do limoneno.

- CLAE-uv.

Cromatograma- HPLC- Limoneno. Método 225 nm ISO 70.

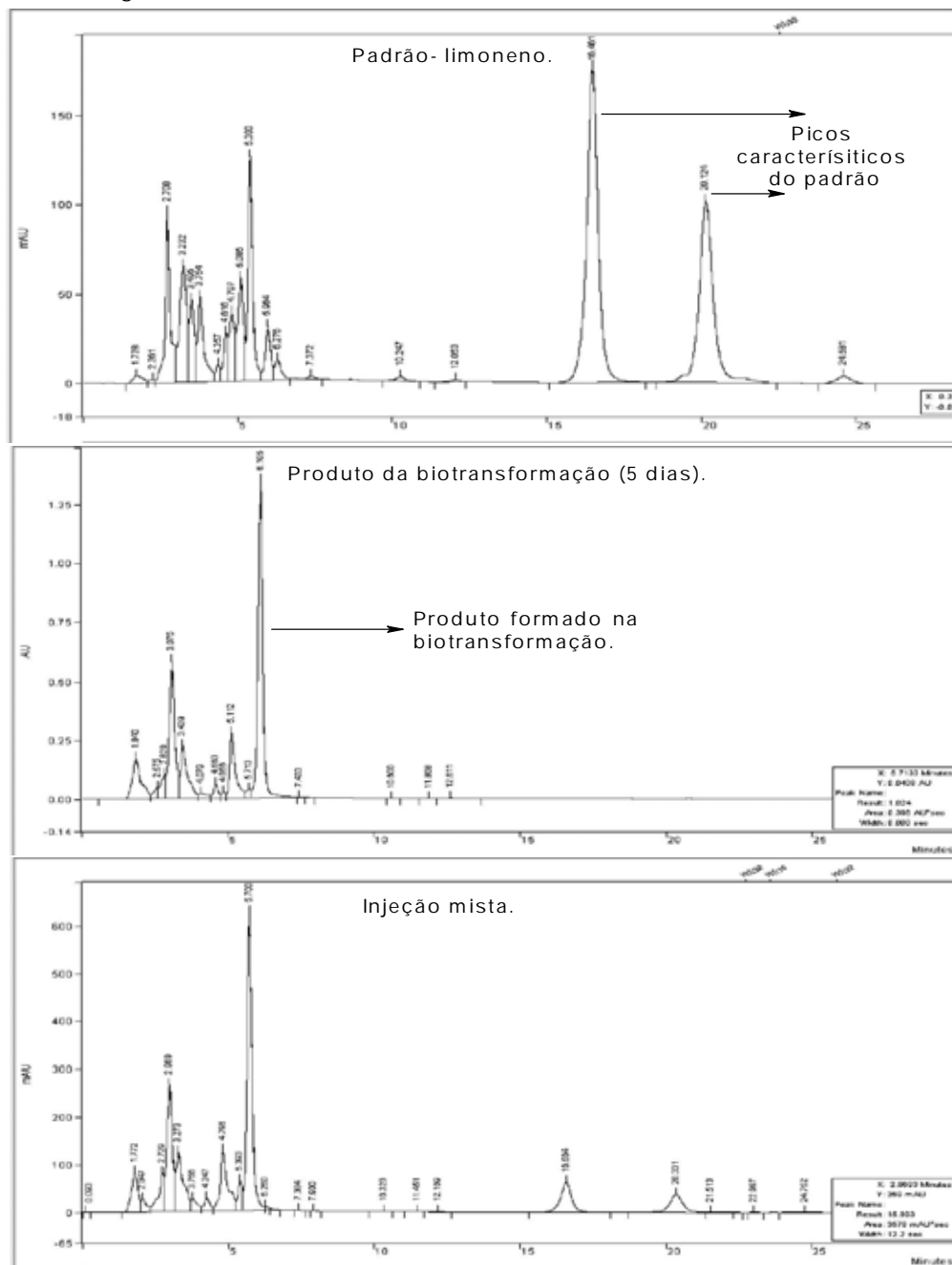


Figura 17. Cromatograma CLAE-uv do padrão do limoneno e do produto da BTF após 5 dias.

• CG/MS

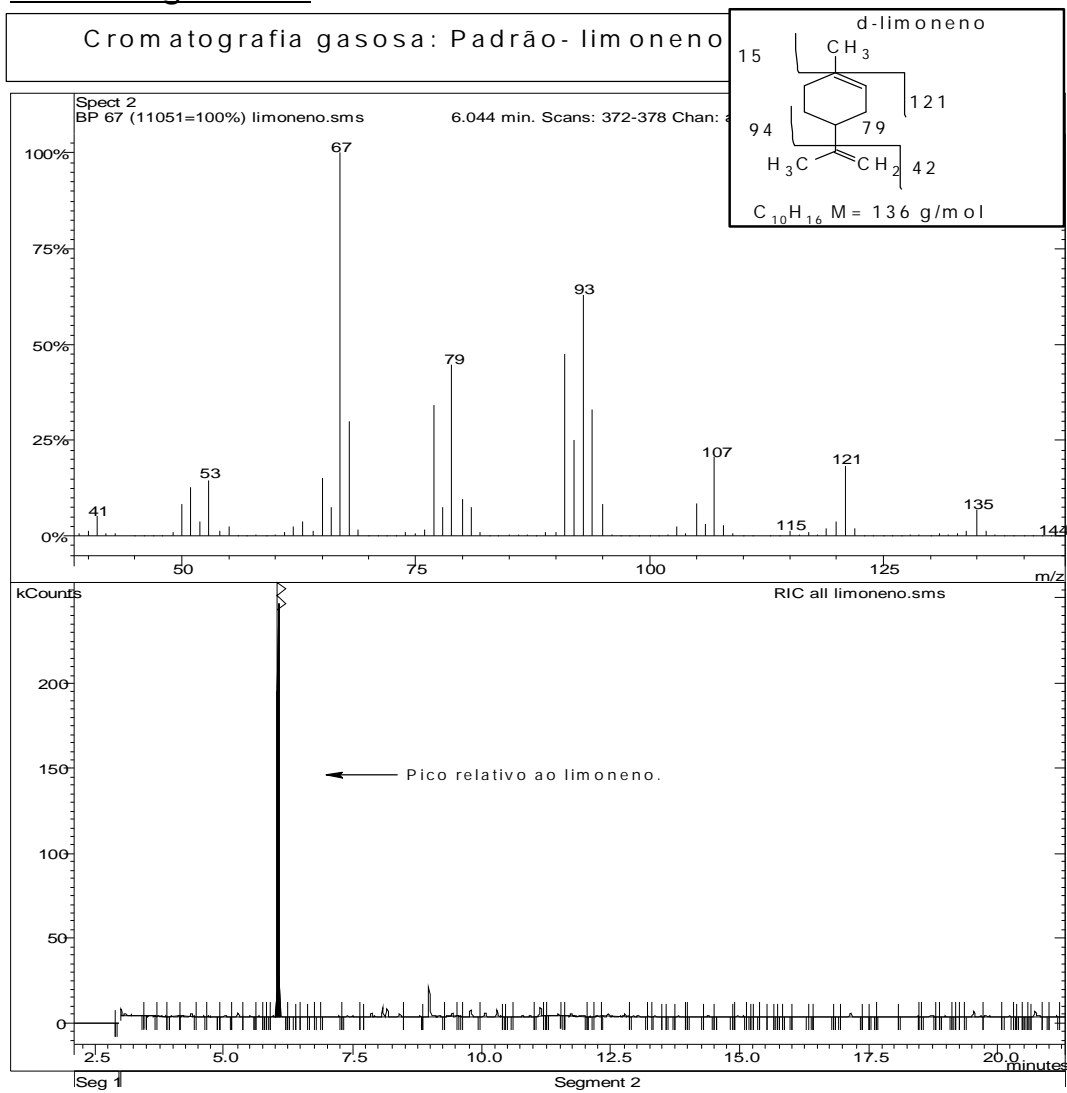
Chromatogram Plot

Figura 18. Cromatograma CG/MS do padrão do limoneno.

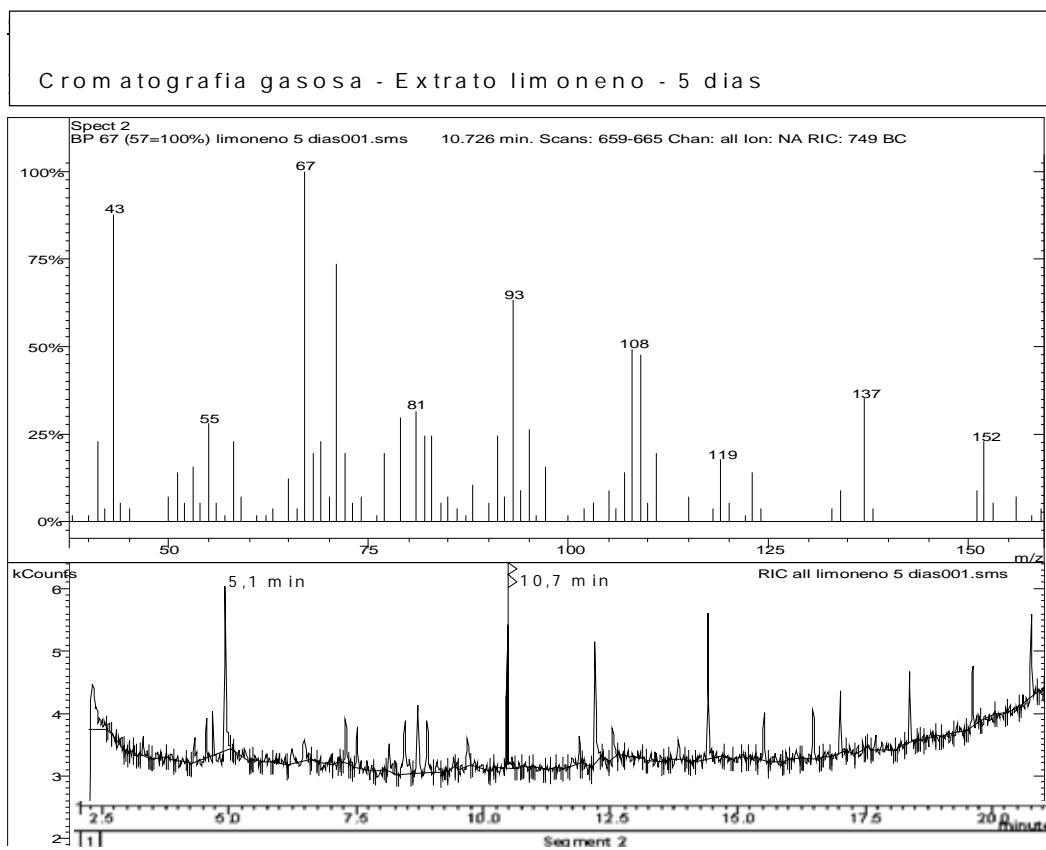


Figura 19. Cromatograma (CG/MS) para o extrato (5 dias) de BTF do limoneno.

- RMN- H^1

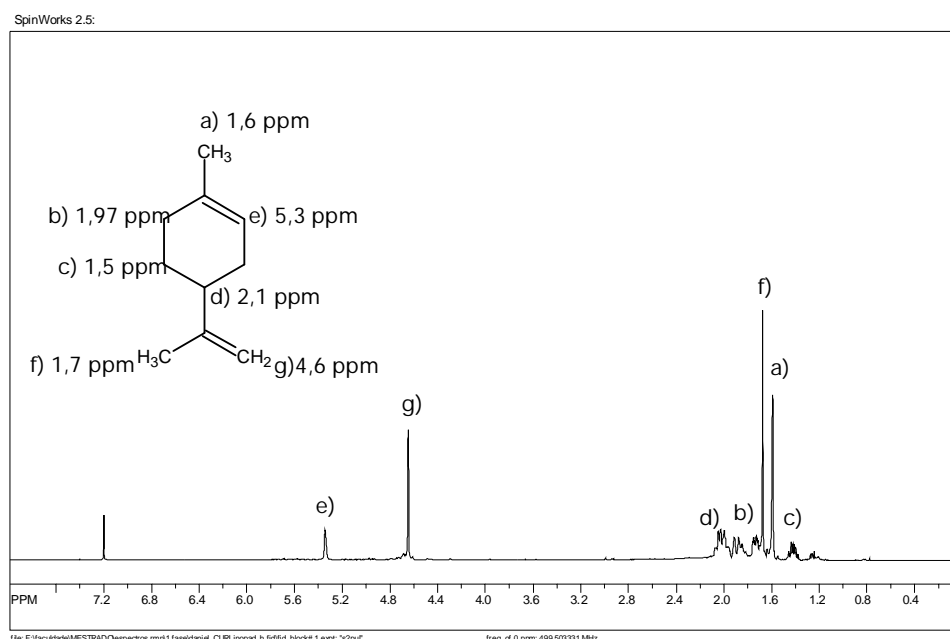


Figura 20. Espectro RMN 1H (500 MHz, $CDCl_3$) do d-limoneno (padrão).

- Fração 11-limoneno.

