

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE QUÍMICA

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À REDAÇÃO FINAL
DA TESE DEFENDIDA POR RAQUEL FERNANDES
PUPO NOGUEIRA E APROVADO PELA COMISSÃO
JULGADORA

28 de junho de 1990

Nelson Durán

SÍNTESE E BIODEGRADAÇÃO DE COMPOSTOS-MODELO DE
LIGNINA POR Chrysonilia sitophila (TFB 27441)

Raquel Fernandes Pupo Nogueira

Tese de Mestrado

Orientador: Prof. Dr. Nelson Durán

CAMPINAS

1990

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Nelson Durán, pela orientação desta tese,

ao Prof. Ronaldo Pilli, pela orientação na parte de síntese e aos seus alunos, pela constante ajuda,

ao Jaime, a quem devo esta tese, pela grande contribuição e por sua doce companhia,

à minha mãe, por seu apoio carinhoso,

ao André, por suas idéias, críticas e amizade,

aos companheiros de sala, Gisele, Angela, Paulo, Norma e Marco, pela convivência,

ao Gil e Nádia do CPQBA e Paulo Massafere do IE pelo uso do HPLC,

ao IQ e seus funcionários pelo apoio técnico e material e

ao CNPq, CAPES, FAPESP PADCT E FINEP pelo apoio financeiro.

RESUMO

Este trabalho envolve a síntese de compostos-modelo de lignina diméricos do tipo β -O-4, bem como a biossíntese de álcool vanílico a partir de vanilina utilizando Saccharomices cerevisiae.

Foi estudada a biodegradação dos compostos sintetizados, e também de alguns monômeros comerciais, por Chrysonilia sitophila (TFB 27441), fungo isolado do trato intestinal de um inseto xilófago. Foi comparado o crescimento de C. sitophila nos diferentes compostos em relação a um controle de glicose, onde foi observada uma inibição do crescimento pelos monômeros que contêm carbonila α e um estímulo pelos compostos β -O-4 I e álcool vanílico.

Foi comparada a degradação de dímeros β -O-4 por C. sitophila à já conhecida degradação por Phanerochaete chrysosporium, fungo ligninolítico que tem sido extensivamente estudado, notando-se semelhanças quanto ao tipo de degradação causada.

Hemina, complexo de ferro porfirina, foi utilizada como modelo biomimético na degradação de compostos-modelo de lignina, já que na presença de H_2O_2 comporta-se como uma peroxidase.

A biodegradação por C. sitophila, P. chrysosporium e a degradação por hemina foram analisadas por espectrometria no ultravioleta e por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC).

ABSTRACT

This work involves the synthesis of β -O-4 lignin model compounds as well as the biosynthesis of vanillyl alcohol from vanillin by Saccharomices cereviseae.

The biodegradation of the synthesized compounds and of the commercial monomers by Chrysonilia sitophila (TFB 27441), fungus isolated from a xylofagous insect, was studied. The growth of C.sitophila on different compounds was compared relatively to a glucose control. It was observed an inhibition of growth by $C\alpha$ -carbonyl monomers and a stimulation by models β -O-4 I and vanillyl alcohol.

It was made a comparison between the degradation of dimeric β -O-4 I compound by C.sitophila and P.chryso sporium, fungus extensively studied, where similarities were observed in relation to the type of degradation caused.

Hemin, iron porfirin complex which acts as a peroxidase, was used as a biomimetic model in the degradation of lignin model compounds in the presence of H_2O_2 .

The biodegradation by C.sitophila, P.chryso sporium and degradation by hemin were analised by ultraviolet spectrometry and HPLC.

INDICE

CAPITULO I	1
I-Introdução	2
I.1-Geral	3
I.2-Biossíntese e Estrutura da Lignina	4
I.3.-Biodegradação de Lignina e Compostos-modelo	7
I.3.1-Enzimas Envolvidas na Degradação de Lignina	8
I.3.2-Degradação de Compostos-modelo de Lignina	12
I.3.2.1- β -1	12
I.3.2.2- β -0-4	19
I.3.2.3-Álcool veratrílico	23
I.4- <u>Chrysonilia sitophila</u>	25
I.5-Hemina	26
I.6-Objetivos	27
CAPITULO II	28
II-Parte Experimental	29
II.1.1-Reagentes e Procedência	29
II.1.2-Instrumentação	31
II.2-Microorganismos e Meios de Cultura	32
II.3-Síntese e Biossíntese de Compostos-modelo de Lignina	35
II.3.1-Aldeído veratrílico	35
II.3.2- β -0-4 I e β -0-4 II	37
II.3.2.1- 1-(3,4-dimetoxifenil)-2-bromoetanova	37

II.3.2.2-	1-(3,4-dimetoxifenil)-2-(2-metoxifenil)- 1-etanona	38
II.3.2.3-	1-(3,4-dimetoxifenil)-2-(2-metoxifenoxi)- -1-ona-3-propanol (β -0-4 II)	39
II.3.2.4-	1-(3,4-dimetoxifenil)-2-(2-metoxifenoxi)- 1,3-propanodiol (β -0-4 I)	40
II.3.3-	Biossíntese de Álcool vanílico	41
II.4-	Biodegradação de Compostos-modelo de Lignina por <u>Chrysonilia sitophila</u>	42
II.4.1-	Condições de Cultura	42
II.4.1.1-	Crescimento Comparativo de <u>Chrysonilia</u> <u>sitophila</u> em diferentes compostos-modelo	42
II.4.1.2-	Biodegradação dos compostos-modelo β -0-4	42
II.4.2-	Extração dos Produtos de Degradação dos modelos β -0-4	43
II.4.3-	Análise por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC)	43
II.5-	Biodegradação de β -0-4 I por <u>Phanerochaete</u> <u>chryso sporium</u>	44
II.5.1-	Condições de Cultura	44
II.6-	Degradação Biomimética de Compostos-modelo por Hemina	45
CAPÍTULO III		46
III-Resultados e Discussão		47
III.1-	Crescimento Comparativo de <u>Chrysonilia</u> <u>sitophila</u> em Diferentes Compostos-modelo	48

III.2-Biodegradação dos Compostos-modelo de Lignina por <u>Chrysonilia sitophila</u>	50
III.3-Degradação Biomimética de Compostos-modelo de Lignina por Hemina	63
CAPÍTULO IV	65
IV-Conclusões	66
Bibliografia	68
Espectros	74

CAPITULO I - INTRODUÇÃO

I-INTRODUÇÃO

I.1-GERAL

Lignina é o mais abundante polímero orgânico depois da celulose. É o constituinte característico entre as paredes celulares dos tecidos de vegetais vasculares, tais como madeira, sendo responsável por sua rigidez (Fengel e Wegener, 1984). Também diminui a permeação de água através das paredes celulares e protege os tecidos contra o ataque de microorganismos patogênicos (Janshekar e Fiechter, 1983).

Muito interesse tem sido dedicado ao estudo da biodegradação de lignina nos últimos anos considerando suas potencialidades como a) biopolpação de madeira e branqueamento de polpas, b) conversão de lignocelulósicos em rações aumentando sua digestibilidade, c) conversão de sub-produtos da lignina em produtos de interesse aproveitando seu conteúdo aromático, d) liberação dos carboidratos nos lignocelulósicos para bioconversão e e) tratamento de efluentes da indústria de celulose (Kirk, 1987).

Lignina é um polímero tridimensional composto de unidades fenil propano unidas não linearmente por diferentes tipos de ligações, o que a faz diferente de outros biopolímeros, lineares e compostos de subunidades conectadas de forma repetitiva (Tien, 1987).

A complexidade de sua estrutura e a dificuldade de isolamento da lignina sem reações secundárias, tais como quebra de ligações e mudanças no conteúdo de grupos funcionais, dificultam o

estudo de sua biodegradação. Tais estudos são geralmente realizados através de lignina de madeira moída (Bjorkman e Person, 1957), onde poucas mudanças estruturais ocorrem durante seu isolamento, lignina sintética (DHP), e compostos modelo de baixo peso molecular com semelhanças estruturais à lignina.

DHP é sintetizada in vitro por polimerização oxidativa de precursores imediatos de lignina, como álcoois p-hidroxicinâmilicos utilizando peroxidase como iniciador (Freudenberg e Neish, 1968). Os precursores podem ser marcados em diferentes posições para estudos radioisotópicos (Faix et.al, 1985).

Compostos modelo de baixo peso molecular são bastante utilizados no estudo de biodegradação de lignina por possibilitar, através de seu metabolismo, o entendimento do mecanismo de ação dos fungos que atuam sobre lignina, bem como das enzimas isoladas (Janshekar e Fiechter, 1983; Kirk, 1988).

1.2-BIOSSÍNTESE E ESTRUTURA DA LIGNINA

Lignina é um polímero complexo composto de unidades fenil propano unidas por diferentes tipos de ligações. Essa irregularidade do polímero é consequência do mecanismo de sua biossíntese que se dá através de acoplamento de várias formas de ressonância de radicais livres (Fengel e Wegener, 1984).

A glicose, fotossintetizada a partir de CO_2 atmosférico e H_2O , é convertida ao ácido chiquímico. Através de várias etapas, são formados os álcoois cinâmicos. A distribuição e a proporção destes álcoois são diferentes nos diferentes vegetais vasculares. Uma vez formados os álcoois cinâmicos, seu grupo hidroxila é oxidado por peroxidase ou lacase formando radicais livres em formas mesoméricas. Estes radicais acoplam-se não enzimaticamente de forma aleatória formando dilignóides, intermediários oligoméricos e finalmente a lignina (Janshekar e Fiechter, 1983)

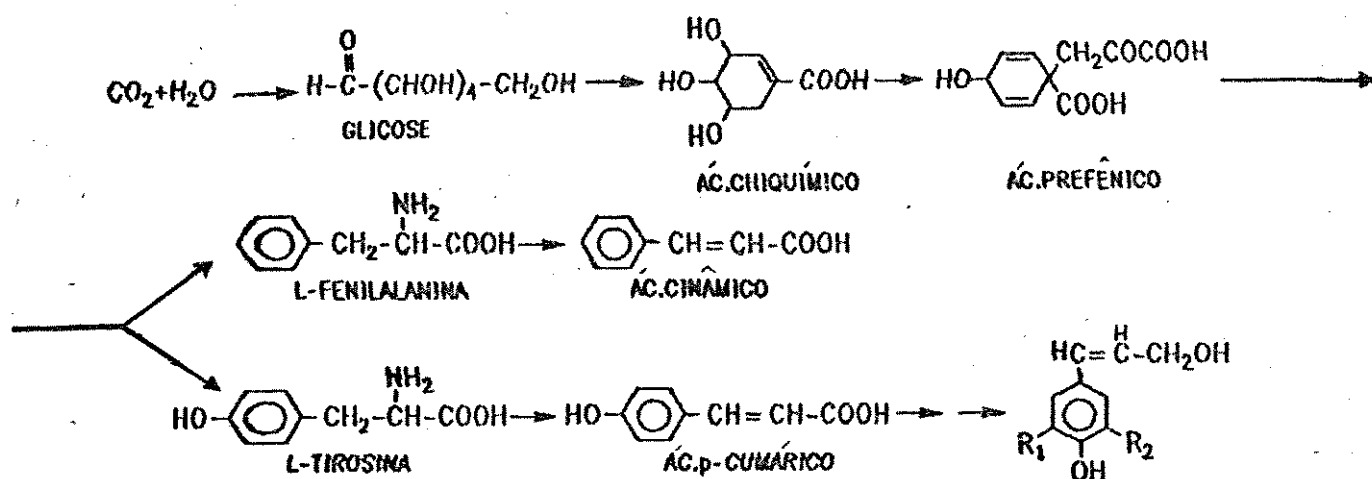


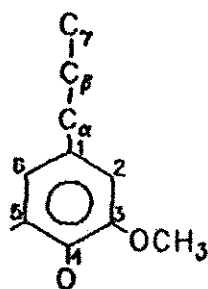
Figura 1- Biossíntese de lignina

$\text{R}_1=\text{R}_2=\text{H}$: Álcool p-cumárico; $\text{R}_1=\text{H}$, $\text{R}_2=\text{OCH}_3$: Álcool coniferílico; $\text{R}_1=\text{R}_2=\text{OCH}_3$: Álcool sinapílico.

A ligação (entre subunidades fenil propano) mais importante na estrutura da lignina é a β -O-4 ou aril glicerol β aril éter, onde o carbono da cadeia lateral de uma subunidade é ligado ao oxigênio do carbono 4 do anel da subunidade adjacente (entre anéis 1 e 2 da Figura 2). Representa cerca de 50 % das ligações interunidades na lignina. Outras ligações presentes na estrutura da lignina (Tabela 1) são 5,5' (ou bifenila, entre anéis 5 e 6), β -5 (ou fenilcumaran, entre anéis 3 e 4), β -1 (entre anéis 8 e 9), 4-O-5 (ou difenil éter, entre anéis 8 e 10), β - β (ou pino-resinol, entre anéis 10 e 11) e α -O-4 (ou α aril éter, entre anéis 15 e 16).

Tabela 1-Principais tipos de ligações interunidades na lignina

Tipos de ligações	% das ligações
β -aril-éter (β -O-4)	45-60
α -aril-éter (α -O-4)	6-8
difenil éter (4-O-5)	3,5-8
bifenil (5-5')	4,5-17
β -1	7-10
β -5	0-14
β - β	0-3



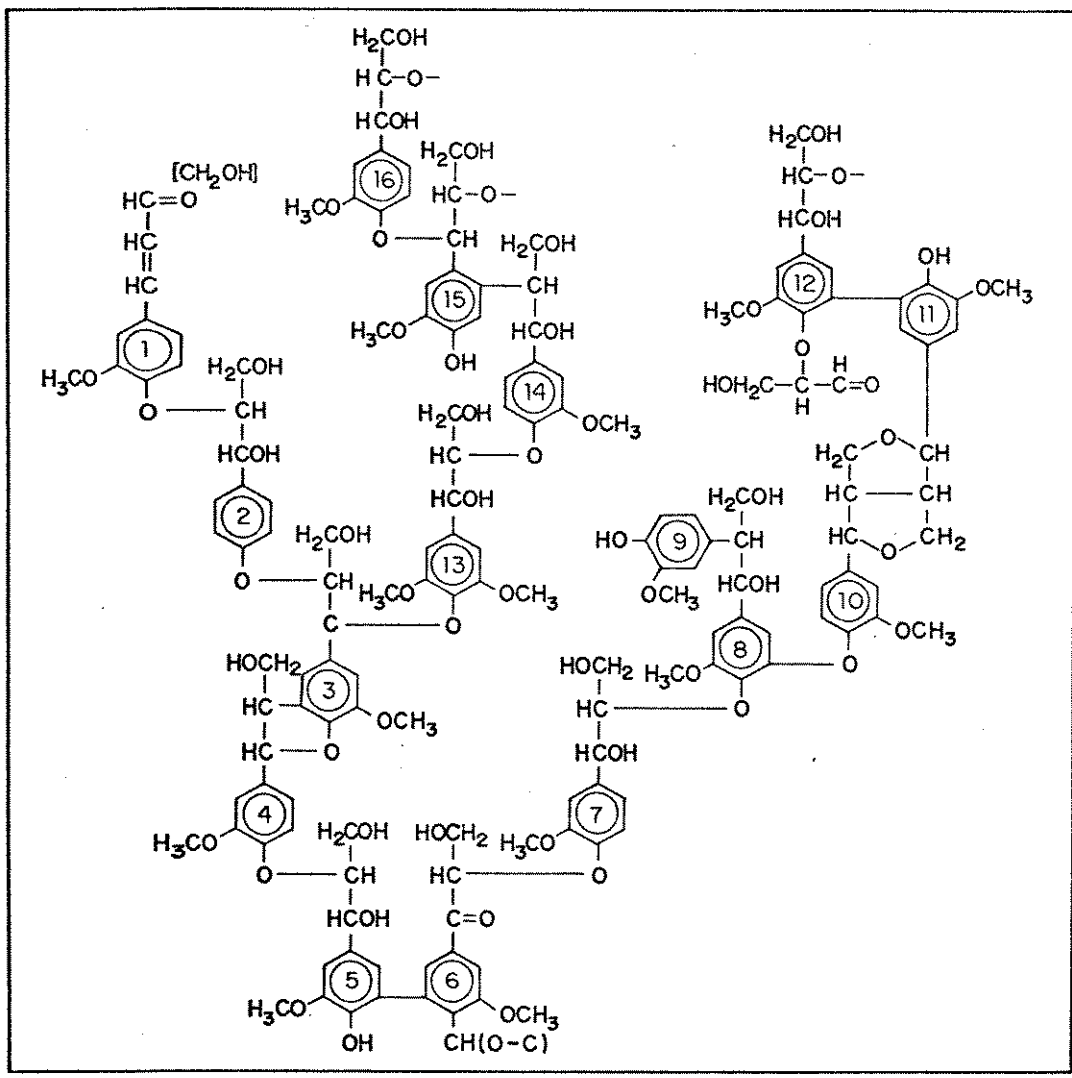


Figura 2 - Estrutura representativa da lignina (Adler, 1977)

1.3-BIODEGRADAÇÃO DE LIGNINA E COMPOSTOS-MODELO

Embora lignina seja recalcitrante à maioria dos microorganismos, alguns grupos são capazes de degradá-la. As mudanças em sua estrutura após ataque microbiológico incluem quebra de ligações β -aril éter, abertura de anel aromático, desmetoxilações, podendo ocorrer biodegradação até CO_2 e H_2O (Leisola e Fiechter, 1985).

