

MÁRCIA CRISTINA DOS SANTOS

BIOTRANSFORMAÇÃO DO ISOESTEVIOL PELO
Penicillium chrysogenum* E *Rhizopus arrhizus

Dissertação apresentada como requisito parcial
à obtenção do grau de Mestre. Curso de Pós-
Graduação em Química, Setor de Ciências
Exatas, Universidade Federal do Paraná.

CURITIBA
1998

TERMO DE APROVAÇÃO

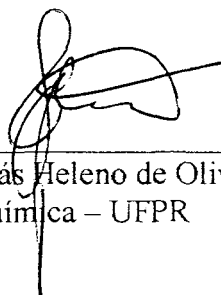
BIOTRANSFORMAÇÃO DO ISOESTEVIOL PELO
Penicillium chrysogenum e Rhizopus arrhizus

por


MÁRCIA CRISTINA DOS SANTOS

Dissertação aprovada como requisito
parcial para obtenção do grau de
Mestre no Curso de Pós-Graduação em Química,
pela Comissão formada pelos Professores:

Orientador:



Prof. Dr. Brás Heleno de Oliveira
Deptº de Química – UFPR



Profª Drª Maria da Graça Nascimento
Deptº de Química – UFSC



Prof. Dr. Álvaro Luiz Mathias
Deptº de Química - UFPR

Curitiba, 29 de setembro de 1998.

DEDICATÓRIA

Este trabalho é dedicado aos meus pais Roberto e Josemary e aos meus irmãos Júnior e Daniel pelo apoio e incentivo.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Prof. Dr. Brás Heleno de Oliveira por sua dedicação e interesse dados ao desenvolvimento deste trabalho, fundamentais para sua realização.

A todos os professores do Departamento de Química que ministraram as disciplinas realizadas neste curso de pós-graduação e àqueles que se dispuseram a ajudar neste trabalho.

Ao Prof. Dr. Philip Gorin e ao Sr. César Tischer do Laboratório de Carboidratos do Setor de Ciências Biológicas da UFPR e ao Departamento de Química da Universidade Estadual de Maringá pela realização dos espectros de ressonância nuclear magnética.

Ao Instituto de Química da Universidade de São Paulo pela realização dos espectros de massa.

Ao Sr. Ângelo R. S. Oliveira do Departamento de Química da UFPR pela realização dos espectros no infravermelho.

Ao Sr. Marcelino, secretário da Pós-Graduação pela atenção dada aos assuntos burocráticos.

Aos colegas do laboratório de produtos naturais, Rodrigo, Sirléia, Elizabete, Valéria, Paulo César pelo apoio prestado na fase experimental.

E aos funcionários dos laboratórios do Departamento de Química pela atenção.

SUMÁRIO

| | |
|---|-------------|
| TERMO DE APROVAÇÃO | II |
| DEDICATÓRIA | III |
| AGRADECIMENTOS | IV |
| SUMÁRIO | V |
| LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS | VI |
| LISTA DE FIGURAS | VII |
| RESUMO | VIII |
| ABSTRACT | IX |
| INTRODUÇÃO | 10 |
| BIOTRANSFORMAÇÃO DE COMPOSTOS ORGÂNICOS | 10 |
| O PROCESSO DE BIOTRANSFORMAÇÃO | 15 |
| DITERPENÓIDES | 17 |
| BIOTRANSFORMAÇÃO DE BAIERANOS | 19 |
| ISOESTEVIOL | 21 |
| FUNGOS | 24 |
| OBJETIVOS | 25 |
| MATERIAIS E MÉTODOS | 26 |
| DETERMINAÇÃO DAS CURVAS DE CRESCIMENTO E PH | 27 |
| ENSAIOS PRELIMINARES DE BIOTRANSFORMAÇÃO | 27 |
| ESCALA PREPARATIVA | 28 |
| DERIVATIZAÇÃO COM DIAZOMETANO | 28 |
| RESULTADOS E DISCUSSÃO | 30 |
| MICRORGANISMOS | 30 |
| ENSAIOS PRELIMINARES DE BIOTRANSFORMAÇÃO | 33 |
| ESCALA PREPARATIVA DE BIOTRANSFORMAÇÃO | 33 |
| PRODUTO DE BIOTRANSFORMAÇÃO PELO P. CHRYSOGENUM | 33 |
| PRODUTO DE BIOTRANSFORMAÇÃO PELO R. ARRHZUS | 38 |
| CONCLUSÕES | 44 |
| ANEXOS | 46 |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 61 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

°C - grau Celsius

CCD - cromatografia em camada delgada

CDCl₃ - clorofórmio deuterado

cm - centímetros

CMI - Commonwealth Micological Institute

d - duplete

DEPT - intensificação do sinal sem distorção por transferência de polarização

DMSO - dimetilsulfóxido

g - grama

g/L - grama por litro

Hz - hertz

man. - manométrica

mg - miligrama

mL - mililitro

mm - milímetro

m/z - razão massa/carga

P.D.A. - meio de cultura sólido composto de batata, dextrose e agar
(mg/L)

R_f - índice de retenção

RMN¹³C - ressonância nuclear magnética de carbono-13

RMN¹H - ressonância nuclear magnética de hidrogênio-1

s - singlete

t - triplete

v_{máx} - número de onda máximo

δ - deslocamento químico (ppm)

LISTA DE FIGURAS

| <i>Número</i> | <i>Página</i> |
|--|---------------|
| Figura 1: Estrutura do ácido giberélico (9) | 17 |
| Figura 2: Estruturas básicas de caureno e baiereno | 18 |
| Figura 3: Estruturas de alguns caurenóides biologicamente ativos | 18 |
| Figura 4: Estrutura do Isoesteviol | 21 |
| Figura 5: Curva de crescimento do <i>P. chrysogenum</i> | 30 |
| Figura 6: Curva de crescimento do <i>R. arrhizus</i> | 31 |
| Figura 7: Curva de pH da cultura do <i>P. chrysogenum</i> | 32 |
| Figura 8: Curva de pH da cultura do <i>R. arrhizus</i> | 32 |
| Figura 9: Formação de ligação de hidrogênio em ácidos carboxílicos | 34 |
| Figura 10: Hidrogênios geminais magneticamente não equivalentes | 36 |
| Figura 11: Espectro ampliado de RMN ¹ H do metil éster 7β-hidroxiioesteviol, em CDCl ₃ | 41 |
| Figura 12: Espectro ampliado de RMN ¹ H do 7α-hidroxiioesteviol, em CDCl ₃ | 41 |
| Figura 13: Representação da estereoquímica do metil éster 7β-hidroxiioesteviol e 7α-hidroxiioesteviol | 42 |

RESUMO

O trabalho descrito nesta dissertação refere-se à biotransformação do isoesteviol pelos fungos *Penicillium chrysogenum* e *Rhizopus arrhizus*. O isoesteviol é um composto obtido da hidrólise química do esteviosídeo, um glicosídeo diterpenóide extraído da *Stevia rebaudiana*.

Os experimentos de biotransformação com o *P. chrysogenum* resultaram no isolamento do 17-hidroxiisoesteviol. Este é o primeiro relato de funcionalização de um grupo metila de um diterpenóide tetracíclico por *P. chrysogenum*. A importância deste resultado é comparável a produção industrial do norpatchoulenol tendo, como uma das etapas a hidroxilação da metila do álcool “patchouli” pelo *Penicillium rubrum*.

O 7 β -hidroxiisoesteviol foi obtido nos experimentos com o *R. arrhizus*. Este resultado foi comparado com a obtenção anterior do seu enantiômero, o 7 α -hidroxiisoesteviol, através de biotransformação do mesmo substrato por outro fungo. Nossos resultados demonstraram a possibilidade da obtenção de novos compostos através do uso de fungos adequados.

ABSTRACT

This dissertation describe the biotransformation of isosteviol by the fungi *Penicillium chrysogenum* and *Rhizopus arrhizus*. Isosteviol is a compound obtained by the chemical hydrolysis of stevioside, which is a diterpenoid glycoside obtained from *Stevia rebaudiana*.

The biotransformation experiments with *P. chrysogenum* produced 17-hydroxiisosteviol, which was isolated. This is the first report of functionalization of a methyl in a tetracyclic diterpenoid by *P. chrysogenum*. The importance of this result is compared with example of industrial production of the norpatchoulenol having the step of hydroxylation of a methyl of the alcohol "patchouli" by *Penicillium rubrum*.

The 7 β -hydroxyisosteviol was obtained with *R. arrhizus*. This result was compared with the obtention of 7 α -hydroxyisosteviol obtained previously by biotransformation of the same substrate by another fungus. Our results shown the possibility of obtaining new compounds using appropriate fungi.

INTRODUÇÃO

INTRODUÇÃO

Biotransformação de Compostos Orgânicos

A biotransformação é um processo pelo qual um composto orgânico é modificado por meio de reações químicas, catalisadas por enzimas. As enzimas podem ser secretadas ou manter-se dentro da célula do microrganismo vivo. A molécula de um determinado composto orgânico pode ser modificada através de transformação funcional acompanhada ou não de degradação do esqueleto carbônico. A transformação química pode ser resultado de uma única reação ou de uma sequência de reações enzimáticas.

As reações enzimáticas geralmente apresentam algumas propriedades que podem ser definidas como características da biotransformação:

- **Reação regioespecífica:** a molécula é atacada em um determinado ponto mesmo existindo outros átomos com as mesmas características .

- **Reação estereoseletiva:** o centro ativo da enzima é capaz de distinguir entre os enantiômeros de uma mistura racêmica fazendo com que a reação ocorra apenas com um dos enantiômeros.

- **Condições brandas:** em geral há uma grande interação entre a molécula e a enzima fazendo com que a energia de ativação seja diminuída e a reação ocorre em condições suaves (temperatura abaixo de 40° C, pH próximo da neutralidade, pressão normal). As condições amenas impedem que ocorra decomposição do produto, requer menor energia e são favoráveis para o desenvolvimento do microrganismo.

- **Abrangência:** Abrange praticamente todos os tipos de reações químicas: oxidação, redução, hidrólise, condensação, isomerização e formação de ligações C-C ou ligações de carbono com heteroátomo.

As características acima podem ser muito úteis na obtenção de alguns produtos difíceis de serem sintetizados por métodos clássicos, os quais muitas

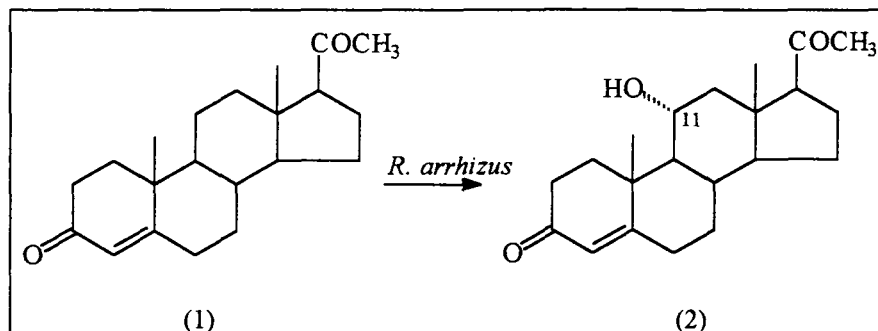
vezes utilizam condições severas de temperatura e pressão incompatíveis com muitas moléculas orgânicas (Faber,1992).

A utilização de microrganismos para modificação de compostos orgânicos é conhecida desde o século passado com aplicações industriais importantes. Como exemplos históricos estão a oxidação do etanol a ácido acético por *Bacterium xylinum* realizada por Pasteur em 1862 e a oxidação de sorbitol a sorbose por *Acetobacter sp* estudada por Bertrand em 1896.

Mais recentemente o interesse pelas biotransformações foi reativado com trabalhos realizados com esteróides. Esteróides são hormônios que exercem várias funções no organismo e são produzidos por algumas glândulas endócrinas. Disfunções das glândulas produtoras desses hormônios levam ao aparecimento de doenças, cujo controle depende da administração aos pacientes dos hormônios que o organismo não produz eficientemente.

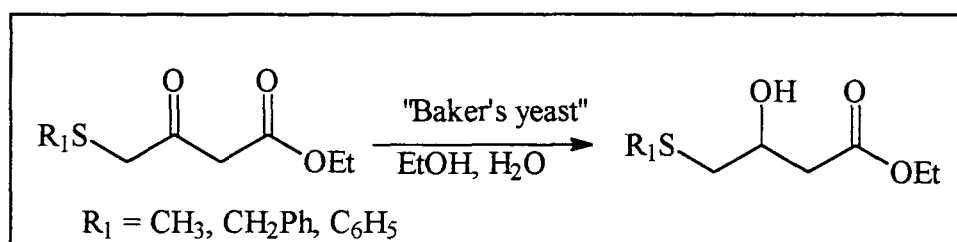
A produção comercial de esteróides para uso terapêutico era, no início, feita através de extração de glândulas de mamíferos. Para atender à crescente demanda foi necessário desenvolver métodos de sínteses, a partir de materiais naturais abundantes com núcleo esteroidal, tais como os esteróides (Hechter *et al*, 1949).

Muitos esteróides comercialmente importantes, como por exemplo os corticosteróides, possuem uma função oxigenada no carbono 11. Entretanto, as fontes naturais abundantes de substâncias com o núcleo esteroidal não possuem o carbono 11 funcionalizado, e os métodos químicos desenvolvidos para hidroxilar aquele carbono eram extremamente ineficientes. Para hidroxilar esta posição através de reações químicas são necessários 31 passos de reação. Isto levou à métodos alternativos de funcionalização de posições não ativadas, que culminou com a descoberta da hidroxilação da progesterona (1) na posição 11 pelo fungo *Rhizopus arrhizus* (Esquema 1) resultando na 11 α -hidroxiprogesterona (2) (Peterson e Murray, 1952), um esteróide utilizado na terapêutica. Este resultado estimulou novos trabalhos com esteróides e derivados, originando um grande volume de informações nesta área.



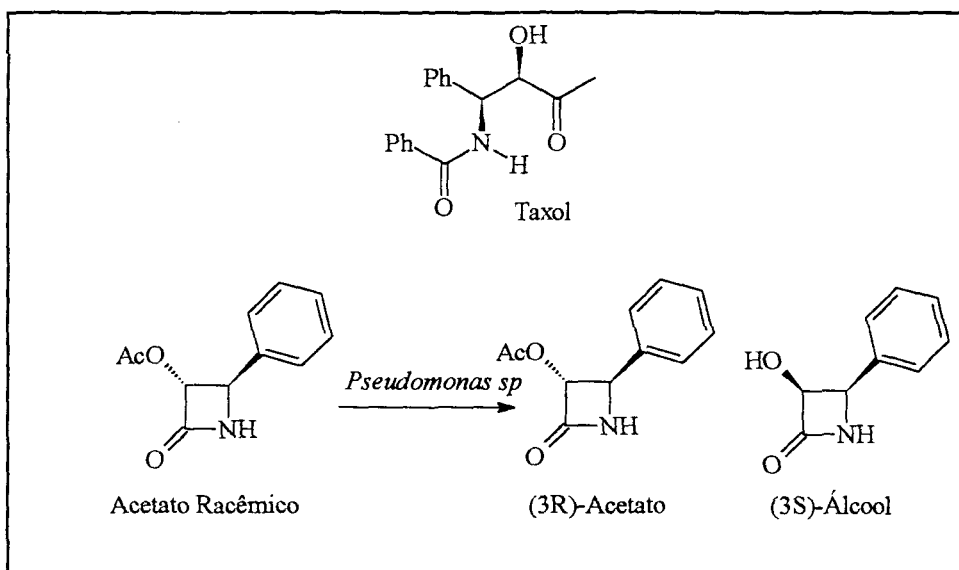
Esquema 1: Biotransformação da progesterona (1) em 11 α -hidroxiprogesterona (2)

O fermento de pão (“baker’s yeast”) é catalisador para algumas reações enzimáticas (Esquema 2), como redução assimétrica de compostos carbonila produzindo intermediários quirais utilizados na obtenção de produtos com importante atividade biológica (Stanley, 1998).



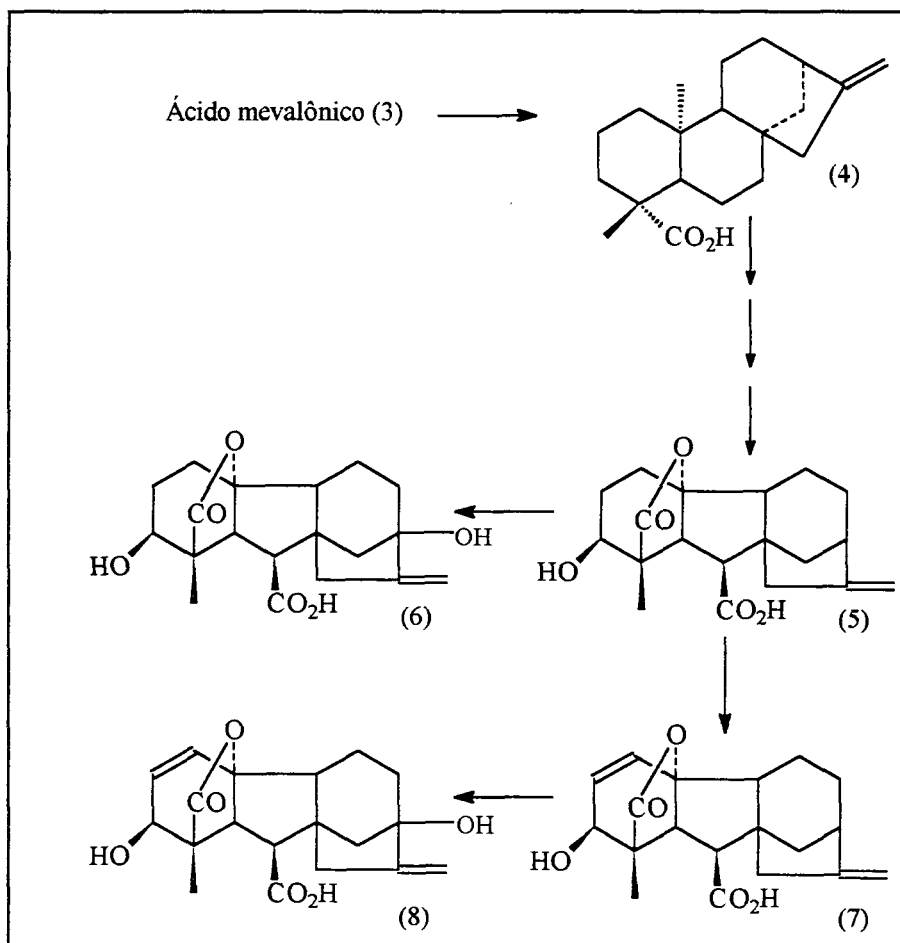
Esquema 2: Redução assimétrica de composto carbonila utilizando-se como catalisador fermento de pão.

O Taxol, um diterpeno policíclico, é um importante produto utilizado no tratamento de vários tipos de cancer. É extraído da casca de árvores da espécie *Taxus*. A porcentagem de Taxol extraído das plantas apresenta baixo rendimento, cerca de 0,07%, portanto outras técnicas foram utilizadas para sua obtenção através de sínteses e biotransformação. Um dos processos alternativos para produção do Taxol é a reação enzimática realizada por *Pseudomonas sp*, onde ocorre a hidrólise estereoseletiva do *cis*-3-(acetoxi)-4-fenil-2-azetidiona, produzindo o (3R)-acetato (Esquema 3), intermediário desejado para produção do Taxol (Patel, 1997).