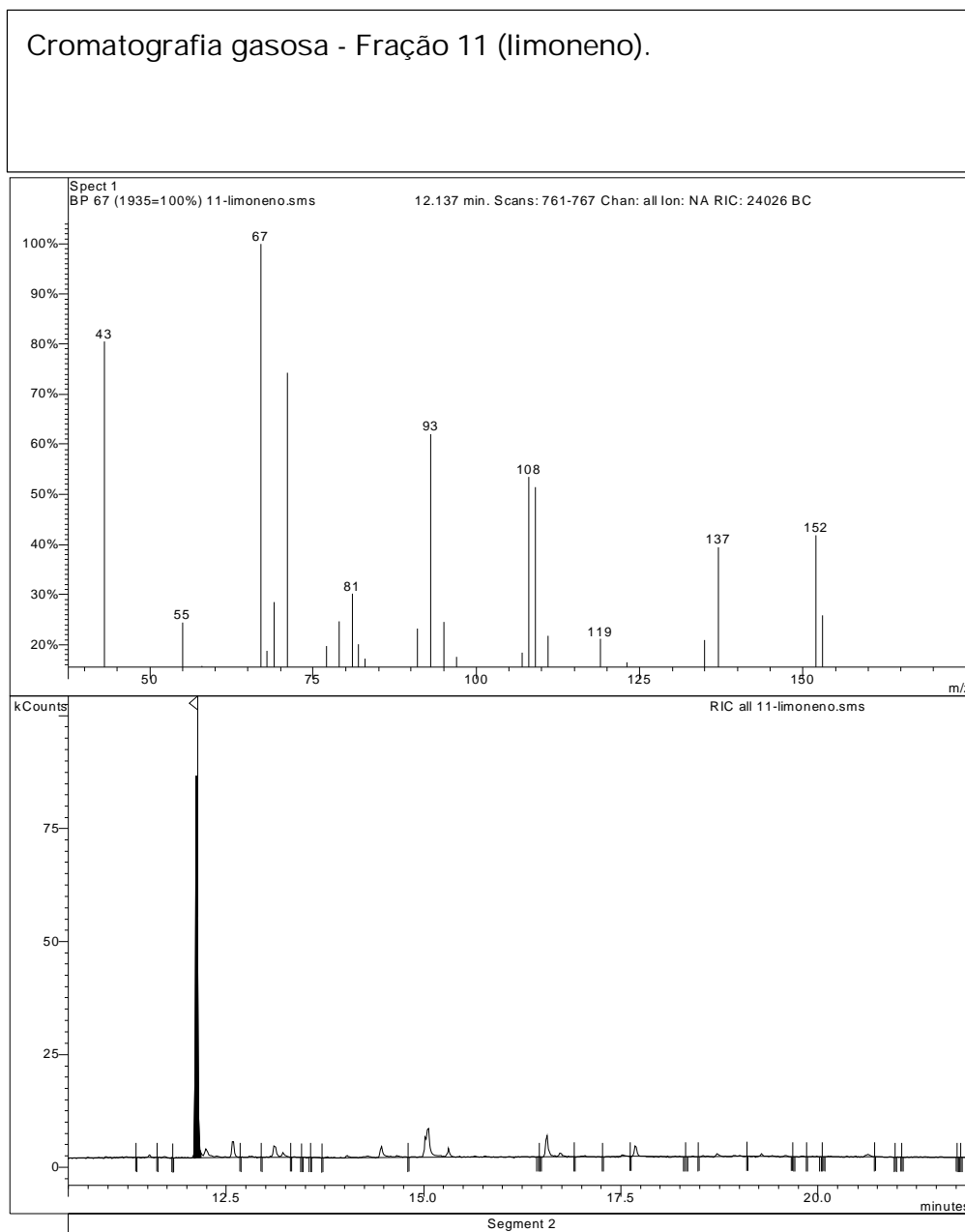


Figura 21. Cromatograma CG/MS da fração 11 do produto de BTF do limoneno em 5 dias.

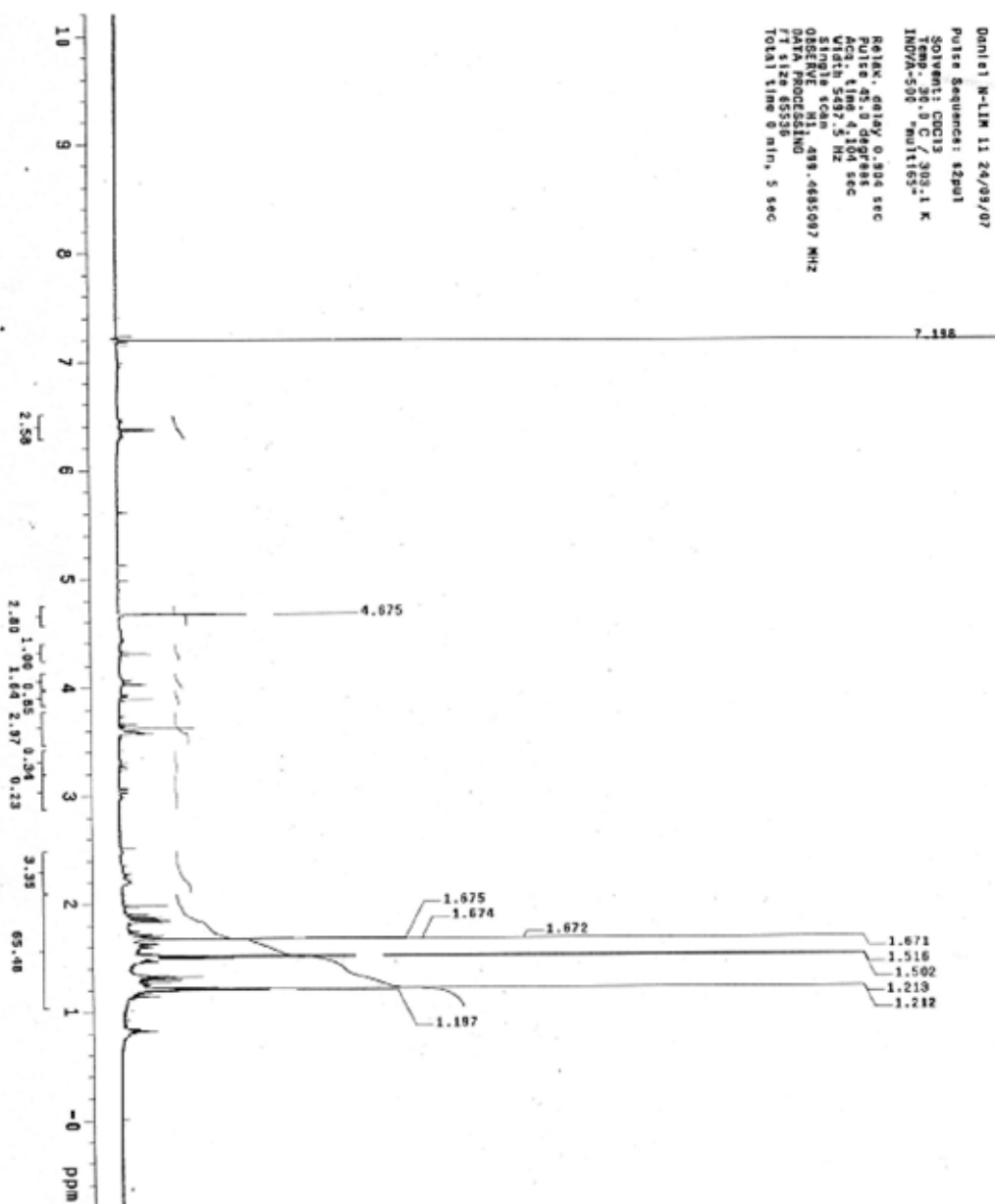


Figura 22. Espectro RMN-¹H da fração 11 do produto de BTf do limoneno em 5 dias.

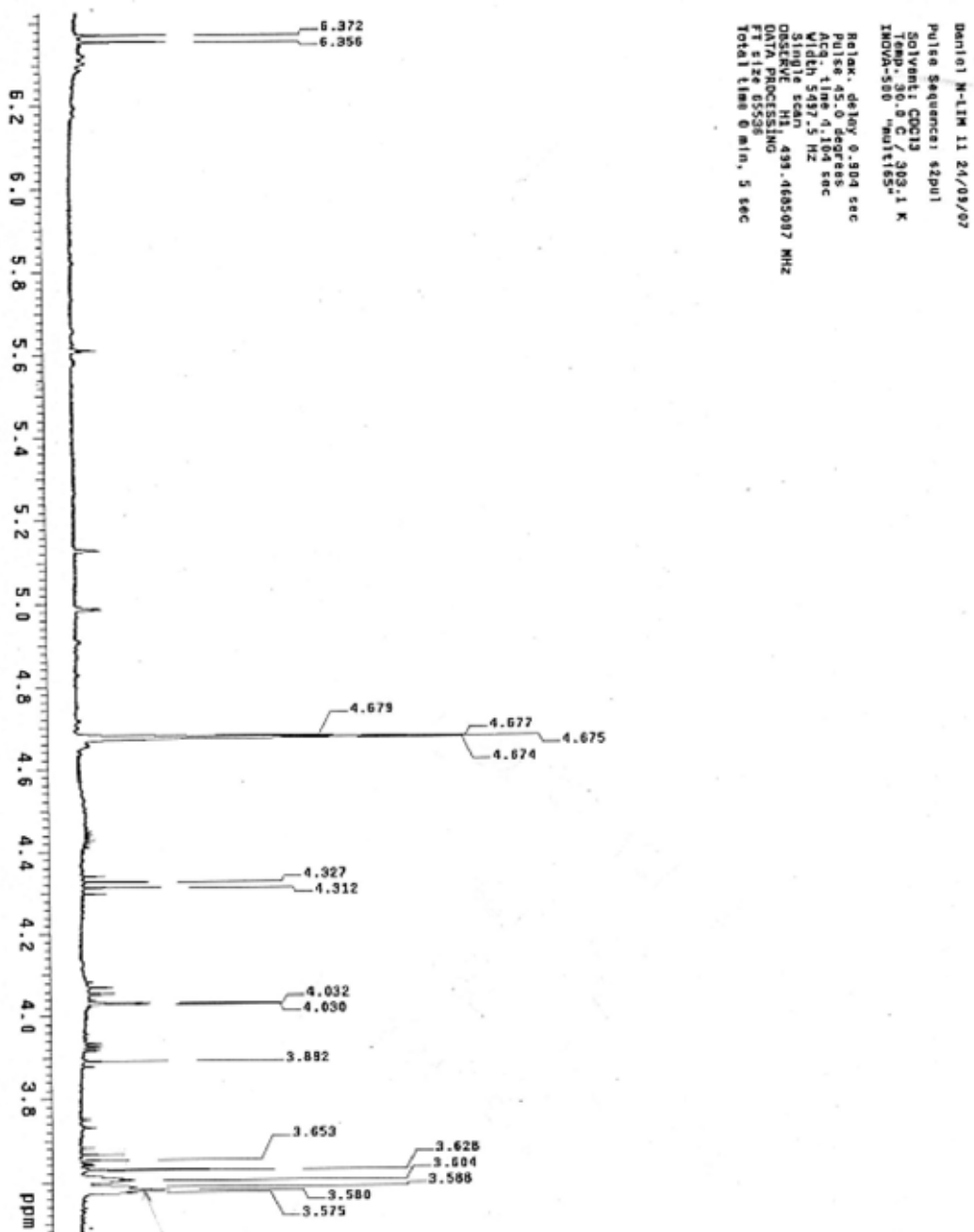


Figura 23. Ampliação do espectro RMN-¹H da fração 11 do produto de BTf do limoneno em 5 dias.

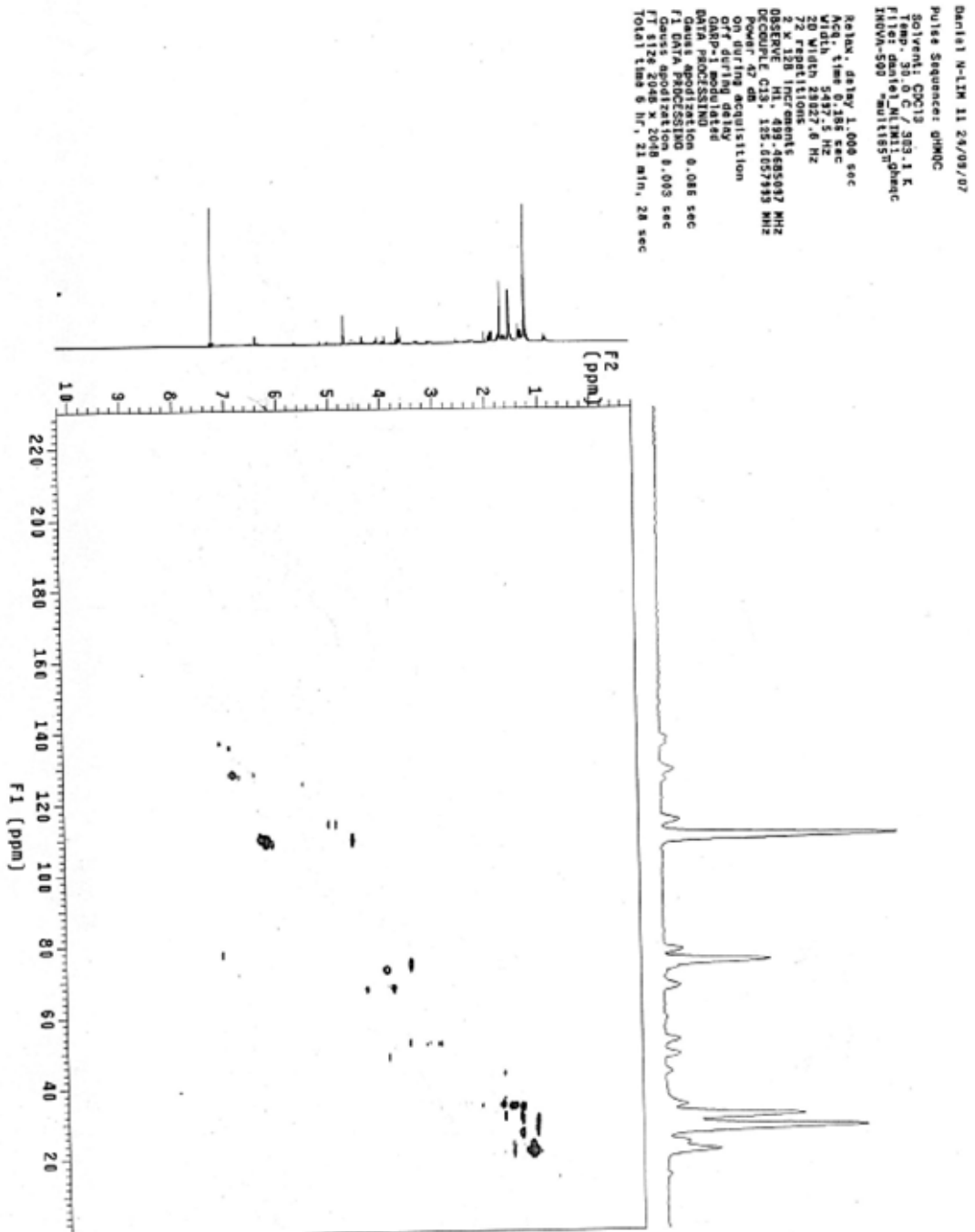


Figura 24. Espectro bidimensional (gHQC) da fração 11 do produto de BTB do limoneno em 5 dias.