Os fungos são os principais responsáveis pela degradação de lignina. Estes são classificados de acordo com o tipo de degradação que causam na madeira, como fungos de decomposição branca ("White-rot fungi"), fungos de decomposição parda ("Brown-rot fungi") e fungos de decomposição branda ("Soft-rot fungi").

Os fungos de decomposição branca são os mais eficientes provocando quebras de ligações como $\text{C}_\alpha\text{-C}_\beta$, β -aril éter, etc. Os fungos de decomposição parda são basicamente responsáveis pela degradação dos polissacarídeos da madeira enquanto que os de decomposição branda causam um amolecimento da camada superficial da madeira ocorrendo limitada degradação (Leisola e Fiechter, 1985).

Entre os fungos de decomposição branca, Phanerochaete chrysosporium (= Sporotrichum pulverulentum) é o mais detalhadamente estudado sendo sua atuação sobre lignina já bem elucidada (Kirk, 1988).

Bactérias também podem degradar lignina porém têm um papel secundário (Vicuña, 1988).

Compostos modelo de lignina têm sido muito utilizados no estudo da biodegradação de lignina. Estes compostos apresentam se-

melhanças estruturais à lignina possibilitando uma analogia que tem contribuído para o entendimento do mecanismo da biodegradação de lignina. Sendo β -O-4, o tipo de ligação mais frequente na lignina, compostos modelo do tipo β -O-4 são os mais representativos.

1.3.1-ENZIMAS ENVOLVIDAS NA DEGRADAÇÃO DE LIGNINA

Os fungos envolvidos na degradação de lignina secretam diferentes enzimas extracelulares que catalisam reações que levam à degradação do polímero. As principais são ligninases, peroxidase dependente de manganês (Mn peroxidase), fenoloxidasas e enzimas que produzem H_2O_2 .

LIGNINASE

Ligninase, pela 1ª vez relatada em 1983 (Tien e Kirk, 1983; Glenn et.al. 1983), tem um papel importante na despolimerização de lignina por P.chryso sporium. É também chamada de peroxidase de lignina. Contém um grupo heme e tem sido encontrada em vários microorganismos. Seu mecanismo indica que H_2O_2 primeiramente oxida a enzima e o intermediário oxidado retira um elétron de núcleos aromáticos formando cátions radicalares arila que se decompõem espontaneamente via reações de caráter iônico e radicalar (Kirk e Farrell, 1987).

Ligninase provoca quebra de ligações $C_{\alpha}-C_{\beta}$ da cadeia propila de modelos díméricos de lignina e despolimeriza lignina in vivo.

Também é capaz de catalisar outras reações sendo a mais significativa a oxidação do álcool veratrílico a aldeído (Figura 3) que tem sido utilizada como método para determinação desta enzima (Tien e Kirk, 1984)

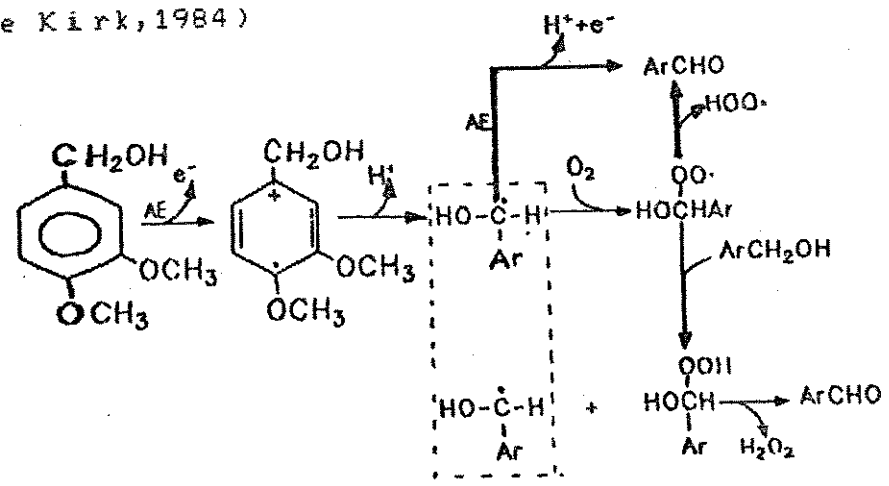


Figura 3- Mecanismo de ação de ligninase (Palmer et.al,1987)
 AE: Aceptor de elétrons; Ar: Anel orto metoxilado.

Mn PEROXIDASE

Uma peroxidase diferente de ligninase foi descoberta por Gold em 1984 em meio extracelular de culturas ligninolíticas de P.chrysosporium. Como a ligninase, Mn peroxidase requer H₂O₂ e contém um grupo heme. Porém, seu mecanismo depende de Mn(II) que é oxidado pela enzima a Mn(III) que por sua vez oxida substratos orgânicos, como fenóis a radicais fenóxi (Kawahara et. al., 1984).

Foi originalmente caracterizada como dependente também de ácidos α-hidróxi, como lactato ou tartarato, porém não existe informação que justifique esta dependência, mas sim o estímulo da atividade por estes ácidos α-hidróxi (Kern,1989).

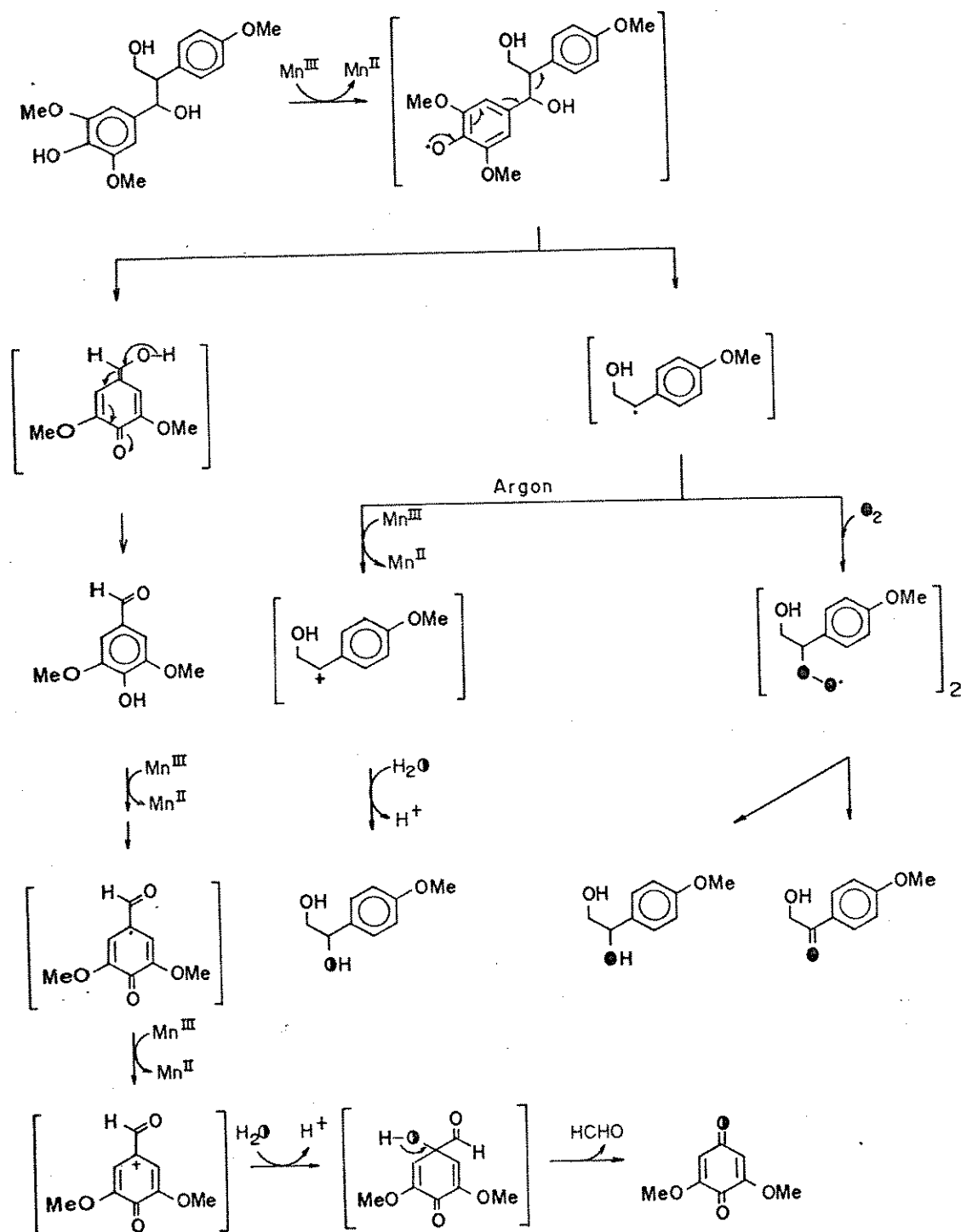


Figura 4- Mecanismo proposto para quebra C_{α} - C_{β} de composto β -1 por Mn peroxidase. (●) Oxigênio derivado de O₂. (◐) Oxigênio derivado de H₂O. (Gold et.al., 1989).

FENOL OXIDASE

Existem 3 tipos de fenol oxidases: tirosinase, lacase e peroxidase (Crawford, 1981).

Tirosinase é uma enzima que contém cobre e participa de reações como monooxidação de fenóis produzindo o-fenóis ou o-quinonas e oxidação de catecóis a o-quinonas. É encontrada em diferentes microorganismos como cogumelos e fungos que degradam madeira. Nestes fungos, tirosinase é intracelular, o que a faz de menor importância na degradação de lignina (Ander e Eriksson, 1978).

Lacase é também uma enzima que contém cobre. É comumente encontrada em fungos de decomposição branca como Coriolus versicolor, um dos mais importantes fungos que degradam lignina (Kawai et al., 1988a). Catalisa a oxidação de orto e para-difenóis por abstração de um elétron e um próton do grupo hidroxila formando um radical livre fenóxi.

As peroxidases contêm ferro e necessitam de H_2O_2 . Também catalisam a oxidação de orto e para-difenóis por abstração de um elétron e um próton do grupo hidroxila formando um radical livre fenóxi. Estes radicais formados podem sofrer transformações posteriores, incluindo desproporcionamento ou polimerização por acoplamento radicalar (Crawford, 1981).

ENZIMAS QUE PRODUZEM H_2O_2

Peroxidases são enzimas importantes envolvidas na degradação de lignina que necessitam de H_2O_2 para sua atividade. H_2O_2 é formado simultaneamente com o sistema ligninolítico na presença de glicose (Eriksson, 1987) através, principalmente de glicose oxidase.

Outra enzima importante é metanol oxidase que produz H_2O_2 durante o metabolismo da lignina. Tem sido demonstrado (Ander et. al., 1983; Ander e Eriksson, 1985) que quantidade considerável de metanol é formado durante a degradação de lignina e seus produtos de degradação em culturas de P.chrysosporium. Este metanol é oxidado a formaldeído pela enzima metanol oxidase e um subproduto desta oxidação é H_2O_2 .

1.3.2- DEGRADAÇÃO DE COMPOSTOS-MODELO DE LIGNINA

1.3.2.1- β -1

No início dos anos 80, esforços foram dedicados para descrever as etapas envolvidas na degradação de compostos-modelo diméricos de lignina por P.chrysosporium com o objetivo de definir reações específicas catalisadas por seu sistema enzimático. A primeira reação que levou à descoberta das enzimas ligninolíticas foi a quebra $C_\alpha - C_\beta$ na cadeia propila do modelo β -1, que já era considerada importante na degradação fungal de lignina.

Em 1982, Enoki e Gold descreveram a degradação de compostos-modelo β -1 sugerindo uma quebra oxidativa da ligação $C_{\alpha}-C_{\beta}$ como na figura 5.

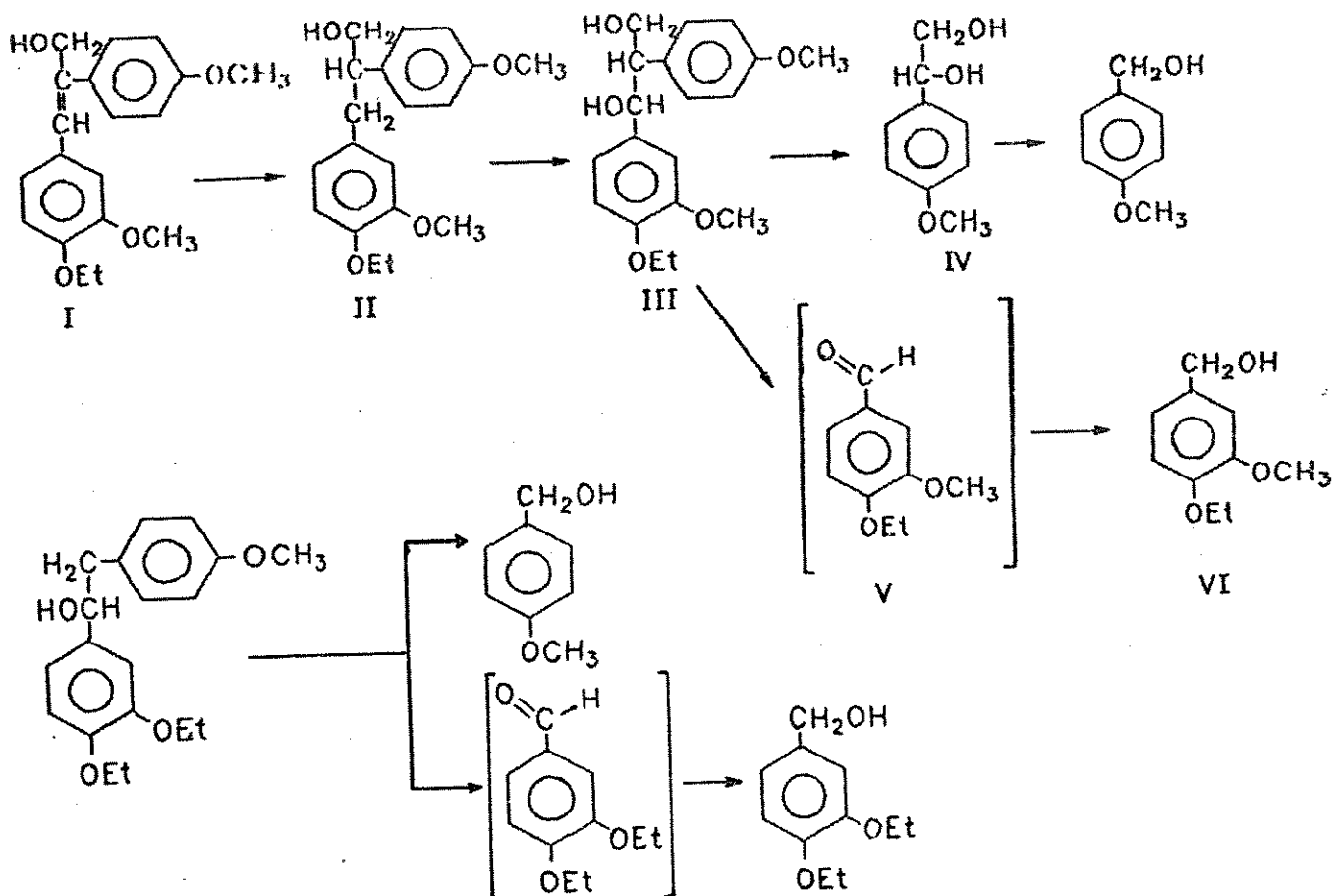


Figura 5- Degradação de dímeros β -1 por células intactas de *P. chrysosporium* (Enoki e Gold, 1982).

Os resultados indicaram que o diol III da figura 5 sofre clivagem na ligação $C_{\alpha}-C_{\beta}$, produzindo o fenil glicol IV e o benzaldeído V que é rapidamente reduzido ao respectivo álcool pelo organismo.

Experimentos com $^{18}O_2$ foram realizados (Umezawa et. al, 1983) com o objetivo de decidir se o oxigênio era incorporado

na posição α ou β durante a clivagem $C\alpha - C\beta$. O metabólito correspondente à posição $C\alpha$ não continha ^{18}O que foi incorporado na posição β , como mostrado na figura 6.