Esquema 3: Hidrólise estereoseletiva do cis-3-(acetoxi)-4-fenil-2-azetidínona

Uma estratégia interessante utilizada em algumas biotransformações é o de submeter ao microrganismo um substrato, semelhante a um intermediário natural da biossíntese de alguma substância de interesse. É a chamada biotransformação biossinteticamente dirigida. Um exemplo interessante é o da biotransformação de caurenos. As giberelinas, hormônios de crescimento de plantas, são também produzidas por um fungo fitopatogênico, a *Gibberella fujikuroi*. Este fungo é utilizado na produção comercial das giberelinas A_3 e $A_{4/7}$. A rota biossintética das giberelinas envolve um caureneno, o ácido cauren-19-óico (4). Após hidroxilações nos carbonos C-6 e C-7, ocorre contração do anel levando ao esqueleto giberelano e às giberelinas, GA_4 (5), GA_1 (6), GA_7 (7), GA_3 (8) (Esquema 4) (Hanson, 1971).



Esquema 4: Rota biossintética resumida de giberelinas

Através de vários trabalhos, verificou-se que a *G. fujikuroi* transforma outros diterpenos tetracíclicos, assim como caurenos modificados (Hanson e White, 1968). Na produção comercial de giberelinas, ao enriquecer o meio de cultura com o substrato natural, o ácido caurenóico, pode-se aumentar a produtividade por ser o ácido caurenóico o principal precursor de giberelinas. Esta estratégia foi objeto de uma patente (Becher *et al.*, 1981).

O sucesso obtido com biotransformações estimulou a pesquisa com outros substratos. Hoje existem na literatura relatos de biotransformações de várias classes de compostos tais como carboidratos, antibióticos e terpenos (Kielisch, 1984).

O Processo de Biotransformação

O processo de biotransformação envolve um substrato, um microrganismo, e um método de biocatálise (Kieslich,1984). O substrato é o composto de partida, a substância que será transformada pelo complexo enzimático do microrganismo resultando em um produto. Quando o substrato é totalmente estranho ao microrganismo a biotransformação é caracterizada como xenobiótica. Caso o substrato seja estruturalmente semelhante a algum intermediário biossintético do microrganismo, a biotransformação é dita biossinteticamente dirigida.

Para que a biotransformação ocorra é necessário que o substrato entre em contato com as enzimas do microrganismo. As enzimas poderão estar dispersas no meio de fermentação ou no interior da célula. Neste último caso, o substrato deverá ser capaz de atravessar a membrana celular do microrganismo. Em casos em que o substrato é insolúvel em água, é necessário realizar uma dispersão do substrato no meio líquido da melhor forma possível. Para isso o substrato é dissolvido em solventes hidrossolúveis e adicionado à cultura do microrganismo. A dispersão conseguida é, na maioria dos casos, suficiente para que o composto orgânico entre em contato direto com a enzima que irá transformá-lo.

A escolha do microrganismo pode ser feita analisando resultados disponíveis na literatura para compostos semelhantes ao qual se pretende estudar. Alguns microrganismos possuem uma certa tolerância, realizando transformações com compostos diferentes dos substratos naturais. Outra forma de escolher o microrganismo é através de um processo empírico de seleção. Nesta seleção realiza-se um experimento em pequena escala e analisa-se o extrato bruto obtido do caldo de fermentação, comparando-o a um controle ao qual não foi adicionado o substrato. Se houver a formação de novos metabólitos o fungo terá realizado alguma transformação no substrato. A seguir realiza-se um experimento em escala preparativa para se proceder ao isolamento e identificação dos produtos.

O método de biotransformação a ser utilizado depende das características do microrganismo e do substrato. Com relação ao microrganismo, pode-se realizar a biotransformação adicionando o substrato durante ou após a fase de crescimento da cultura. Durante a fase de crescimento do microrganismo ocorre a formação do seu complexo enzimático capaz de metabolizar os nutrientes. Se o composto de partida for adicionado nesta fase ele poderá induzir a formação de enzimas normalmente não produzidas pelo microrganismo. Dessa forma são maiores as chances de resultados positivos. Se a opção for de adicionar o substrato após o desenvolvimento completo do microrganismo, ele é inicialmente cultivado sob condições ótimas e a biomassa é separada por centrifugação ou filtração. Em seguida as células são transferidas para um outro meio de cultura simples - como água e glicose - e o substrato é adicionado. A composição simples do meio de cultura facilita o isolamento do produto. Entretanto, a transformação irá depender de enzimas já formadas (Hanson,1992).

Com relação ao substrato, seu estado físico e volatilidade podem exigir técnicas especiais. Com relação aos voláteis, por exemplo, é necessário tomar precauções para evitar a evaporação do substrato, empregando frascos especiais de fermentação, ou adicionando o substrato a intervalos regulares.

É importante ressaltar que nem sempre determinado microrganismo executa alguma transformação em um substrato adicionado ao meio de cultura no qual ele se desenvolve. Resultados obtidos no nosso grupo confirmam esta afirmativa. Em alguns casos, apesar da detecção de novos metabólitos, estes são produzidos em quantidades tão reduzidas que dificultam seu isolamento e identificação.

Outra dificuldade também já enfrentada é a da ocorrência de produtos de biotransformação com comportamento cromatográfico muito semelhante a metabólitos normais do microrganismo. Nestes casos o isolamento dos produtos de biotransformação se torna muito difícil sem a utilização de métodos cromatográficos de alta eficiência.

Diterpenóides

Os terpenóides são compostos orgânicos naturais constituídos de duas ou mais unidades de isopreno (2-metil-1,3-butadieno) e diterpenóides são terpenóides constituídos de 20 átomos de carbono . Eles podem ser acíclicos, bicíclicos, tricíclicos, tetracíclicos ou macrocíclicos (Hanson, 1971). Dentre os diterpenóides tetracíclicos os de esqueletos giberelano, caurano e baierano tem sido utilizados como substratos em experimentos de biotransformação.

Um composto importante com esqueleto giberelano é o ácido giberélico (9). Ele faz parte de um grupo de compostos chamados giberelinas, que são hormônios vegetais envolvidos em vários processos fisiológicos. Como dito anteriormente, alguns desses compostos são também produzidos por alguns microrganismos, principalmente a *G. fujikuroi*. O ácido giberélico (9), Figura 1 por exemplo, é produzido comercialmente por fermentação pela *G. fujikuroi* (Kumar e Lonsane, 1989)(Hanson, 1991) e é utilizado em várias culturas vegetais e na produção do malte, como auxiliar da fermentação da cevada.

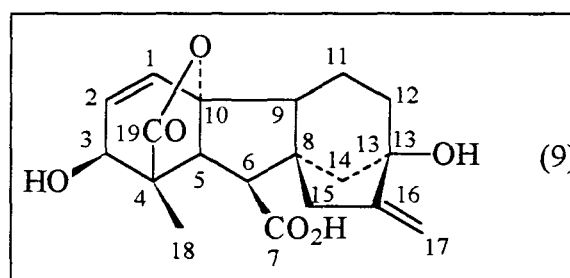


Figura 1: Estrutura do ácido giberélico (9)

Outros diterpenóides tetracíclicos comuns na natureza são aqueles com esqueleto caureno (10) e baierano (11), Figura 2 .

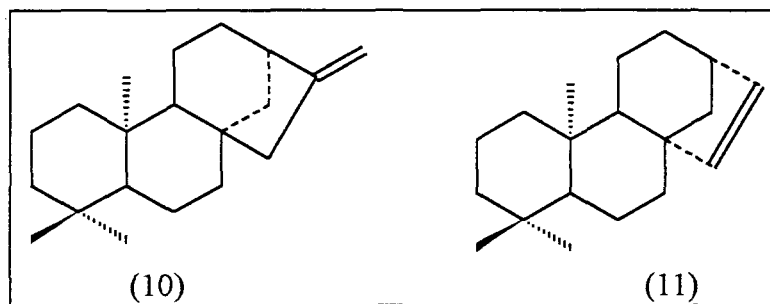


Figura 2: Estruturas básicas de caureneno e baiereno

Alguns caurenóides, encontrados em várias famílias vegetais, possuem atividades biológicas importantes: a oridonina (12), por exemplo, é um inibidor tumoral (Fujita, 1976); o ácido cauren-19-óico (4) é um antibiótico (Mitscher *et al*, 1983); o tripterifordin (13) é um agente anti-HIV (Chen *et al*, 1992), e o esteviosídeo (14) é um adoçante não-calórico (Hanson *et al*, 1993). Pode-se observar nestes exemplos que o número e as posições das hidroxilas influenciam na atividade biológica (Figura 3). A hidroxilação de diterpenóides pode ser convenientemente realizada por fungos (Hanson, 1992), o que torna este método atraente para obtenção de substâncias biologicamente ativas a partir de diterpenóides facilmente obtidos.

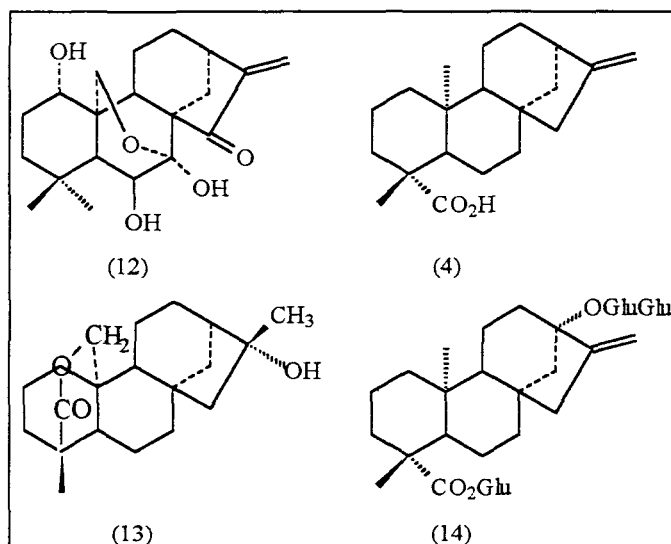


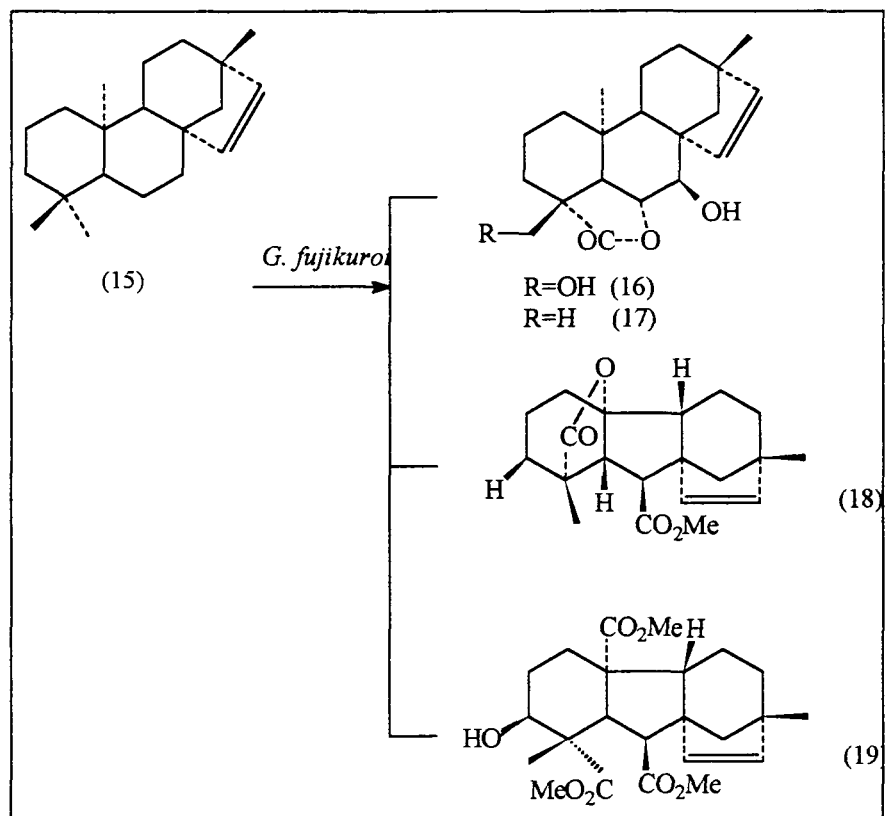
Figura 3: Estruturas de alguns caurenóides biologicamente ativos

A maioria dos trabalhos de síntese e biotransformação de diterpenóides tetracíclicos envolvem compostos com esqueleto caureno (Hanson, 1992). Esta preferência pode estar relacionada ao fato de vários compostos dessa classe possuírem atividades biológicas significativas (Ghisalberti, 1997). Sobre os compostos com esqueleto baiereno, muito pouco foi explorado em termos de transformações químicas e microbiológicas.

Biotransformação de Baieranos

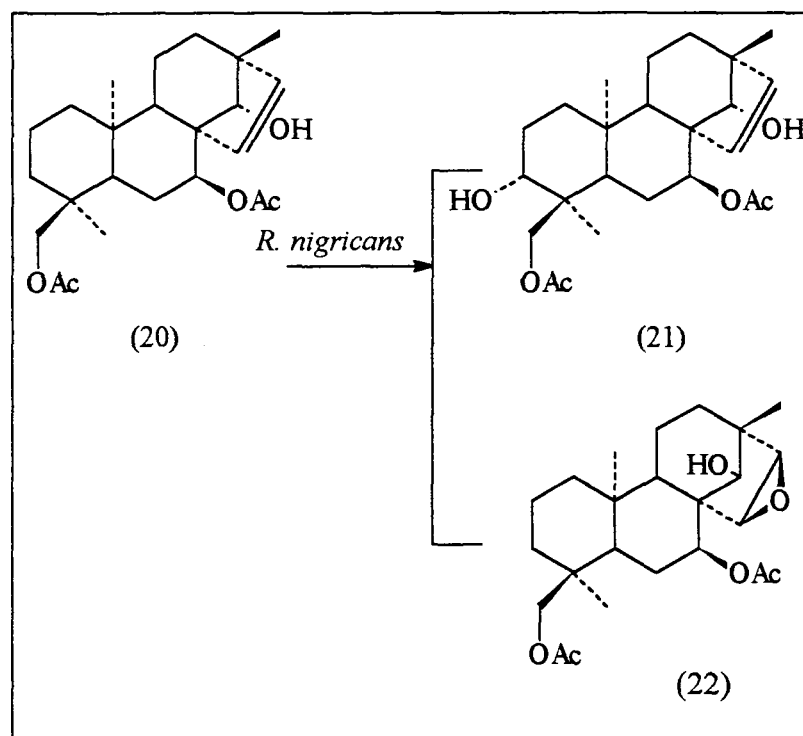
Os trabalhos sobre biotransformação de baieranos são relativamente escassos. Boa parte dos relatos envolve o uso da *G. fujikuroi*, embora outros fungos tenham sido utilizados.

Como afirmado anteriormente, as giberelinas são normalmente biossintetizadas pela *G. fujikuroi* via um diterpenóide tetracíclico com esqueleto caureno, o ácido caurenóico (4). Entretanto o fungo é capaz também de transformar compostos com esqueleto baiereno; o baier-15-eno (15), por exemplo, foi convertido nos produtos hidroxilados 7 β ,18-dihidroxibaierenolídeo (16) e 7 β -hidroxibaierenolídeo (17), e nas baiergiberelinas A₉ (18) e A₁₃ (19) (Esquema 5). Este resultado indica que o fungo tem a capacidade de metabolizar substratos não naturais, conduzindo à formação de giberelinas modificadas (Diaz *et al*, 1985). Este método pode ser útil para a obtenção de giberelinas não-naturais.



Esquema 5: Biotransformação do baier-15-eno por *Gibberella fujikuroi*

Outro trabalho apresentou a biotransformação do 7 β ,18-diacetóxi-14 α -hidroxibaier-15-eno (20) por *Rhizopus nigricans*. Os resultados indicaram hidroxilação no carbono C-3, (3 α ,14 α -dihidroxi-7 β ,18-diacetoxi-baier-15-eno (21)) e oxidação nos carbonos C-15 e C-16, (7 β ,18-diacetoxi-14 α -hidroxi-15 β ,16 β -epoxibaierano (22)) (Esquema 6) (Garcia-Granados *et al*, 1985).



Esquema 6: Biotransformação do 7 β ,18-diacetoxi-14 α -hidroxibaiereno por *Rhizopus arrhizus*

Com relação ao isoesteviol, o número de relatos de biotransformação na literatura é escasso. A seguir serão descritos alguns trabalhos.

Isoesteviol

O isoesteviol (23) (Figura 4) é um diterpenóide tetracíclico baierano que pode ser obtido através da hidrólise ácida do esteviosídeo (14), um glicosídeo obtido da *Stevia rebaudiana*.

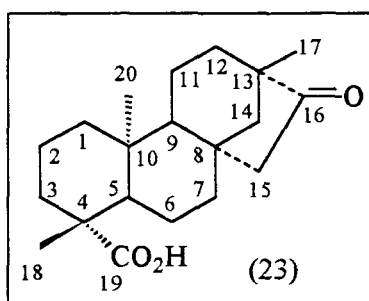
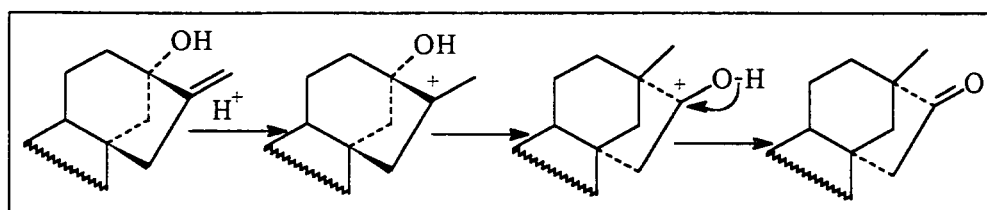


Figura 4: Estrutura do Isoesteviol

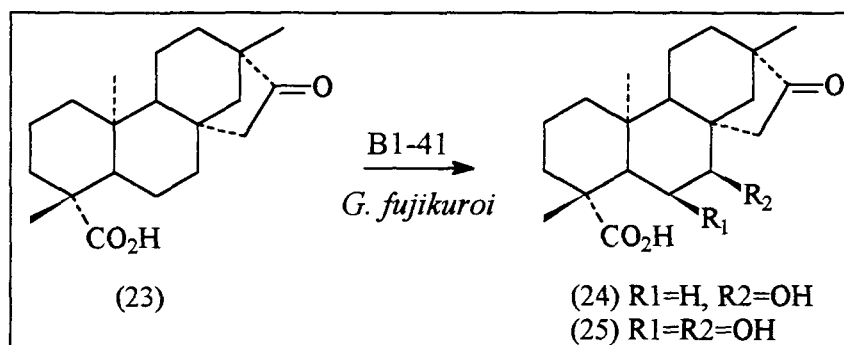
A *Stevia rebaudiana* é uma planta nativa da Serra de Amambay, localizada no nordeste do Paraguai. A *S. rebaudiana* produz o esteviosídeo (14), um glicosídeo diterpênico, caracterizado como um adoçante não calórico e trezentas vezes mais doce que a sacarose. O esteviosídeo é encontrado nas folhas da planta e é utilizado como substituto da sacarose em bebidas e alimentos para diabéticos (Kazuyama, 1979). Ele é produzido e comercializado em países como o Brasil, Japão, Israel, Coréia e China (Hanson *et al*, 1993)(Brito e Brito, 1993).

A hidrólise ácida do esteviosídeo (14) leva ao esteviol que reage imediatamente, através do rearranjo de Wagner Meerwein, (Esquema 7) (March, 1992) produzindo o isoesteviol (Ogawa *et al*, 1980)(Avent *et al*, 1990).