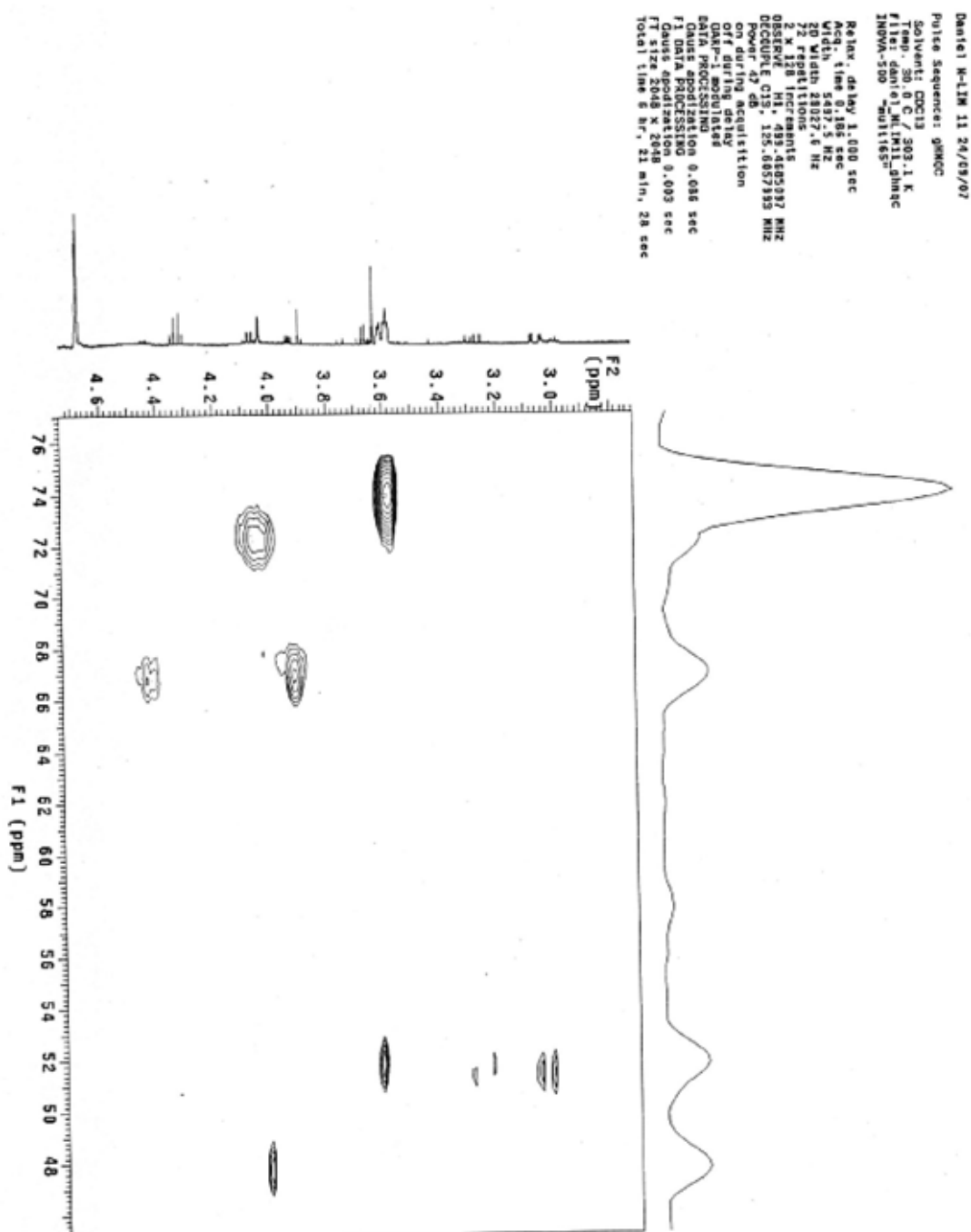


Figura 25. Ampliação do espectro bidimensional (gHQC) da fração 11 do produto de BTF do limoneno em 5 dias.

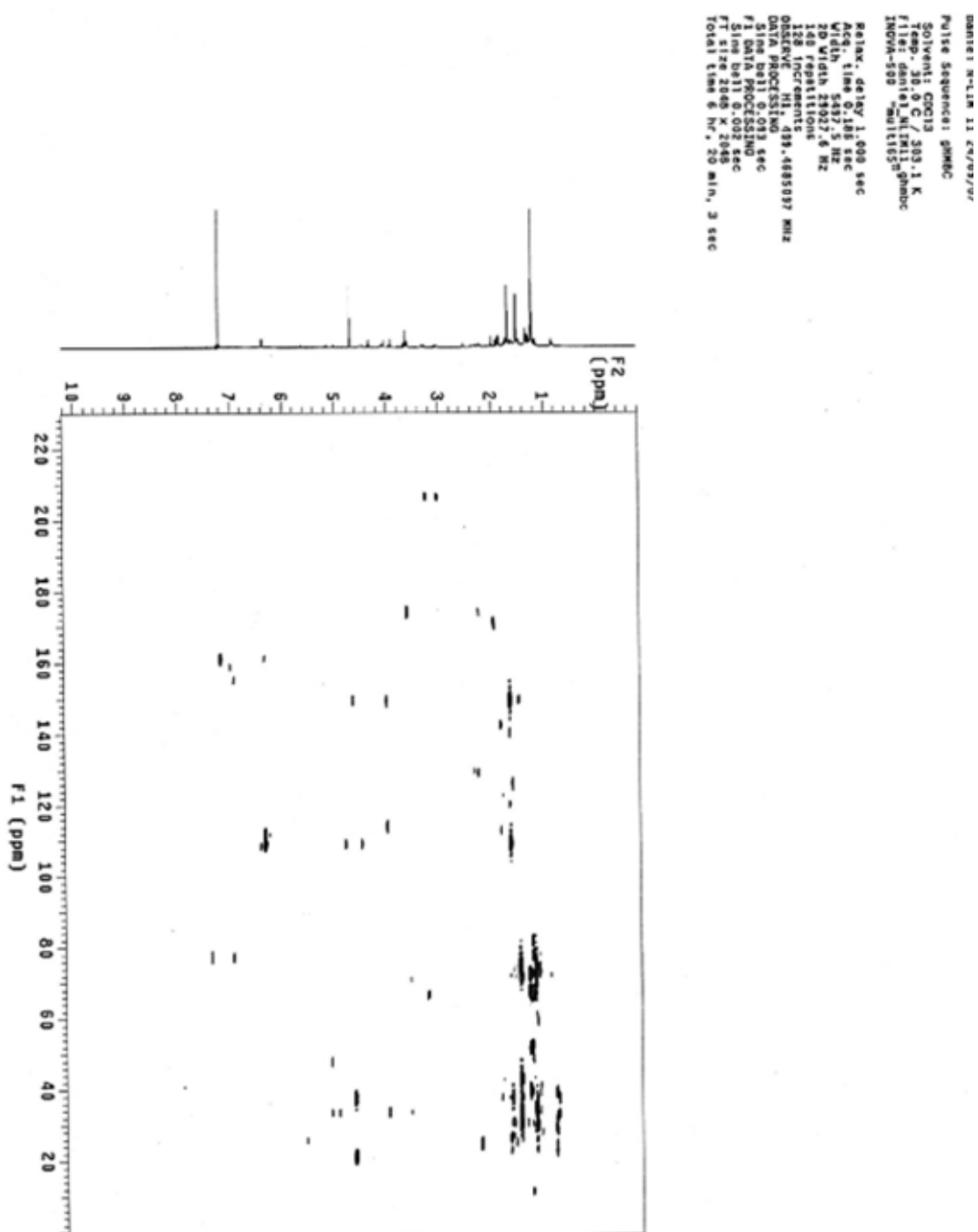


Figura 26. Espectro bidimensional (gHBC) da fração 11 do produto de BTF do limoneno em 5 dias.

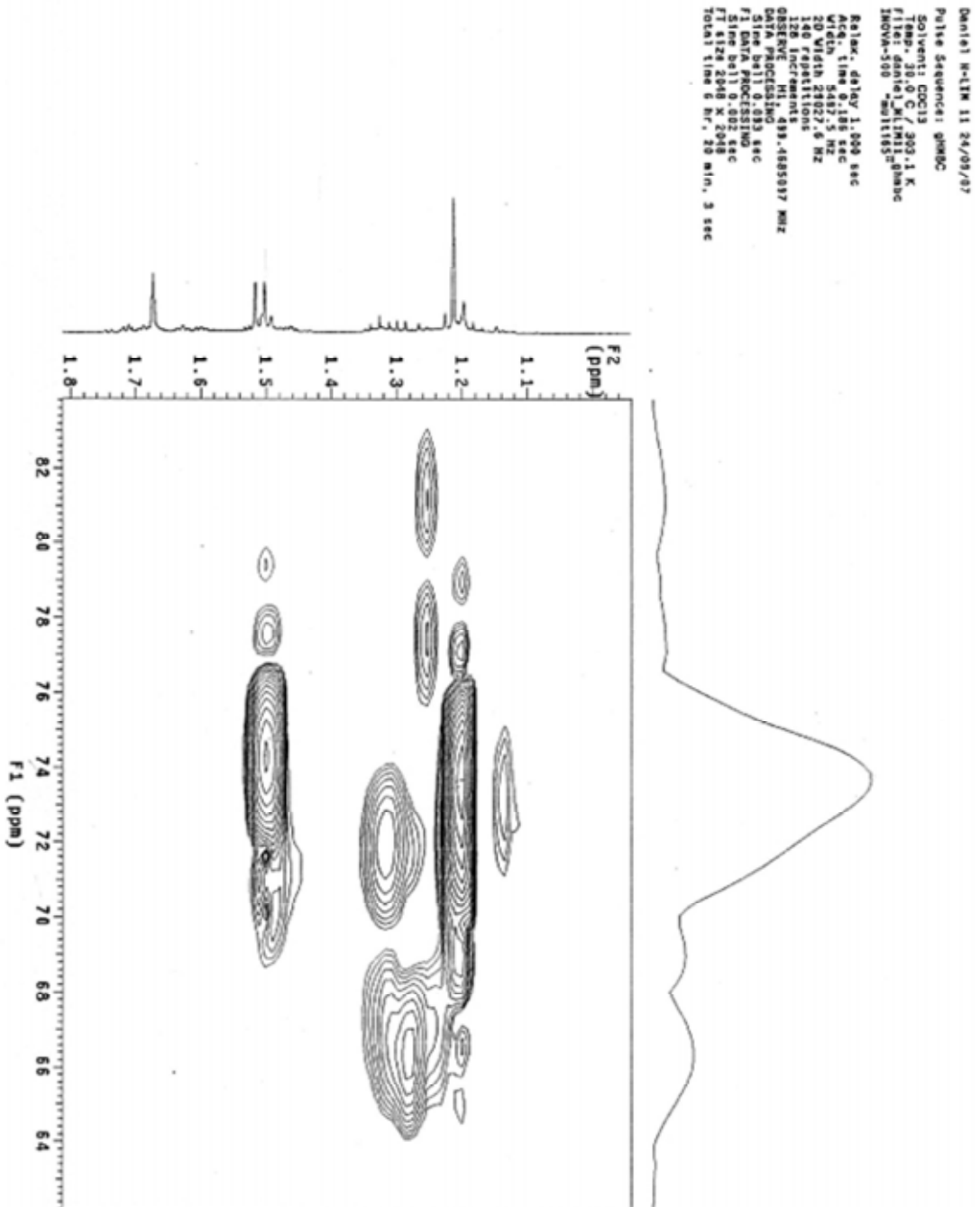


Figura 27. Ampliação do espectro bidimensional (gHBC) da fração 11 do produto de BTF do limoneno em 5 dias.

ANEXO III. Resultados da análise da biotransformação do mentol.

- CLAE-uv.

Cromatograma -HPLC-UV Mentol. Método: 200 nm, ISO 70.

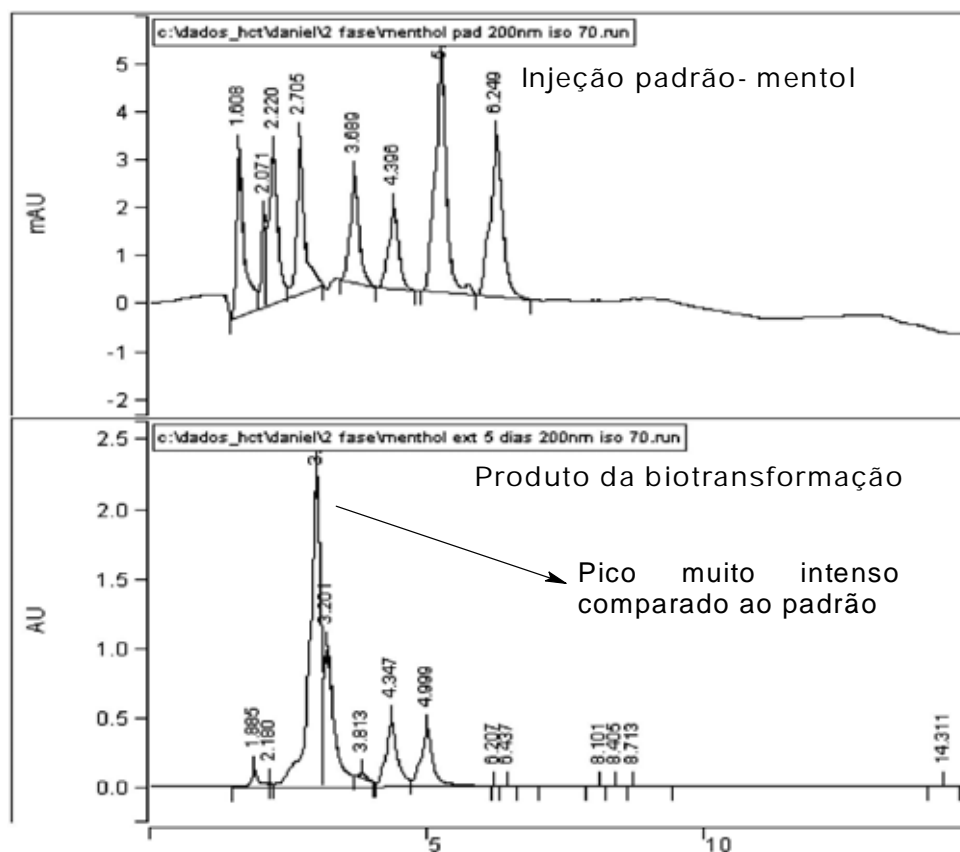


Figura 28. Cromatograma CLAE-UV para o padrão do mentol e do produto da BTF após 5 dias.