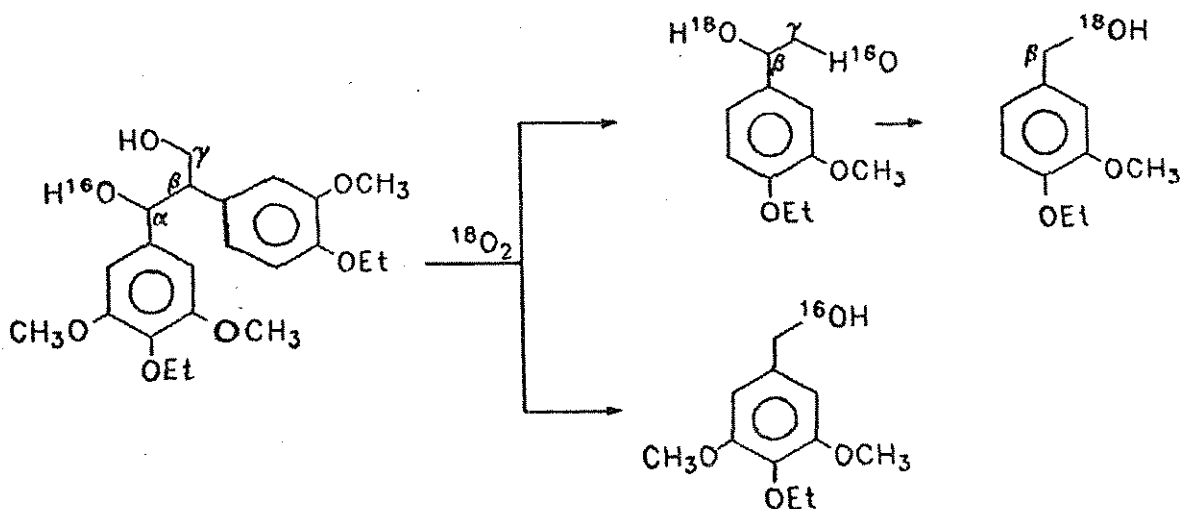


Figura 6- Incorporação de ^{18}O a partir de $^{18}O_2$ na degradação de β -1 por P.chryso sporium (Umezawa et.al., 1983).

Produtos análogos foram encontrados a partir da degradação de composto fenólico β -1, o que indica que a quebra $C\alpha - C\beta$ de dímeros β -1 ocorre tanto para compostos fenólicos como não fenólicos, na degradação por P.chryso sporium (Kamaya e Higuchi, 1984).

Coriolus versicolor, secreta uma enzima fenol oxidase, lacase que catalisa a retirada de um hidrogênio de grupo hidroxila fenólico dando origem a radicais fenóxi (item 1.3.1), ao passo que compostos não fenólicos não são degradados por lacase de C.versicolor (Lundquist e Kristerson, 1985; Higuchi, 1985).

Estudos realizados com compostos fenólicos β -1 indicam que estes compostos sofrem quebra $C_{\alpha}-C_{\beta}$ via radicais fenóxi (Kawai et.al.,1987). No entanto os produtos formados podem ser provenientes tanto da oxidação do anel A como B. O esclarecimento do mecanismo só foi possível utilizando compostos com um só grupo fenólico (Kawai et.al.,1988), onde ocorrem 3 tipos de reação: quebra $C_{\alpha}-C_{\beta}$, oxidação C_{α} e quebra alquil-aril (figuras 7 e 8)

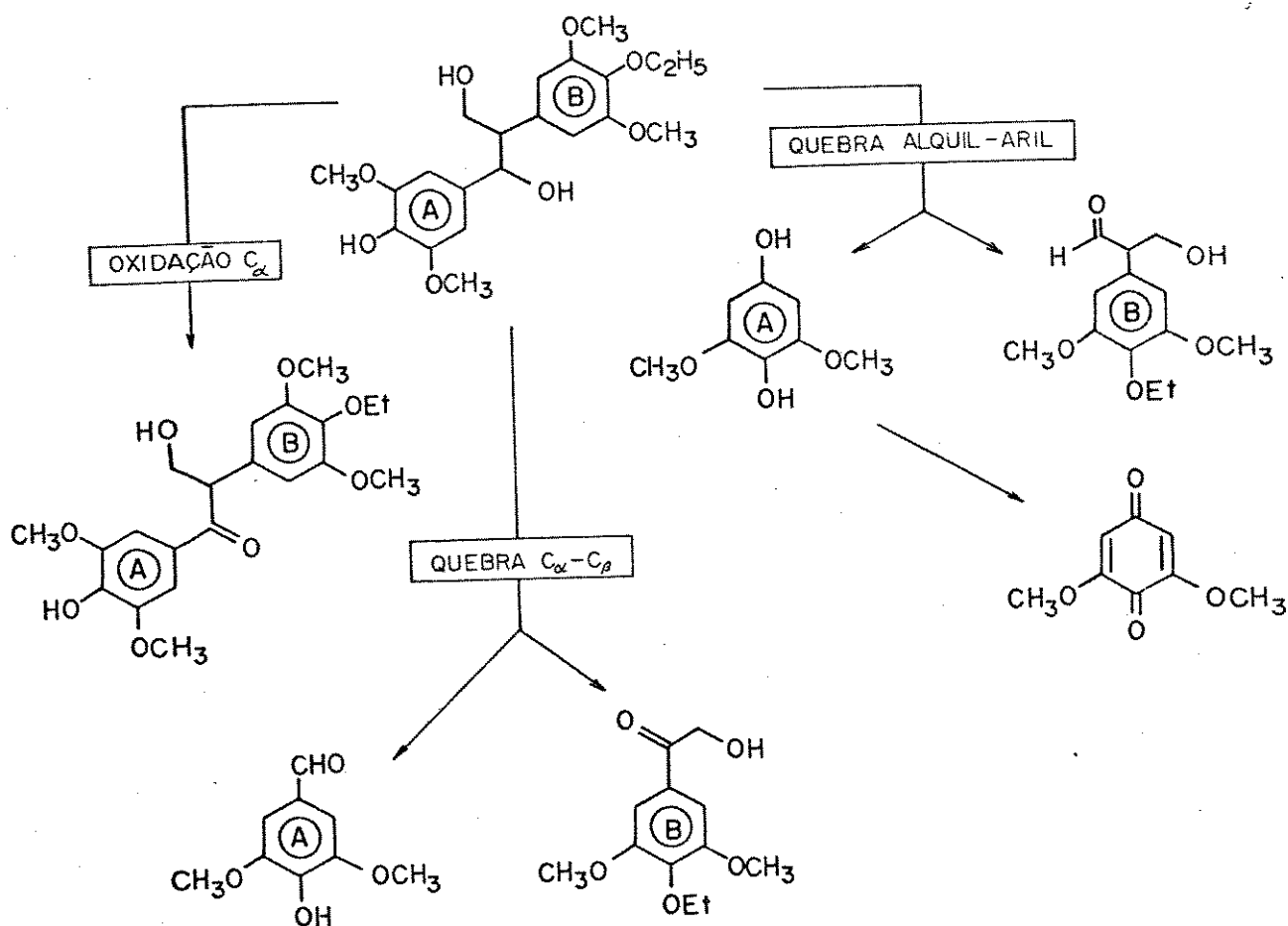


Figura 7- Degradação de composto β -1 com grupo fenólico no anel A por lacase de C.versicolor (Kawai et.al.,1988).

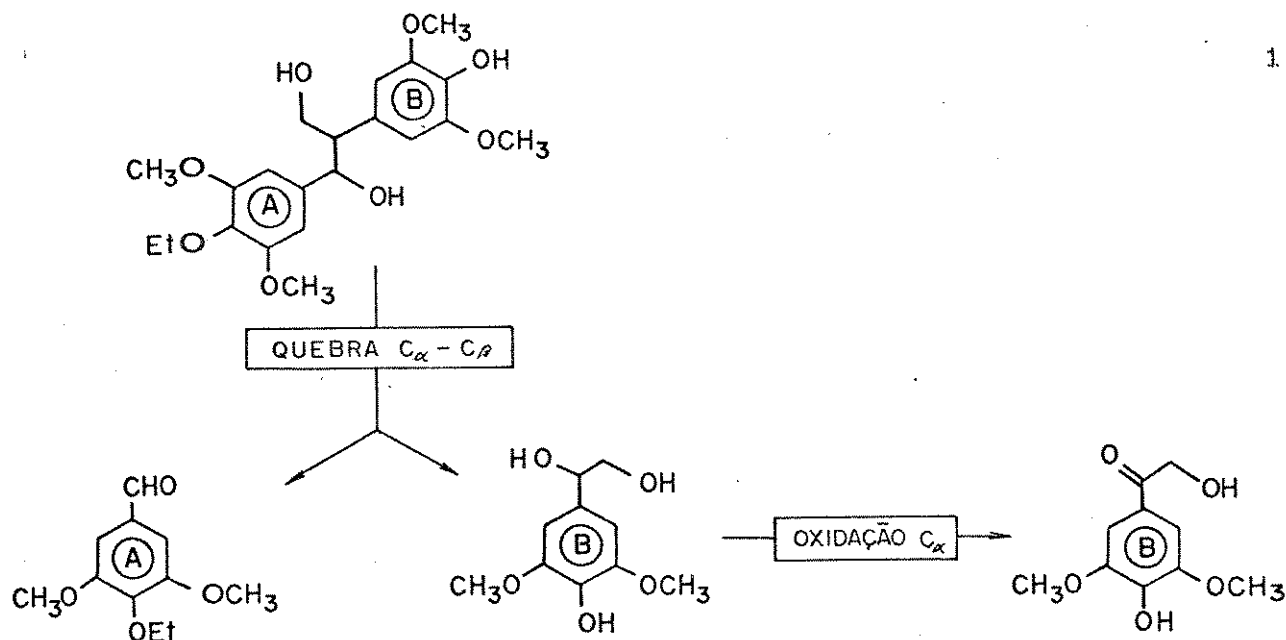


Figura 8- Degradação de composto β -1 com grupo fenólico no anel B por lacase de *C.versicolor* (Kawai et.al.,1988).

Outro fungo recentemente isolado e caracterizado e que apresenta alta eficiência e seletividade na degradação de lignina é IZU-154 (Nishida et.al.,1988).

Na degradação de composto fenólico β -1 por IZU-154 ocorre quebra alquil-fenil e quebra $C_{\alpha} - C_{\beta}$ como na figura 9.

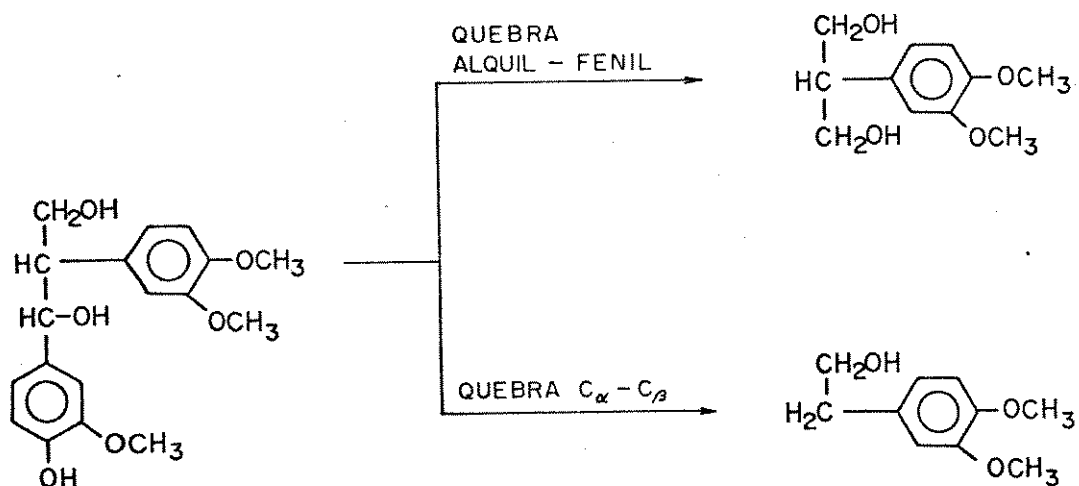


Figura 9- Degradação de composto β -1 por cultura de IZU-154 (Nishida et.al., 1989a)

Como dito em 1.3.1, a reação-chave catalisada por ligninase com compostos-modelo é a oxidação do núcleo aromático por 1 elétron formando um cátion radicalar.

Se um núcleo aromático é ou não um substrato para ligninase depende de seu potencial de oxidação. Substituintes retiradores de elétron como $C=O$ -carbonila tendem a inativar o núcleo aromático frente à ligninase enquanto grupos alcóxi o ativam (Kirk e Farrell, 1987).

As reações mostradas na figura 10 para a oxidação de composto β -1 por ligninase/ H_2O_2 foram encontradas também em células intactas de *P.chryso sporium* e provêm de oxidação do anel A. Produtos de quebra de anel para oxidação de β -1 por ligninase não foram observados.

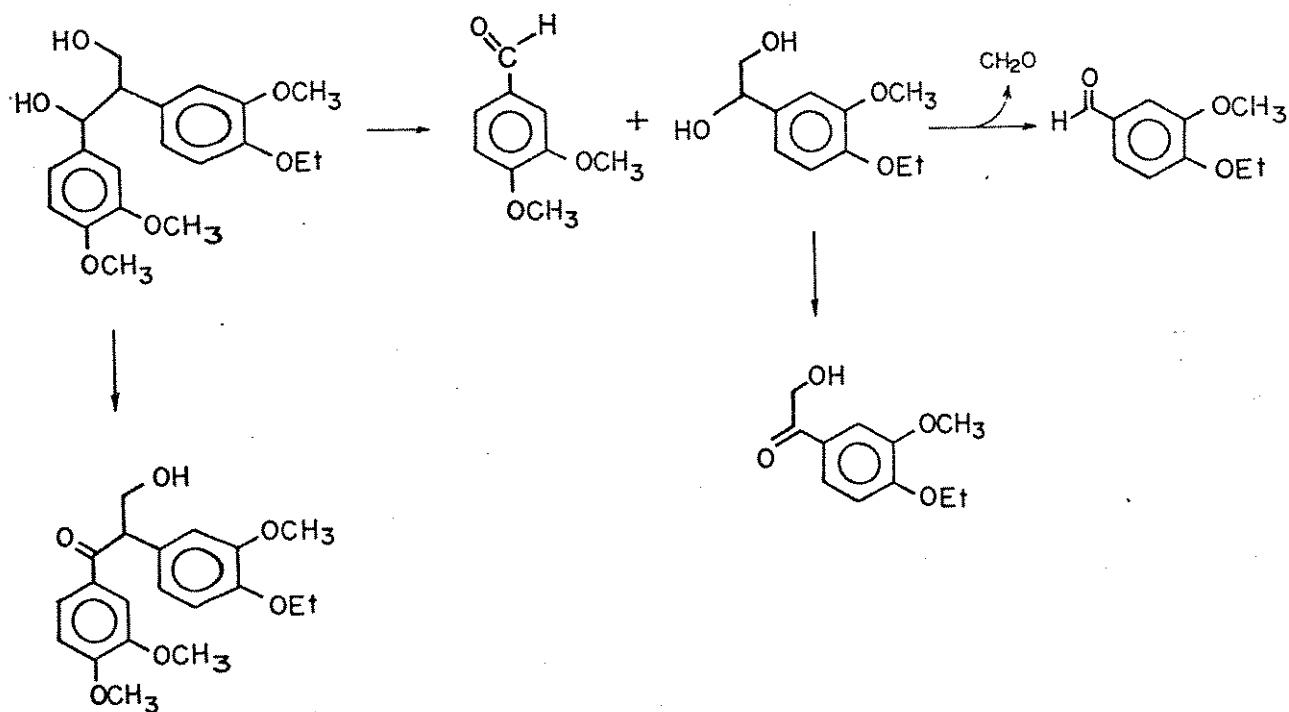


Figura 10- Oxidação de composto-modelo β -1 por ligninase/ H_2O_2 de *P.chryso sporium* (Kirk e Farrel, 1987).

Compostos-modelo do tipo β -1 também são oxidados por Mn peroxidase produzindo vários produtos provenientes de 3 tipos de reação como quebra da ligação alquil-fenil, oxidação da hidroxila α e quebra da ligação $C\alpha - C\beta$ como na figura 11 (Wariishi et.al., 1989).

Compostos não fenólicos não foram oxidados por Mn peroxidase nas mesmas condições sugerindo que a etapa crítica na reação catalisada por Mn peroxidase é a oxidação do fenol a radical fenóxi por Mn III gerado pela enzima.

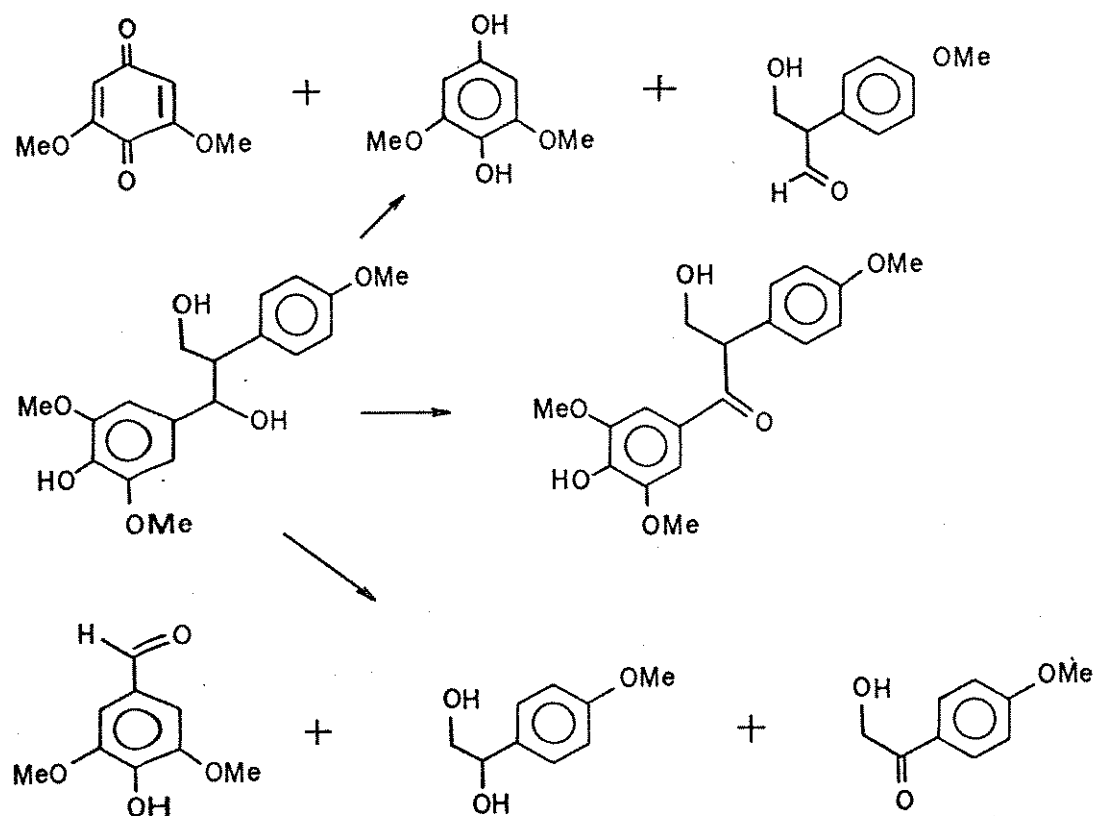


Figura 11- Degradação de composto-modelo β -1 por Mn peroxidase de *P.chrysosporium* (Wariishi et.al., 1989).