Esquema 7: Rearranjo de Wagner-Meerwein de caurenos

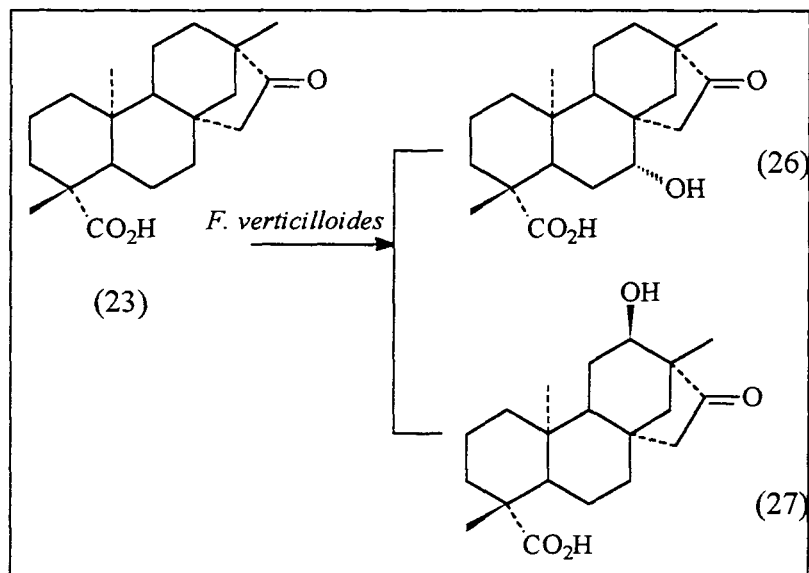
Poucos trabalhos de biotransformação do isoesteviol (23) foram encontrados na literatura. No primeiro foi utilizado a mutante B1-41 do fungo *G. fujikuroi*, obtendo-se os metabólitos 7 β -hidroxiisoesteviol (24) e 6 β ,7 β -dihidroxiisoesteviol (25) (Esquema 8). Porém a identificação dos produtos foi realizada através da CG-EM e eles não foram isolados e completamente caracterizados por métodos espectroscópicos (Bearder *et al*, 1976).



Esquema 8: Biotransformação do isoesteviol por *Gibberella fujikuroi*

Outro trabalho (Costa, 1994) mostrou que o isoesteviol (23) inibe a biossíntese de giberelinas pela *G. fujikuroi*. Entretanto, nenhum produto de biotransformação foi isolado e identificado.

Mais recentemente uma biotransformação do isoesteviol foi realizada em nosso grupo com o fungo *Fusarium verticilloides*, sendo obtidos os produtos 7 α -hidroxiisoesteviol (26) e 12 β -hidroxiisoesteviol (27) (Esquema 9) (Strapasson, 1996; Oliveira, 1996).



Esquema 9: Biotransformação do isoesteviol por *Fusarium verticilloides*

Fungos

As espécies de fungos utilizados neste trabalho tem importantes usos industriais. O *P. chrysogenum* pertence a classe morfológica dos fungos filamentosos chamado de Deuteromicetos, ou Fungos Imperfeitos, uma vez que as etapas de reprodução ainda não estão perfeitamente definidas (Stanier,1984). Esta classe de microrganismo é abundante na natureza, sendo que algumas espécies de *Penicillium* causam a deterioração de alimentos como frutas e pão, e outras são utilizadas na produção de aromas e na maturação de queijos famosos, como Roquefort, Camembert e Brie (Pelczar, 1980). A utilização mais famosa e importante deste gênero de fungos, é na produção de penicilina a partir de algumas estirpes de *P. notatum* e *P. chrysogenum*, sendo que estas produzem ácido penicílico como metabólito secundário (Bu'lock e Kristiansen, 1987). Outro antibiótico útil produzido por este gênero é a griseofulvina usada para tratar infecções de fungos sobre a pele, incluindo o pé de atleta (Wainwright, 1983).

O *R. arrhizus* pertence à classe morfológica dos Ficomicetos da subclasse dos Zigomicetos (Pelczar, 1980)(Atlas, 1981). São de interesse na biotecnologia devido à sua utilização na indústria de alimentos na preparação de alimentos fermentados (Soccol, 1986). É também utilizado na produção de ácidos orgânicos, como o ácido fumárico (Rhodes *et al*, 1959) e o ácido láctico (Hang *et al*, 1989), assim como na produção de enzimas como as lipases (Laboureur *et al*, 1966). Ele tem sido utilizado em biotransformações, como a hidroxilação da progesterona (Peterson *et al*, 1952) e do fenil-ciclohexano (Fonken *et al*, 1967) e em processos de biodegradação e biossorção de poluentes industriais, como a absorção do urânio (Tsezos *et al*, 1981).

Objetivos

O presente trabalho têm o objetivo de identificar biotransformações ocorridas com o isoesteviol realizadas pelos fungos *P. chrysogenum* e *R. arrhizus*. A escolha do *P. chrysogenum* e do *R. arrhizus* foi devido ao fato de que nenhum trabalho de biotransformação do isoesteviol foi realizado com estes fungos. Portanto, é de interesse verificar se eles são capazes de funcionalizar posições na molécula do isoesteviol e comparar com os resultados da literatura.

Em caso positivo, pretende-se isolar e identificar que tipo de transformação ocorreu e comparar os resultados obtidos com a literatura. Os compostos obtidos serão, posteriormente, submetidos à testes biológicos de reguladores de crescimento vegetal e testes farmacológicos.

MATERIAIS E MÉTODOS

MATERIAIS E MÉTODOS

Os fungos *P. chrysogenum* (CMI37767) e *R. arrhizus* (CMI83711) foram fornecidos por Commonwealth Micological Institute da Inglaterra. Os fungos foram mantidos em meio sólido P.D.A. na geladeira. Os experimentos foram realizados em meio líquido com a seguinte composição: 8,0 g/L de *corn steep liquor*, 10,0 g/L de D-glicose (+) e 2,0 g/L de extrato de levedura. A esterilização dos meios de cultura foi realizada em autoclave vertical PHOENIX a uma temperatura de 121 °C (110 kPa man.) por 20 minutos.

A Steviafarma (Maringá PR) forneceu o esteviosídeo o qual foi submetido à uma hidrólise ácida (Strapasson, 1996) obtendo-se o isoesteviol 100% puro.

Para os testes preliminares foram utilizados frascos de *Erlenmeyer* de 250 ml contendo 50 mL de meio líquido. Frascos de 1000 mL contendo 200 mL de meio foram usados em escala preparativa. O papel de filtro utilizado nos experimentos é da marca Fisher, nº 12A.

O isolamento dos produtos foi realizado por cromatografia em coluna de sílica (Merck, art 9385, 230-400 mesh). A cromatografia em camada delgada foi realizada em placas preparadas (Merck, art 5554). Os solventes utilizados acetato de etila e hexano foram destilados antes do uso, são comerciais e fornecidos por Quimespar. Para medidas de pH foi utilizado um pHmetro EVLAB.

Os equipamentos analíticos utilizados foram: espectrômetro de massas AUTOSPEC (University of Georgia, EUA), espectrômetro no infravermelho BOMEM MB-100 (Dep. Química, UFPR), espectrômetro de RMN BRUKER DRX400 (Dep. de Bioquímica, UFPR) e GEMINI-300BB (Dep. Química, UEM).

Determinação das Curvas de Crescimento e pH

Inicialmente os fungos foram cultivados em placas de Petri contendo o meio sólido P.D.A., durante 7 dias a 30°C

Em seguida esporos foram transferidos para 16 frascos contendo meio de cultura líquido descrito acima (isento de isoesteviol), os quais permaneceram em um agitador-incubador por 108 horas a 27°C e 100 rpm. A cada 12 horas foram retirados dois frascos e seu conteúdo foi filtrado, usando papel de filtro previamente pesado. A biomassa foi lavada com água destilada (2 vezes) e acetona/água (1:1) (1 vez). Os papéis de filtro contendo a biomassa foram levados à estufa por 48 horas a 60°C, e em seguida pesados (Krieger, 1995).

A curva de pH foi determinada a partir de amostras (5 mL) coletadas a cada 12 horas, com auxílio de um pHmetro.

Ensaio preliminares de biotransformação

O fungo, proveniente do tubo inclinado em meio PDA, foi inoculado em quatro frascos contendo 50 mL de meio de cultura líquido. Em seguida, os frascos foram levados a um agitador-incubador orbital e mantidos a 27 °C e 100 rpm por 48 horas. Após este período, 0,031 moles de isoesteviol, previamente dissolvido em DMSO (1 mL), foi distribuído em dois dos frascos. Os outros dois frascos foram mantidos como controle.

Após a adição do isoesteviol, a fermentação foi conduzida por 7 dias. O acompanhamento da reação foi realizado coletando-se alíquotas (1,0 mL) a cada 24 horas dos frascos experimentais e de controle. Após a extração com 1,0 mL de acetato de etila, fez-se cromatografia em camada delgada (CCD) das amostras, utilizando-se hexano/acetato de etila (4:1) como eluente.

Escala Preparativa

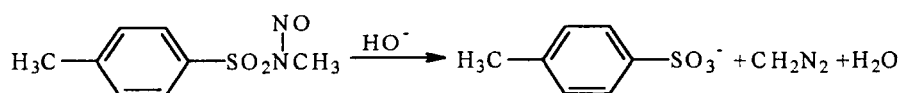
O procedimento geral foi o mesmo descrito nos ensaios preliminares. Porém, neste caso foram utilizados seis frascos de *Erlenmeyer* de 1000 mL com 200 mL de meio de cultura. 1,572 moles de isoesteviol foi dissolvido em DMSO (5 mL) e distribuídos em cinco frascos. Um outro frasco, sem o isoesteviol, foi usado como controle (sem isoesteviol). A fermentação foi conduzida a 27°C e 100 rpm.

Após mais 7 dias de fermentação, o conteúdo dos frascos foi filtrado e submetido a extração líquido-líquido com acetato de etila (3x300 mL). O micélio remanescente no papel de filtro foi lavado com o mesmo solvente e os extratos orgânicos foram combinados e secos com sulfato de sódio anidro. Após filtração e evaporação do solvente obteve-se o extrato bruto.

Este foi fracionado em coluna sílica gel (30x300mm) (Still, Kahn e Mitra, 1978). A eluição foi realizada com hexano/acetato de etila (3:2) a temperatura ambiente e foram coletadas frações de 20 mL, o tempo de eluição é cerca de 20 mL/min. As frações que apresentaram R_f semelhantes foram reunidas e evaporadas a 80°C. Os compostos isolados foram recristalizados em acetato de etila, secos a 50°C e mantidos em frasco em atmosfera inerte, até serem submetidos às análises espectrométricas.

Derivatização com Diazometano

O precursor para a obtenção do diazometano é a metil-nitrosotolueno-*p*-sulfonamida. O diazometano é obtido através de reação com uma solução de hidróxido de potássio, sendo posteriormente destilado junto com o éter. O diazometano é, portanto, obtido em solução etérea.

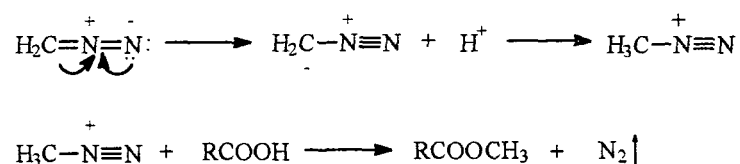


metil-nitrosotolueno-*p*-sulfonamida

diazometano

a) Preparação do Diazometano Etéreo: hidróxido de potássio (0,089 moles) foi dissolvido em água destilada (10 mL) e a esta solução acrescentou-se etanol (25 mL). A solução alcoólica foi colocada em um balão com saída lateral e aquecida a uma temperatura de 65°C. Um funil contendo 10% de metil-nitrosotolueno-*p*-sulfonamida (diazald®) dissolvido em éter etílico foi colocado sobre o balão. Esta solução foi gotejada sobre a solução alcoólica quente. O éter etílico contendo o diazometano dissolvido foi evaporado e condensado em banho de gelo (Vogel, 1989).

b) Esterificação com Diazometano Etéreo: a substância isolada foi dissolvida em metanol e sobre esta solução foi acrescentado o diazometano etéreo. Após alguns minutos a efervescência devida à liberação de N₂ foi cessada e a solução permaneceu amarelada indicando um excesso de diazometano e término da reação. O excesso de diazometano foi destruído com ácido acético e o solvente foi evaporado. O produto foi recristalizado em metanol e seco a uma temperatura de 55 °C. A esterificação do ácido carboxílico ocorreu de acordo com a seguinte reação:



RESULTADOS E DISCUSSÃO

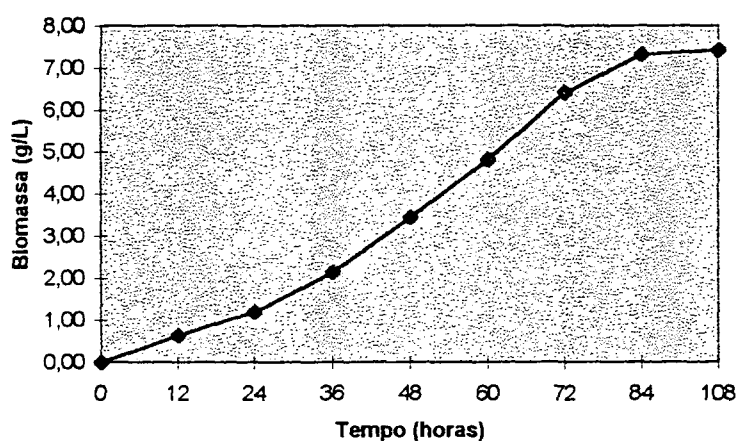
RESULTADOS E DISCUSSÃO

O trabalho consistiu em duas etapas: um teste preliminar para verificar se ocorreria a biotransformação do isoesteviol pelos dois fungos, e realização de experimentos em escala preparativa com o objetivo de se obter, isolar e identificar os metabólitos formados.

Microrganismos

A curva de crescimento foi feita relacionando o peso da biomassa em g/L e o tempo de incubação em horas. O objetivo de se fazer a curva foi apenas para se observar o tempo em que a fase estacionária era atingida. Pretendia-se adicionar o substrato durante a fase de crescimento. Dessa forma, este procedimento facilitaria a indução de enzimas que transformassem o isoesteviol e que poderiam não estar presentes caso a indução não fosse feita. Observou-se que a fase estacionária para ambos os fungos foi atingida após 72 horas de incubação (Figura 5 e 6).

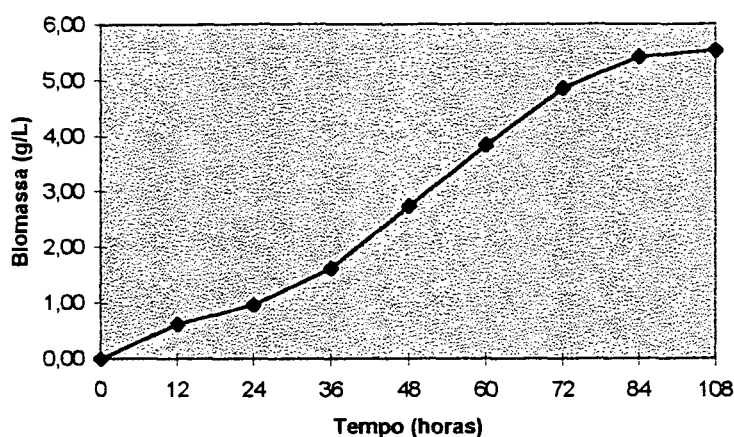
Curva de crescimento



| | | | | | | | | | |
|----------------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| Biomassa (g/L) | 0,00 | 0,65 | 1,20 | 2,15 | 3,46 | 4,83 | 6,43 | 7,33 | 7,45 |
| Tempo (horas) | 0 | 12 | 24 | 36 | 48 | 60 | 72 | 84 | 108 |

Figura 5: Curva de crescimento do *P. chrysogenum*

Curva de crescimento

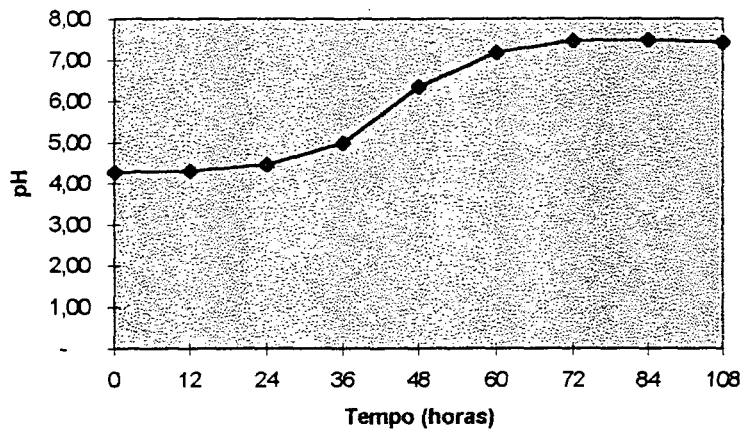


| | | | | | | | | | |
|----------------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| Biomassa (g/L) | 0,00 | 0,63 | 0,97 | 1,63 | 2,75 | 3,85 | 4,87 | 5,43 | 5,54 |
| Tempo (horas) | 0 | 12 | 24 | 36 | 48 | 60 | 72 | 84 | 108 |

Figura 6: Curva de crescimento do *R. arrhizus*

O pH final do meio de cultura é importante para a etapa seguinte de extração. Como trabalhou-se com um ácido carboxílico, um pH final básico exigiria a acidificação do caldo antes da extração com solvente. A evolução do pH com o tempo forneceria informações importantes e, por isso, foram construídas as curvas de pH para os dois fungos. Os resultados mostraram que o *P. chrysogenum* conduziu a um pH final de 7,45, (Figura 7) portanto próximo a neutralidade, como o isoesteviol tem caráter ácido, não foi necessário fazer acidificação do meio.

Curva do pH

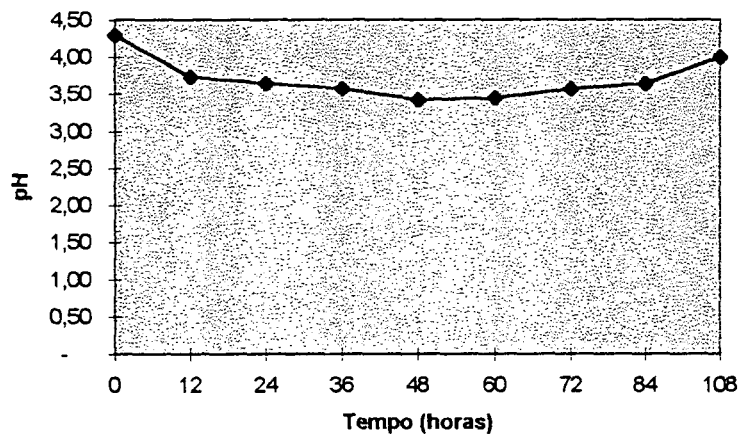


| pH | 4,28 | 4,32 | 4,48 | 5,00 | 6,37 | 7,19 | 7,48 | 7,51 | 7,45 |
|---------------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| Tempo (horas) | 0 | 12 | 24 | 36 | 48 | 60 | 72 | 84 | 108 |

Figura 7: Curva de pH da cultura do *P. chrysogenum*

Para o *R. arrhizus*, que produz ácidos orgânicos no seu metabolismo, observa-se que a variação de pH foi de 4,28 inicialmente, diminuindo até 3,4 e subindo para um pH final de 4,01 (Figura 8).

Curva do pH



| pH | 4,28 | 3,74 | 3,65 | 3,58 | 3,43 | 3,46 | 3,58 | 3,65 | 4,01 |
|---------------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| Tempo (horas) | 0 | 12 | 24 | 36 | 48 | 60 | 72 | 84 | 108 |

Figura 8: Curva de pH da cultura do *R. arrhizus*

Como o isoesteviol é um ácido muito fraco (insolúvel em NaHCO₃ 5%), não houve necessidade de acidificação do meio antes da extração com solvente.

Ensaio Preliminares de Biotransformação

Os ensaios preliminares foram realizados de acordo com o descrito em Materiais e Métodos. Durante 168 horas de incubação foram retiradas alíquotas do caldo de cultura e elas foram analisadas por CCD utilizando-se como eluente hexano/acetato de etila (4:1).

Para as alíquotas coletadas dos frascos contendo o *P. chrysogenum* observou-se uma mancha com Rf=0,80 referente ao isoesteviol. Uma outra mancha com Rf=0,75 que surgiu após dois dias de incubação, intensificou-se nos dias seguintes.