• CG/MS

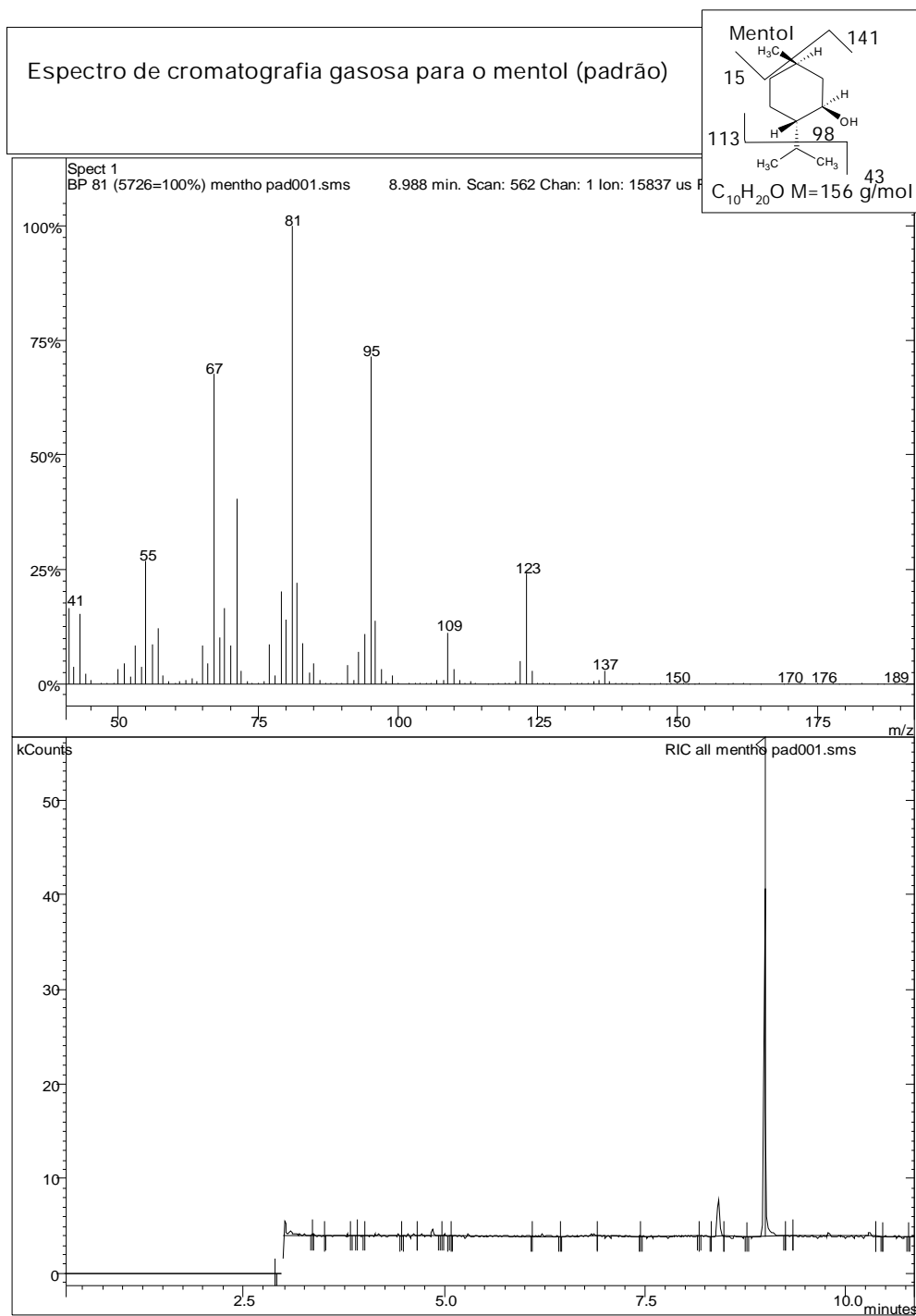


Figura 29. Cromatograma CG/MS do padrão do mentol.

Espectro de cromatografia gasosa para o extrato do mentol após 5 dias de biotransformação.

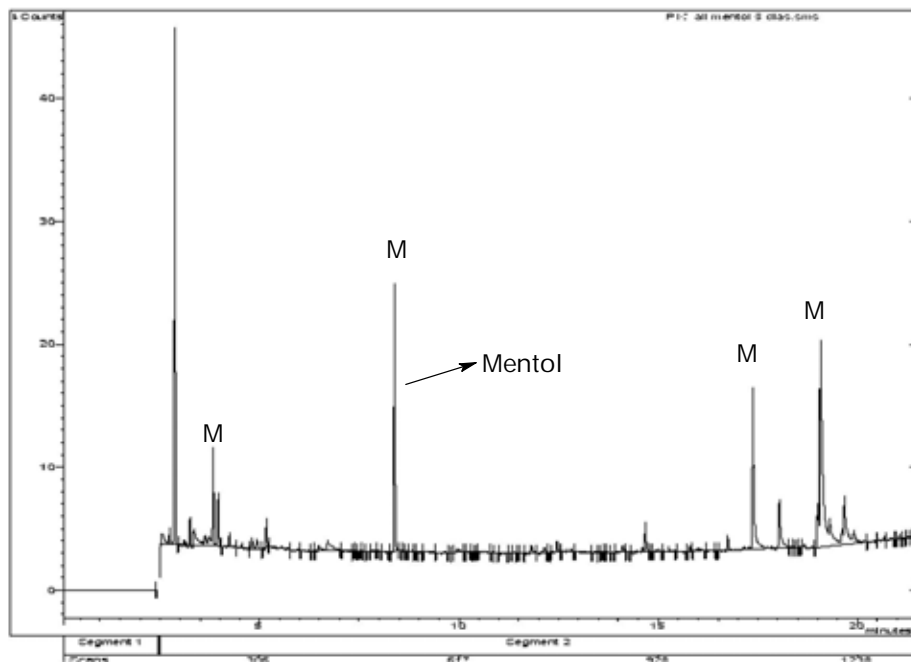


Figura 30. Cromatograma CG/MS do extrato do mentol (5dias)

- RMN- H^1

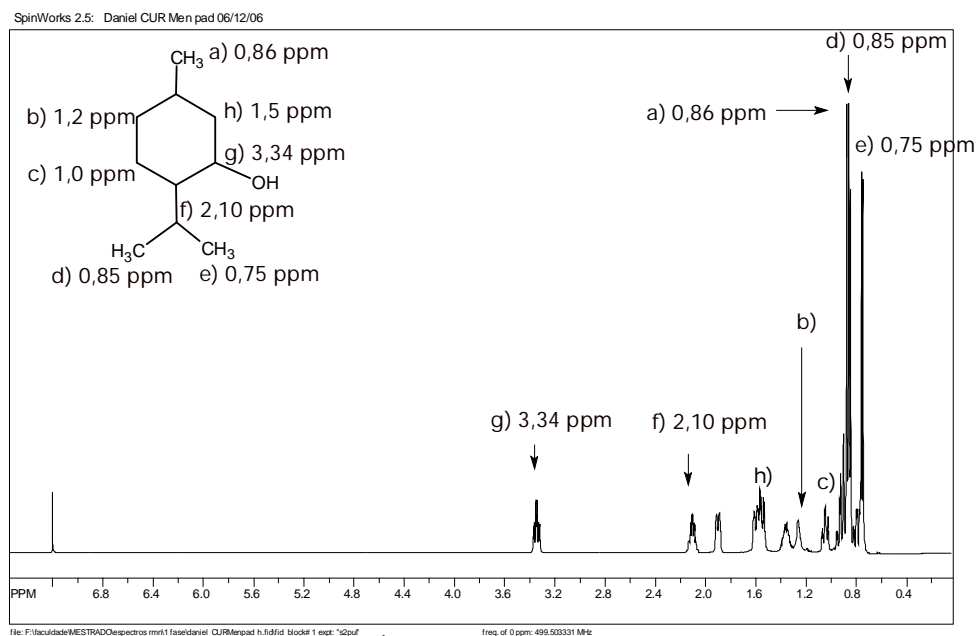


Figura 31. Espectro RMN 1H (500 MHz, CDCl₃) do padrão mentol.

- Fração 25 – mentol.

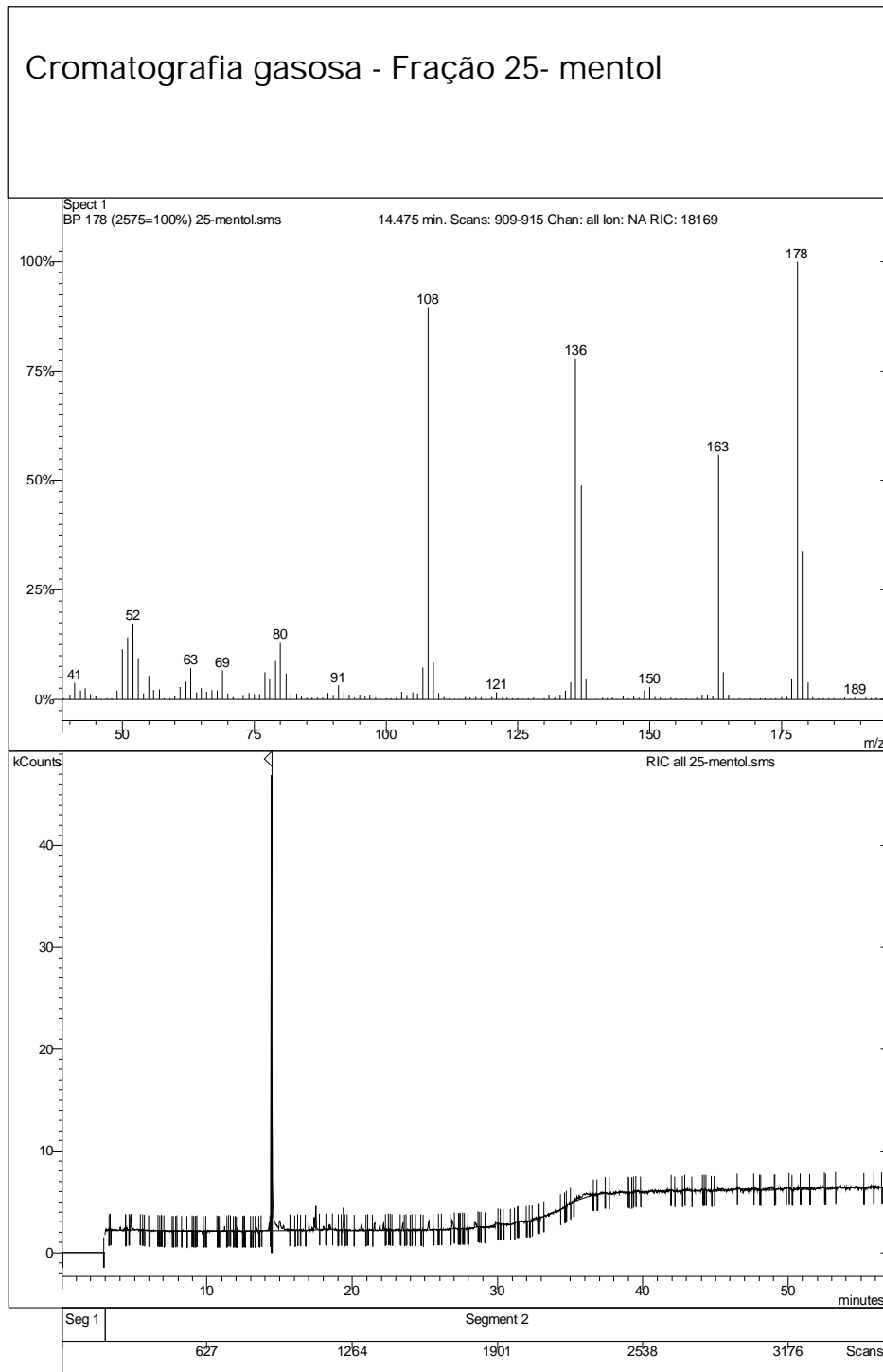


Figura 32. Cromatograma CG/MS da fração 25 do produto de BTF do mentol em 5 dias.

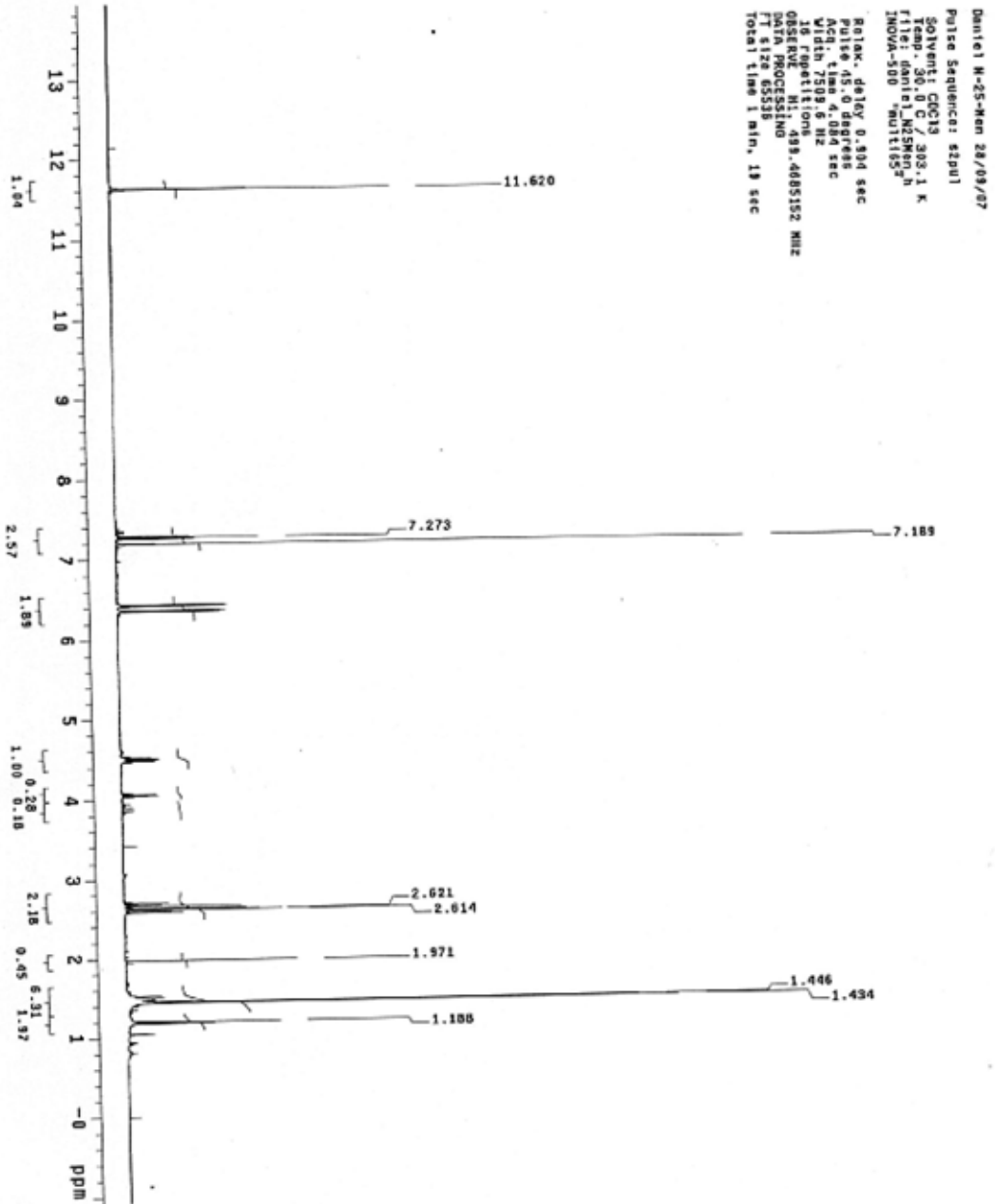


Figura 33. Espectro de RMN-¹H da fração 25 do produto de BTF do mentol em 5 dias.