1.3.2.2- β -O-4

Estudos com modelos β -O-4 com culturas intactas de Phanerochaete chrysosporium têm demonstrado dois caminhos de degradação (Umezawa et.al., 1983; Umezawa e Higuchi, 1985). O primeiro é iniciado por quebra oxidativa entre a ligação C_{α} - C_{β} da cadeia propila e o segundo, envolve quebra inicial de O-C₄ da ligação β -O-4 (figura 12).

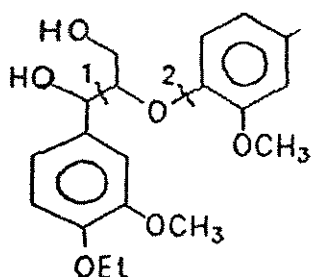


Figura 12- 1) Quebra C_{α} - C_{β} e 2) quebra O-C₄ da ligação β -O-4.

Muitas das reações de degradação de β -O-4 por células intactas deste fungo são as reações catalisadas por ligninase, exceto a redução de benzaldeído a álcool benzílico nas culturas (Yokota et.al., 1988).

No caso de composto-modelo β -O-4, ligninase pode oxidar tanto o anel A como B (figura 13). Abertura de anel também ocorre.

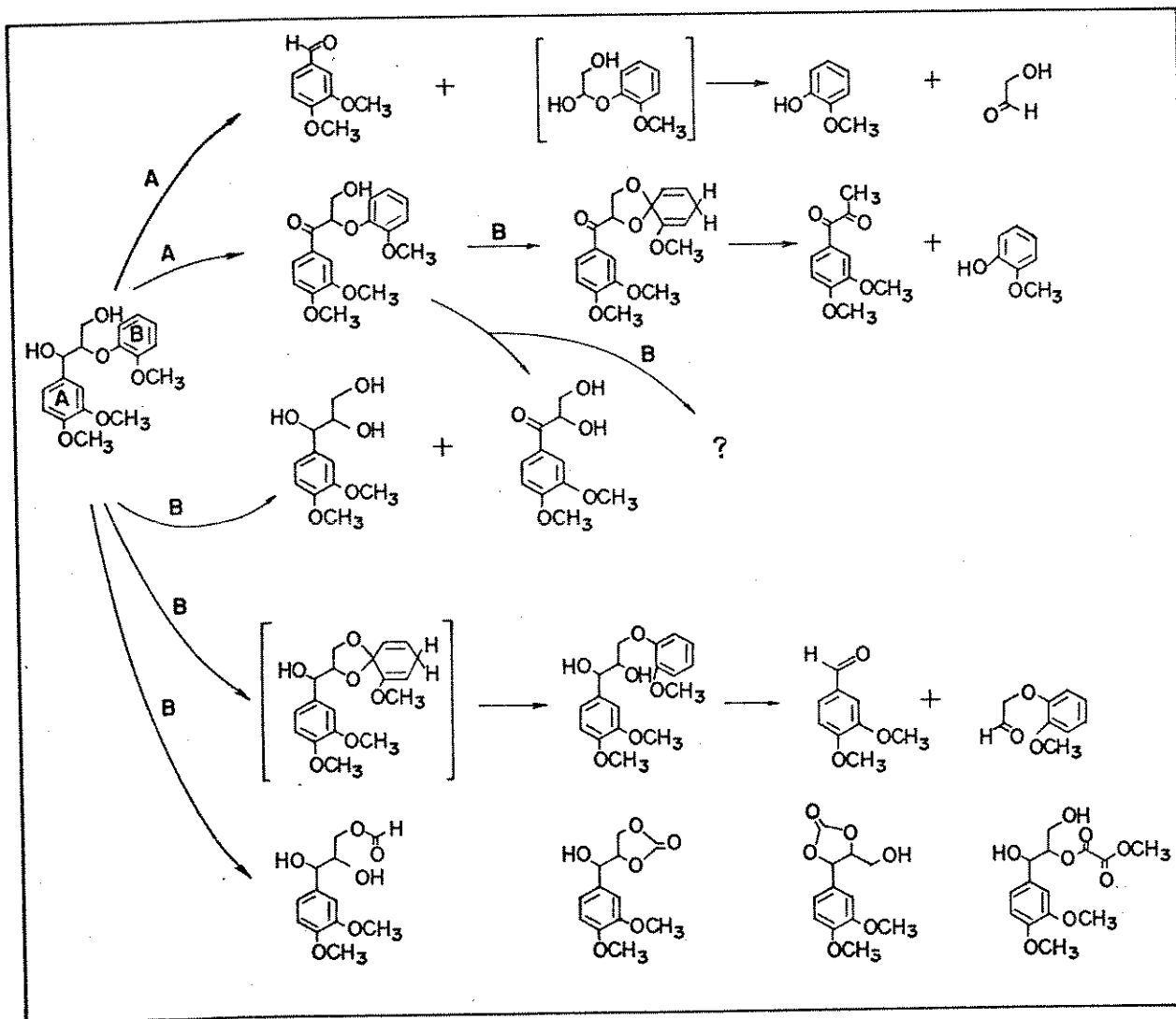


Figura 13- Produtos de oxidação de composto-modelo β -O-4 por ligninase/H₂O₂ de *P. chrysosporium* (Kirk, 1988).
A: oxidação do anel A. B: oxidação do anel B.

Aspergillus flavus é um fungo bastante encontrado em ambientes de degradação de madeira e foi classificado como fungo de decomposição branda ("soft-rot fungi").

O primeiro passo na degradação de composto-modelo β -O-4 por A.flavus é a oxidação da hidroxila α para carbonila. Este passo é análogo ao processo pelo qual fungos de decomposição branca atacam lignina e compostos-modelo, porém o sistema enzimático envolvido na oxidação por A.flavus difere consideravelmente destes microorganismos pois inclui dependência de NAD^+ desidrogenase (enzima extracelular dependente de H_2O_2) e uma fenol oxidase (Betts e Dart, 1988).

O segundo passo é a desmetilação da metoxila na posição 4, cujo mecanismo envolve a perda de metanol (Iyayi e Dart, 1982).

Os produtos finais do passo seguinte poderiam ser provenientes tanto de quebra $\text{C}\alpha - \text{C}\beta$ como β -aryl éter, porém estudos com carbono marcado indicam que ocorre quebra $\text{C}\alpha - \text{C}\beta$ (figura 14).

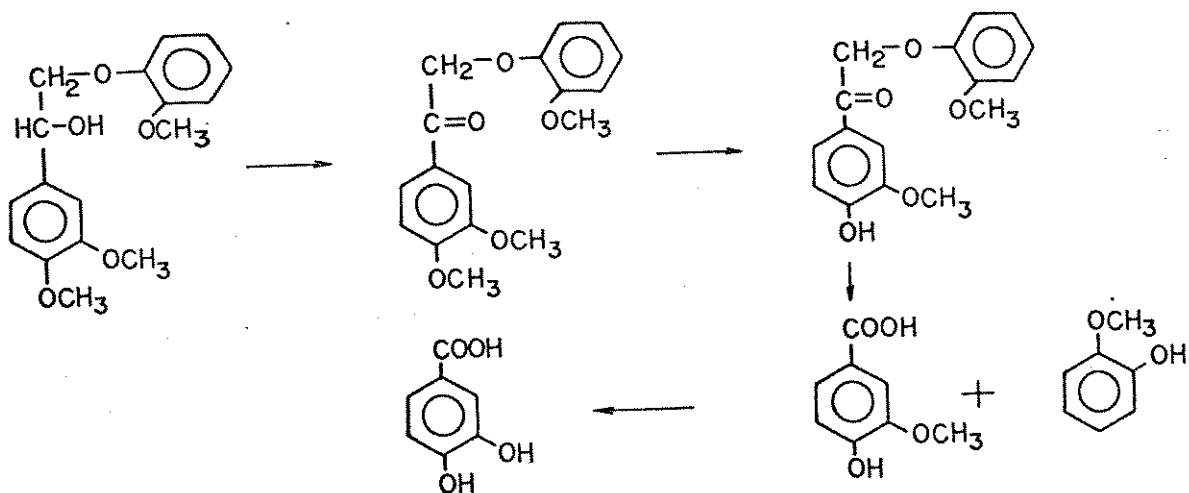


Figura 14- Degradação de compostos-modelo β -O-4 por cultura de A.flavus (Betts e Dart, 1988).

O fungo IZU-154 também é capaz de degradar compostos-modelo β -O-4, onde os produtos de degradação indicam quebra alquil-fenil, β aril éter, oxidação C_{α} para compostos β -O-4 fenólicos e quebra $C_{\alpha}-C_{\beta}$ para compostos β -O-4 não fenólicos como pode ser visto na figura 15 (Nishida et.al.,1989b).

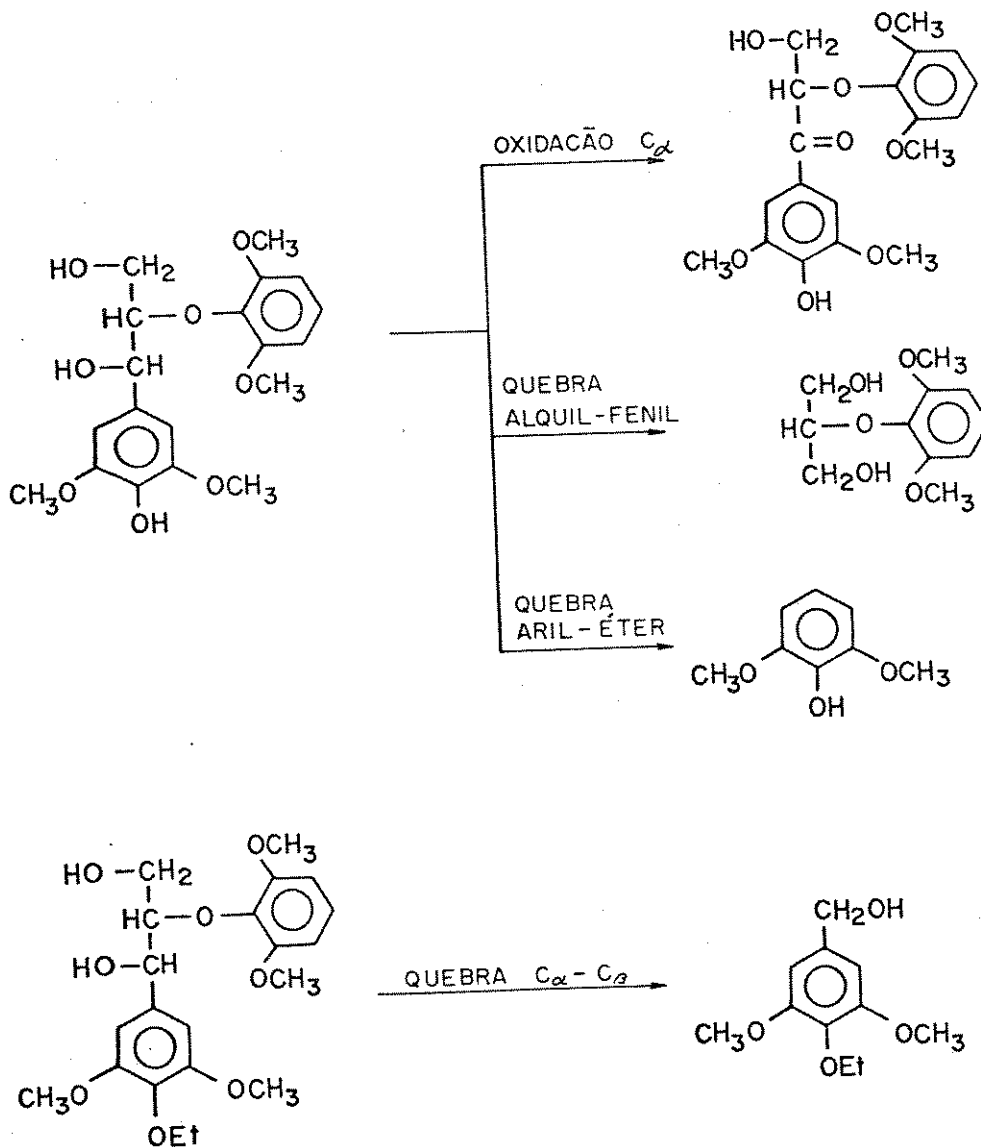


Figura 15- Produtos de degradação identificados na degradação de composto-modelo β -O-4 fenólico e não fenólico por cultura de IZU-154 (Nishida et.al.,1989b).

1.3.2.3- ÁLCOOL VERATRÍLICO

Estudos têm demonstrado que álcool veratrílico é sintetizado de novo a partir de glicose em culturas de P.chryso sporium (Lundquist e Kirk, 1978) tendo como intermediário L-fenilalanina, álcool 3,4-dimetoxicinâmílico e veratrílglicerol (Shimada et. al., 1981). É capaz de ativar o sistema ligninolítico deste fungo atuando como mediador na transferência de elétrons entre peroxidase e o polímero da lignina, tornando-o mais acessível à oxidação enzimática e favorecendo a estabilidade das ligninases (Maemmerli et.al., 1986).

Enquanto era monitorada a quantidade de álcool veratrílico em culturas de P.chryso sporium, outros produtos também eram encontrados (Leisola et.al., 1985). Estes compostos são duas lactonas isômeras provenientes de abertura do anel aromático que também foram detectados na oxidação do álcool veratrílico a aldeído por ligninase.

Estudos foram realizados para elucidar o mecanismo de abertura de anel por ligninase e foi confirmada a formação de tais lactonas e um novo produto foi também encontrado, uma lactona de 6 membros (Shimada et.al., 1987a).

Na figura 16 são mostradas possíveis reações do cátion radicalar Ia formado. A perda de próton de Ia produz o radical Ib o qual, sob condições anaeróbicas, pode ser oxidado a aldeído veratrílico. Sob condições aeróbicas, ativação de oxigênio pode ocorrer. O ânion superóxido formado é protonado a pH ácido formando o radical peridroxil. Reação do cátion radicalar Ia com radical pe-

ridroxil e H_2O leva à abertura do anel aromático formando lactonas. O cátion radicalar Ia pode também reagir com água formando radicais fenóxi que posteriormente formam as quinonas.

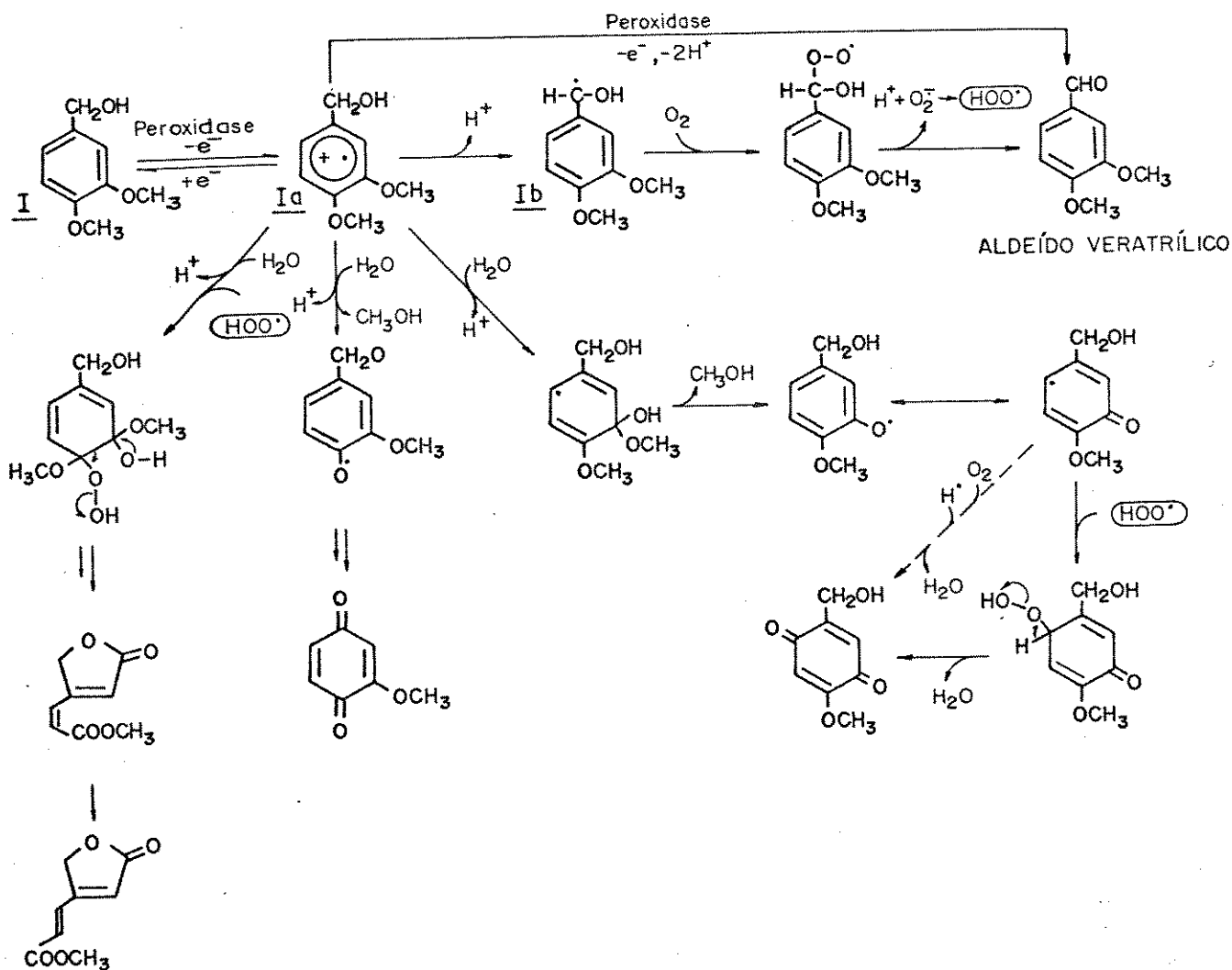


Figura 16- Mecanismo proposto para abertura de anel aromático de álcool veratrílico por ligninase de *P. chrysosporium* (Maemmerli et.al., 1987).