Nas alíquotas referente ao frasco contendo o *R. arrhizus*, o isoesteviol foi observado com Rf=0,80 e, à medida que seguia-se o experimento outra mancha, com Rf=0,70, foi observada.

Escala Preparativa de Biotransformação

A escala preparativa foi realizada como descrito em Materiais e Métodos, a partir de 500 mg de isoesteviol. A identificação dos produtos foi realizada através da análise dos dados dos espectros de massa, infravermelho e RMN ¹H e RMN ¹³C.

Produto de Biotransformação pelo *P. chrysogenum*

Após a extração e concentração do extrato bruto foi realizada a CCD, que confirmou os resultados observados nos ensaios preliminares. Foram obtidos 467 mg de extrato bruto. A cromatografia em coluna utilizando-se como eluente hexano/acetato de etila (3:2) levou ao isolamento de 148 mg de isoesteviol e de 137 mg de um novo produto. Portanto foram

recuperados 285 mg, atribui-se os 215 mg restantes à perdas durante o processo de purificação.

O espectro de massas do produto (pagina 51) apresenta o pico do íon molecular em m/z 334, que está de acordo com a fórmula molecular $C_{20}H_{30}O_4$ e com 16 unidades a mais que o peso molecular do isoesteviol (PM=318, $C_{20}H_{30}O_3$), indicando a incorporação de um átomo de oxigênio na molécula. O pico-base ocorre em m/z 41 podendo ser referente a um fragmento $C_3H_5^+$. Observam-se também as seguintes fragmentações características: o pico em m/z 316 (M-18) indica perda de uma molécula de água, típica de álcoois. O fragmento em m/z 289 (M-45) indica perda de grupo CO_2H^+ típica de ácido carboxílico. Em m/z 55 encontra-se um fragmento característico de cetonas $CH_2=CH-C \equiv O^+ \leftrightarrow ^+CH_2-CH=C=O$.

O espectro no infravermelho (página 52) apresenta uma banda larga entre 3500 e 2500 cm^{-1} característica da ligação O-H do ácido carboxílico. A banda larga ocorre devido a formação de ligação hidrogênio intermolecular (Figura 9). A deformação axial da hidroxila livre só é observada em soluções muito diluídas em solventes apolares.

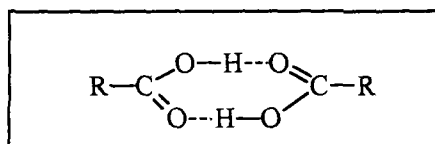


Figura 9: Formação de ligação de hidrogênio em ácidos carboxílicos

Em 1650 cm^{-1} observa-se a banda da carboxila do ácido enquanto que em 1719 cm^{-1} ocorre a absorção referente à carbonila cetônica. Além disso observa-se em 1250 cm^{-1} a deformação axial da ligação C-O e em 995 cm^{-1} deformação angular fora do plano da ligação O-H.. O espectro no infravermelho do isoesteviol apresenta banda larga entre 3500 e 2500 cm^{-1} referente a função de ácido carboxílico, em 1738 referente a carbonila cetônica e em 1678 à carboxila do ácido (página 47). Portanto, as absorções observadas

indicam que o produto de biotransformação mantém as principais funções (CO₂H e C=O) observadas para o isoesteviol.

O espectro de RMN¹³C do isoesteviol (página 49) apresenta 20 átomos de carbono, os deslocamentos químicos atribuídos aos átomos de carbono são apresentados na tabela 1 confirmados através de dados obtidos na literatura. Observa-se a carbonila cetônica (C-16) em 225,08 ppm e a carboxila do ácido (C-19) em 181,48 ppm (Oliveira e Strapasson, 1996).

O espectro de DEPT do isoesteviol (página 50) mostra três metilas (C-17, C-18, C-20); nove metilenos (C-1, C-2, C-3, C-6, C-7, C-11, C-12, C-14, C-15) dois metinos (C-5, C-9). São identificados seis carbonos quaternários (C-4, C-8, C-10, C-13, C-16, C-19).

O espectro de DEPT do produto (página 55) apresenta duas metilas, dez metilenos e dois metinos. Um grupo metileno em região desblindada do espectro (65,48 ppm), não observada para o isoesteviol (página 50), indica a ligação do carbono à um átomo eletronegativo. A incorporação de um átomo de oxigênio na molécula e a presença de apenas duas metilas indica que pode ter ocorrido hidroxilação em uma das metilas do isoesteviol.

Comparando-se ambos espectros de DEPT observa-se que os deslocamentos químicos dos metilenos C-2, C-6 e C-11 e dos metinos C-5 e C-9 não sofreram mudanças significativas. As metilas identificadas no espectro de DEPT do isoesteviol em 13,97 ppm e 29,53 ppm são observadas em 13,74 ppm e 29,35 ppm no espectro de DEPT do produto e podem ser atribuídas aos carbonos C-20 e C-18 respectivamente, portanto a hidroxilação ocorreu na metila C-17. Um dos grupos metilenos que absorve na região entre 39 e 45 ppm mudou seu valor para 32,49 ppm, provavelmente devido à proximidade da metila hidroxilada. e o grupo metileno mais próximo ao C-17 presente nessa região de absorção influenciado pela presença da hidroxila foi o C-12. Os metilenos C-14 e C-15 próximos ao C-17 também sofrem influência. Estas considerações são importantes para a atribuição dos deslocamentos químicos do produto obtido, apresentados na tabela 1.

O espectro de RMN¹³C do produto (página 54) apresenta as absorções referentes à carbonila cetônica (C-16) em 223,66 ppm e à carboxila

do ácido (C-19) em 183,21 ppm confirmando junto com as absorções do espectro no infravermelho (página 52) que estas funções identificadas na estrutura do isoesteviol foram mantidas no produto de biotransformação.

A hidroxilação de uma das metilas conduz ao aparecimento de um duplete em região mais desblindada do espectro referente ao acoplamento geminal de dois hidrogênios ligados ao carbono que sofreu hidroxilação, inexistente no espectro do isoesteviol. Entretanto, o espectro de RMN¹H do produto (página 53), apresenta dois dupletes em 3,54 e 3,67 ppm ($J=11,38$ Hz), esta situação ocorre porque os hidrogênios geminais não são magneticamente equivalentes.

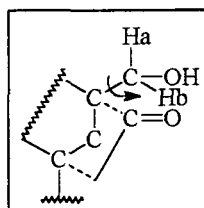
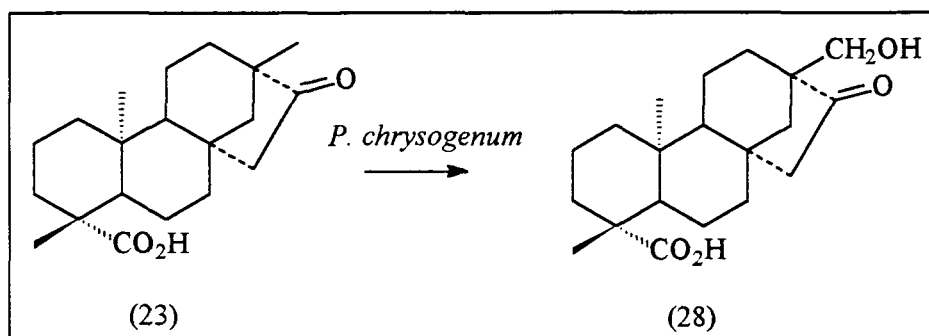


Figura 10: Hidrogênios geminais magneticamente não equivalentes

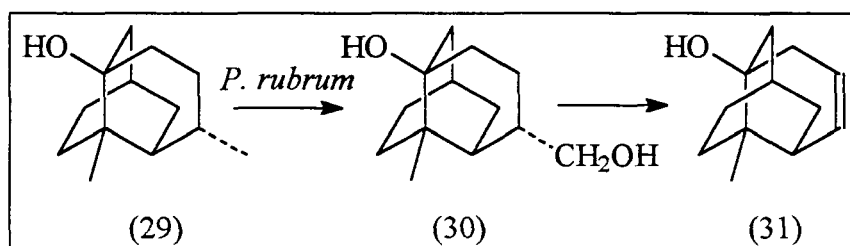
Os dados acima mostram que o produto isolado da biotransformação do isoesteviol (23) (ácido 16-cetobaieren-19-óico) pelo *P. chrysogenum* é o 17-hidroxiisoesteviol (28) (ácido 17-hidroxi-16-cetobaieren-19-óico) (Esquema 10).



Esquema 10: Biotransformação do isoesteviol por *P. chrysogenum*

A importância deste resultado se deve ao fato de que não foi encontrado na literatura nenhum relato de hidroxilação microbiológica de uma metila de diterpenóide tetracíclico realizada por *P. chrysogenum* e portanto este fungo pode ser utilizado para funcionalizar seletivamente o C-17 de baieranos.

Um exemplo industrialmente importante de hidroxilação de metilas está relacionado com a obtenção do norpatchoulenol (31), componente mais importante da fragrância “patchouli”. O óleo essencial é obtido das folhas de *Pogostenon cablin* e tem o álcool “patchouli” (29) como principal constituinte. O odor principal do óleo, entretanto, é atribuído ao norpatchoulenol (31) mas sua concentração no óleo é de apenas 0,4-0,5 %. Devido ao seu valor comercial métodos químicos foram desenvolvidos para a síntese do norpatchoulenol (31), mas o produto foi obtido com baixo rendimento. Assim foi desenvolvido e patentado um método microbiológico (Becher, *et al.* 1981) utilizando alguns fungos como, por exemplo, o *Penicillium rubrum* (Esquema 11). Eles promovem a hidroxilação de (29) na posição 10 e o diol (30) pode, então, ser convertido quimicamente no valioso norpatchoulenol (31). É importante observar que recentemente foi divulgada a existência do álcool “patchouli” (29) como principal componente do óleo essencial da *Anemia tomentosa*, uma planta brasileira (Carvalho *et al.* 1998).



Esquema 11: Obtenção do norpatchoulenol por *P. rubrum*

Este resultado mostra que a hidroxilação de grupos CH_3 em determinados substratos pode levar a produtos de importância comercial.

Produto de Biotransformação pelo *R. arrhizus*

Após a extração do caldo de fermentação obteve-se o extrato bruto (487 mg), o qual foi submetido à cromatografia em coluna utilizando-se como eluente hexano/acetato de etila (3:2). Após o fracionamento foram recuperados 85 mg do isoesteviol não reagido e 193 mg de outro produto. O produto obtido com *R. arrhizus* apresentou-se insolúvel em clorofórmio, o que dificultaria a análise de RMN devido ao maior custo dos solventes deuterados mais polares. Portanto foi necessário fazer sua esterificação de modo a torná-lo solúvel em CDCl_3 . O diazometano, CH_2N_2 , é um composto utilizado na esterificação de ácidos carboxílicos. A vantagem do seu uso é que a reação é quantitativa e limpa. Após a esterificação com diazometano obteve-se um produto sólido (PF: 242-245°C).

O espectro de massa do produto (página 56) apresentou um m/z de 348 para o íon molecular, o qual está de acordo com a fórmula molecular $\text{C}_{21}\text{H}_{32}\text{O}_4$ e o pico base é observado em m/z 123. Outras fragmentações características podem ser observadas: em m/z 289 (M-59) a perda do fragmento CH_3CO_2^+ e em m/z 271 (M- CH_3CO_2^+ - H_2O), o pico característico da cetona ocorre em m/z 55 ($\text{CH}_2=\text{CH}-\text{C}\equiv\text{O}^+ \leftrightarrow ^+\text{CH}_2-\text{CH}=\text{C}=\text{O}$).

O espectro no infravermelho (página 57), apresenta uma forte absorção em 3517 cm^{-1} , característica da deformação axial da ligação O-H. A absorção em 1744 cm^{-1} refere-se à deformação axial da carbonila do éster enquanto que a banda da carbonila cetônica ocorre em 1707 cm^{-1} . Estas informações indicam que há grupo O-H, (C=O)O, e C=O na molécula.

No espectro de RMN¹³C (página 59) observa-se que a absorção em 18,78 ppm possui quase o dobro da intensidade das outras absorções, indicando que há mais de um carbono correspondente a este deslocamento químico. Portanto considerando a sobreposição em 18,78 ppm tem-se 21 átomos de carbono. Identifica-se a carbonila cetônica em 221,70 ppm e a

carboxila do éster em 178,07 ppm mostrando as funções do ácido carboxílico, posteriormente esterificada, e da cetona foram preservadas no processo de biotransformação.

O espectro de DEPT (página 60) apresenta: quatro metilas em 12,80 ppm, 19,81 ppm e 28,52 ppm referentes às três metilas C-17, C-18 e C-20 e em 51,26 ppm a metila do ester; três metinos em 48,63 ppm e 47,33 ppm referentes aos carbonos C-5, C-9 e outro em 76,13 ppm referente à um carbono ligado à um átomo eletronegativo. Apenas sete metilenos são observados, de acordo com a estrutura do isoesteviol deveriam aparecer nove metilenos, porém a absorção de um dos grupos metileno deve estar sobreposta a outro como observado no espectro de RMN¹³C (página 59) e outro metileno sofreu hidroxilação o que explica o aparecimento de um grupo metino em 76,13 ppm, portanto a estrutura do produto de biotransformação deve ter oito grupos metilenos.

Observa-se, comparando-se os espectros de DEPT do isoesteviol (página 50) e do produto (página 60), observa-se que os grupos metilenos sofreram mudanças em seus deslocamento químicos influenciados pela hidroxilação do composto. O metileno C-2 em 20,13 ppm identificado para o isoesteviol permanece em região semelhante para o produto em 18,78 ppm indicando que este carbono e os carbonos próximos à ele não foram influenciados pela hidroxilação. Portanto C-1 e C-3 podem ser identificados em 39,39 ppm e 37,19 ppm respectivamente. Os grupos metilenos C-14 e C-15 são observados em 49,78 ppm e 47,14 ppm.

No espectro do isoesteviol tem-se dois metilenos em 21,44 ppm e 22,96 ppm referentes aos carbonos C-11 e C-6 respectivamente. Para o produto a absorção de um destes dois metilenos está sobreposta ao carbono C-2 e outro teve seu deslocamento químico alterado para 29,30 ppm, influenciado pela hidroxilação do carbono vizinho. Portanto a hidroxilação ocorre no carbono C-7 ou C-12. A hidroxilação em C-12 ocasionaria em alteração na absorção do C-20 espacialmente próximo, o que não é observado, já que o C-20 absorve em 12,80 ppm. De acordo com estas observações pode-se concluir que a hidroxilação ocorreu no metileno C-7 alterando seu

deslocamento de 42,47 ppm para 76,13 ppm e como grupo metino. O deslocamento químico observado em 29,30 ppm é referente ao metileno C-6 o qual absorve em região mais desblindada se comparado ao isoesteviol.

Fazendo-se a integração do espectro de RMN¹H do produto (página 58) identificam-se um multiplete na região entre 0,69 ppm e 2,23 ppm correspondente à 27 átomos de hidrogênios, neste multiplete são observadas três metilas em 0,69, 1,00 e 1,18 ppm e são referentes aos carbonos C-20, C-17 e C-18. Um hidrogênio em 2,55 ppm, 3 hidrogênios em 3,64 ppm referentes à metila do éster e um hidrogênio em 3,70 ppm sugestivo ao hidrogênio ligado ao carbono que sofreu hidroxilação e que acopla com os hidrogênios do carbono vizinho com J=2,51 Hz. Portanto foram observados 32 átomos de hidrogênios como indicado na fórmula molecular

A estereoquímica do carbono hidroxilado pode ser determinada pela multiplicidade do sinal em 3,70 ppm (CHOH) e através da constante de acoplamento. De acordo com os parâmetros observados no espectro da página 58 tem-se que o acoplamento H-7 do carbono hidroxilado com os hidrogênios H-6a e H-6b é 2,51 Hz e sua multiplicidade pode ser observada na Figura 11.

O caso contrário foi observado na identificação do 7 α -hidroxiisoesteviol (26) obtido pela biotransformação do isoesteviol pelo *Fusarium verticilloides*. O hidrogênio H-7 possui constante de acoplamento de 11,4 Hz para os hidrogênios axiais H-7 e H-6a e 3,8 Hz entre o hidrogênio axial H-7 e o hidrogênio equatorial H-6b como é observado na literatura (Oliveira e Strapasson,1996). Na Figura 12 observa-se um duplo duplete bem definido referente ao acoplamento destes hidrogênios.

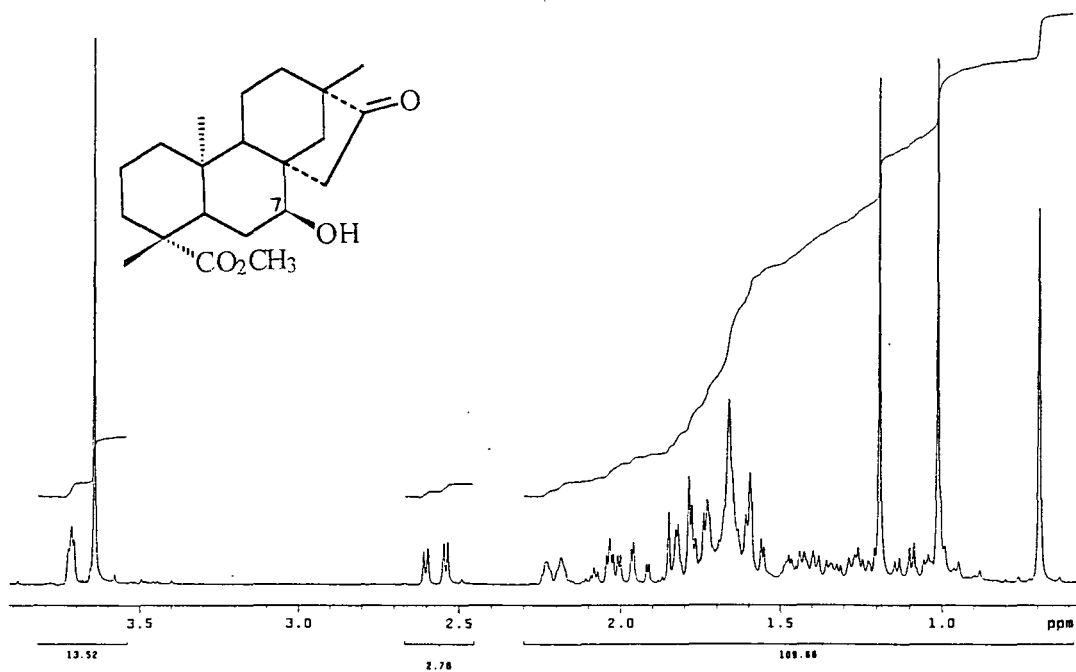


Figura 11: Espectro ampliado de RMN¹H do metil éster 7β-hidroxiosteviol, em CDCl₃

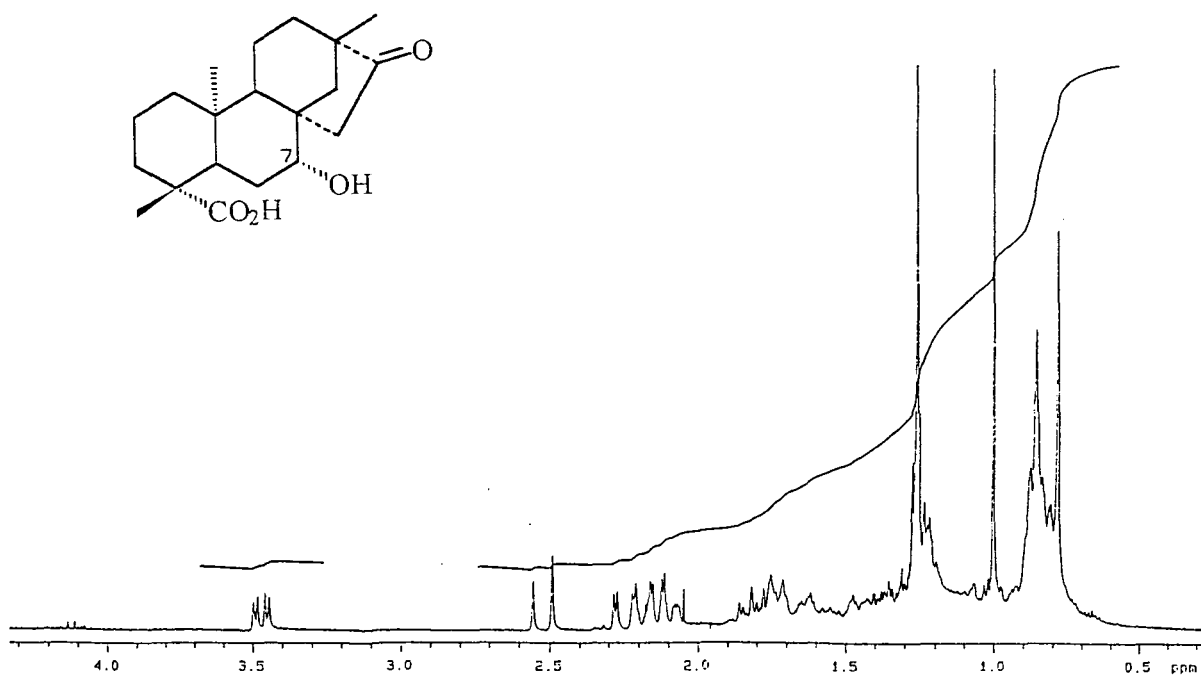


Figura 12: Espectro ampliado de RMN¹H do 7α-hidroxiosteviol, em CDCl₃

As constantes de acoplamento e as multiplicidades observadas indicam que o hidrogênio ligado ao carbono C-7 do produto de biotransformação do isoesteviol por *R. arrhizus* está em posição equatorial (α) em relação aos hidrogênios ligados ao carbono vizinho C-6. Portanto o grupo OH está ligado na posição axial (β).