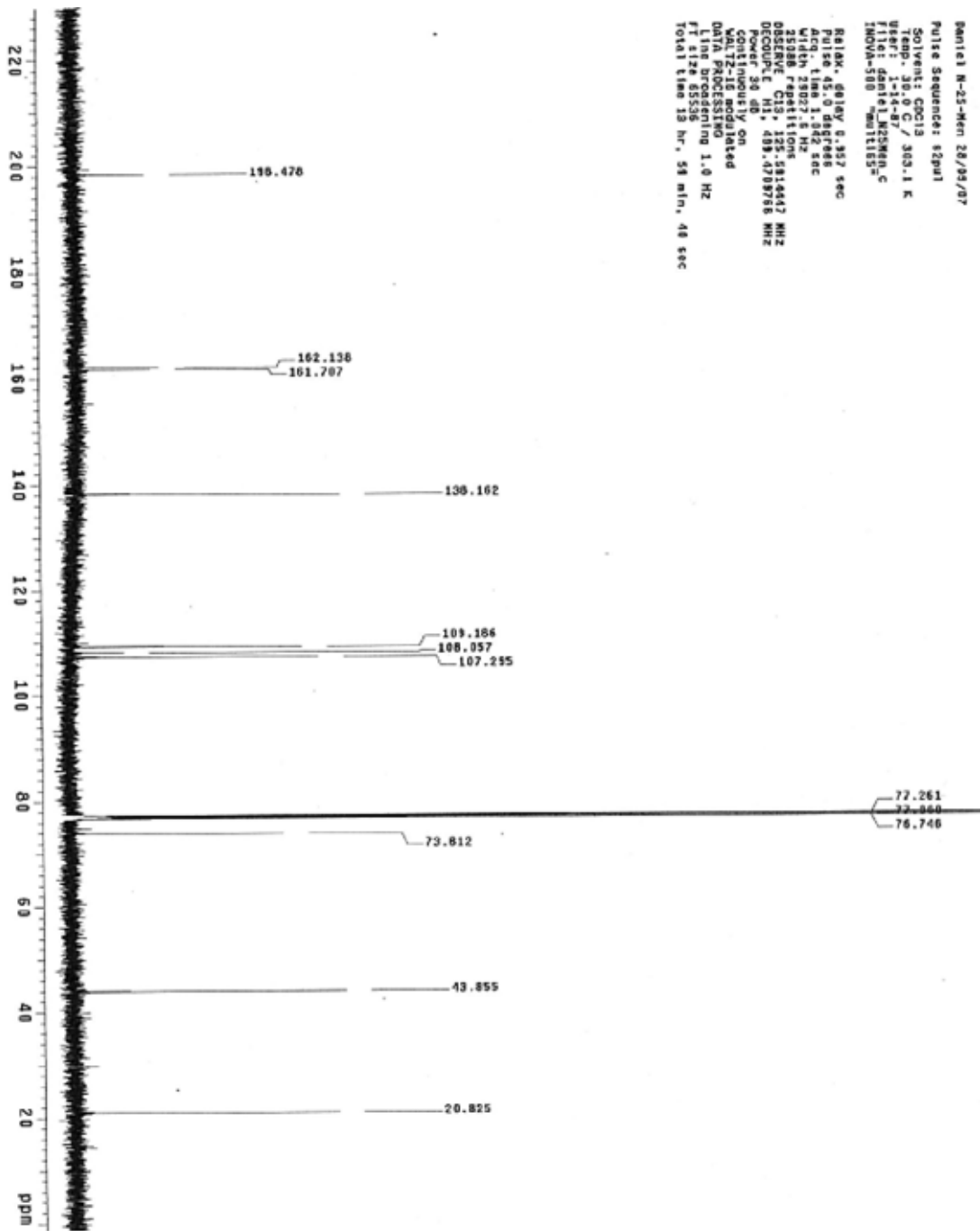
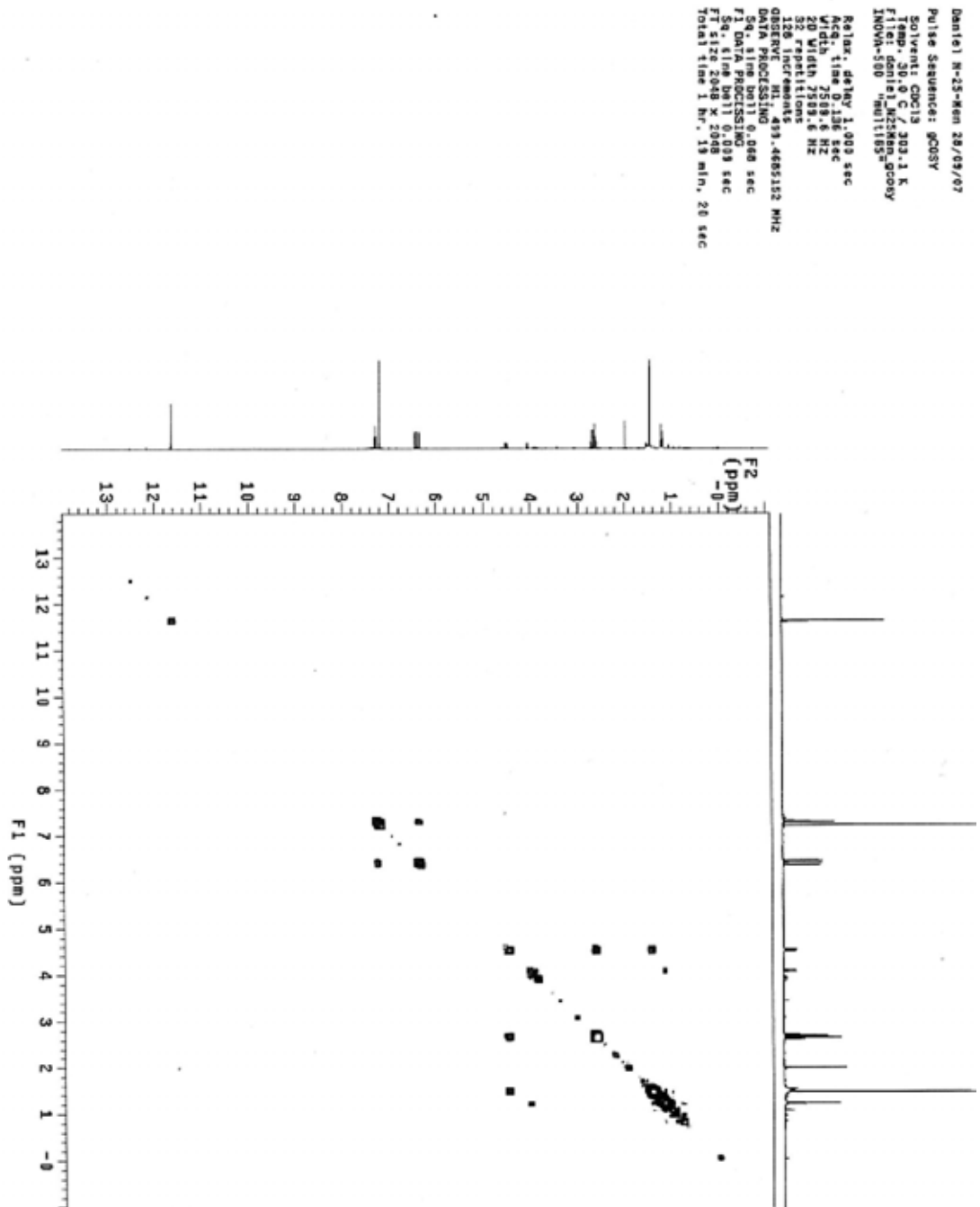


Figura 34. Espectro de RMN-¹³C da fração 25 do produto de BTF do mentol em 5 dias.



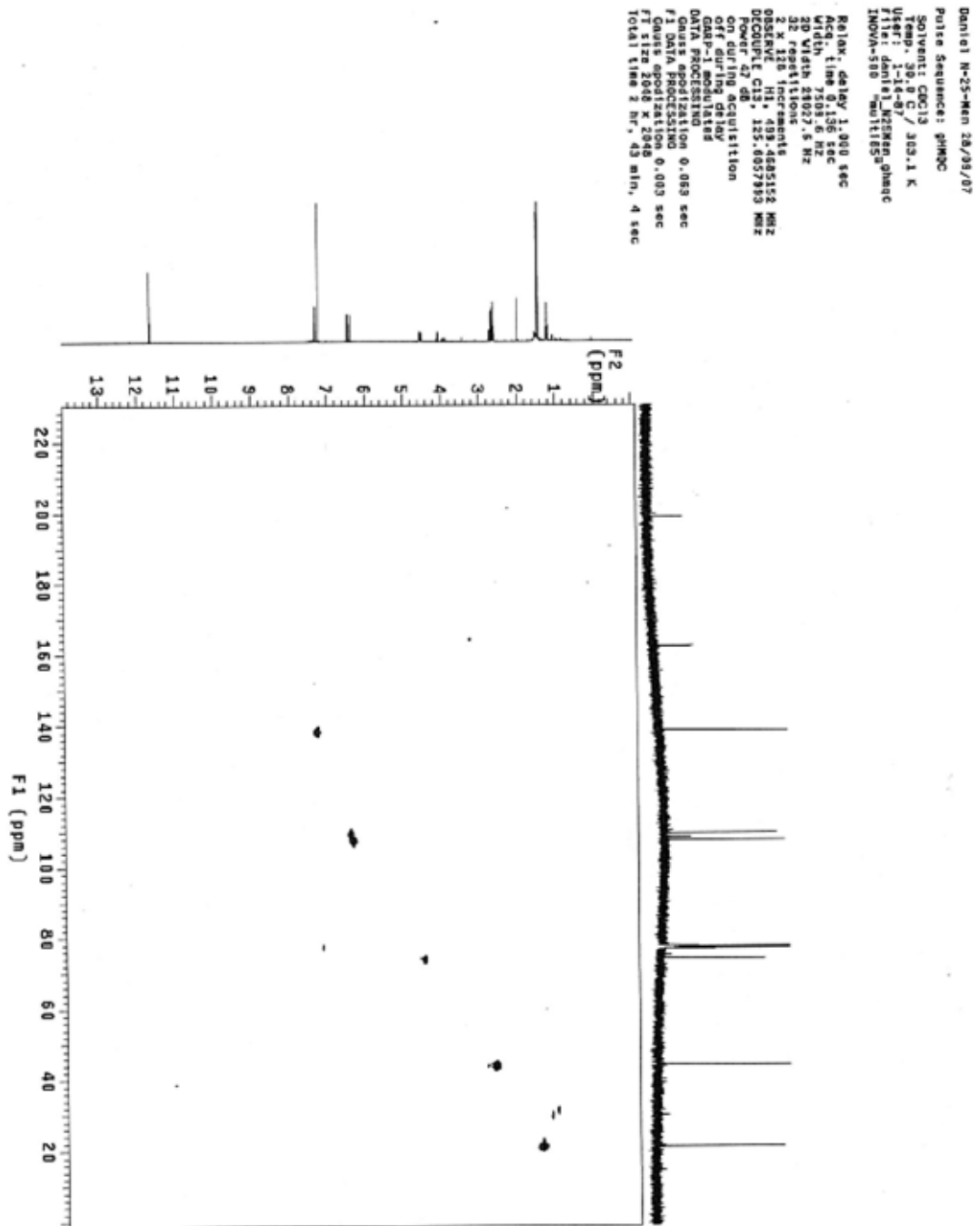


Figura 36. Espectro bidimensional (gHQC) da fração 25 do produto de BTF do mentol em 5 dias.