Outros produtos também foram identificados posteriormente em menor proporção como pode ser visto na figura 17.

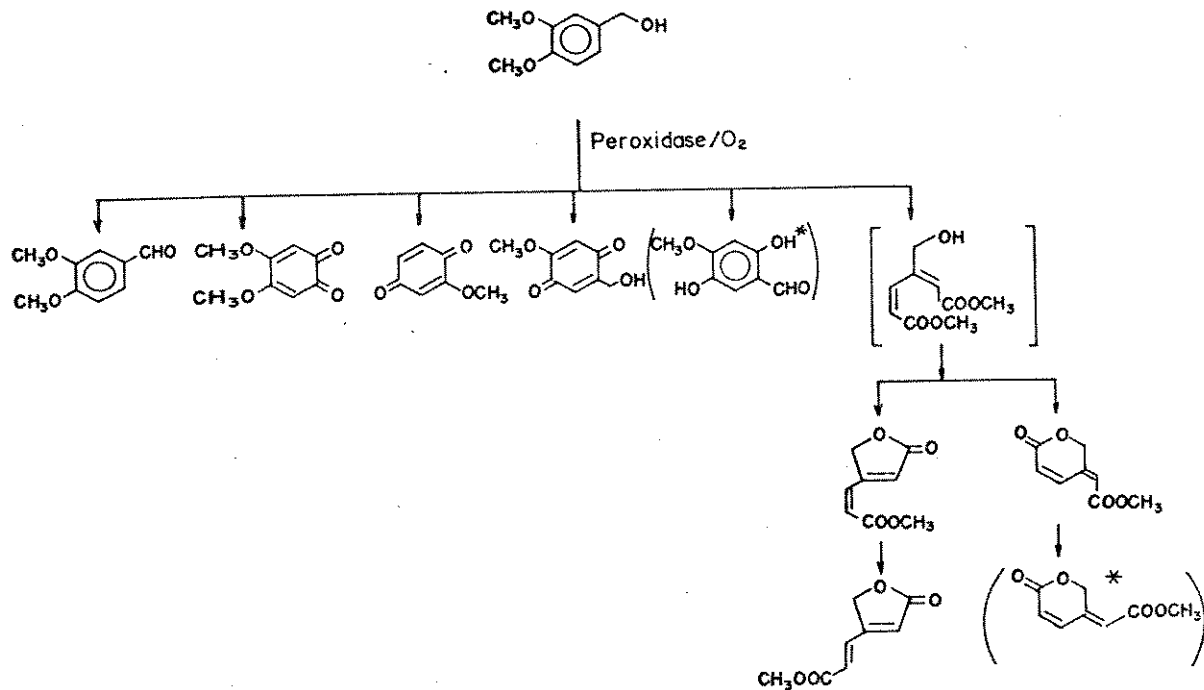


Figura 17- Produtos de degradação de álcool veratrílico por ligninase de P.chrysosporium (Schmidt, et.al., 1989).

* possíveis produtos

1.4- Chrysonilia sitophila

Chrysonilia sitophila (TFB 27441) é um fungo isolado do trato intestinal de um inseto xilófago (Campos et.al., 1986). O estado teleomórfico desta espécie é Neurospora sitophila, um fungo bem conhecido que tem sido usado na preparação de "Ontjom" na Indonésia, um fermentado de amendoim (Fardiaz e Markakis, 1981) para alimentação humana.

Os efeitos de diferentes condições de crescimento deste fungo foram estudados (Ferraz e Durán, 1989).

C.sitophila tem demonstrado alta atividade ligninolítica e capacidade para degradar celulose e casca de arroz (Durán et.al., 1988a; Durán et.al., 1988b; Durán et.al., 1987).

Ligninase de C.sitophila foi purificada por cromatografia de troca iônica sendo que 3 hemoproteínas foram isoladas com propriedades de ligninase, nenhuma delas dependente de Mn (Rodríguez e Durán, 1988).

1.5- HEMINA

Desde a purificação de ligninase a partir de meio extracelular de P.chrysosporium, alguns modelos químicos desta peroxidase têm sido relatados (Habe et.al., 1985; Hattori et.al., 1988; Shimada et.al., 1987b). A maioria destes modelos de ligninase são baseados em complexos de ferro porfirina.

Algumas das razões que levaram ao estudo de modelos biomiméticos de ligninase são a possibilidade de desenvolvimento de um catalisador para a indústria papeleira e contribuição ao estudo do mecanismo de ligninase.

Hemina é um complexo natural protoporfirina com Fe (III) (figura 18) que na presença de H₂O₂ tem catalisado reações de quebra C α -C β de compostos-modelo de lignina β -1 e β -0-4 (Habe et.al., 1985).

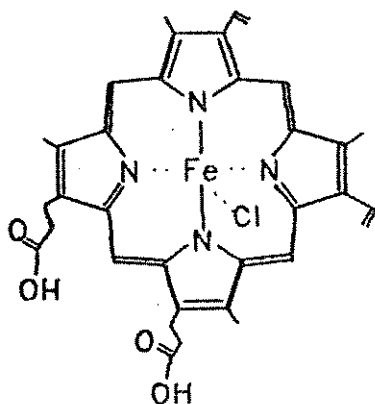


Figura 18- Estrutura da hemina (Shimada et.al., 1987b).

1.6- OBJETIVOS

Sendo C.sitophila um fungo recentemente isolado, pouco ainda se sabe sobre seu sistema ligninolítico e seu mecanismo de ação sobre lignina. Vários esforços estão sendo realizados em nosso grupo no sentido de elucidar este sistema, como o estudo da ação do fungo sobre lignina in situ (madeira), sobre lignossulfonatos e o estudo da produção e purificação das enzimas deste fungo.

Este trabalho tem como objetivo conhecer os tipos de reações que ocorrem nas culturas com os compostos-modelo e o efeito destes compostos no crescimento de C.sitophila, comparar estes resultados com um fungo já bem estudado, P.chrysosporium e com um modelo de ligninase, hemina.

CAPITULO II-PARTE EXPERIMENTAL

II-PARTE EXPERIMENTAL

II.1-MATERIAIS

II.1.1-REAGENTES E PROCEDÊNCIA

Acetato de zinco	Merck
Acetovanilona	Aldrich
Ácido acético	Merck
Ácido bórico	Reagen
Ácido cítrico	Geel
Ácido 3,4-dihidroxifenilacetico	Sigma
Ácido 2,5-dihidroxifenilacetico	Sigma
Ácido D,L-4-hidroxi-3-metoxi mandélico	Sigma
Ácido nicotínico	Aldrich
Ácido p-aminobenzóico	Aldrich
Ácido vanílico	Sigma
Álcool veratrílico	Aldrich
Agar-agar	Micromed
Biftalato de potássio	Reagen
Biotina	Quimis
Borohidreto de sódio	Sigma
Bromo	Reagen
Carbonato de potássio anidro	Cinética Quimica
Citrato de sódio	Dyne
Cloreto de cálcio	Ecibra
Cloreto de sódio	Sinth

Cloreto de zinco	Merck
Detapac	Aldrich
Dimetilformamida	Merck
Dimetilssulfóxido	Merck
3,4-dimetoxiacetofenona	Aldrich
Fosfato de potássio monobásico anidro	Carlo Erba
D-Glicose	Merck
Guaiacol	Aldrich
Hemina Bovina	Sigma
Hidroxicobalamina	Squibb
Hidróxido de sódio	Merck
Molibdato de amônio IV.tetrahidratado	Aldrich
Pantotenato de cálcio-DL	Fluka Chemie
Parafolmaldeído	Aldrich
Peróxido de hidrogênio	Merck
Piridoxina.HCl	Aldrich
Riboflavina	Riedel-de-Haen
Sílica gel 60 F254 (camada delgada)	Merck
Sílica gel (coluna)	Carlo Erba
Sulfato de amônio	Sigma
Sulfato de cobre	Carlo Erba
Sulfato de ferro (II)	Ecibra
Sulfato de magnésio anidro	Fisher
Sulfato de manganês	Carlo Erba
Sulfato de metila	Aldrich
Sulfato de potássio e alumínio	Aldrich
Tartarato de diamônio	Carlo Erba

Tiossulfato de sódio

Carlo Erba

Vanilina

Prods.Quim.Labor

Os demais solventes utilizados foram de grau p.a. e não necessitaram de tratamento especial para os objetivos deste trabalho.

II.1.2-INSTRUMENTAÇÃO

- Balança Metler H54 AR
- Balança Metler ME22
- Espectrofotômetro DMS 100 Intralab
- Autoclave vertical Phoenix
- Estufa de cultivo modelo 116 Fabbe
- Fluxo laminar Veco modelo VLFS 12
- Cromatógrafo líquido: Bomba Waters 6000
Detector UV/VIS Varian 50
- Medidor de ponto de fusão Metler FP5

Os espectros de ^1H -RMN foram registrados em aparelho BRUCKER AW-80. Os deslocamentos químicos estão expressos em ppm, tendo-se como referência dissiloxano ou TMS, indicando-se multiplicidade (s, singlete; d, dubleto; t, tripleto; q, quarteto; m, multipletto; l, largo) e número de prótons. Os espectros de infravermelho foram registrados em aparelho PERKIN-ELMER 399B, utilizando-se pastilhas de KBr. Espectro de massa foi registrado em aparelho VARIAN MAT 311A.

II.2-MICROORGANISMOS E MEIOS DE CULTURA

Os microorganismos necessitam de nutrientes para seu crescimento, que contenham fonte de carbono, como glicose, celulose, amido, etc., sais minerais e elementos traços.

Chrysonilia sitophila, TFB 27441, é um fungo pertencente à classe dos ascomicetes, obtido originalmente do trato intestinal do besouro Tribolium ferrugenum (Campos et. al., 1986), e posteriormente conservado em placas de agar a 5°C. Culturas estoque foram mantidas em glicerol a -15°C. O meio de cultura utilizado para este microorganismo, Fries modificado (Ferraz e Durán, 1989), é constituído de:

-Sulfato de amônio	5,6g/l
-Fosfato de potássio monobásico	1,0g/l
-Sulfato de magnésio	0,5g/l
-Cloreto de sódio	0,1g/l
-Traços *:	
Sulfato de cobre pentahidratado	0,10mg/l
Sulfato de ferro(II)	0,20mg/l
Sulfato de manganês	0,02mg/l
Cloreto de zinco	0,15mg/l
-Glicose: concentração variada	
-Tampão biftalato 0,025 M pH 6	
* solução preparada previamente e utilizada na quantidade de 0,1 ml/l	

Phanerochaete chrysosporium, BKM-F 1767 (ATCC 24725), fungo pertencente à classe dos basideomicetes, foi obtido através do

Prof.Dr.Juan Carrau (Universidade de Caxias do Sul, Brasil).

O meio de cultura utilizado para seu cultivo (Linko e Zhong, 1987) é constituído de:

-D-Glicose	2,00g/l
-Tartarato de diamônio	0,60g/l
-Sulfato de magnésio.heptahidratado	0,50g/l
-Cloreto de cálcio.dihidratado	0,10g/l
-Sulfato de ferro II	18,40mg/l
-Solução de vitaminas	1 ml
-Solução de elementos traços	1 ml
pH ajustado para 4,6 com KOH 6 N	

Solução de vitaminas

Tiamina.HCl	100,0 mg/l
Piridoxina.HCl	20,0 mg/l
Riboflavina	10,0 mg/l
Ácido nicotínico	10,0 mg/l
Pantotenato de cálcio-DL	10,0 mg/l
Ácido p-aminobenzóico	10,0 mg/l
Biotina	4,0 mg/l
Hidroxicobalamina	0,2 mg/l

Solução de elementos traços

Acetato de zinco.dihidratado	2,300 mg/l
Detapao	1,400 mg/l
Sulfato de manganês.monohidratado	1,000 mg/l
Cloreto de cálcio.hexahidratado	1,000 mg/l
Sulfato de cobre.pentahidratado	1,000 mg/l
Sulfato de potássio e alumínio.dodecahidratado	0,010 mg/l
Ácido bórico	0,010 mg/l
molibdato de amônio.tetrahidratado	0,060 mg/l
Cloreto de sódio	0,002 mg/l

Saccharomyces cerevisiae foi utilizado na redução da vanilina a álcool vanílico. Foi obtido comercialmente como fermento Itaiquara. O meio de cultura utilizado para seu crescimento é constituído de:

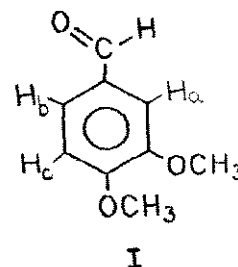
-Fermento comercial de levedura	8,2 g/l
-Sacarose (açúcar comercial)	200,0 g/l
-Sulfato de magnésio.heptahidratado	0,4 g/l
-Sulfato de amônio	1,3 g/l
-Cloreto de cálcio	0,2 g/l
-Tampão citrato 0,1 M PH 3	

MÉTODO DE INÓCULO

P.chrysosporium e C.sitophila foram inoculados em placas de Pétri, em seus meios de cultura correspondentes (10ml) contendo 1,5% de glicose e 1,5% de agar. Estas placas foram incubadas a 28°C por 48 horas. Metade do conteúdo de micélio da placa foi raspado e transferido para 20 ml de solução inoculante (meio de cultura) e agitado até dispersão máxima. 1 ml desta solução foi adicionado a 20 ml de meio.

11.3-SÍNTESE E BIOSÍNTESE DE COMPOSTOS-MODELO DE LIGNINA

11.3.1-ALDEÍDO VERATRILICO (Buck, 1943)



A um balão de 1 l de 3 bocas, foram conectados um funil de adição contendo 26,2 ml(0,27 moles) de sulfato de metila, um condensador de refluxo e um agitador mecânico, no qual uma mistura de 18,2 g(0,12 moles) de vanilina e 45 ml de água foi aquecida em um banho de vapor. Foram aquecidos até 100°C 36 ml de solução 5 M de NaOH e adicionados à mistura de vanilina e água.

O aquecimento foi mantido e 14,2 ml(0,15 moles) de sulfato de metila foram adicionados através do funil de adição numa velocidade suficiente para manter a ebulição. Após a adição de todo o sulfato de metila, aproximadamente uma hora, a mistura de reação foi aquecida por mais 45 minutos e uma porção extra de 3 ml

(0,03 moles) de sulfato de metila foi adicionada. Após 10 minutos de aquecimento, foram adicionados 6 ml de NaOH 5 M e outra porção de 3 ml (0,03 moles) de sulfato de metila. Adição alternada de 6 ml de NaOH e 3 ml de sulfato de metila foi repetida mais duas vezes completando um volume total de 26,2 ml (0,27 moles) de sulfato de metila adicionado. A mistura de reação, foram adicionados 15 ml de NaOH e aquecida por 20 minutos. A mistura foi resfriada rapidamente até 25°C sob agitação e o produto foi extraído com 3 porções de 30 ml de éter etílico.

Os extratos foram combinados, secados com sulfato de magnésio anidro, filtrados e o éter evaporado.

A massa de aldeído veratrílico obtida foi de 10,6 g (0,064 moles), rendimento de 53,3%.