No caso do 7 α -hidroxiisoesteviol(26), o grupo OH está na posição equatorial (α) e o hidrogênio ligado ao carbono C-7 na posição axial (β)(Figura 13).

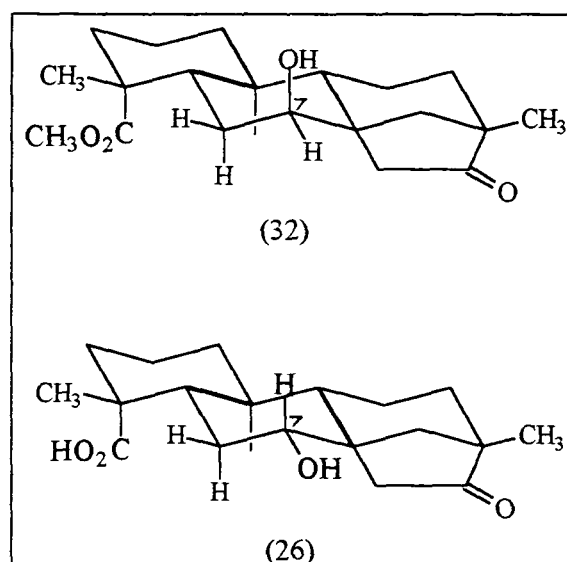
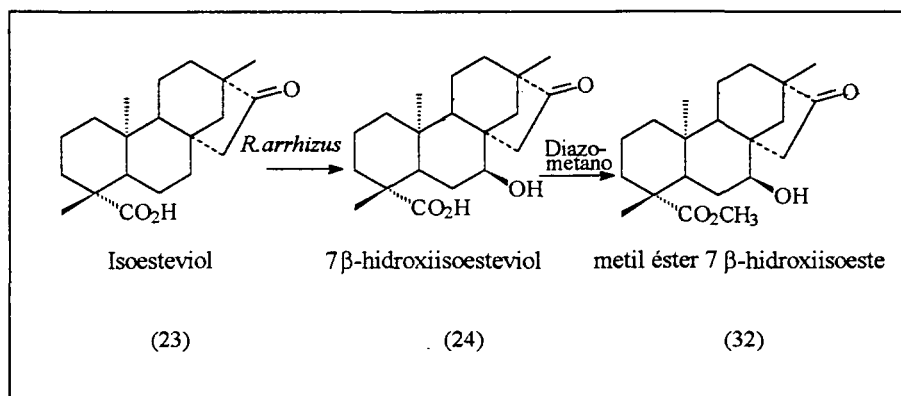


Figura 13: Representação da estereoquímica do metil éster 7 β -hidroxiisoesteviol e 7 α -hidroxiisoesteviol

Através dos dados acima conclui-se que o isoesteviol sofreu hidroxilação em C-7 na posição equatorial, e a esterificação do composto isolado formou o produto identificado como metil éster 7 β -hidroxiisoesteviol (metil éster 7 β -hidroxi-16-cetobaieren-19-oato) (32) conforme o Esquema 12.



Esquema 12: Biotransformação do isoesteviol por *R. arrhizus*

Como foi ressaltado acima, o isômero deste composto foi obtido pela biotransformação do isoesteviol pelo *Fusarium verticilloides*. O resultado obtido neste trabalho mostra, portanto, que é possível hidroxilar o C-7 do isoesteviol não apenas na posição axial (α), como obtido anteriormente, mas também na posição equatorial (β).

CONCLUSÕES

CONCLUSÕES

O primeiro objetivo do trabalho foi alcançado pois os fungos utilizados foram capazes de transformar o isoesteviol. O segundo objetivo também foi alcançado pois foram obtidos, isolados e caracterizados dois produtos. O 17-hidroxiisoesteviol (28) foi obtido usando o *P. chrysogenum* e o 7 β -hidroxiisoesteviol (24) o *R. arrhizus*.

Com relação ao 17-hidroxiisoesteviol (28), este é o primeiro relato de funcionalização de um grupo metila de um diterpenóide tetracíclico por *P. chrysogenum*. A importância deste resultado se deve ao fato de que não foi encontrado na literatura nenhum relato de hidroxilação microbiológica de metila de diterpenóide tetracíclico por *P. chrysogenum*. Portanto este fungo pode ser utilizado para funcionalizar seletivamente o C-17 de baieranos.

A comparação dos resultados do 7 β -hidroxiisoesteviol (24) com aquele obtido pela biotransformação do isoesteviol pelo *F. verticilloides*, quando foi obtido o isômero - 7 α -hidroxiisoesteviol (26) - demonstra que, pode-se obter isômeros de determinado substrato.

O trabalho mostrou também a importância da utilização da espectrometria na análise das estruturas dos produtos obtidos. A determinação do peso molecular e de fragmentos característicos da estrutura através da espectrometria de massa, a identificação de grupos funcionais presentes na molécula observados nos espectros no infravermelho, a determinação do número de átomos de carbono e diferenciação entre carbonos primários, secundários, terciários e quaternários observados respectivamente nos espectros de RMN¹³C e RMN¹³C DEPT e a determinação de estereoquímica através de análise do espectro de RMN¹H foram de extrema importância para determinação das biotransformações observadas a partir do isoesteviol.

A biotransformação de compostos orgânicos está envolvida com as áreas de bioquímica e química orgânica, tornando-a interdisciplinar e tem evoluído juntamente com o desenvolvimento dos estudos relativos as enzimas

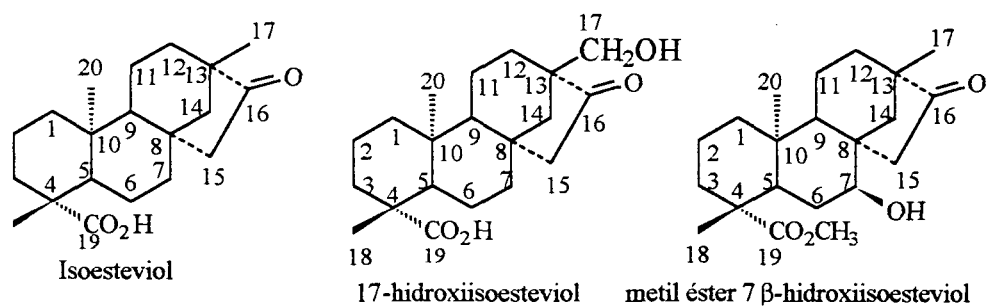
participantes deste processo bem como o aperfeiçoamento de métodos para purificação e identificação dos produtos obtidos.

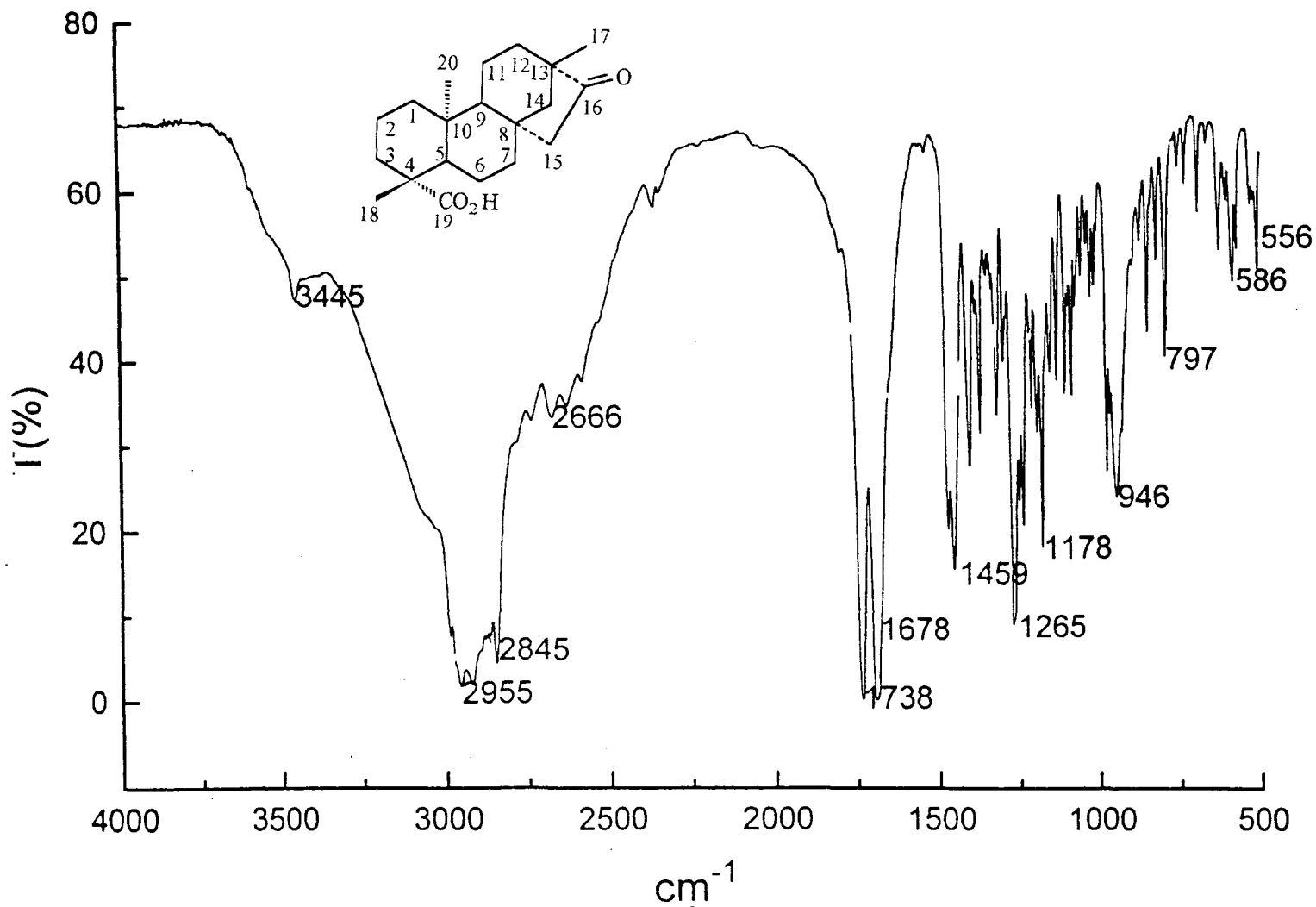
Como sugestão de trabalhos futuros na área sugere-se a utilização de outros fungos para biotransformação do isoesteviol e derivados. Testes preliminares já indicaram biotransformação com *Aspergillus niger*, *Rhizopus sp* e *G. fujikuroi* e os trabalhos para obtenção e isolamento dos metabólitos estão em andamento.

ANEXOS

Tabela 1: RMN ¹³C do isoesteviol, 17-hidroxiisoesteviol e metil éster 7β -hidroxiisoesteviol

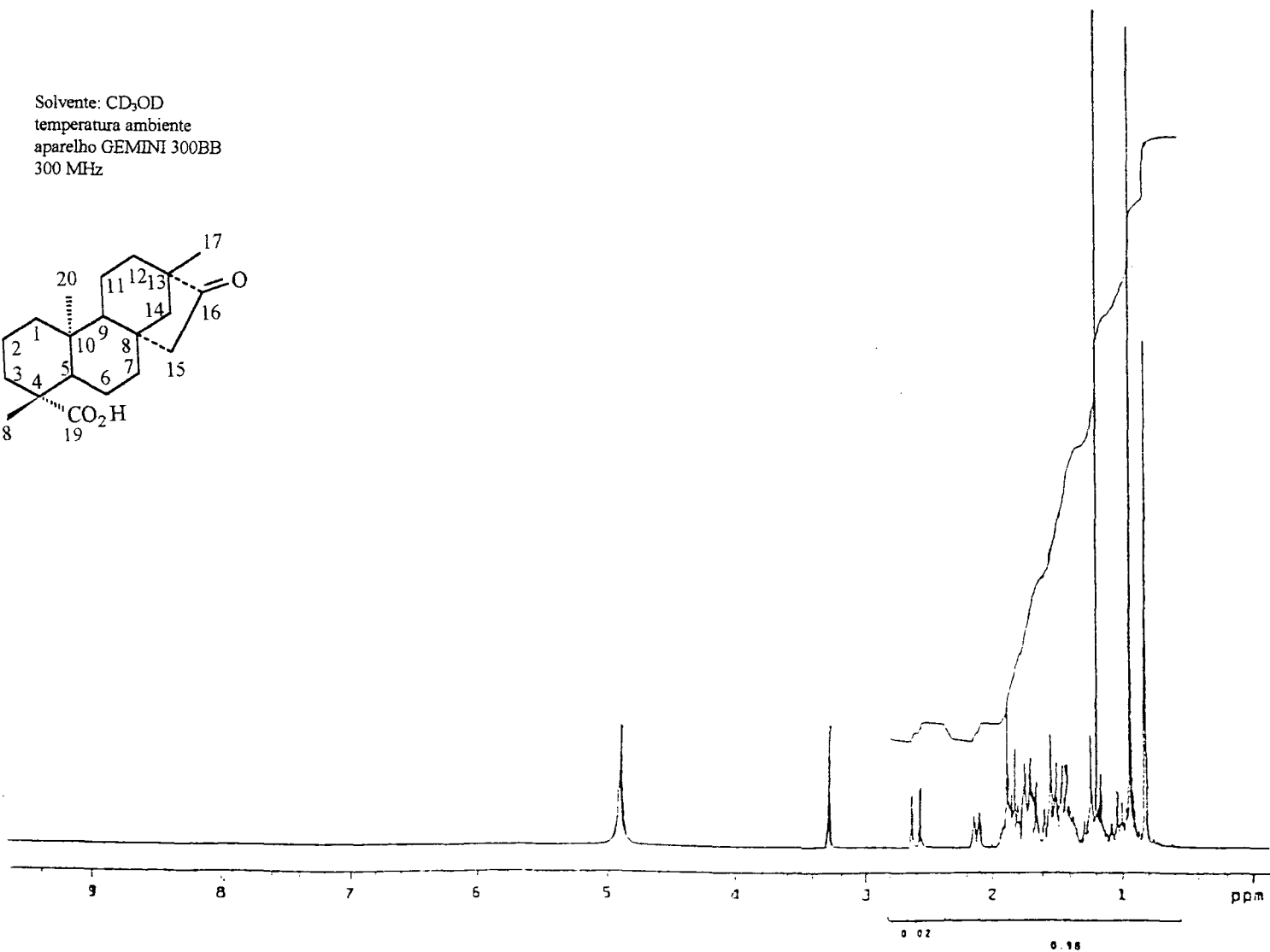
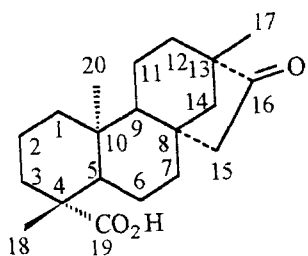
| Carbonos | Isoesteviol | 17-hidroxi- isoesteviol | metil éster- 7β-hidroxi- isoesteviol |
|----------|-------------|----------------------------|--|
| C-1 | 40,72 | 40,13 | 39,39 |
| C-2 | 20,13 | 19,24 | 18,78 |
| C-3 | 38,48 | 38,08 | 37,19 |
| C-4 | 44,65 | 44,03 | 43,58 |
| C-5 | 58,16 | 57,34 | 48,63 |
| C-6 | 22,96 | 22,01 | 29,30 |
| C-7 | 42,47 | 41,72 | 76,13 |
| C-8 | 49,85 | 40,09 | 48,49 |
| C-9 | 55,88 | 55,82 | 47,33 |
| C-10 | 39,25 | 38,66 | 37,73 |
| C-11 | 21,44 | 20,24 | 18,78 |
| C-12 | 39,08 | 32,49 | 37,66 |
| C-13 | 41,05 | 54,51 | 43,20 |
| C-14 | 55,18 | 49,41 | 49,78 |
| C-15 | 49,58 | 49,32 | 47,14 |
| C-16 | 225,08 | 223,66 | 221,70 |
| C-17 | 20,20 | 65,48 | 19,81 |
| C-18 | 29,53 | 29,35 | 28,52 |
| C-19 | 181,48 | 183,21 | 178,07 |
| C-20 | 13,97 | 13,74 | 12,80 |
| C-21 | ----- | ----- | 51,26 |





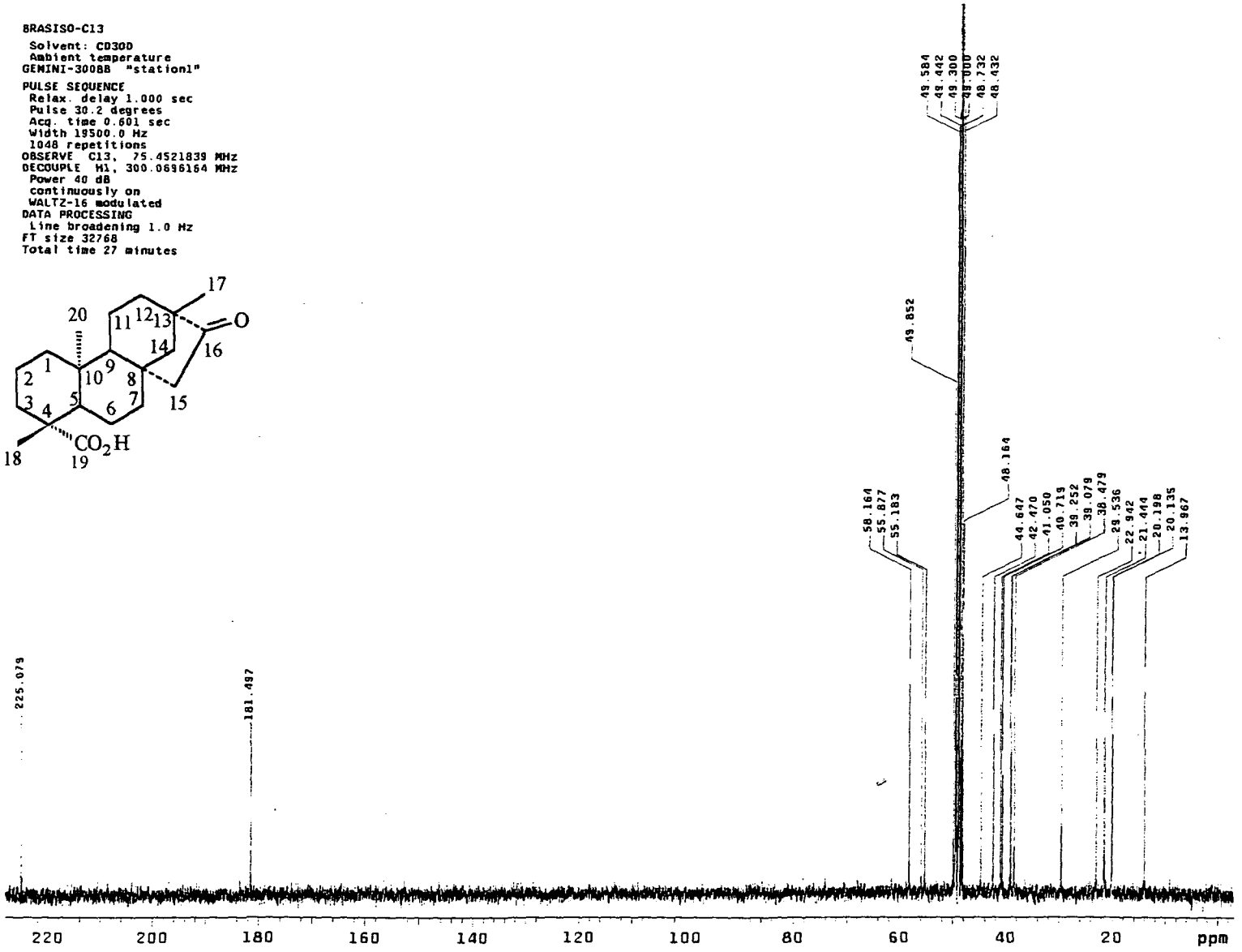
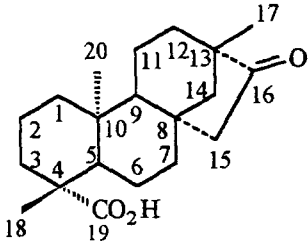
Espectro no infravermelho do isoesteviol, em KBr.