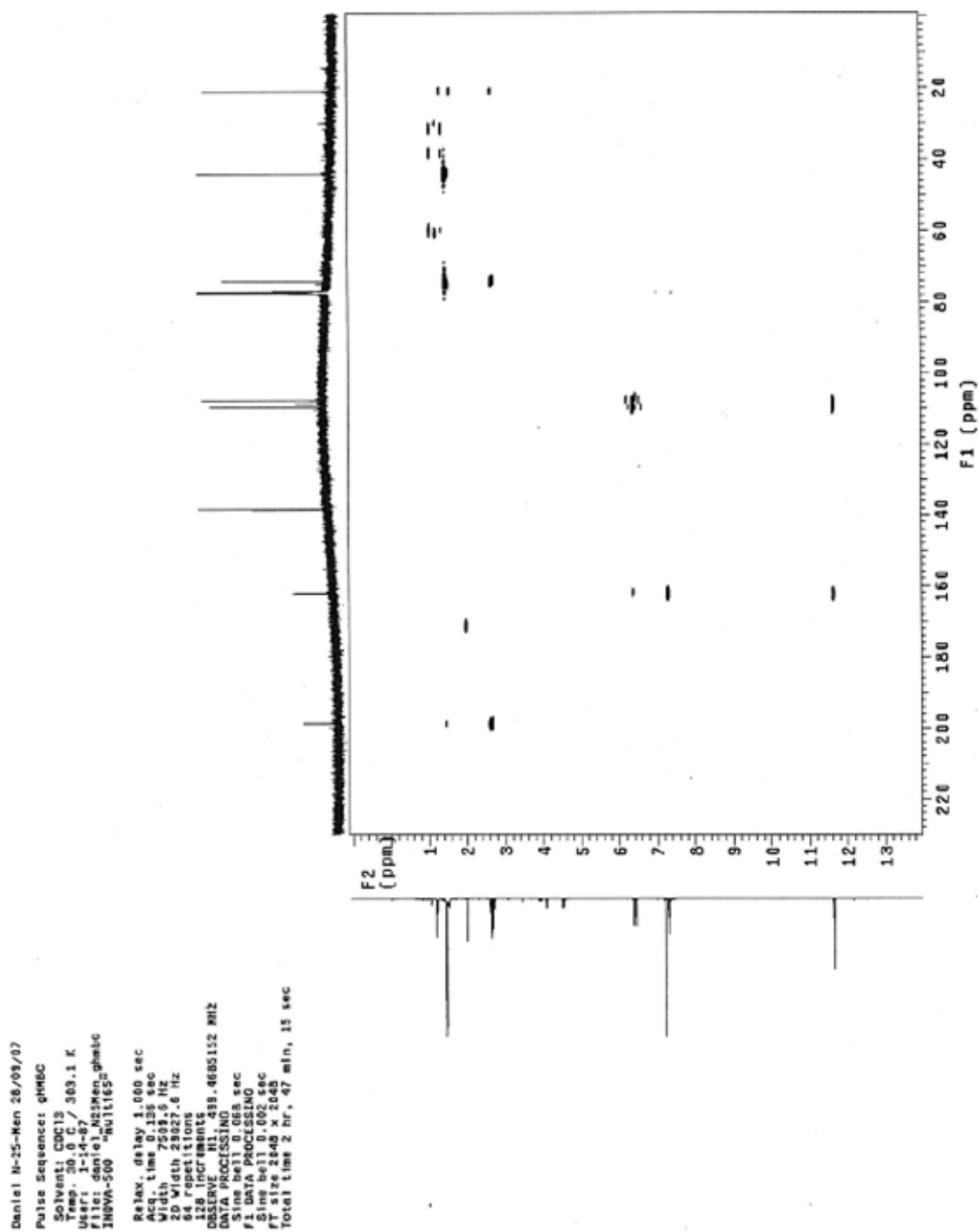


Figura 37. Espectro bidimensional (gHMBC) da fração 25 do produto de BTF do mentol em 5 dias.

ANEXO IV. Resultados da análise da biotransformação da cânfora.

- CLAE-uv.

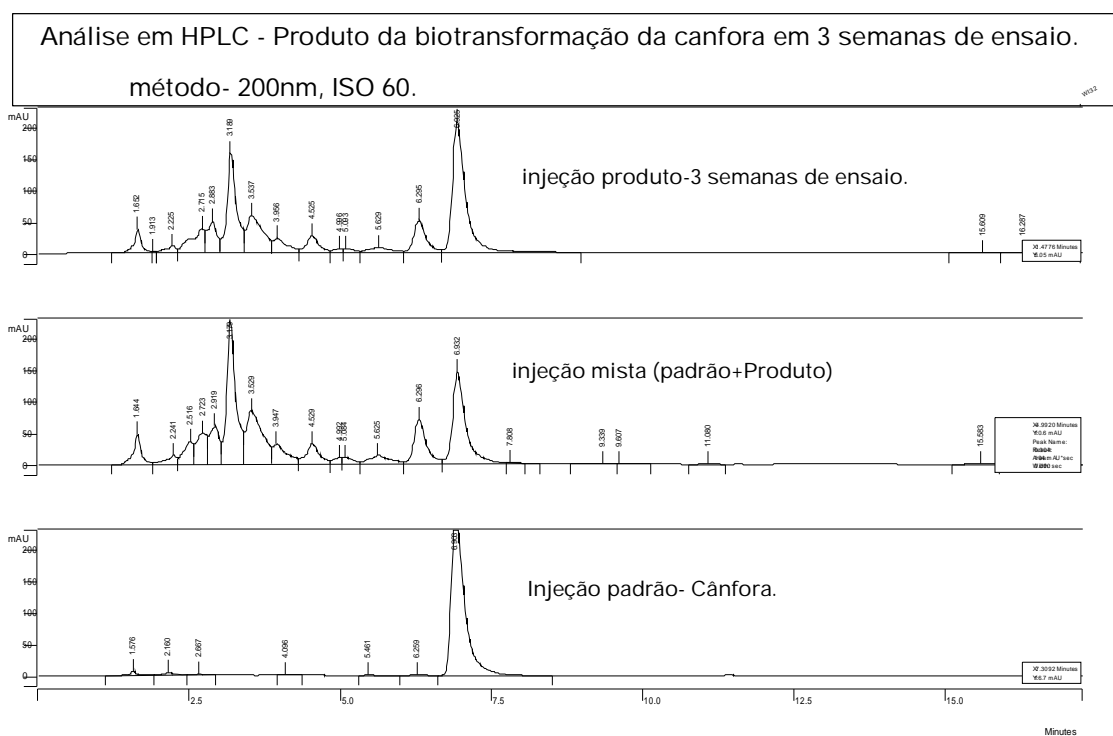


Figura 38. Cromatograma CLAE-UV – do padrão e do produto de BTF com 5 dias de ensaio.

• CG/MS

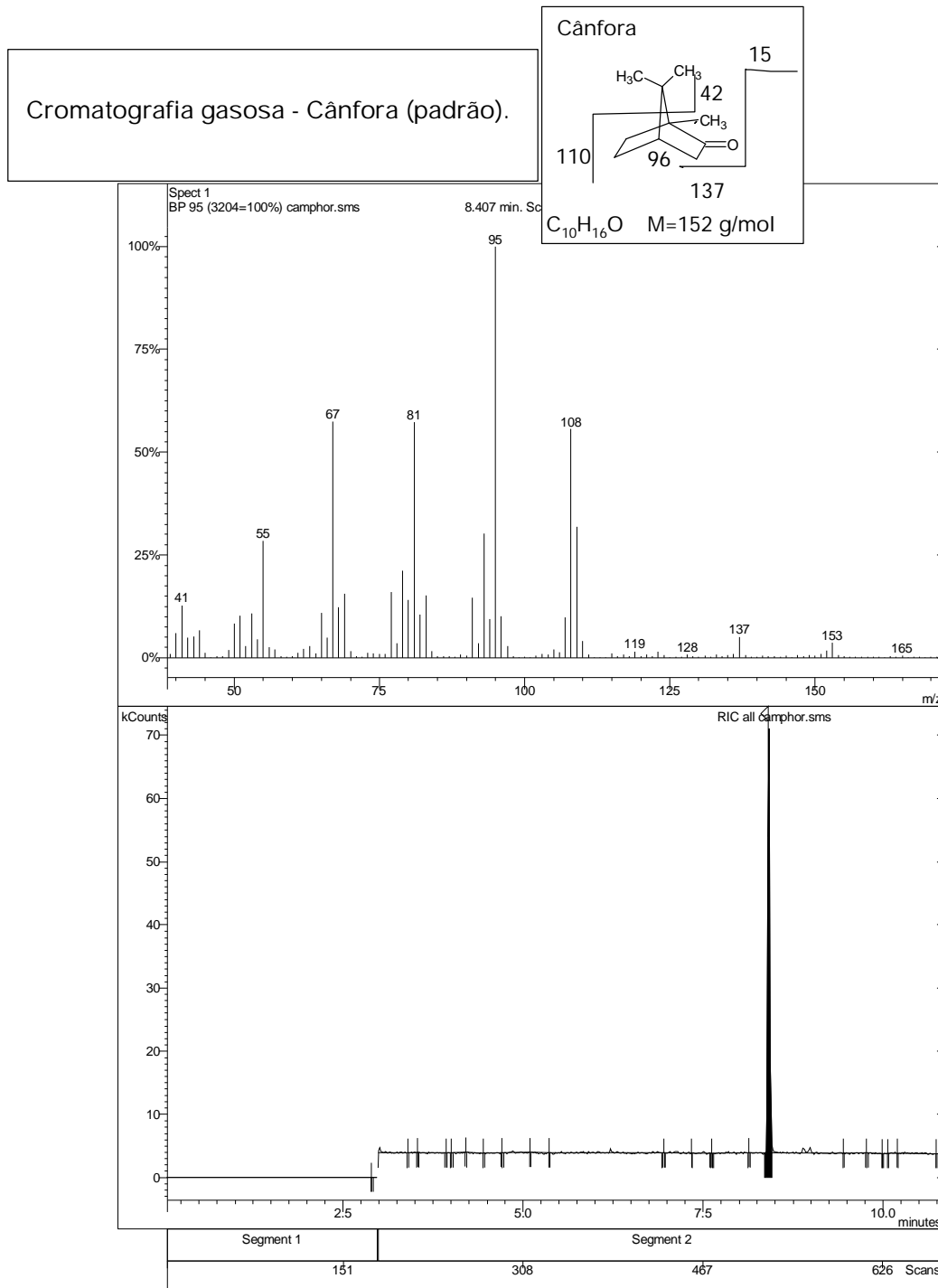


Figura 39. Cromatograma CG/MS do padrão da cânfora.

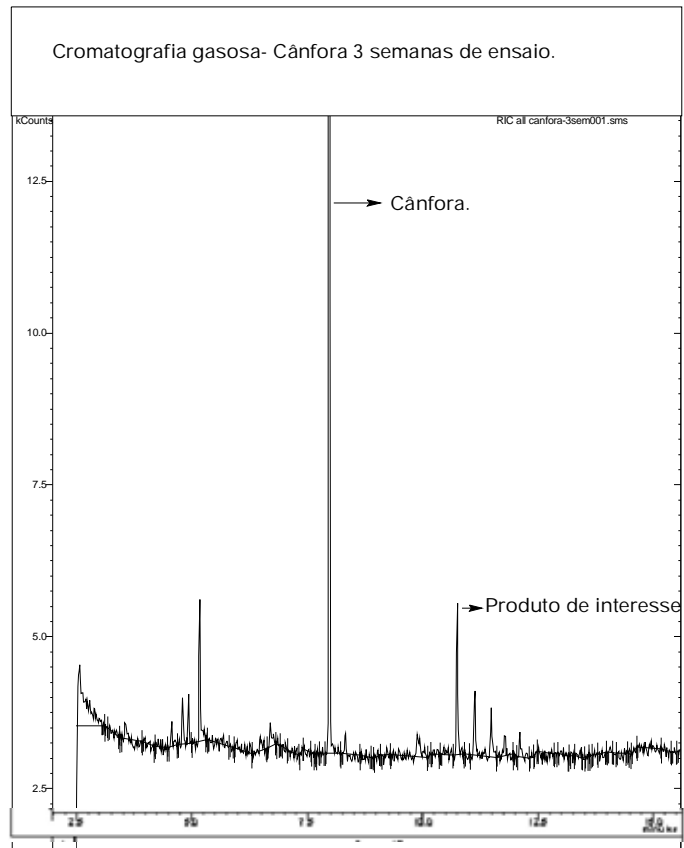


Figura 40. Cromatograma CG/MS do extrato da cânfora (3 semanas).

- RMN- H^1

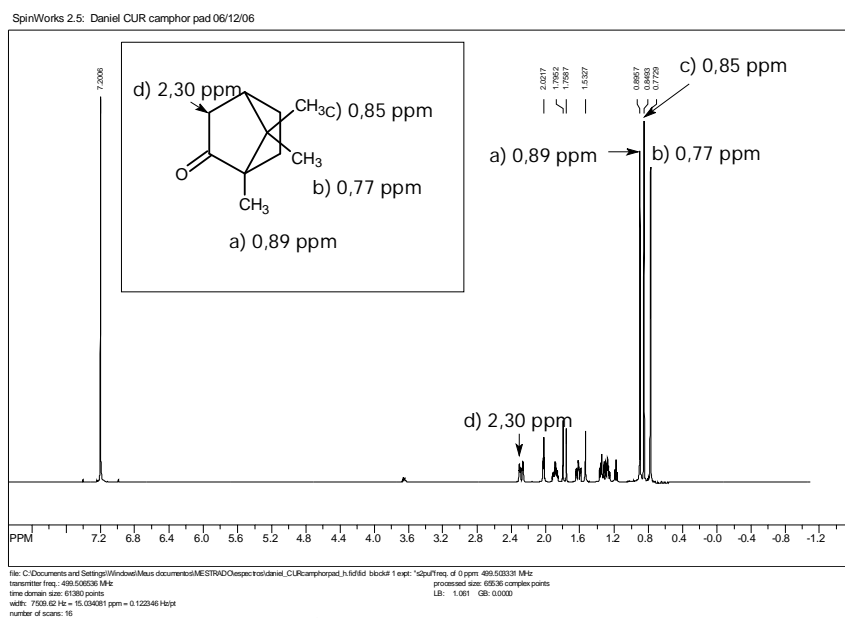


Figura 41. Espectro RMN 1H (500 MHz, $CDCl_3$) do padrão cânfora.

- Fração 12 - Cânfora.