$^1\text{H-RMN}(\text{CCl}_4/\text{dissiloxano})$: 3,8 (s, 6H; OCH_3); 6,8 (H_c , d); 7,2 (H_a , s); 7,25 (H_b , d); 9,7 (s, 1H) - Espectro 1, p.75

UV (metanol): $\lambda_{\text{max}}=306,4 \text{ nm}$, $\epsilon_{\text{max}}=9326,5 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ -

Espectro 2, p.76

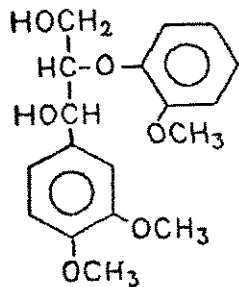
P.F.: 39,9-41,1°C

11.3.2-SÍNTESE DO DIOL β -O-4 I, 1-(3,4-dimetoxifenil)-2-

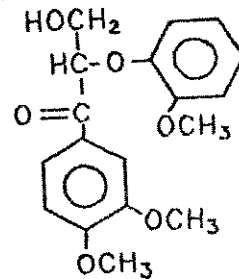
(2-metoxifenoxi)-1,3-propanodiol, e do cetol β -O-4 II,

1-(3,4-dimetoxifenil)-2-(2-metoxifenóxi)-1-ona-3-propanol

(Adler et.al.,1952)

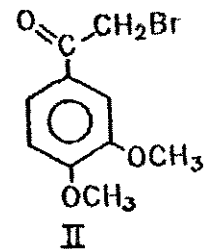


β -O-4 I (V)



β -O-4 II (IV)

11.3.2.1- 1-(3,4-dimetóxifenil)-2-bromoetanona

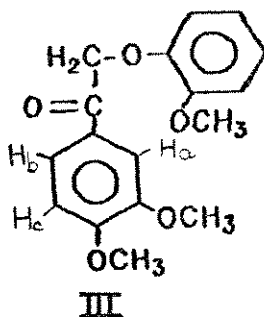


Em um balão de 250 ml, 3,6 g (20 mmoles) de 3,4-dimetoxiacetofenona foram dissolvidos em 100 ml de clorofórmio. Foi adaptado um funil de adição contendo 1 ml de bromo (20 mmoles) diluído em 5 ml de clorofórmio. Com agitação magnética constante, bromo foi gotejado muito lentamente. Após a adição total de bromo (aproximadamente 3 horas), a reação foi tratada com 100 ml de solução 0,1 M de tiosulfato de sódio. A fase orgânica foi secada com sulfato de magnésio anidro e o clorofórmio evaporado à pressão reduzida.

Obteve-se 4,30 g de produto bruto, que continha, de acordo com $^1\text{H-RMN}$, aproximadamente 50% do produto desejado e 50% da cetona reagente. O produto não foi purificado pois a cetona reagente não interferiria na reação posterior.

$^1\text{H-RMN}$ ($\text{CCl}_4/\text{dissiloxado}$): 4,2 (2H, s); 3,9 (6H, s); 6,6-7,8 (3H, aromáticos) - Espectro 3, p.77

II.3.2.2- 1-(3,4-dimetoxifenil)-2-(2-metoxifenóxi)-1-etanona



Em um balão de 50 ml, 4,1 g da bromocetona (bruto, II-3.2.1) foram dissolvidos em 15 ml de acetona. Mantendo agitação constante, 2,6 g de carbonato de potássio e 0,79 ml de guaiacol (9,8 mmoles) foram adicionados e a mistura de reação foi refluxada durante uma noite.

A mistura foi então filtrada, diluída com água e extraída com diclorometano. O extrato foi lavado com solução de NaOH e com água para retirar o excesso de guaiacol. Em seguida, secada com sulfato de magnésio anidro, filtrada e o solvente evaporado à pressão reduzida.

O resíduo foi filtrado em sílica gel, eluído com éter etílico e posteriormente recristalizado em metanol em "freezer", obtendo-se 0,63 g (2,1 mmoles) de produto puro.

$^1\text{H-RMN}$ (CDCl_3/TMS): 3,9 (3H, s; OCH_3); 3,95 (6H, s; OCH_3);
 5,2 (2H, s); 6,8-7,0 (5H, aromáticos); 7,5 (H_a , s)
 7,6 (H_b , d) - Espectro 4, p.78

IV: 1685 $\text{C}=\text{O}$ - Espectro 5, p.79

UV/VIS (metanol): $\lambda_{\text{max}}=398$ nm, $\epsilon_{\text{max}}=1036,4$ $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$;
 $\epsilon_{304}=9036,4$ $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$; $\epsilon_{275}=13514$ $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ -
 Espectro 6, p.80

P.F.: 91,8-93,0°C

11.3.2.3- 1-(3,4-dimetoxifenil)-2-(2-metoxifenoxi)-1- -ona-3-propanol (β -O-4 II)

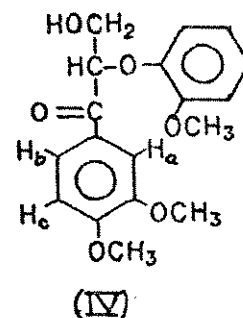
Uma solução de formaldeído foi previamente preparada dissolvendo-se 0,54 g (6 mmoles) de paraformaldeído em 5 ml de água com agitação e refluxo.

Foram adicionados 0,4 ml da solução de formaldeído a 0,61 g (2 mmoles) da cetona (III) preparada anteriormente (II-3.2.2) dissolvida em 8 ml de etanol. A mistura foram adicionados 0,04 g de carbonato de potássio e esta foi aquecida a 35°C com agitação por 2 horas.

A mistura de reação foi diluída com água, extraída com diclorometano, secada com sulfato de magnésio anidro, filtrada e evaporada.

O cetol obtido foi recristalizado em uma mistura de éter etílico-metanol (1:1) em "freezer" obtendo-se 0,28 g (0,84 mmoles) do produto puro, o que representa 42% de rendimento.

$^1\text{H-RMN}(\text{CDCl}_3/\text{TMS})$: 1,65(1H,1;OH); 3,8, 3,9 e 3,95(3H,s;
 OCH_3); 4,1(2H,d);5,4(1H,t); 6,8-7,0(5H,aro-
máticos); 7,60(H_a ,s); 7,75(H_b ,d) - Espectro 7, p.81
IV: 3600-3100 \checkmark OH; 1680 C=O - Espectro 8, p.82
EM (m/e): 332(M^+ ,12,9%); 165(100%)
UV(etanol): $\lambda_{\text{max}}=277$ nm, $\epsilon_{\text{max}}=8745$ $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ -
Espectro 9, p.83
P.F.: 69,3-70,7 $^\circ\text{C}$



11.3.2.4-1-(3,4-dimetoxifenil)-2-(2-metoxifenoxi)-1,3- propanodiol (β -D-4 I)

Foram adicionados 0,013 g (0,34 mmoles) de borohidreto de sódio a uma suspensão contendo 0,78 mmoles do cetol preparado (11-3.2.3) em 5 ml de etanol. A mistura foi agitada por aproximadamente uma hora, quando o cetol e o borohidreto se dissolveram. A solução foi deixada durante uma noite, então diluída com água, extraída com diclorometano, secada com sulfato de magnésio anidro, filtrada e o solvente evaporado a pressão reduzida.

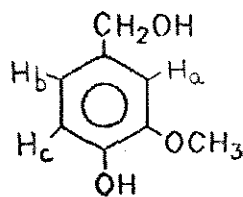
Obteve-se 0,18 g do diol (0,54 mmoles), com rendimento de 70%. O produto não necessitou de purificação.

$^1\text{H-RMN}(\text{CDCl}_3/\text{TMS})$: 1,7(1H,1;OH); 2,8(1H,1;OH); 3,5(2H,d,
 H_γ); 3,8(9H,s; OCH_3); 4,0(1H,m, H_β); 4,9(1H,d, H_α);
6,8-7,2(7H,aromáticos) - Espectro 10, p.84
IV: 3700-3100 \checkmark OH - Espectro 11, p.85

UV(etanol): $\lambda_{\max}=277$ nm, $\epsilon_{\max}=3400$ $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ - Espectro 12,

p.86

11.3.3- BIOSÍNTESE DE ÁLCOOL VANÍLICO (De wulf et.al.,1987;Seebach et.al.,1985)



VI

Cerca de 20 g de levedura comercial (fermento) foram adicionados a 150 ml de meio de cultura com 30 g de sacarose e submetidos a agitação magnética por uma hora, a 30°C, quando então, 2 g de vanilina (13,2 mmoles) e 100 g de meio a 40°C contendo 20 g de sacarose foram adicionados e agitados por uma hora. Em seguida, mais 2 g de vanilina (13,2 mmoles) foram adicionados e a agitação foi mantida por mais 50 horas.

Após este período de reação, esta foi extraída com diclorometano em extrator contínuo líquido-líquido por uma noite, secada com sulfato de magnésio anidro, filtrada e o solvente evaporado.

O produto foi recristalizado em diclorometano-éter (1:1) em "freezer", obtendo-se 1,62 g de produto puro (10,5 mmoles), o que representa 40 % de rendimento.

$^1\text{H-RMN}(\text{CDCl}_3/\text{TMS})$: 1,6(1H,1); 3,8(3H,s;OCH₃); 4,2(2H,s);

5,6(1H,1); 6,8(H_a,s); 6,9(H_b,H_c,d) - Espectro 13, p.87

IV: 3450 ν_{OH} ; 3180 ν_{OH} - Espectro 14, p.88

UV(metanol): $\lambda_{\max}=280$ nm, $\epsilon_{\max}=2777$ M⁻¹cm⁻¹ -

Espectro 15, p.89

P.F.: 113,4-113,6°C

II.4-BIODEGRADAÇÃO DE COMPOSTOS-MODELO DE LIGNINA POR C.sitophila

II.4.1-CONDIÇÕES DE CULTURA

II.4.1.1-CRESCIMENTO COMPARATIVO DE C.sitophila EM DIFERENTES COMPOSTOS-MODELO

C.sitophila foi inoculada em 20 ml de meio líquido contendo 0,1% p/v de glicose, 0,1 % e 0,3 % dos diferentes compostos-modelo em Erlenmeyers de 125 ml. O pH foi ajustado para 6,0 com NaOH 0,1 M. Neste caso não foi utilizado tampão biftalato devido à interferência na análise espectral realizada posteriormente. As culturas, feitas em duplicata, foram incubadas sem agitação a 28°C por 5 dias, quando então foram filtradas, secadas em estufa a 80°C durante uma noite e pesadas, determinando-se assim o peso seco de micélio.

Um controle sem substrato e outro com substrato não inoculado também foram feitos.

II.4.1.2-BIODEGRADAÇÃO DOS COMPOSTOS-MODELO β -O-4

C.sitophila foi cultivada durante 3 dias em Erlenmeyers de 125 ml contendo 20 ml de meio de cultura com 0,1% de glicose e

tampão biftalato 0,025 N pH 6,0. Após 3 dias de incubação, o meio foi retirado e o micélio lavado cuidadosamente com água estéril para retirar traços de tampão.

Os substratos foram adicionados ao micélio na forma de suspensões preparadas com 50 μ l de N,N-dimetilformamida, composto-modelo e 20 ml de meio de cultura sem tampão biftalato (pH ajustado para 6,0 com NaOH 0,1 M) em quantidade suficiente para uma concentração final de 0,02% p/v.

Foram feitos um controle sem substrato e outro com substrato não inoculado.

As culturas foram incubadas por mais 4 ou 7 dias, conforme indicado.

11.4.2-EXTRAÇÃO DOS PRODUTOS DE DEGRADAÇÃO DOS MODELOS β -O-4

Após a incubação com os substratos, as culturas foram filtradas, acidificadas com HCl 6 N até pH 2, extraídas com acetato de etila (3 x 20 ml), lavadas com solução saturada de NaCl, secadas com sulfato de magnésio anidro e o solvente evaporado.

Os resíduos foram dissolvidos em etanol ou metanol conforme indicado e analisados por espectrometria no UV/VIS e cromatografia líquida de alta eficiência.

11.4.3-ANÁLISE POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (HPLC)

As amostras foram analisadas por HPLC fase reversa usando uma coluna C-18 Bondapack (25 cm). Os compostos foram eluídos com

metanol-H₂O 1:1 a um fluxo de 1 ml/min e detectados por absorção no ultravioleta a 280 nm.

II.5-BIODEGRADAÇÃO DE β -O-4 I POR P.chrysosporium

II.5.1-CONDIÇÕES DE CULTURA

Foram feitas culturas de P.chrysosporium (Erlenmeyers de 125 ml) que foram incubadas durante 6 dias a 28°C em 20 ml de meio de cultura já descrito (II.2). Depois deste período de incubação, foi feita uma suspensão do substrato dissolvendo-se 8 mg do composto em 50 μ l de N,N-dimetilformamida e adicionando-se 1 ml de água estéril. Metade deste volume foi adicionado a uma cultura e a outra metade foi adicionada à mesma quantidade de meio porém não inoculado, que foi deixado como controle. Outro controle sem substrato, inoculado, também foi feito.

As culturas foram incubadas por mais 6 dias. Após este período de incubação, o mesmo procedimento descrito em II-4.2 foi feito neste caso para extração dos produtos de degradação. As amostras foram analisadas por HPLC como já descrito em II.4.3.

11.6-DEGRADAÇÃO BIOMIMÉTICA DE COMPOSTOS-MODELO POR HEMINA (Fiechter et.al.,1988) Álcool veratrílico e β -0-4 I

As reações dos modelos β -0-4 I e álcool veratrílico com hemina, foram feitas ao ar, com agitação a 30°C por 1,5 horas. Foi preparada solução estoque de β -0-4 I, dissolvendo-se primeiro em dimetilssulfóxido e completando-se o volume com água. Foi preparada uma suspensão de hemina, dissolvendo-se 8,35 mg em 0,1 ml de dimetilssulfóxido e completando-se com água o volume para 10 ml, havendo uma precipitação parcial do soluto. Peróxido de hidrogênio foi utilizado no lugar de terc-butil hidroperóxido. As concentrações finais na reação foram de 5,56 mM para peróxido de hidrogênio, 0,67 mM para cada substrato e 1,13 mM para hemina. Um volume homogêneo da suspensão de hemina foi adicionado à solução de cada substrato e a reação foi iniciada com a adição de peróxido. Após 1,5 horas, a reação foi filtrada, retendo-se toda a hemina. Foram feitos 2 controles para cada substrato, na ausência de hemina e outro na ausência de H₂O₂, ambos nas mesmas condições. Após a filtração, as amostras foram analisadas por UV e HPLC.

CAPITULO III-RESULTADOS E DISCUSSÃO

III-RESULTADOS E DISCUSSÃO

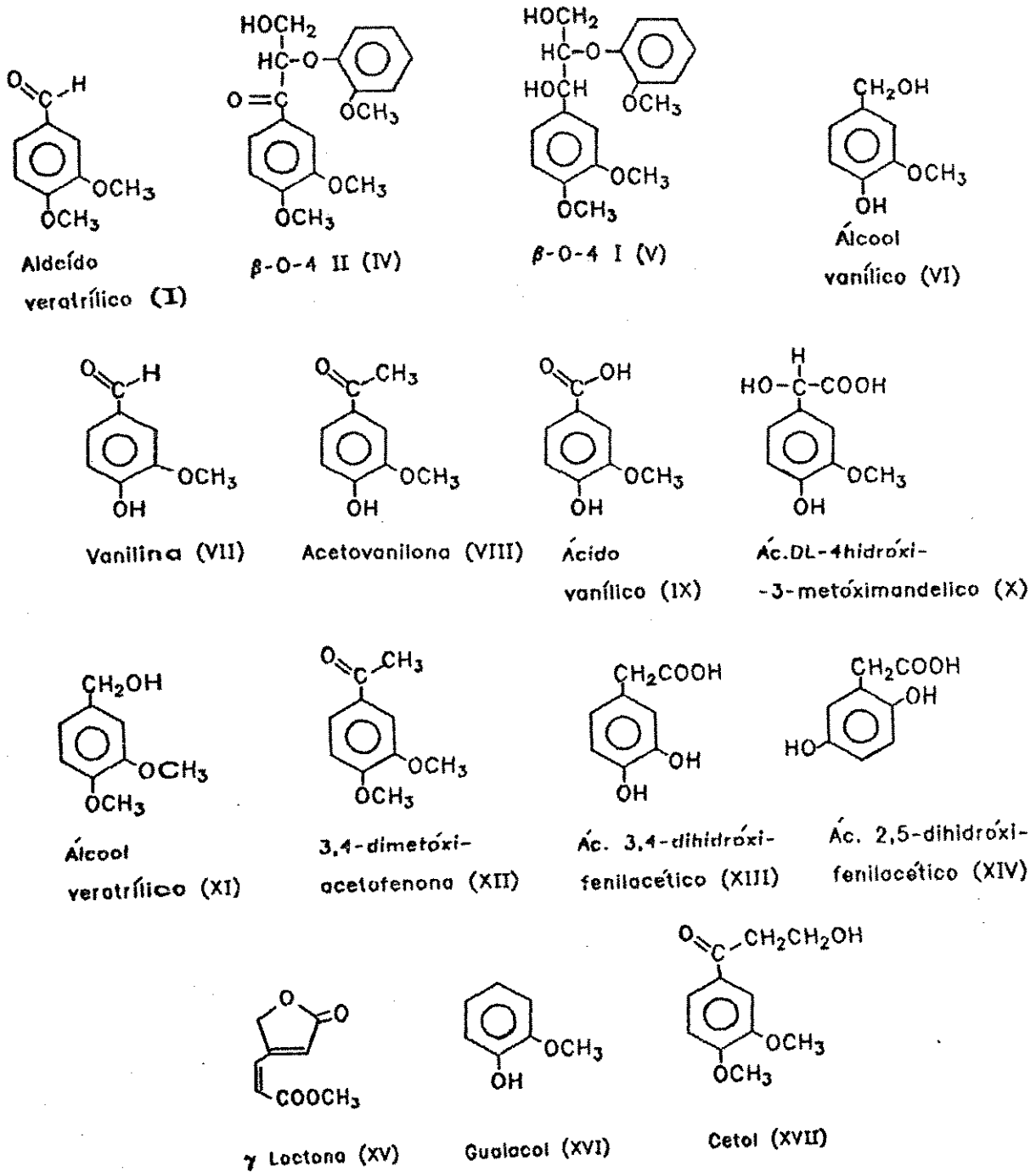


Figura 19- Compostos-modelo de lignina utilizados e alguns produtos de sua degradação

III.1- CRESCIMENTO COMPARATIVO DE C.sitophila EM DIFERENTES COMPOSTOS-MODELO DE LIGNINA

O crescimento de C.sitophila foi determinado através do peso seco de micélio, como pode ser observado na tabela 2, onde os melhores substratos na concentração de 0,1% foram ácido 3,4-dihidroxifenilacético (XIII), β -O-4 I (V), álcool veratrílico (XI) e ácido 2,5-dihidroxifenilacético (XIV), em relação ao controle de glicose, sendo que o composto β -O-4 I (V) apresentou crescimento superior a este controle. Isto indica que estes compostos foram metabolizados pelo fungo.