Solvente: CD₃OD
temperatura ambiente
aparelho GEMINI 300BB
300 MHz



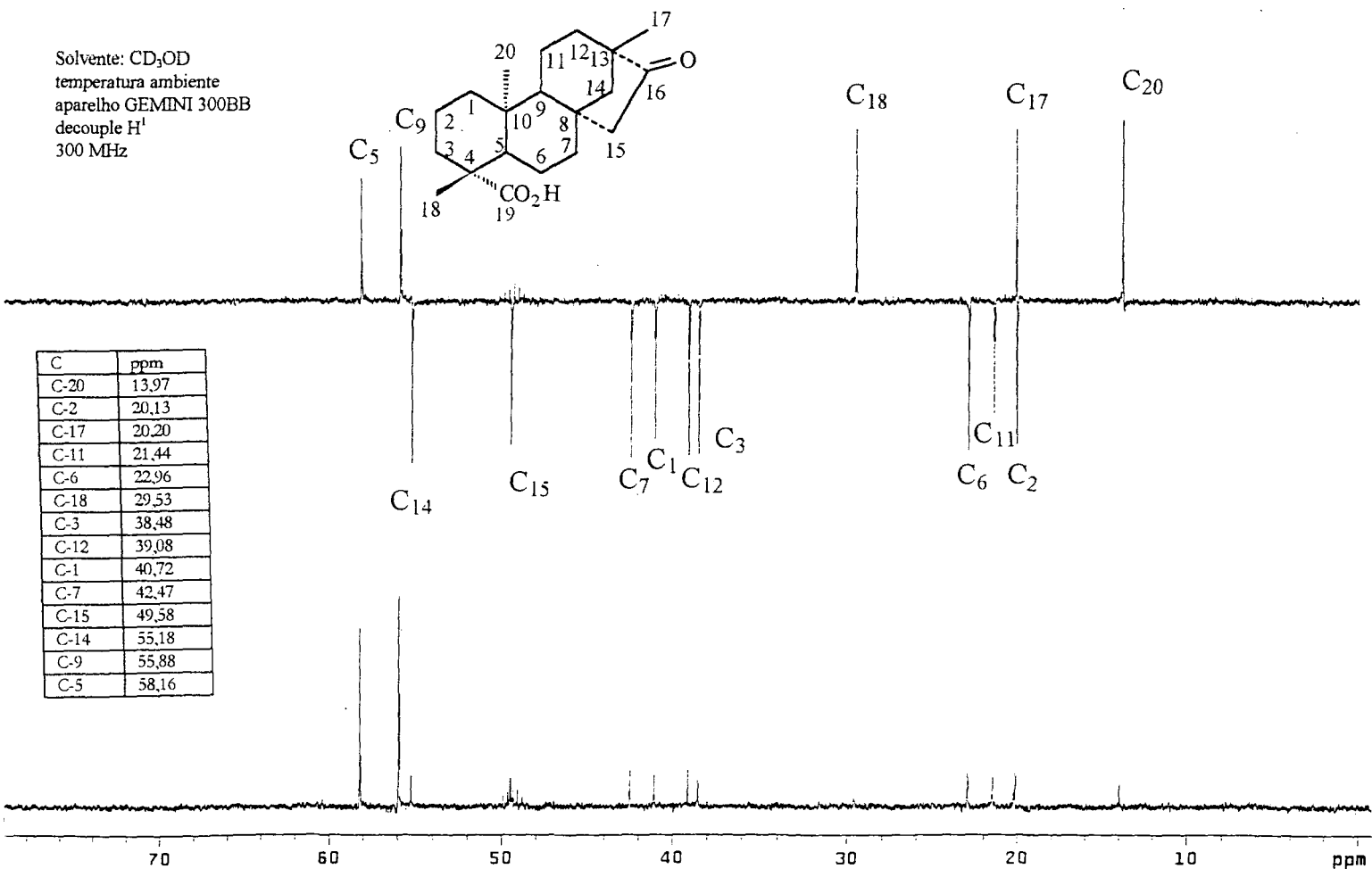
Espectro de RMN¹H do isoesteviol, em CD₃OD (300MHz)

BRASISO-C13
 Solvent: CD3OD
 Ambient temperature
 GEMINI-300BB "station1"
 PULSE SEQUENCE
 Relax. delay 1.000 sec
 Pulse 30.2 degrees
 Acq. time 0.601 sec
 Width 19500.0 Hz
 1048 repetitions
 OBSERVE C13, 75.4521839 MHz
 DECOUPLE H1, 300.0696164 MHz
 Power 40 dB
 continuously on
 WALTZ-16 modulated
 DATA PROCESSING
 Line broadening 1.0 Hz
 FT size 32768
 Total time 27 minutes

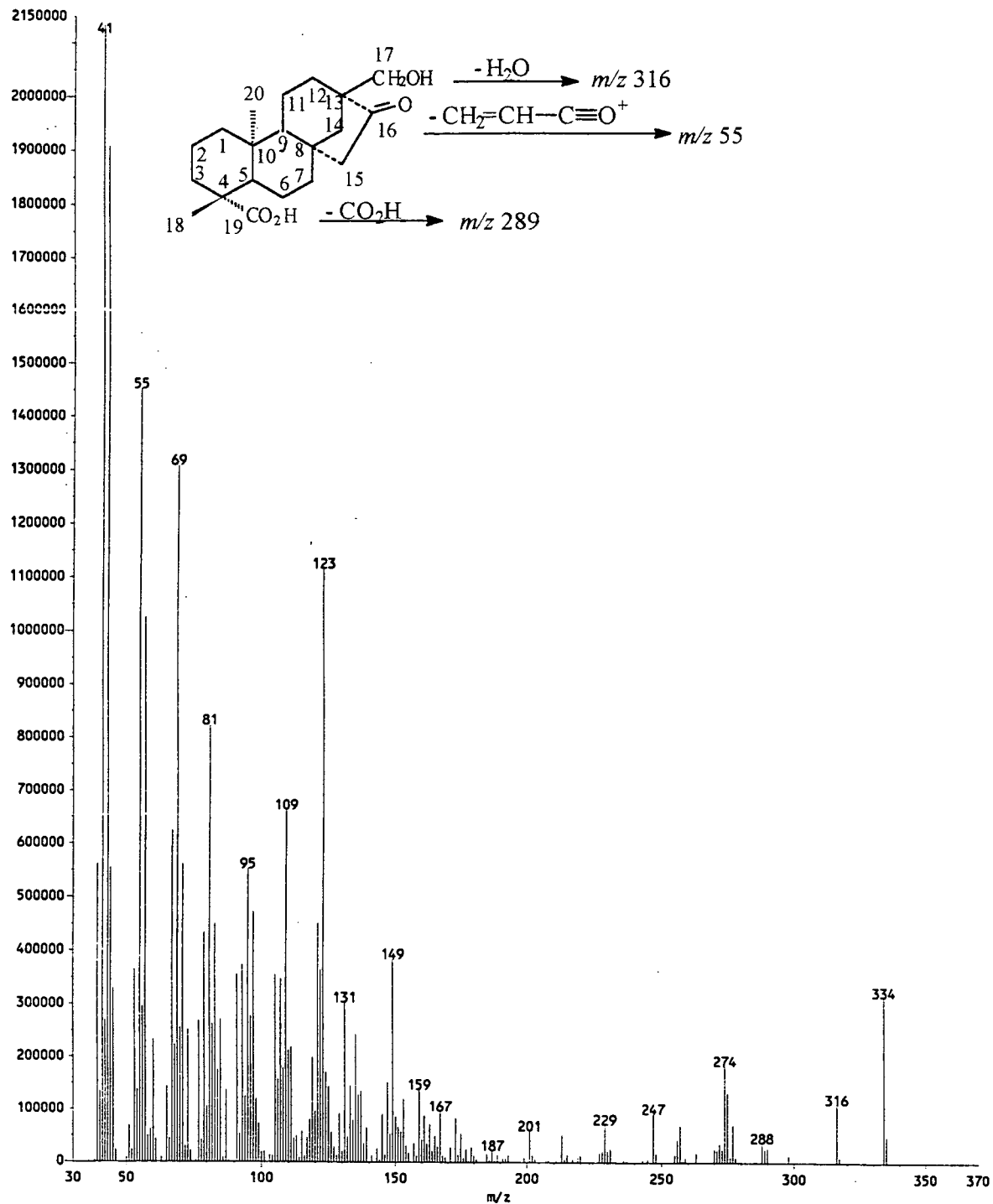


Espectro de RMN¹³C do isoesteviol, em CD₃OD (300MHz)

Solvente: CD₃OD
 temperatura ambiente
 aparelho GEMINI 300BB
 decouple H¹
 300 MHz

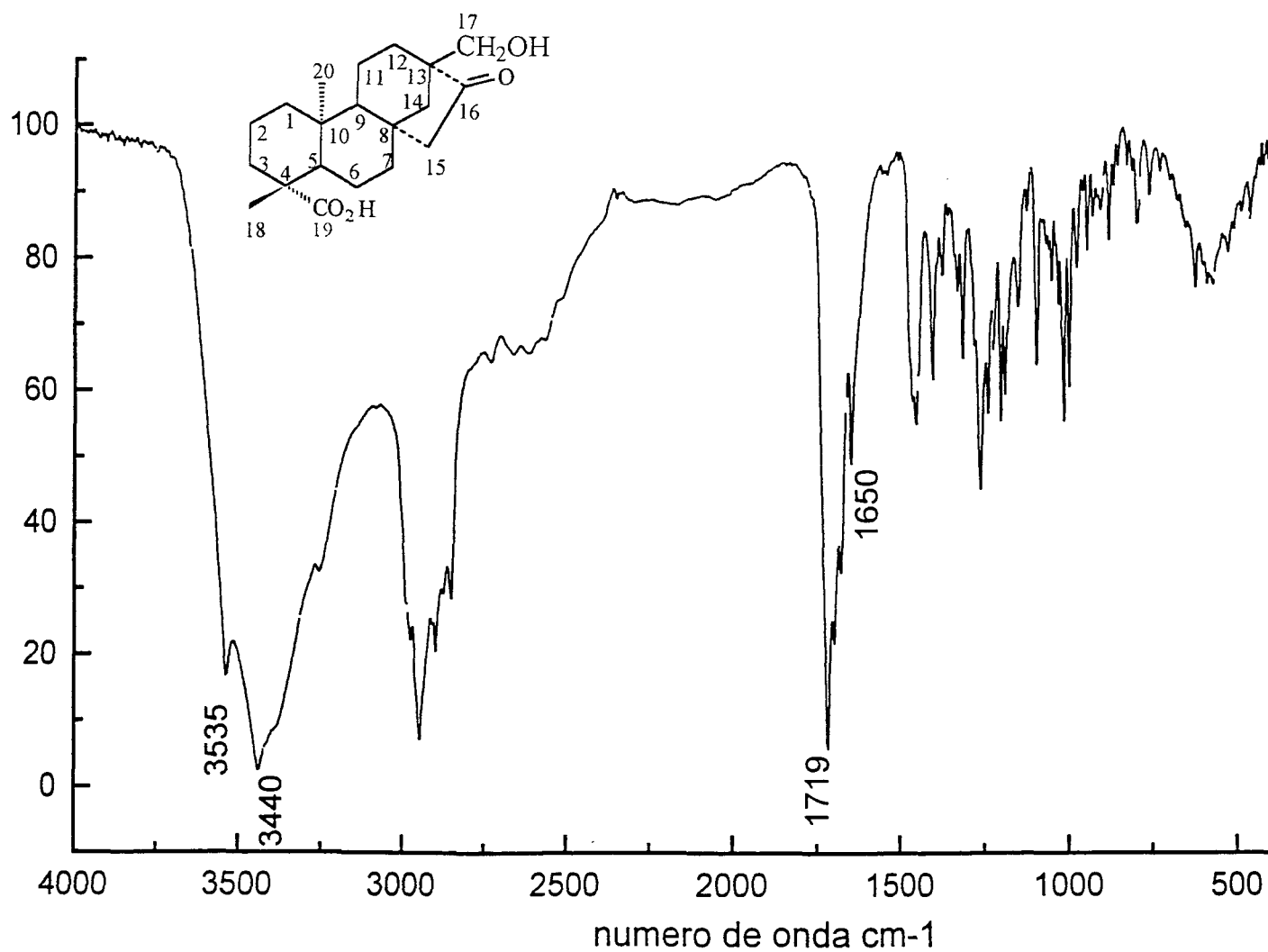


Espectro de RMN¹³C DEPT do isoesteviol, em CD₃OD (300MHz)