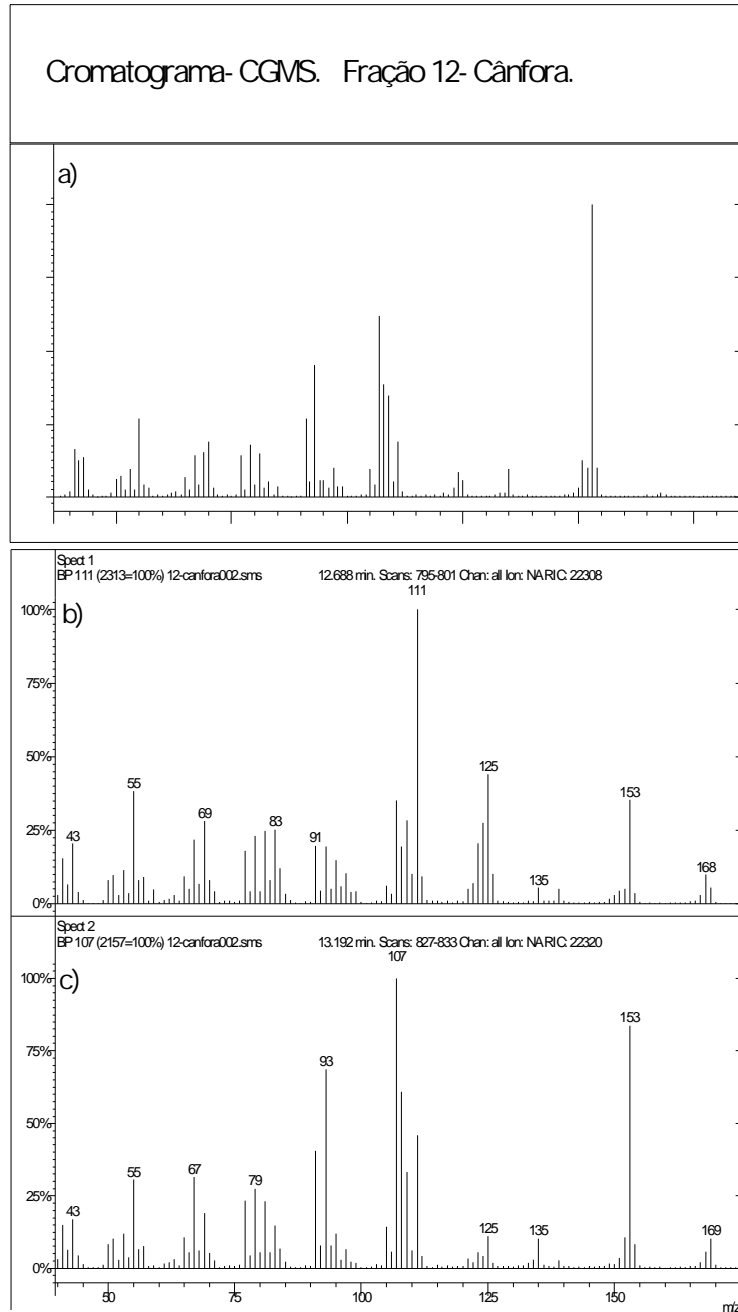


Figura 42. Cromatograma CG/MS da fração 12 do produto de BTF da cânfora em 3 semanas.

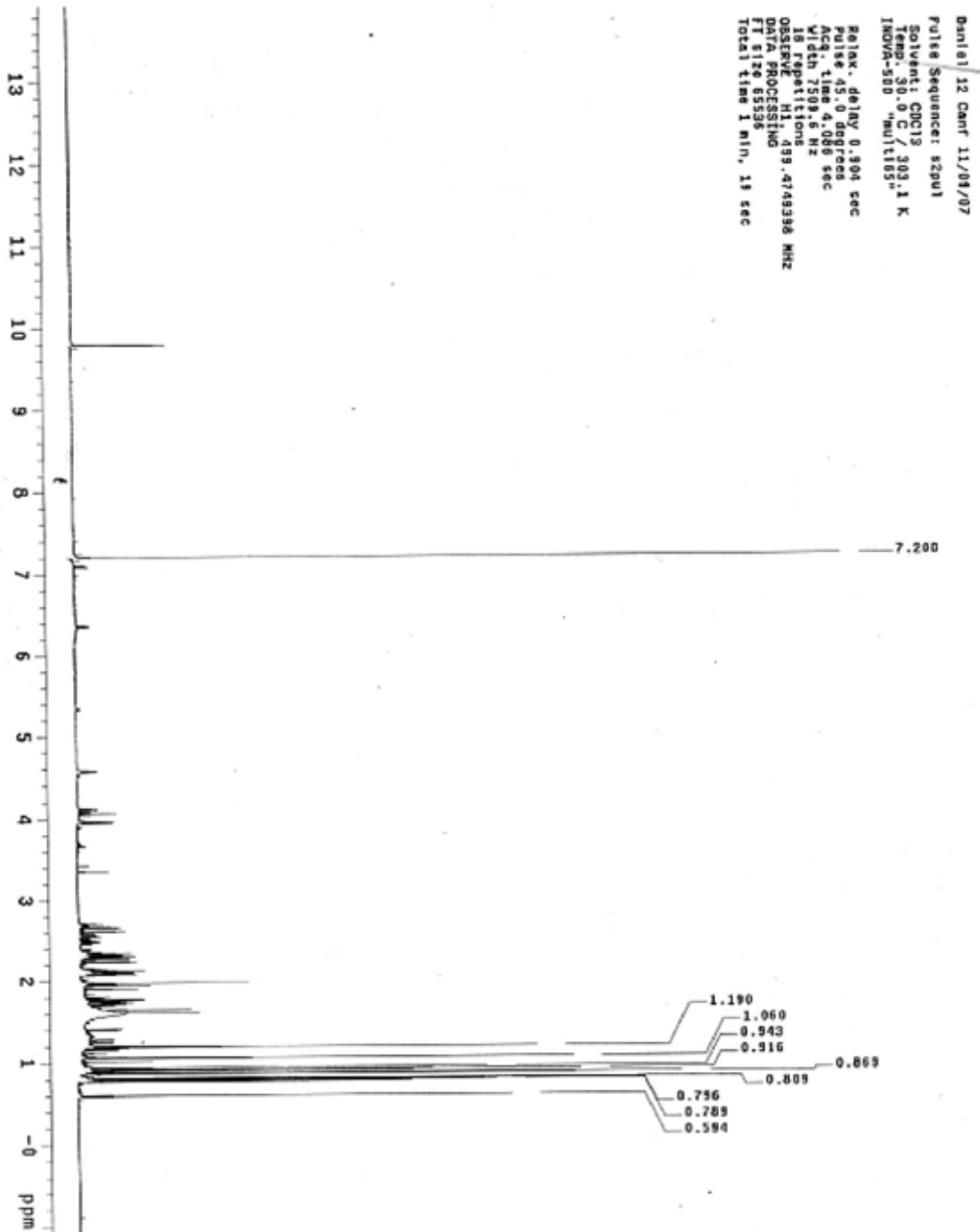


Figura 43. Espectro de RMN-¹H da fração 12 do produto de BTF da cânfora 3 semanas.

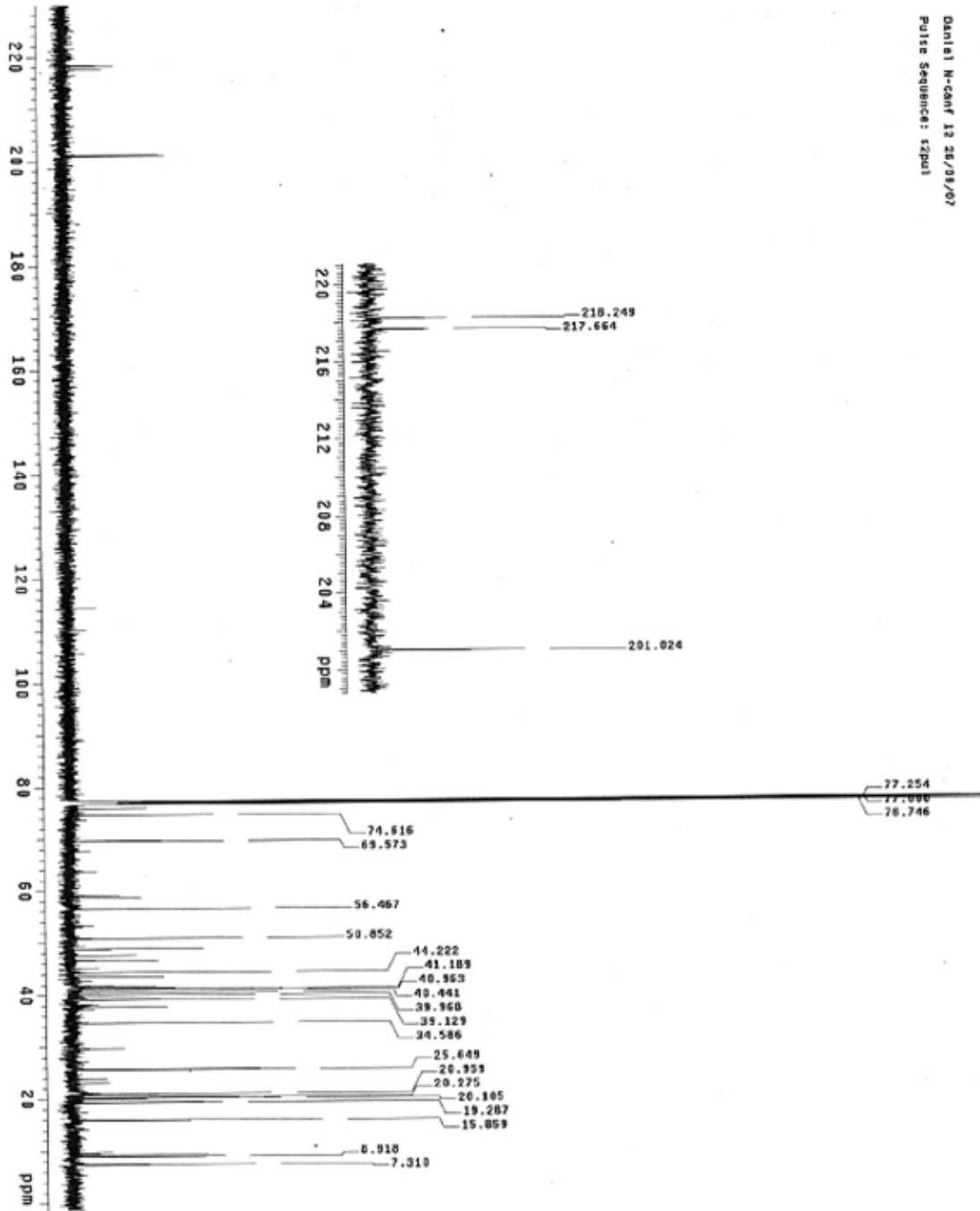


Figura 44. Espectro de RMN- ^{13}C da fração 12 do produto de BTF da cânfora 3 semanas.

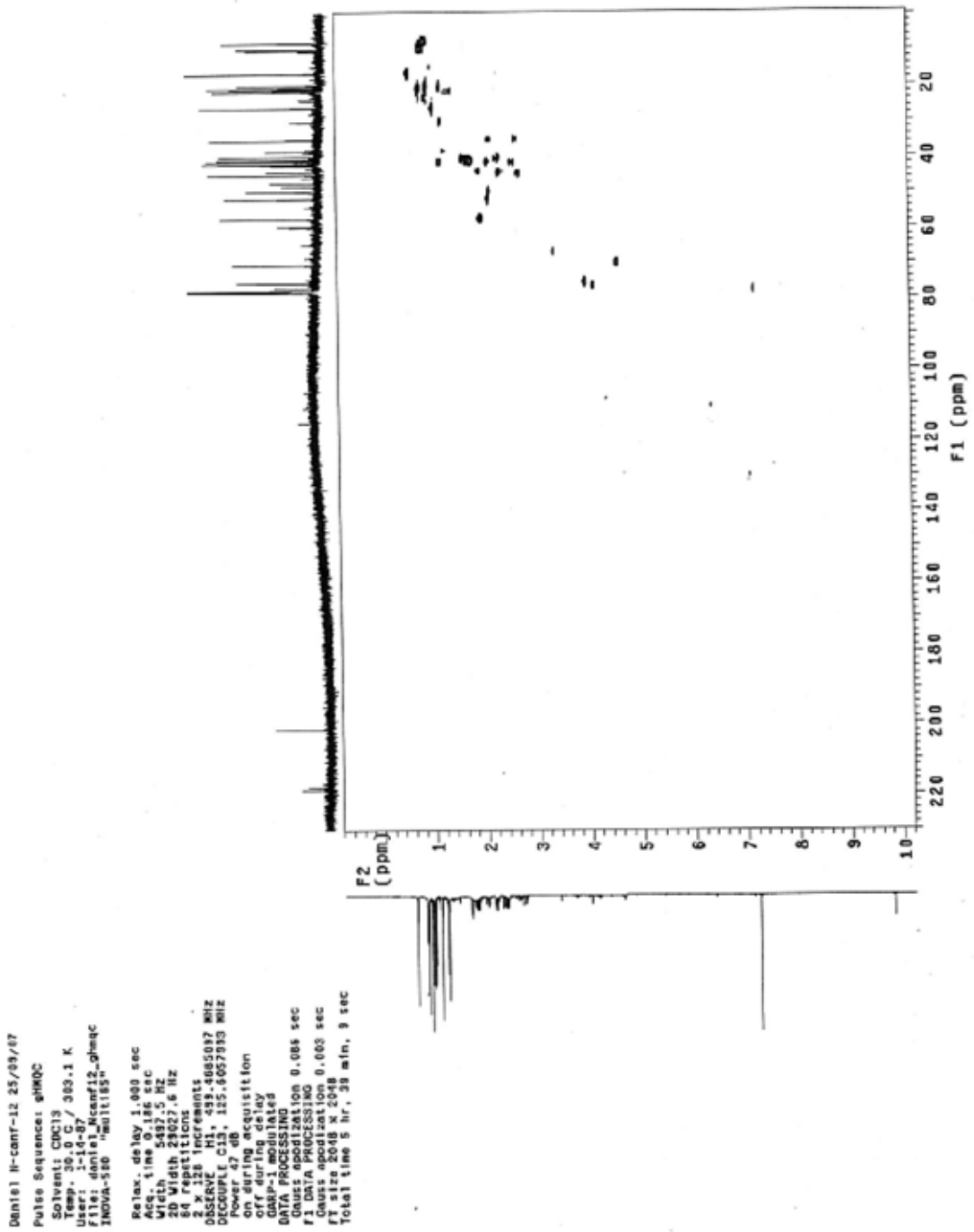


Figura 45. Espectro bidimensional (gHMQC) da fração 12 do produto de BTF da cânfora 3 semanas.