Tabela 2- Peso seco de micélio após 5 dias de crescimento em diferentes compostos-modelo de lignina na concentração de 0,1% (p/v) + 0,1% de glicose.

COMPOSTO	PESO SECO(mg)
CONTROLE *	5,06 ± 0,68
ALDEÍDO VERATRÍLICO (I)	2,39 ± 1,64
β -O-4 I (V)	7,56 ± 1,70
VANILINA (VII)	1,67 ± 1,21
ACETOVANILONA (VIII)	2,17 ± 0,96
ACIDO VANÍLICO (IX)	1,32 ± 0,07
AC. DL-4-HIDRÓXI-3-METÓXIMANDELICO (X)	4,03 ± 0,09
ALCOOL VERATRÍLICO (XI)	5,54 ± 0,22
3,4-DIMETOXIACETOFENONA (XII)	4,08 ± 1,17
ACIDO 3,4-DIHIDRÓXIFENILACÉTICO (XIII)	7,36 ± 1,35
ACIDO 2,5-DIHIDRÓXIFENILACÉTICO (XIV)	5,92 ± 0,28

* 0,1% glicose

Com o objetivo de verificar se a metabolização dos compostos pelo fungo seria maior diante de uma maior concentração de substrato, esta foi aumentada para 0,3%. Entretanto, a esta concentração, o crescimento foi menor chegando a ser inibido completamente pelos compostos aldeído veratrílico (I), vanilina (VII), acetovanilona (VIII), ácido vanílico (IX) e 3,4-dimetóxiacetofenona (XII), como pode ser visto na tabela 3, enquanto que as culturas com os compostos álcool vanílico (VI), álcool veratrílico (XI), ácido 3,4-dihidroxifenilacético (XIII) e ácido 2,5-dihidroxifenilacético (XIV) apresentaram crescimento considerável, porém menor que o controle de glicose com excessão do composto VI cuja cultura apresentou crescimento comparável ao controle de glicose nesta concentração.

Tabela 3- Crescimento comparativo de C. sitophila em diferentes compostos-modelo na concentração de 0,3% (p/v) + 0,1% de glicose.

COMPOSTOS	PESO SECO (mg)
CONTROLE *	8,93±0,35
ALDEÍDO VERATRÍLICO (I)	0,00
ALCOOL VANÍLICO (VI)	9,13±0,29
VANILINA (VII)	0,00
ACETOVANILONA (VIII)	0,00
ACIDO VANÍLICO (IX)	0,00
ALCOOL VERATRÍLICO (XI)	6,74±0,24
3,4-DIMETOXIACETOFENONA (XII)	0,00
ACIDO 3,4-DIHIIDROXIFENIL ACÉTICO (XIII)	6,70±0,10
ACIDO 2,5-DIHIIDROXIFENIL ACÉTICO (XIV)	6,55±0,03

* 0,1% de glicose

Kirk e Farrel (1987) propuseram que o potencial de oxidação é determinante para que um núcleo aromático seja substrato para ligninase. Substituintes fortemente retiradores de elétrons como C_{α} -carbonila tendem a inativar o núcleo aromático à oxidação por ligninase enquanto grupos alcoxila o ativam.

Em nosso caso, os compostos que inibiram o crescimento fúngal são compostos que contêm carbonila C_{α} , o que sugere que a carbonila α tem um efeito tóxico sobre C.sitophila que também impede a metabolização.

III.2- BIODEGRADAÇÃO DOS COMPOSTOS-MODELO POR C.sitophila

Os espectros de absorção no ultravioleta dos compostos ácido 3,4-dihidroxifenilacético (XIII) e álcool veratrílico (XI) na concentração inicial de 0,1% mostram um decréscimo na absorção da banda a 280 nm e análises por HPLC mostram diminuição na concentração após biodegradação (Figuras 20 e 21). Na degradação do composto XIII, nenhum produto foi observado, o que pode indicar um processo de mineralização ($CO_2 + H_2O$) ou metabolização intracelular. O mesmo não acontece com álcool veratrílico (XI) onde além de um decréscimo na concentração, é observada por HPLC a formação de produtos com tempo de retenção 4,4 min e 7,4 min, sendo que o produto com tempo de retenção 7,4 min corresponde provavelmente à lactona (XV) proveniente de abertura de anel aromático já publicada para P.chrysosporium (Leisola et.al., 1985). A tabela 4 converte os tempos de retenção já publicados (Haemmerli et.al., 1987)

para as condições utilizadas neste caso.

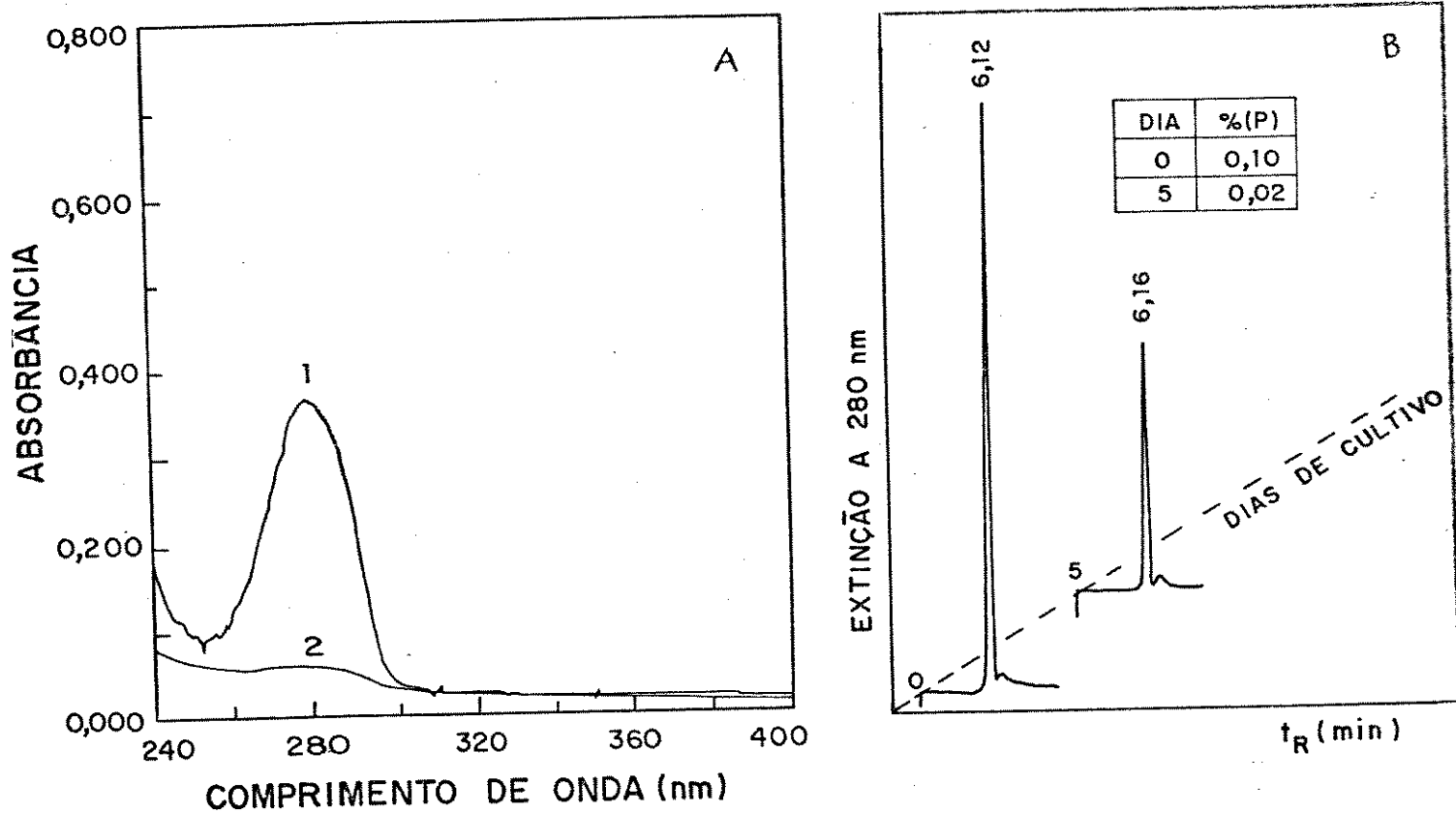


Figura 20-(A) Espectro de absorção no ultravioleta do composto XIII, controle (1) e após 5 dias de biodegradação (2) por *C. sitophila*; concentração inicial de 0,1%.
 (B) HPLC do composto XIII, controle e biodegradado.

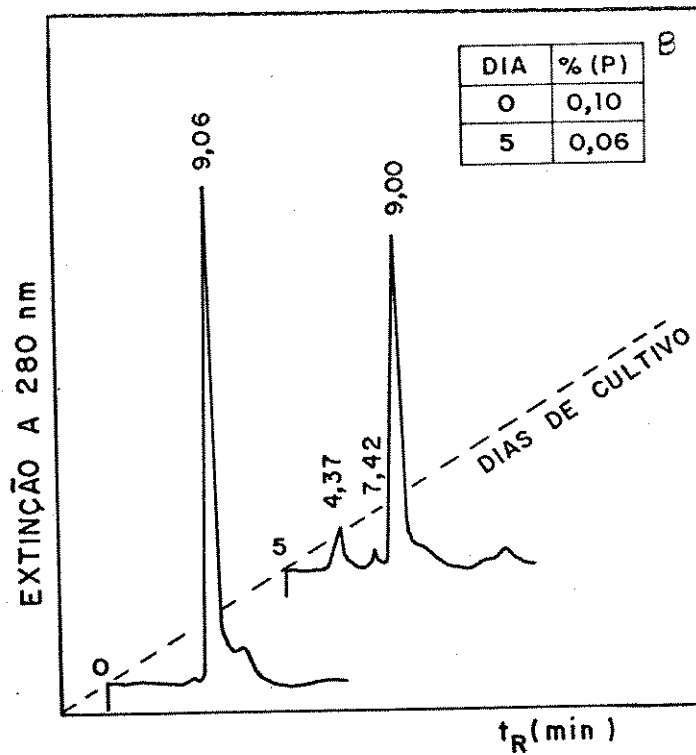
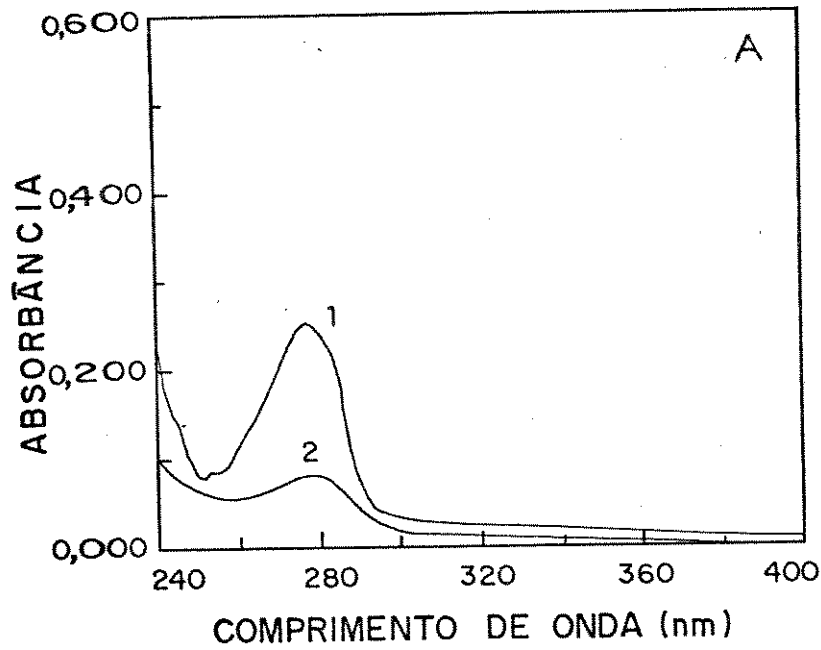


Figura 21-(A) Espectro de absorção no ultravioleta do composto XI, controle (1) e após 5 dias de biodegradação (2) por *C. sitophila*; concentração inicial de 0,1%.
 (B) HPLC do composto XI, controle e biodegradado.

Tabela 4- Conversão dos tempos de retenção de aldeído veratrílico e lactona(XV) em relação ao álcool veratrílico.

Composto	Tempo de Retenção(min)		
	*	Calculado	Experimental
Aldeído veratrílico(I)	17,5	11,5	11,4
Alcool veratrílico(XI)	13,7	9,0	9,0
Lactona(XV)	11,9	7,8	7,4

* Haemmerli et.al.,1987

Na degradação de álcool veratrílico por C.sitophila, não foi observada a formação de aldeído veratrílico, ao contrário do observado para P.chryso sporium, o que sugere que este esteja sendo metabolizado intracelularmente por uma oxidoredutase cuja existência já foi detectada para P.chryso sporium (Leisola et. al.,1988).

Na concentração de 0,3% também foi observada a diminuição na absorção da banda a 280 nm para os compostos cujas culturas apresentaram crescimento, mas não foi observado nenhum produto por HPLC a esta concentração (Figuras 22, 23, 24 e 25) o que está de acordo que, in vivo e a este estágio de crescimento, estes monômeros sejam metabolizados intracelularmente.

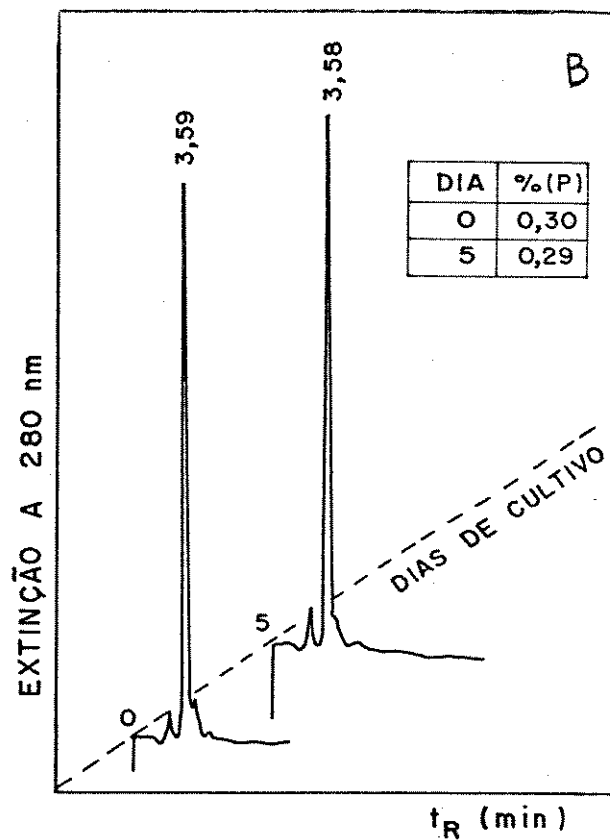
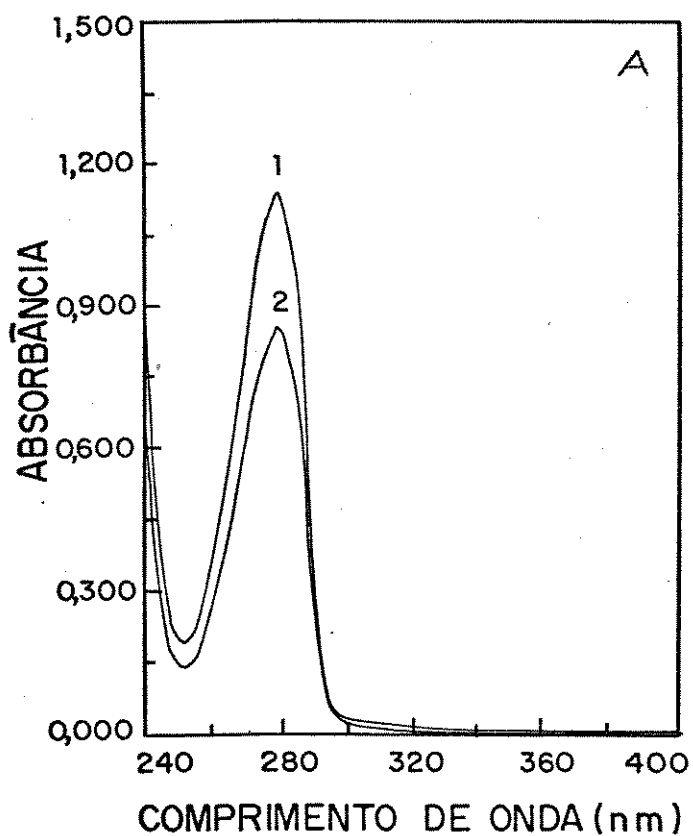


Figura 22-(A) Espectro de absorção no ultravioleta do composto VI, controle (1) e após 5 dias de biodegradação (2) por *C. sitophila*; concentração inicial de 0,3%.