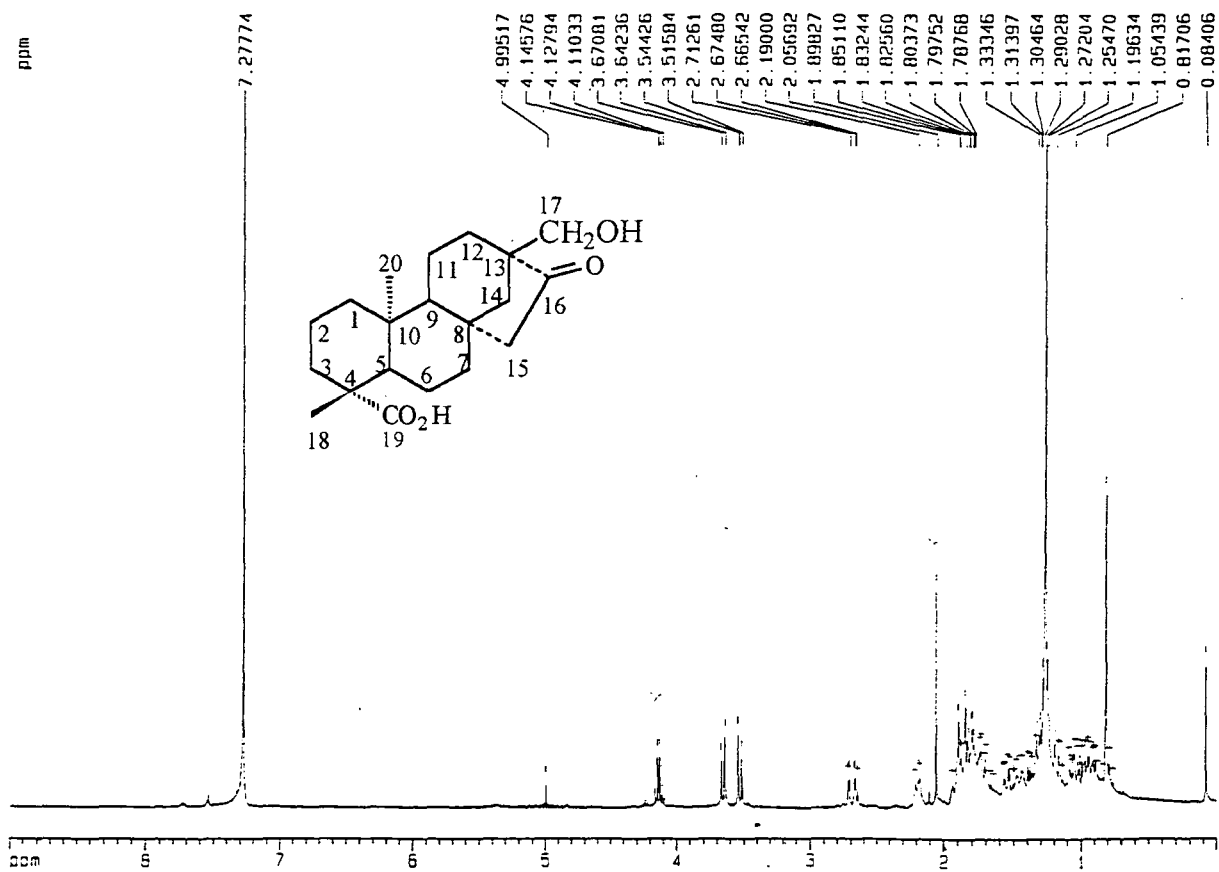


Espectro de massa do 17-hidroxiisoeestiol

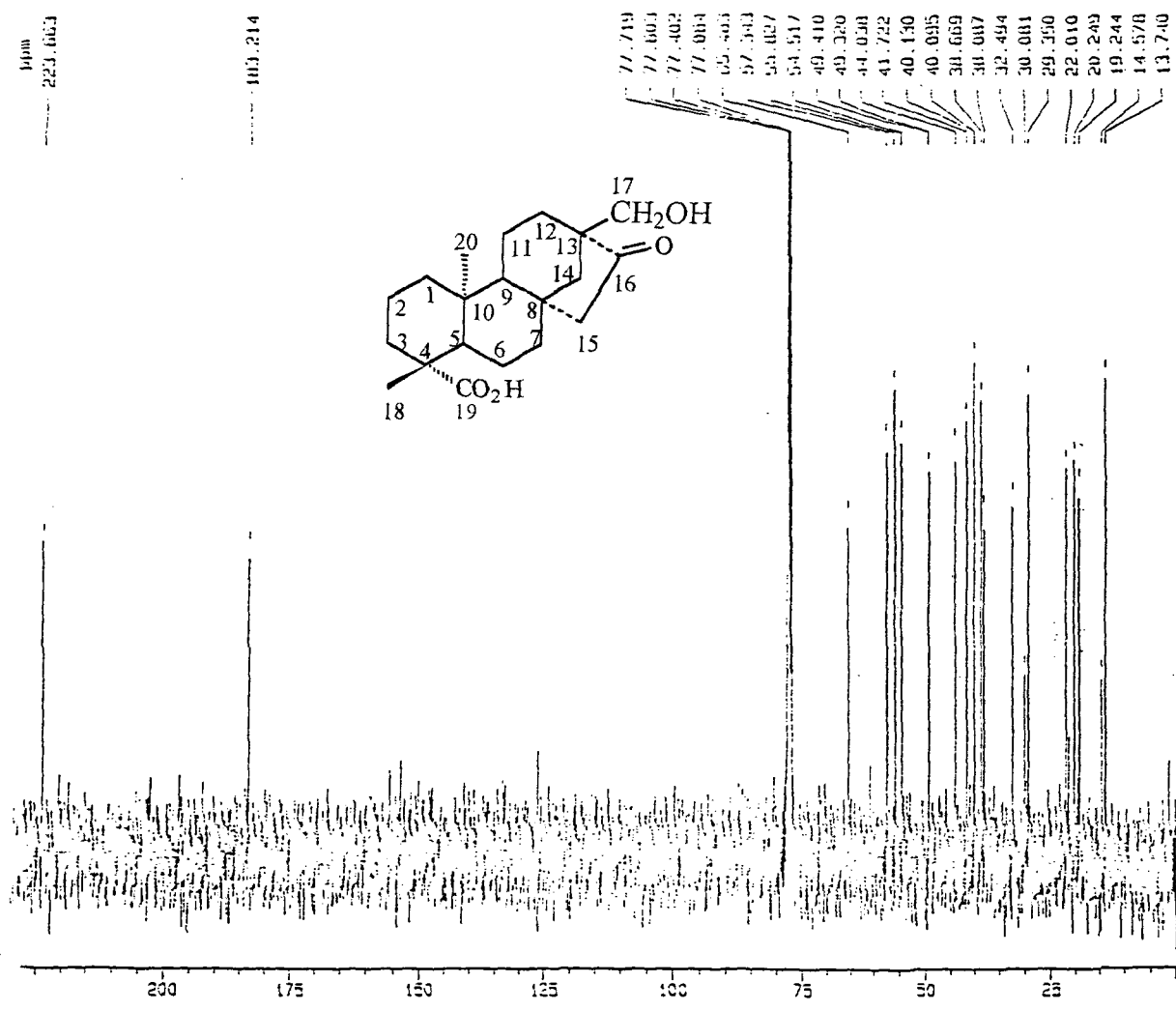
17-hidroxiisoesteviol



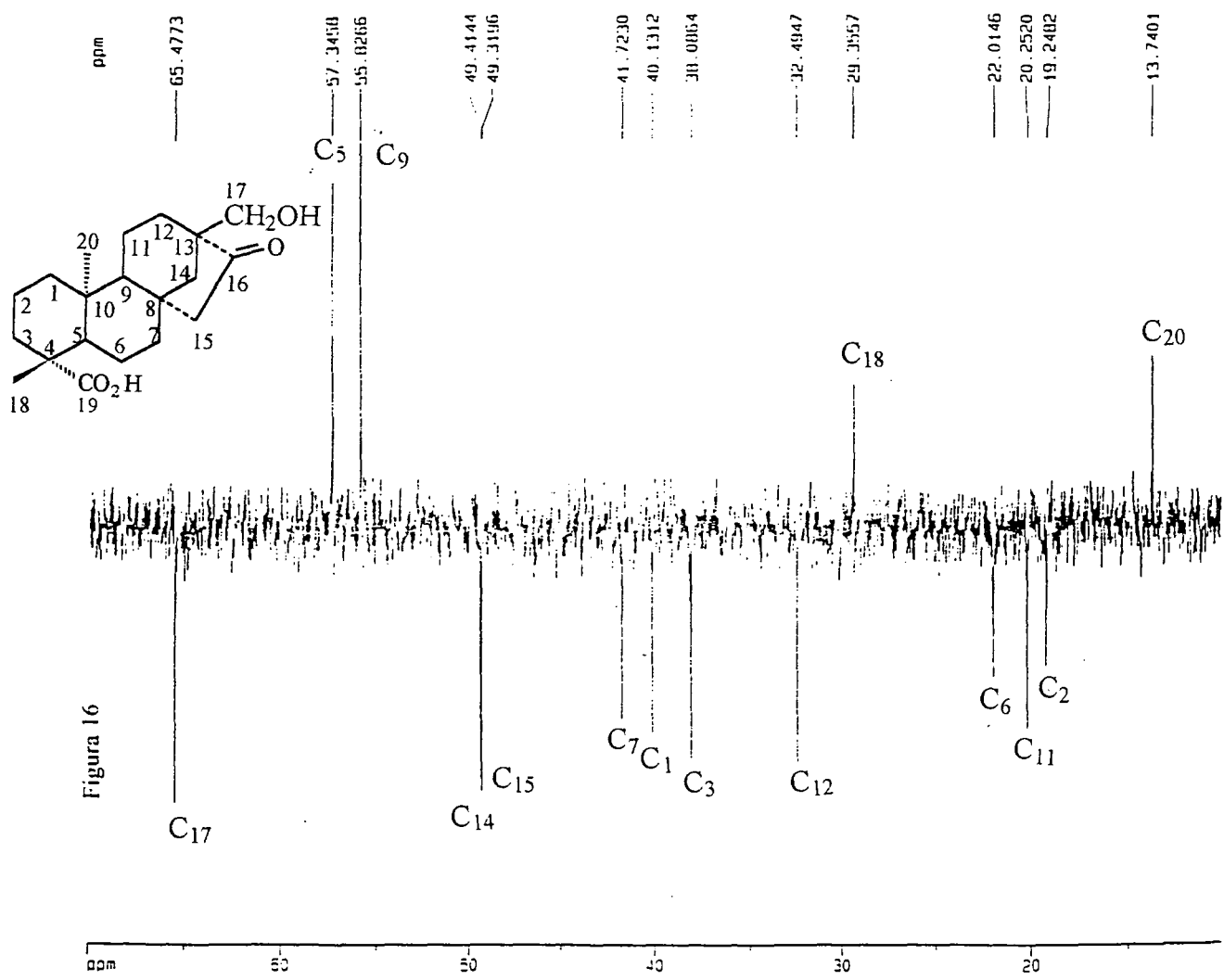
Espectro no infravermelho do 17-hidroxiisoesteviol, em KBr



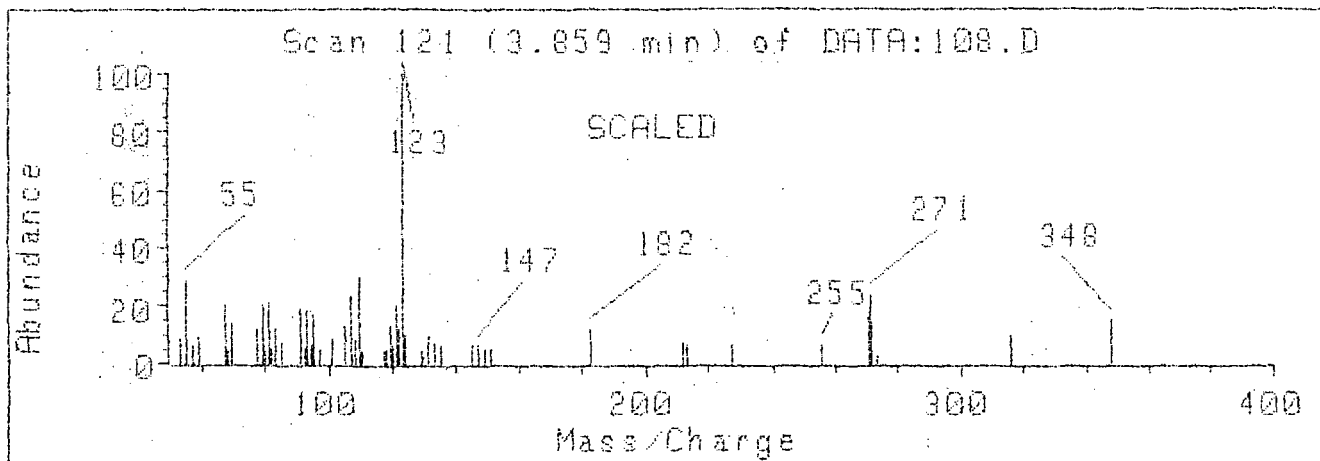
Espectro de RMN¹H do 17-hidroxiisosteviol, em CDCl₃ (400 MHz)



Espectro de RMN¹³C do 17-hidroxiisosteviol, em CDCl₃ (400 MHz)

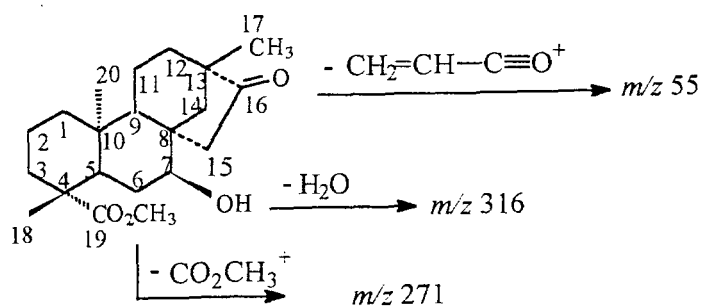


Espectro de RMN¹³C DEPT do 17-hidroxiisosteviol, em CDCl₃ (400 MHz)



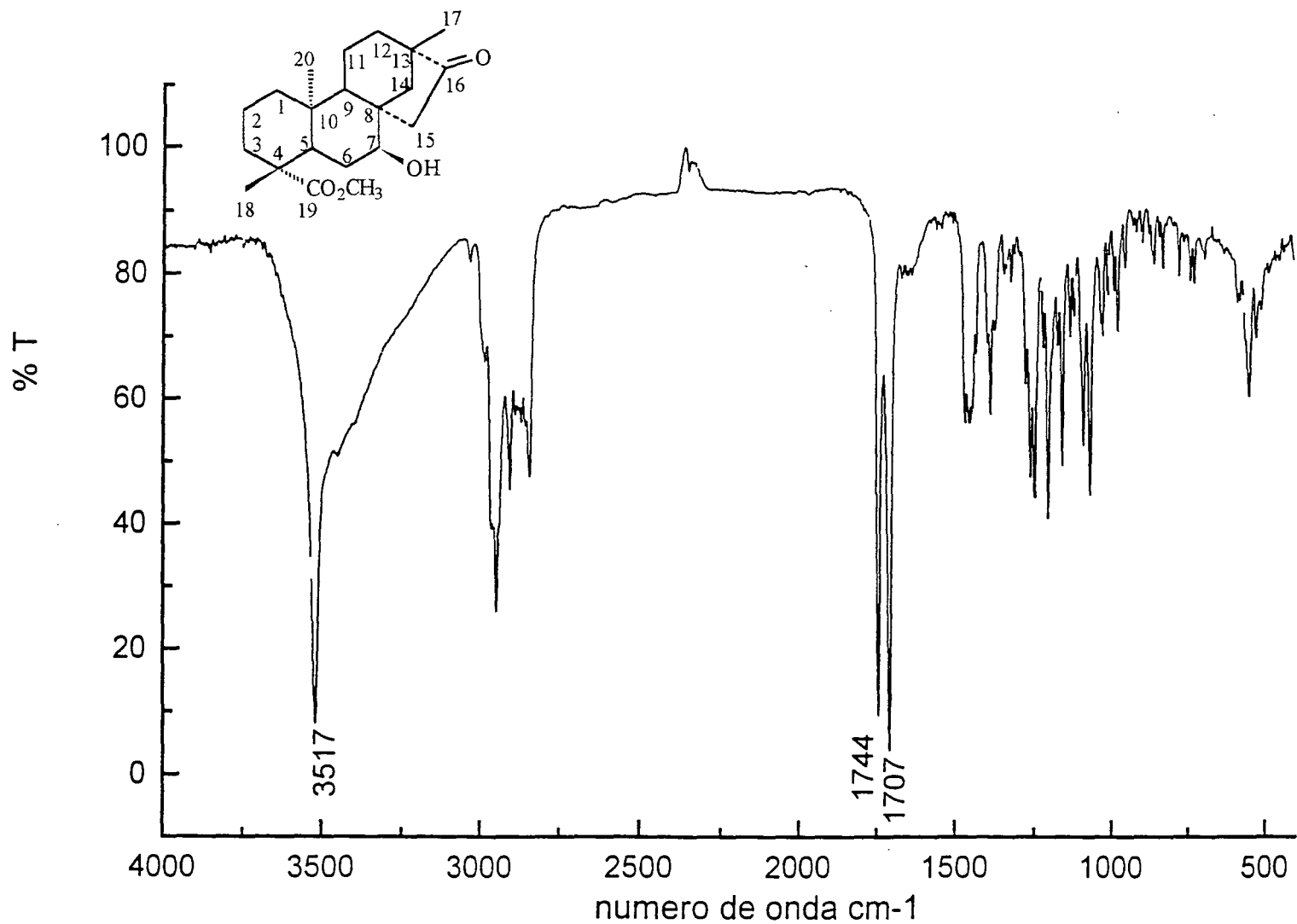
Scan 121 (3.859 min) of DATA:108.D

MOI



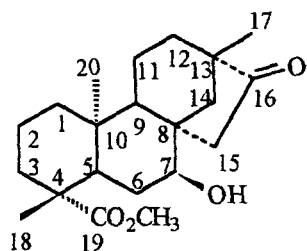
Espectro de massa do metil éster 7 β -hidroxiisosteviol

metil éster 7-B-hidroxiisoesteviol

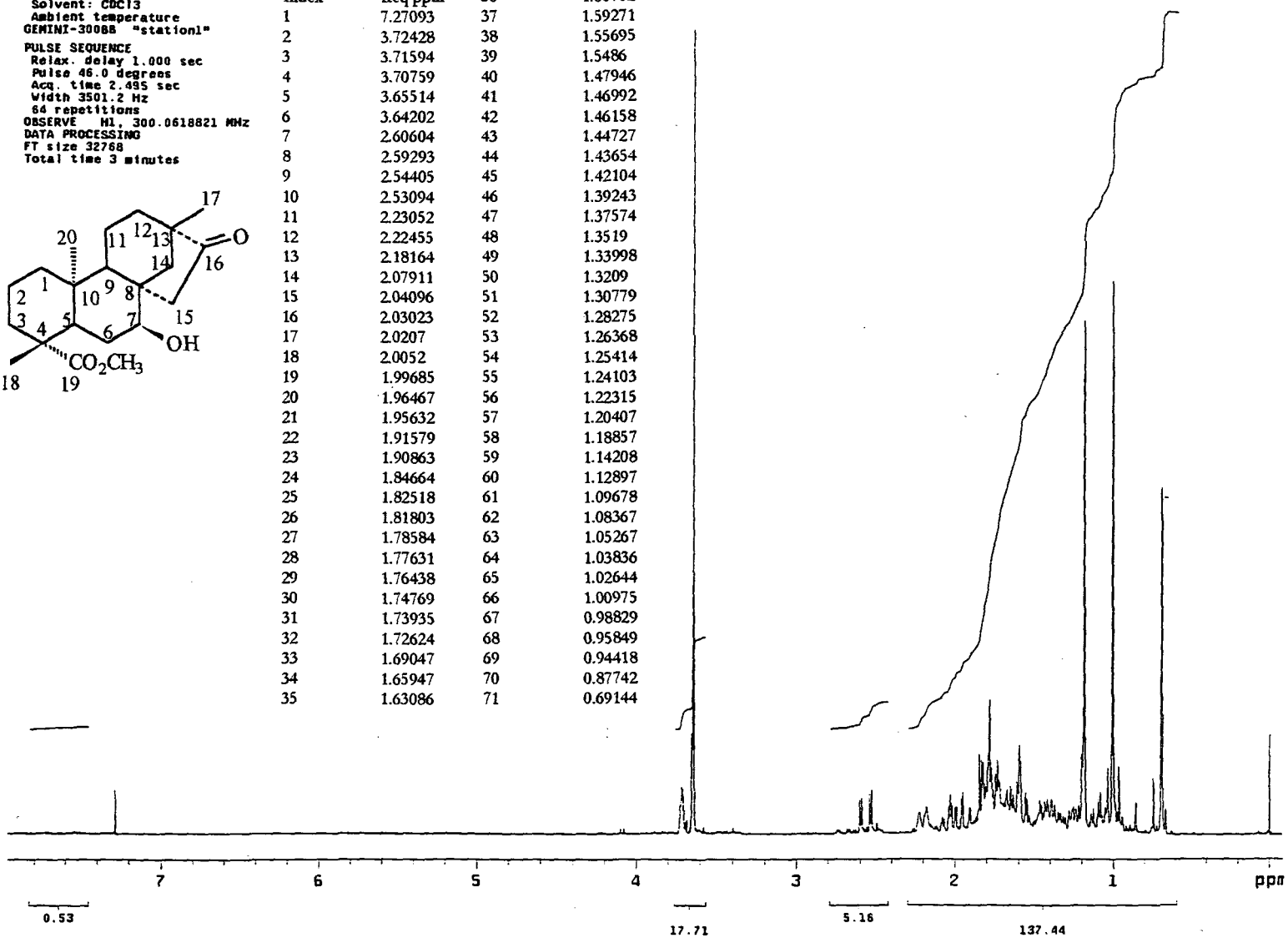


Espectro no infravermelho do metil éster 7β-hidroxiisoesteviol, em KBr

P-01-M1
 Solvent: CDCl₃
 Ambient temperature
 GEMINI-300BS "station1"
 PULSE SEQUENCE
 Relax. delay 1.000 sec
 Pulse 46.0 degrees
 Acq. time 2.495 sec
 Width 3501.2 Hz
 64 repetitions
 OBSERVE HI, 300.0618821 MHz
 DATA PROCESSING
 FT size 32768
 Total time 3 minutes



| Index | freq ppm | 36 | 1.60702 |
|-------|----------|----|---------|
| 1 | 7.27093 | 37 | 1.59271 |
| 2 | 3.72428 | 38 | 1.55695 |
| 3 | 3.71594 | 39 | 1.5486 |
| 4 | 3.70759 | 40 | 1.47946 |
| 5 | 3.65514 | 41 | 1.46992 |
| 6 | 3.64202 | 42 | 1.46158 |
| 7 | 2.60604 | 43 | 1.44727 |
| 8 | 2.59293 | 44 | 1.43654 |
| 9 | 2.54405 | 45 | 1.42104 |
| 10 | 2.53094 | 46 | 1.39243 |
| 11 | 2.23052 | 47 | 1.37574 |
| 12 | 2.22455 | 48 | 1.3519 |
| 13 | 2.18164 | 49 | 1.33998 |
| 14 | 2.07911 | 50 | 1.3209 |
| 15 | 2.04096 | 51 | 1.30779 |
| 16 | 2.03023 | 52 | 1.28275 |
| 17 | 2.0207 | 53 | 1.26368 |
| 18 | 2.0052 | 54 | 1.25414 |
| 19 | 1.99685 | 55 | 1.24103 |
| 20 | 1.96467 | 56 | 1.22315 |
| 21 | 1.95632 | 57 | 1.20407 |
| 22 | 1.91579 | 58 | 1.18857 |
| 23 | 1.90863 | 59 | 1.14208 |
| 24 | 1.84664 | 60 | 1.12897 |
| 25 | 1.82518 | 61 | 1.09678 |
| 26 | 1.81803 | 62 | 1.08367 |
| 27 | 1.78584 | 63 | 1.05267 |
| 28 | 1.77631 | 64 | 1.03836 |
| 29 | 1.76438 | 65 | 1.02644 |
| 30 | 1.74769 | 66 | 1.00975 |
| 31 | 1.73935 | 67 | 0.98829 |
| 32 | 1.72624 | 68 | 0.95849 |
| 33 | 1.69047 | 69 | 0.94418 |
| 34 | 1.65947 | 70 | 0.87742 |
| 35 | 1.63086 | 71 | 0.69144 |