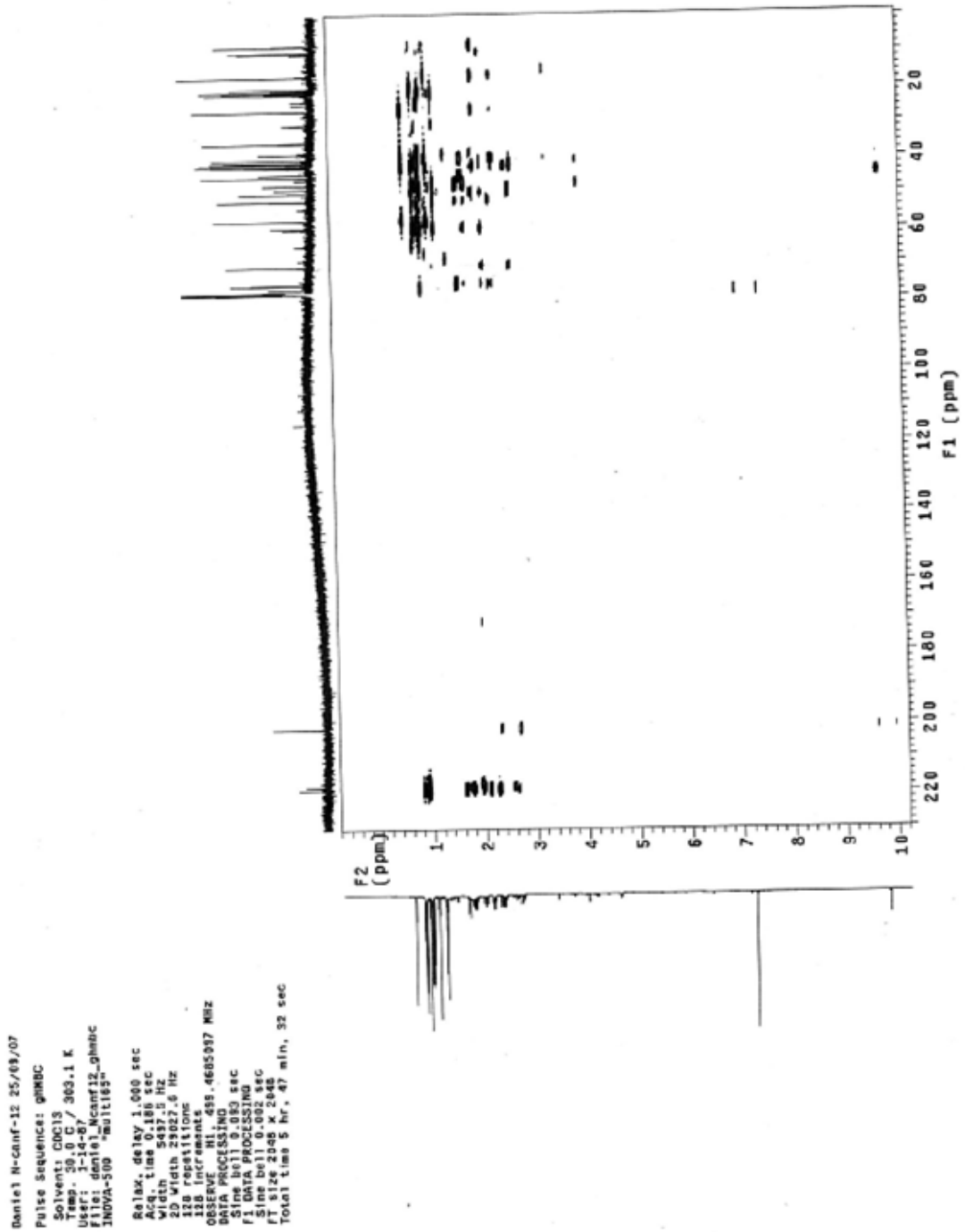


Figura 46. Espectro bidimensional (gHMBC) da fração 12 do produto de BTF da cânfora 3 semanas.

Referências

ABRAHAM, W. R.; STUMPF, B.; KIESLICH, K. Microbial transformations of terpenoids with 1-p-menthene skeleton. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 24, p. 24-30, 1986.

ANDREWS, J. H. ; HIRANO, S. S. **Microbial ecology of leaves**. New York: Springer-Verlag, 1991.

ARRUDA, A. L. A.; MARQUES, M. R.; LIMA, D. P.; BEATRIZ, A. π -Face selectivity from Bioreductions of 2-endo-substituted norbornan-7-ones by **Beauveria densa** and **Curvularia lunata**. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 3, p. 1-6, 2006.

AZERAD, R. Microbial models for drug metabolism. In: _____. **Advances in biochemical engineering biotechnology**. New York: Springer-Verlag, 1998. p. 169-218.

AZEVEDO, J. L. Microrganismos endofíticos In: MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. (Ed.). **Ecologia microbiana**. Jaguariúna: Embrapa-CNPMA 1998, Cap. 4, p. 116-137.

BALANDRIN, M. F.; KINGHORN, A.; FARNSWORTH, N. R. Plant-derived natural-products in drug discovery and development: an overview. **Acs Symposium Series**, v. 534, p. 2-12, 1993.

BARREIRO, E. J.; FRAGA, C. A. M. Cardiotonic drugs: history and perspectives of an old and important class os therapeutic agents. **Química Nova**, v. 19, n. 2, p. 182-189, 1996.

BILLS, G. F. Analyses of microfungual diversity from a users perspective. **Canadian Journal of Botany**, v.73, p.S33-S41, 1995.

BLAIR, M. Facile methods for the separation of cis and trans diastereomers of limonene 1,2 oxide and convenient routes to diequatorial and diaxial 1,2 diols. **Synthesis**, v. 10, p. 1523-1527, 2007.

BRÁS, H. de; OLIVEIRA, R.; STRAPASSON, A. Biotransformation of the Monoterpene, Limonene, by *Fusarium verticillioides*. *Archives of Biology and Technology*, v. 43, n. 1, p. 11-14, 2000.

CARROLL, G. Fungal endophytes in stems and leaves - from latent pathogen to mutualistic symbiont. *Ecology*, v. 69, n. 1, p. 2-9, 1988.

CHARNEY, W.; HERZOG, H. L. **Microbial transformation of steroids: a handbook**. New York: Academic Press, 1967.

CHATTERJEE, P.; PEZZUTTO, J. M.; KOUZI, S. A. Glucosidation of betulinic acid by *Cunninghamella* species. *Journal Natural Products*, v. 62, p. 761-763, 1999.

CHATTERJEE, T.; BHATTACHARYYA, D. K. Biotransformation of limonene by *pseudomas putida*. *Applied Microbiology Biotechnology*, v. 55, p. 541-546, 2001.

CLARK, D. S. Can immobilization be exploited to modify enzyme activity? *Trends Biotechnology*, v. 12, p. 439-443, 1994.

CZARNIK, A. W. Special issue on combinatorial chemistry. *Accounts of Chemical Research*, v. 29, n. 3, p.112-113, 1996.

DEMYTTENAERE, J. C. R.; VAN BELLEGHEM, K.; DE KIMPE, N. Biotransformation of (R)-(+)- and (S)-(-)- limonene by fungi and the use of solid phase microextraction for screening. *Phytochemistry*, v. 57, p. 199-208, 2001.

DEMYTTENAERE, J.; KIMPE, N. Biotransformation of terpenes by fungi. Study of the pathway involved. *Journal of Molecular Catalysis B. Enzymatic*, v. 11, p. 265-270, 2001.

DRACZYNSKA, L. B. Oxidation of selected p-menthane derivatives by means of *Armilaria mellea* (Honey fungus), a parasite of woodlands. *Journal Basic Microbiology*, v. 27, p. 191-196, 1987.

DUETZ, W. A.; BUWMEESTER, H.; BEILEN, J. B. V. Biotransformation of limonene by bacteria, fungi, yeast, and plants. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 61, p. 269-277, 2003.

FABER, K. **Biotransformations in organic chemistry: a textbook**. 3rd ed. Berlin: Springer, 1997. Cap. 2.

FERNANDEZ, M. D. E.; NOYOLA, S. N.; ROSSMANN, M. S.; EDWARDS. Cutaneous phaeohyphomycosis caused by *Curvularia lunata* and a review of *Curvularia* infections in pediatrics. **Pediatric Infectious Disease Journal**, v. 18, p. 727-731, 1999.

FURUYA, T.; ORIHARA, Y.; MIYATAKE, H. Biotransformation of (-)-Menthol by *Euca/yptusperriniana* Cultured Cells, **Journal of the Chemical Society Perkin Transactions**, v. 24, p.1711-1719, 1989

GARDNER, W. A.; McCOY, C. W. Insecticides and herbicides. In: FINKELSTEIN, D. B.; BALL, C. **Biotechnology of filamentous fungi: technology and products**. Boston: Butterworth-Heinemann, 1992. p.335-359.

GRAY, L. E. Production and toxicity of 2,3-dihydro-5-hydroxy-2 methyl-4H-1-benzopyran-4-one by *Thialophoa gregata*. **Phytochemistry**, v. 50, n. 8, p. 1337-1340, 1999.

GULLO, V. P. **The discovery of natural products with therapeutic potential**. Boston: Butterworth-Heinemann, 1994.

HAWKSWORTH, D. L. The magnitude of fungal diversity: the 1,5 million species estimate revisited. **Mycological Research**, v. 105, p. 1422-1432, 2001.

HEIZIR, F. C.; ADRIANO, A. M.; JÚLIO, C. S. Modificação de óleos e gorduras por biotransformação. **Química Nova**, v. 27, n. 1, p. 146-156, 2004.

HENCH, P. S.; KENDALL, E. C.; SLOCUMB, C. H.; POLLEY, H. F. The effect of a hormone of the adrenal cortex (17-hydroxy-11-dehydrocorticosterone: compound E). **Proceeding Staff Meet Mayo Clinic**, v. 24, p. 181-197, 1949.

HOLLAND, H. L. **Organic synthesis with oxidative enzymes**. Weinheim: VCH Publishers, 1992. p. 255-311.

HOOG, G. S.; GUARRO, J.; GENE, M. J.; FIGUERAS, **Centraalbureau voor Schimmelcultures: Atlas of Clinical Fungi**. 2nd ed. Utrecht]: Universitat Rovira, 2000. v.1.

LEHMAN, L. R.; STEWART, J. D. Filamentous Fungi: potentially useful catalysts for the biohydroxylations of non-activated carbon centers. **Current Organic Chemistry**, v. 5, p. 439-470, 2001.

MASUREKAR, P. S. Therapeutic metabolites. In: FINKELSTEIN, D. B.; BALL, C. **Biotechnology of filamentous fungi: technology and products**. Boston: Butterworth-Heinemann, 1992. p. 241-301.

MATTISON, J. E.; McDOWELL, L. L.; BAUM, R. H. Cometabolism of selected monoterpenoids by fungi associated with monoterpene containing plants. **Bacteriological Proceedings**, v. 141, 1971.

MIYAZAWA, M.; KAWAZOE, H.; HYAKUMACHI, M. Biotransformation of l-menthol by soil-borne plant pathogenic fungi (*Rhizoctonia solani*). **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 77, n.1, p. 21-24, 2002.

MILLER, J. D.; TRENHOLM, H. L. **Mycotoxins in grain: compounds other than Aflatoxin**. Minnesota: Esgan Press, 1991.

MITSUO, M.; YOHEI, M. Biotransformation of (1R)-(+)- and (1S)-(-)-camphor by the larvae of common cutworm (*Spodoptera litura*). **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 27, n. 2-3, p. 83-89, 2004.

PETERSON, D. H.; MURRAY, H. C. J. Microbial oxygenation of steroids at carbon 11. **Journal of the American Chemical Society**, v. 74, p. 741-871, 1952.

ROBERTS, S. M.; TURNER, N. J.; WILLETS, A. J.; TURNER, M. K. **Introduction to biocatalysis using enzymes and microorganisms**. New York: Cambridge University Press, 1995.

SAKUDA, Y. Oxidation of limonene with selenium dioxide. **Bulletin of the Chemical Society of Japan**, v. 42, p. 3348, 1969.

SHAW, N. M.; KAREN, T. R.; KIENER, A. Lonza: 20 Years of biotransformation. **Advanced Synthesis Catalysis**, v. 345, n. 4, p. 425-435, 2003.

SILVA SANTOS, A. ; BIZZO, H. R.; ANTUNES, A. M. S.; D'AVILA, I. A. A produção patentária de óleos essenciais e compostos terpênicos para o desenvolvimento tecnológico e industrial. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 8, n. 4, p. 14-22, 2006.

SMITH, R, V.; ROSAZZA, J. P. Microbial models of mamalian metabolism. **Archives Biochemistry Biophysics**, v. 2, p. 551-558, 1974.

STOUDT, T. H. The microbiological transformation os steroids. **Advanced Applied Microbiology**, p. 190-195, 1960.

ST-GERMAIN, G.; SUMMERBELL, R. **Identifying Filamentous Fungi: a clinical laboratory handbook**. [S.l.]: Belmont Star Publishing, 1996.

TAN, Q.; DAY, D. F. Organic co-solvent effects on the bioconversion of (R)-(+)-limonene para (R)-(+)-alpha-terpineol. **Process Biochem**, v. 33, p. 755-761, 1998.

TELES, H. L. **Estudo químico de metabólitos secundários produzidos por fungos endofíticos e micoparasitas**. 2005. 30 f. Tese (Doutorado em Química) – Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2005.

TORI, K.; TAKAMIZAWA, A. Nuclear magnetic resonance studies of bridge ring system signals of methyl groups in bornane derivatives. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, v. 12, n. 8, p. 924-937, 1964.

VAN DER WERF, M. J.; KEIJZER, P. M.; VAN DER SCHAFT, P. H. **Xanthobacter** sp. C20 contains a novel bioconversion pathway for limonene. **Journal Biotechnology**, v. 84, p. 133, 2000.

VAN DER WERF, M. J.; SWARTS, H. J.; DE BONT, J. A. M. **Rhodococcus erythropolis** DCL 14 contains a novel degradation pathway for limonene. **Applied Environmental Microbiology**, v. 65, p. 2092-2102, 1999.

VEZINA, C.; SEHGAL, S. N.; SINGH, K. – Transformation of steroids by spores of microorganinms. **Applied and Environmental Microbiology**, v.11, n.1, p. 50-57, 1963.

ZHI, L. D. C.; MAARTEN, F. H.; BERNARD, W. Enantioselective Trans Dihydroxylation of Nonactivated C-C Double Bonds of Aliphatic Heterocycles with *Sphingomonas* sp. HXN-200. **Journal of Organic Chemistry**, v. 68, n. 22, p. 8599 -8606, 2003.