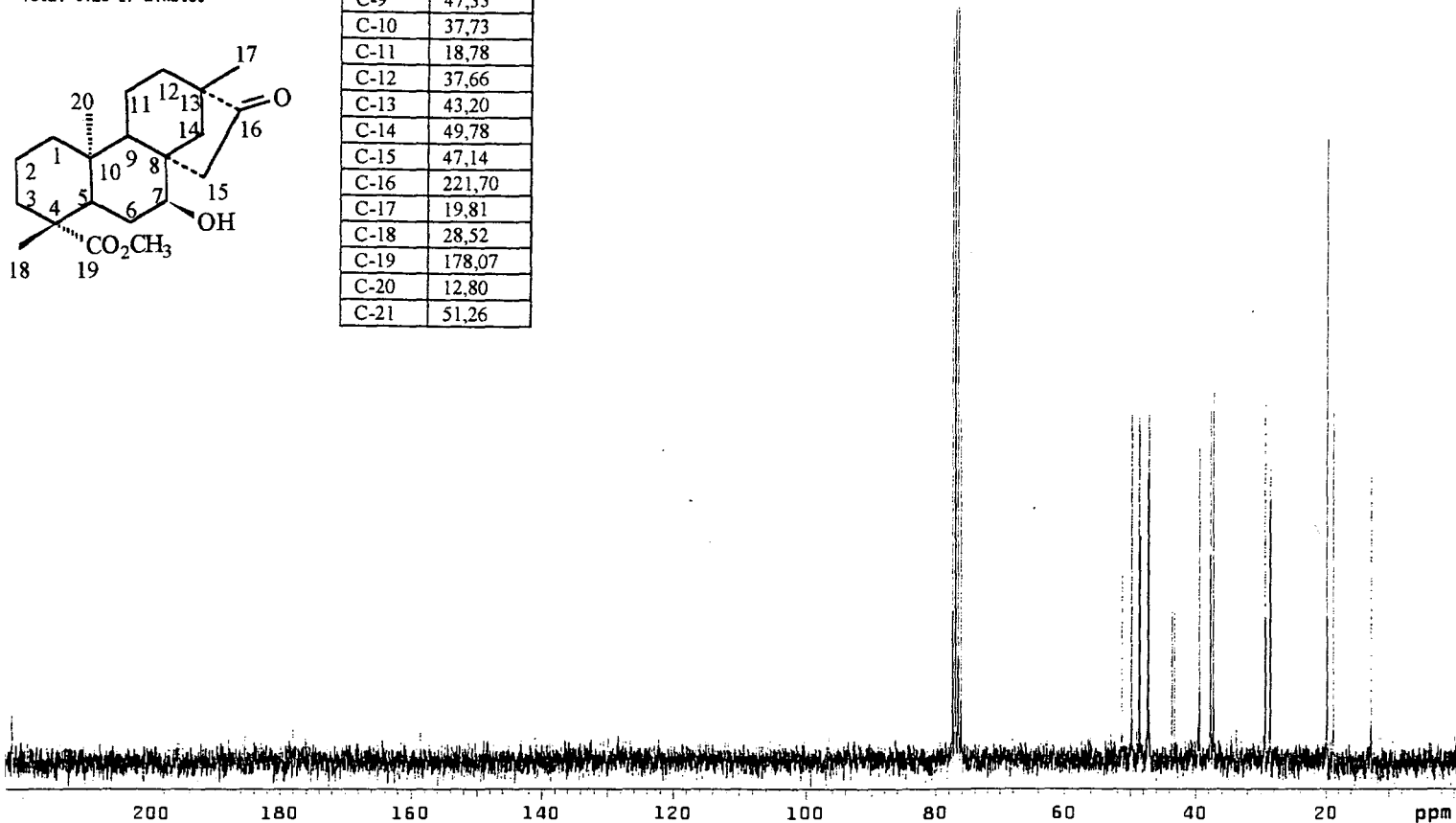
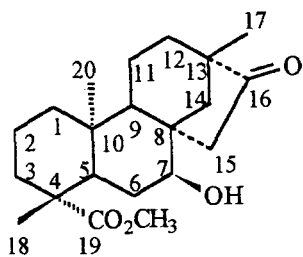


Espectro de RMN¹H do metil éster 7β-hidroxiisosteviol, em CDCl₃, (300 MHz).

MDI-C13

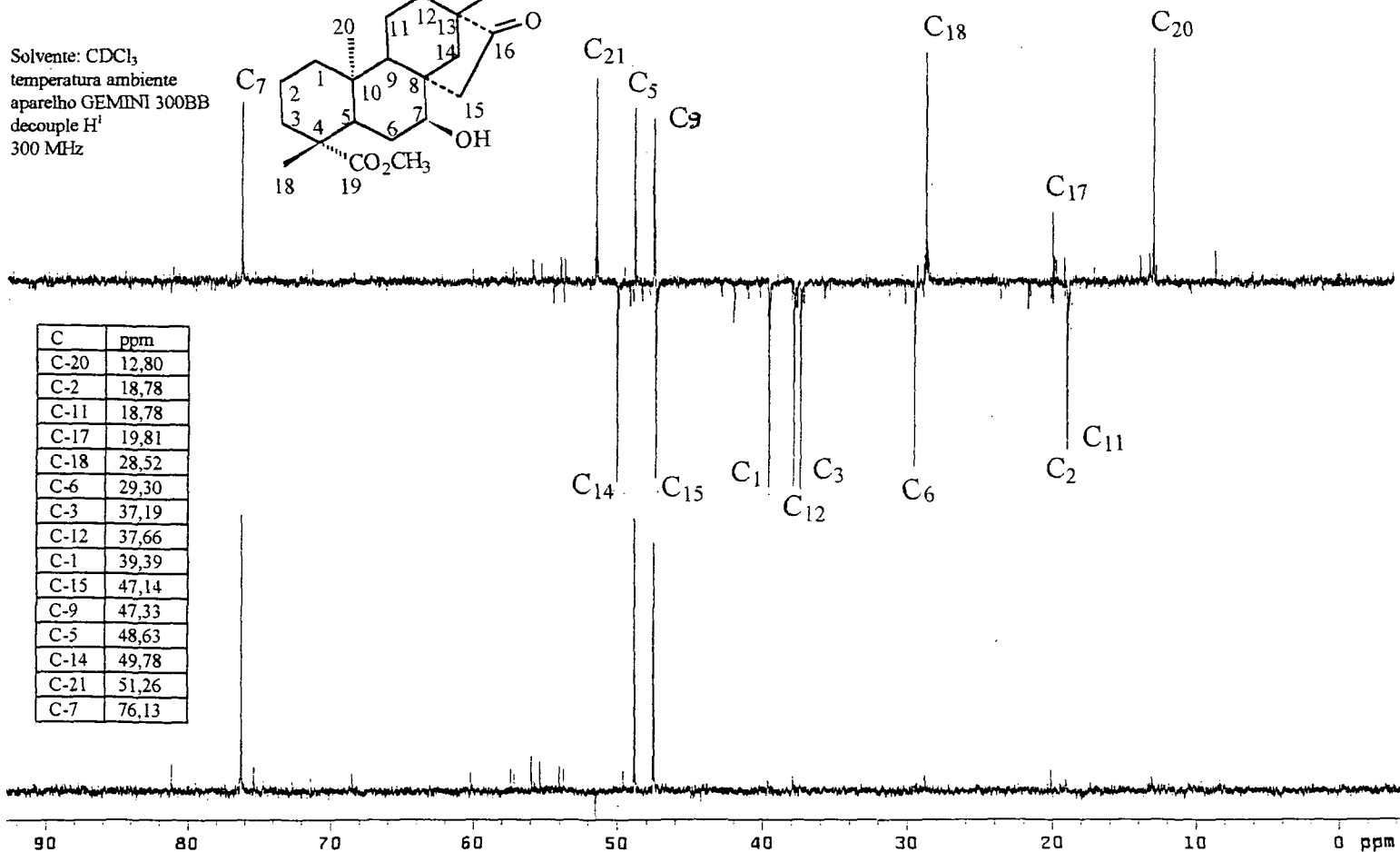
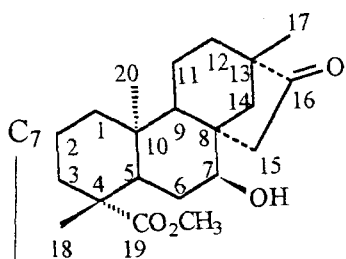
Solvent: CDCl₃
Ambient temperature
GEMINI-300BB "station1"
PULSE SEQUENCE
Relax. delay 1.000 sec
Pulse 45.0 degrees
Acq. time 0.600 sec
Width 18761.7 Hz
1024 repetitions
OBSERVE C13, 75.4506187 MHz
DECOUPLE H1, 300.0629670 MHz
Power 39 dB
continuously on
WALTZ-16 modulated
DATA PROCESSING
Line broadening 1.0 Hz
FT size 32768
Total time 27 minutes

| C | ppm |
|------|--------|
| C-1 | 39,39 |
| C-2 | 18,78 |
| C-3 | 37,19 |
| C-4 | 43,58 |
| C-5 | 48,63 |
| C-6 | 29,30 |
| C-7 | 76,13 |
| C-8 | 48,49 |
| C-9 | 47,33 |
| C-10 | 37,73 |
| C-11 | 18,78 |
| C-12 | 37,66 |
| C-13 | 43,20 |
| C-14 | 49,78 |
| C-15 | 47,14 |
| C-16 | 221,70 |
| C-17 | 19,81 |
| C-18 | 28,52 |
| C-19 | 178,07 |
| C-20 | 12,80 |
| C-21 | 51,26 |



Espectro de RMN¹³C do metil éster 7β-hidroxiisosteol, em CDCl₃, (300 MHz).

Solvente: CDCl₃
 temperatura ambiente
 aparelho GEMINI 300BB
 decouple H¹
 300 MHz



| C | ppm |
|------|-------|
| C-20 | 12,80 |
| C-2 | 18,78 |
| C-11 | 18,78 |
| C-17 | 19,81 |
| C-18 | 28,52 |
| C-6 | 29,30 |
| C-3 | 37,19 |
| C-12 | 37,66 |
| C-1 | 39,39 |
| C-15 | 47,14 |
| C-9 | 47,33 |
| C-5 | 48,63 |
| C-14 | 49,78 |
| C-21 | 51,26 |
| C-7 | 76,13 |

**Espectro de RMN¹³C DEPT do 7β-hidroxiisosteviol metil éster,
 em CDCl₃ (300 MHz).**

REFERÊNCIAS

BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALVAREZ, M.; KUSUMOTO, I. T., **Análise quantitativa dos glicosídeos edulcorantes da Stevia rebaudiana e dos seus produtos de hidrólise através da cromatografia líquida de alta performance (HPLC)**, Arq. de Biol. e Tecnol., 30: 2, 337-348, 1987
- ATLAS, R. M.. **Microbiology**. Macmillan Publishing Company. 426, 1984.
- AVENT, A.G.; HANSON, J. R.; OLIVEIRA, B. H.. **Hidrólise de um glicosídeo diterpenoide, o steviosídeo**. Phytochemistry, 29, p. 2712-2715, 1990.
- BEARDER, J. R.; FRYDMAN, V.M.; GASKIN, P.; MacMILLAN, J.; WELS, C.M.. **Conversion of isosteviol and steviol acetate into gibberellin analogues by mutant B1-41a of *Gibberella fujikuroi* and the preparation of [³H] gibberellin A₂₀**. J. C. S. Perkin Trans. 1, p. 173-178, 1976.
- BECHER, E., SCHUEP, W., MATZINGER, P.K., TEISSEIRE, P.J., EHRET, CH., MARUYAMA, H., SUHARA, Y., ITO, S., OGAWA, M., YOKOSE, K., SAWADA, T., FUJIWARA, A., FUKUWARA, M., TAZOE, M., SHLOMI, Y. BR. Patent 1.586.759 (1981).
- BRITO, A. R. S.; BRITO A. A. S.. **Forty years of Brazilian medicinal plant research**. Journal of Ethnofarmacology, 39, p. 53-67, 1993.
- BU'LOCK, J.; KRISTIANSEN, B.. **Biotechnologia básica**. Editorial Acribia. Zaragoza. p.235-237. 1987.
- CARVALHO, E.S.; SANTOS, M.G.; FEVEREIRO, P.C.A.; ROCHA, L.M. **Investigação da Composição Química do Óleo Essencial de Anemia tomentosa (Savigny) Swartz var. anthriscifolia (Schrader) Mickel (Schizaeaceae-Pteridophyta) Uma Nova Fonte de Álcool de Patchouli**. 21a. Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, Livro de Resumos vol. 2, PN-144, 1998.
- CHEN, K.; SHI, Q.; FUJIOKA, T.; ZHANG, D.; HU, C.; JIN, J.; KILKUSKIE, R.; LEE, K.. **Anti-Aids Agents. Tripterifordin a novel anti-HIV principle from *Tripterygium wilfordii*. Isolation and structural elucidation**. J. Nat. Prod., vol 55, n° 1, pp. 88-92, 1992.
- COSTA, S.C.; ALVAREZ, M.. **Metabolism of Isosteviol as a low specific substrate by a wild strain of *G. fujikuroi***. Arq. de Biol. e Tecnol., 37: p.1013,1994.

- DEMAIN, A.L., SOLOMON, N. A. , **Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology**, Ed. American Society for Microbiology, 1986.
- FABER, K.. **Biotransformations in Organic Chemistry**. Springer-Verlag. Alemanha, 1992.
- FONKEN, G. S.; HERR M. E.; MURRAY H. C.; REINEKE L. M.. **Microbiological Hydroxylation of Monocyclic Alcohols**. J. Am. Chem. Soc., 89, p-672, 1967.
- FUJITA, E.; NAGAO, Y.; KANEKO, K.; NAKAZAWA, S.; KURODA, H. **The antitumor and antibacterial activity of *Isodon* diterpenoids**. Chem. Pharm. Bulletin, 24 (9), p. 2118-2127, 1976.
- FURNIN B. S.; HANNAFORD A. J., SMITH, P.W., **Vogel's Textbook of Practical Organic Chemistry**, 5^o edição, London, 1989.
- GARCIA-GRANADOS, A. ; MARTINEZ, A. ; ONORATO, M.E.. **Microbial transformation of tetracyclic diterpenes: conversion of *ent*-beyerenes by *Rhizopus nigricans* cultures**. J. Nat. Prod., vol. 48, n^o 3, pp. 371-375, 1985.
- GHISALBERTI, E.L..**The biological activity of naturally occurring kaurane diterpenes**. Fitoterapia, 68, v. 4, p. 303-325, 1997.
- HANG Y. D.; HAMANCI H.; WOODANS E. E.. **Production of L(+)*l*actic acid by *Rhizopus orizae* immobilized in calcium alginate gels**. Biotechnol. Letters, 11, n 2, p. 119-120, 1989.
- HANSON, J. R., WHITE, A. F.. **The transformation os steviol by *Gibberella fujikuroi***. Tetrahedron, v. 24, p. 6291-6293, 1968.
- HANSON. J. R.. **The biosynthesis of the diterpenes**. Edit. W. Herz, 1971
- HANSON, J. R.. **Diterpenoids**. Nat. Prod. Rep. 8,1. 1991.
- HANSON, J. R.. **The microbiological transformation of diterpenoids**. Nat. Prod. Rep., 1992.
- HANSON, J. R.; OLIVEIRA, B. H.. **Hydrolysis of the diterpenoid glycoside, stevioside**. Nat. Prod. Rep., 10(3), p. 301, 1993.
- HECHTER, O.; JACOBSON, R.P.; JEANLOZ, R.; LEVY, H.; MARSHAL, C.W.; PINCUS, G.; SCHENKER, V. **The bio-oxigenation of 11-desoxycorticosterone at C-11**. J. Am. Chem. Soc., n^o 71, p. 3261, 1949.

- HERNANDEZ M. G.; MARTIN, A. S.. **The microbiological transformation of some *ent*-beyerene diterpenoids by *Gibberella fujikuroi* to beyergibberellins and beyerenolides.** *Phytochemistry*, vol. 24, n° 7, pp. 1489-1491, 1985).
- KAZUYAMA, S. **Present status of sweeteners from *Stevia*.** *Shokuhin to kagaku*, 21, pp. 90-94, 1979.
- KIESLICH, K.. **Biotechnology.** v. 6a. Verlag-Chemie. Florida. 1984.
- KOHDA, H.; KASAI R.; YAMASAKI, K.; TANAKA, O. **New sweet diterpene glucosides from *Stevia rebaudiana*.** *Phytochemistry*, 15, p. 981-983, 1976.
- KRIEGER, N. **Produção, Purificação e Caracterização de Lipases de *Penicillium citrinum*.** Tese de Doutorado ao Curso de Pós-Graduação em Bioquímica do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná. 1995
- KUMAR, P.K.R.; LONSANE, B.K.. **Microbial Production of Gibberellines: State of the Art.** *Advances Applied Microbiology*. vol 34, pp 29-59. 1989.
- LABOUREUR, P.; LABROUSSE, M.. **Lipase de *Rhizopus arrhizus*. Obtention, purification et propriétés de la lipase de *Rhizopus arrhizus* var. *delemar*.** *Bul. Soc. Chim. Biol.*, 48, p. 747, 1966.
- MARCH, J.. **Advanced Organic Chemistry.** 4° edição, 1992.
- MITSCHER, L. A.; RAO G. S.; VEYSOGLU, T.; DRAKE S.; HAAS, T.. **Antimicrobial agents from higher plants prenylated flavonoids and other phenols from *Glycyrrhiza lepidota*.** *Phytochemistry*, 22 (2), p. 573-576, 1983.
- OLIVEIRA, B.H.; BUENO, D.D.. **Biotransformação de esteróis.** *Quimica Nova*. 19(3). p. 233-236. 1996.
- OLIVEIRA, B. H., STRAPASSON, R., **Biotransformation of isoesteviol by *Fusarium verticilloides*.** *Phytochemistry*, vol 43, n 2, p.393-395, 1996.
- OGAWA, T.; NOZAKI, M.; MATSUI, M.. **Total synthesis of stevioside.** *Tetrahedron*, vol 36, p. 2641-2648, 1980.
- PATEL, R.N. **Stereoselective Biotransformation in Synthesis of some Pharmaceutical Intermediates.** *Advances in Applied Microbiology*, vol43, p. 91-140, 1997.

- PELCZAR, M.; REID, R.; CHAN, C.C.S.. **Microbiologia**.v.4, McGrawHill do Brasil. São Paulo. 1980.
- PETTERSON, D. H.; MURRAY, H.C.. **Microbial Transformation of Steroids. Introduction of oxygen at carbon 11 of Progesterone**. J. Am. Chem. Soc. 74, p. 1871-1872. 1952.
- RHODES, R.A .; MOYER A . J.; SMITH M. L.; SINAH, E. K. **Production of fumaric acid by *Rhizopus arrhizus***. Appl.Microbiol.,7,p.74-80,1959.
- SOCCOL, C. R. **Aproveitamento do resíduo do extrato hidrossolúvel para elaboração da pasta de soja fermentada**. Tese de Mestrado ao curso de pós-graduação em Tecnologia Química do Setor de Tecnologia da Universidade Federal do Paraná. 120 p.,1986).
- STANIER, R. Y.; DOUDOROFF, M.; ADELBERG, E. A.. **General Microbiology**. Prentice-Hall. London. 1984.
- STANLEY, M. R.. **Preparative Biotransformation: the employment of enzymes and whole-cells in synthetic organic chemistry**. J. Chem. Soc. Perkin Trans 1, 1998.
- STILL, W. C.; KAHN, M.; MITRA, A.. **Rapid Chromatographic Technique for Preparative Separations with Moderate Resolution**. J. Org. Chem.. vol 43, n 14. 1978.
- STRAPASSON, R.A., **Biotransformação do Limoneno e Isoesteviol pelo fungo *Fusarium verticilloides***. Dissertação de Mestrado ao Curso de Pós-graduação de Química do Setor de Ciências Exatas da Universidade Federal do Paraná, 1996.
- TSEZOS M.; VOLESKY, B.. **Biosorption of uranium and thorium**. Biotechnol. & Bioeng., 23, p. 583-604, 1981.
- WAINWRIGHT, M.. **Introducción a la biotecnología de los hongos**. Editorial Acribia. Zaragoza. 1995.