(B) HPLC do composto VI, controle e biodegradado.

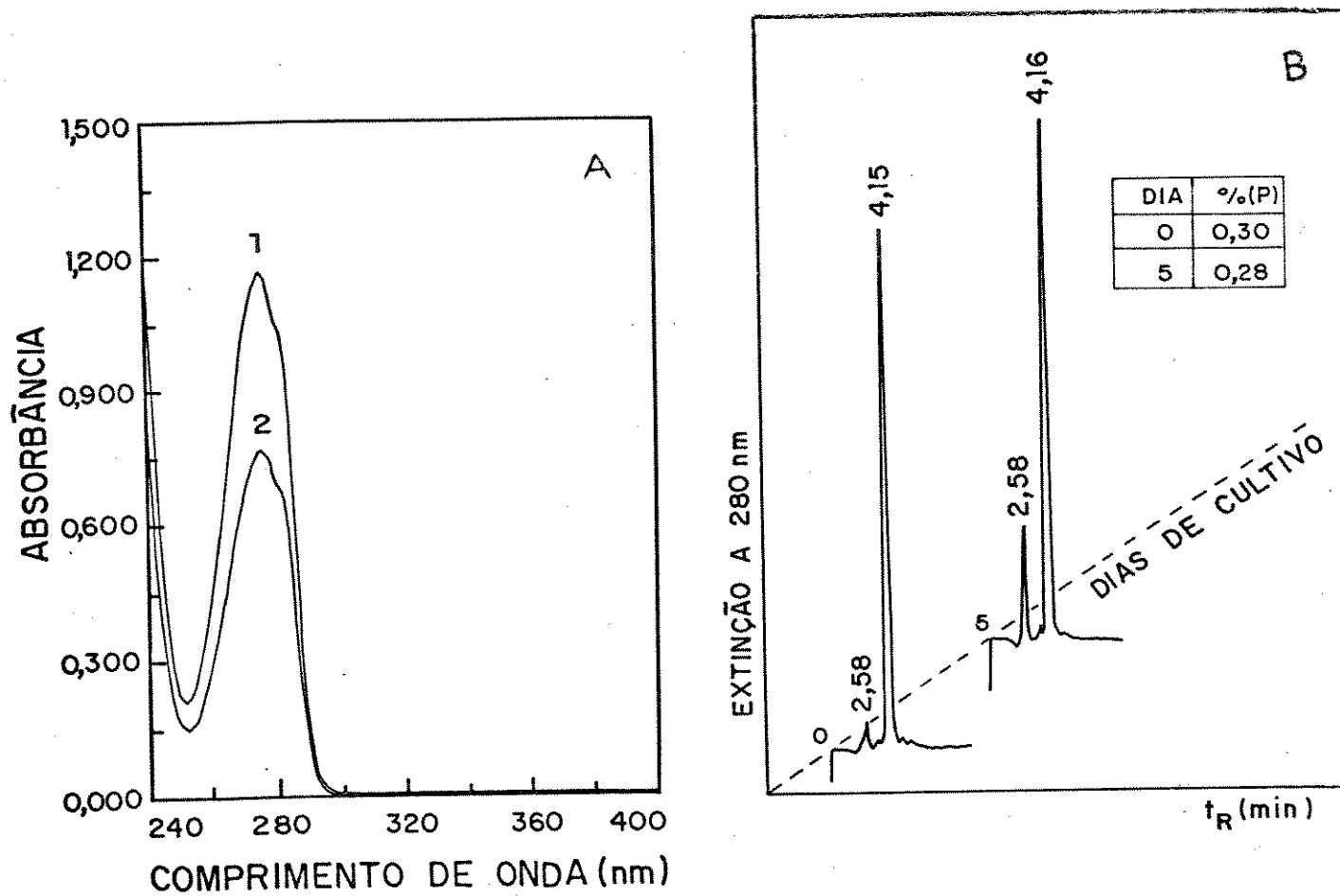


Figura 23-(A) Espectro de absorção no ultravioleta do composto XI, controle (1) e após 5 dias de biodegradação (2) por *C. sitophila*; concentração inicial de 0,3%. (B) HPLC do composto XI, controle e biodegradado.

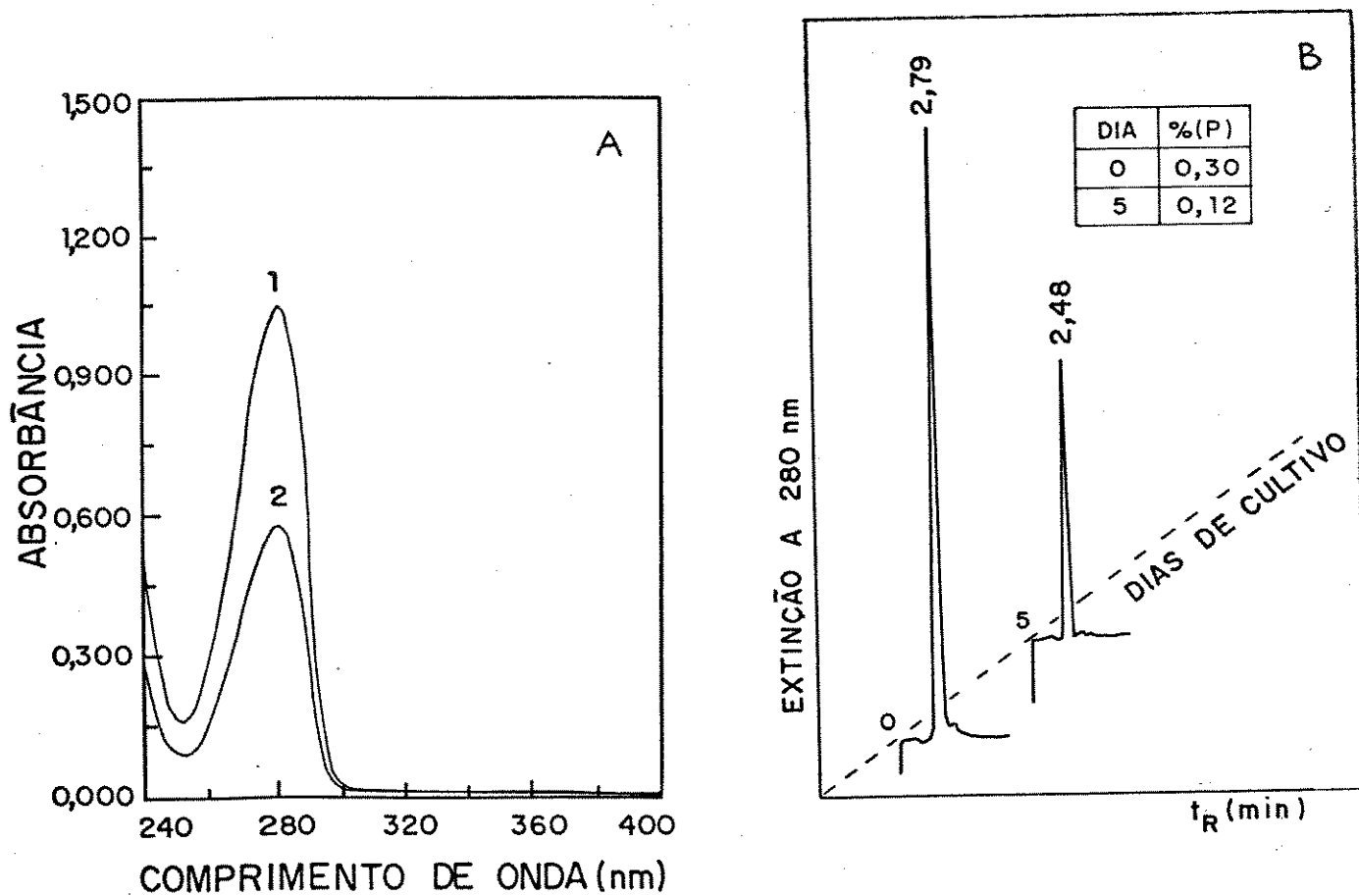


Figura 24-(A) Espectro de absorção no ultravioleta do composto XIII, controle (1) e após 5 dias de biodegradação (2) por *C. sitophila*; concentração inicial de 0,3%. (B) HPLC do composto XIII, controle e biodegradado.

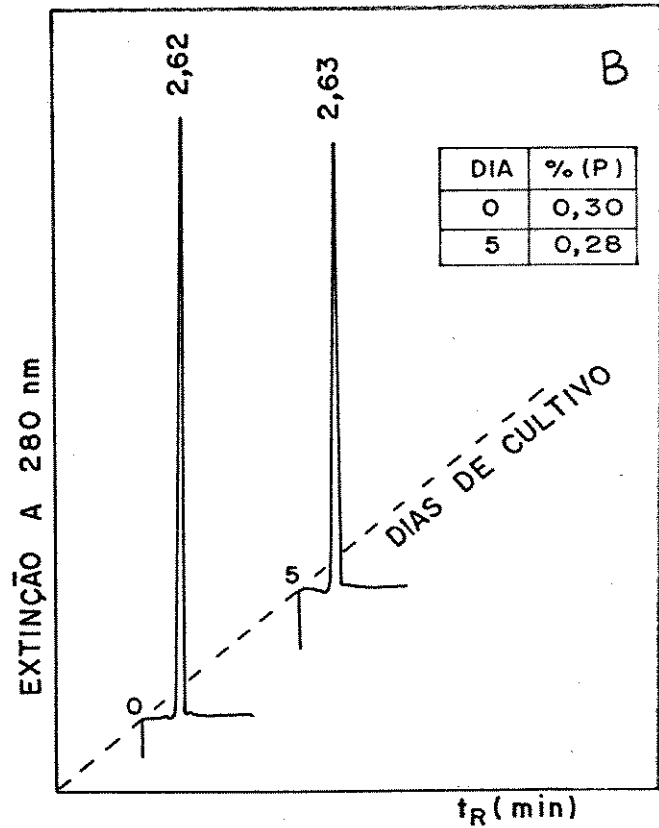
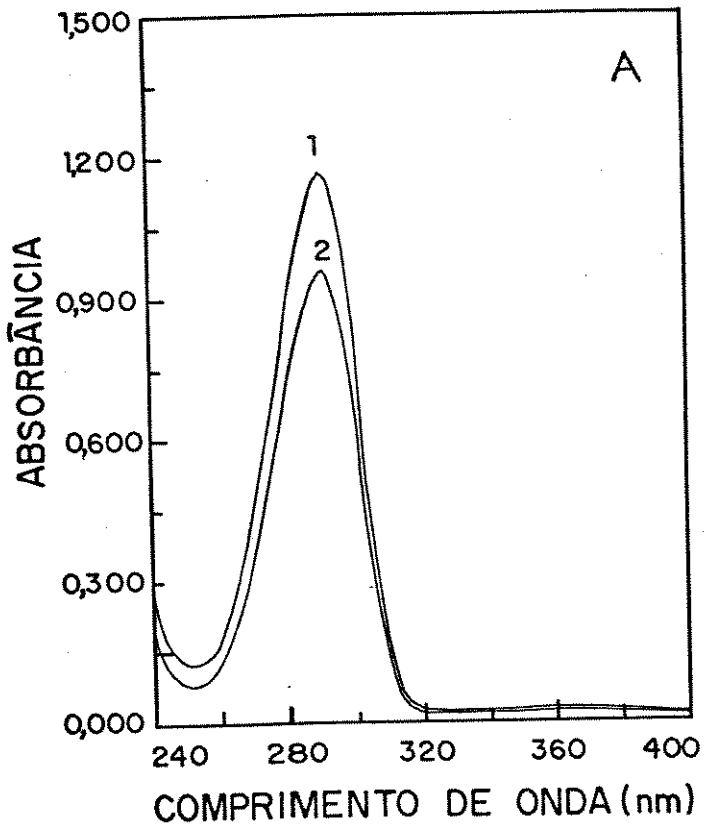


Figura 25-(A) Espectro de absorção no ultravioleta do composto XIV, controle (1) e após 5 dias de biodegradação (2); concentração inicial de 0,3%.

(B) HPLC do composto XIV, controle e biodegradado.

O espectro de absorção de β -O-4 I (V) após biodegradação mostra o aparecimento de uma nova banda a 300 nm (figura 26(A)). Análise por HPLC (figura 26(B)) mostra a formação de álcool veratrílico (4,17 min), guaiacol (4,7 min), um composto com tempo de retenção 7,32 min e o produto de oxidação $C\alpha$ (8,9 min). O composto com tempo de retenção 7,32 min é provavelmente derivado do produto de oxidação $C\alpha$ de β -O-4 I (V), cujo tempo de retenção é 8,9 min (Figura 26).

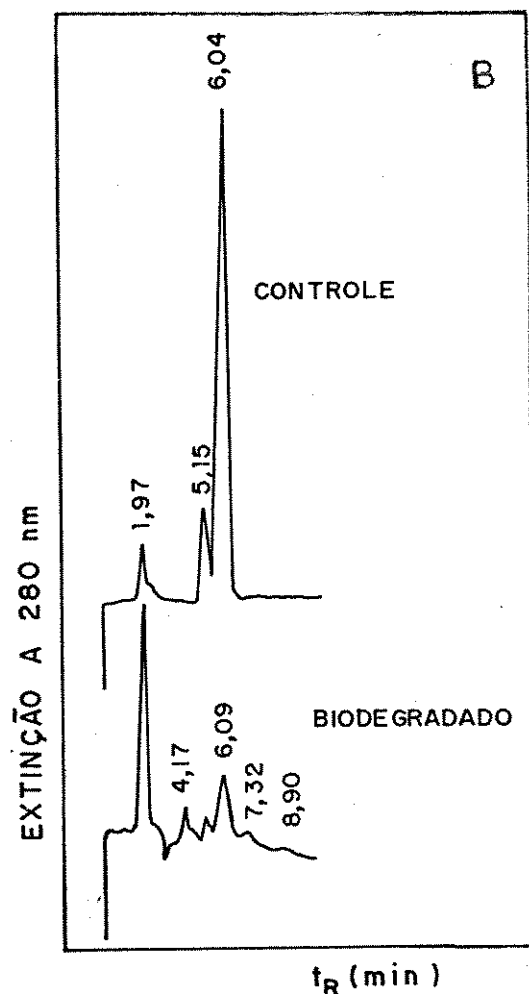
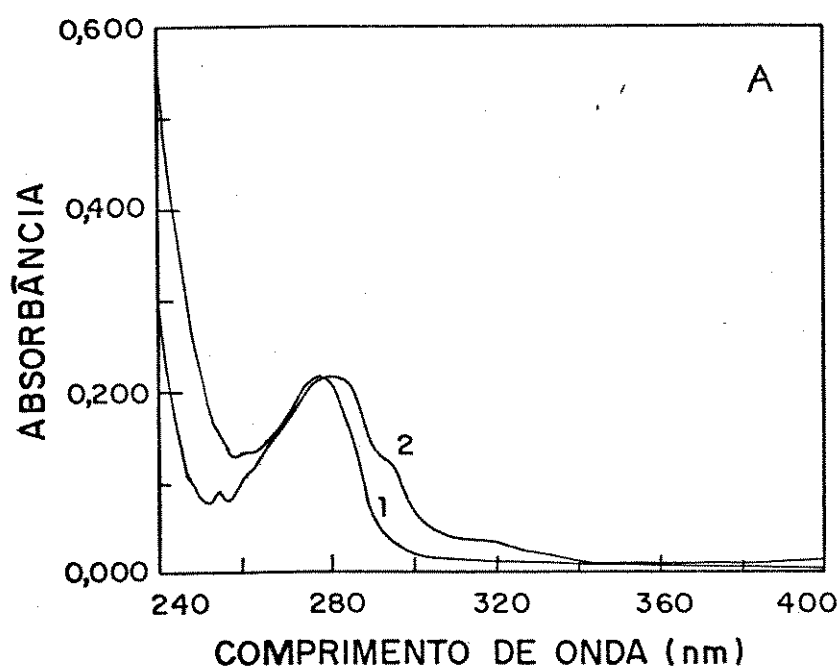


Figura 26-(A) Espectro de absorção no ultravioleta do composto β -O-4 I (V), controle (1) e após 4 dias de biodegradação (2) por C. sitophila.

(B) HPLC do composto V controle e biodegradado.

Para confirmar estes produtos, foi feita a degradação de β -O-4 I (V) por P.chrysosporium, já que os produtos são conhecidos (Umezawa et.al.,1983; Umezawa e Higuchi, 1985). A figura 27(A) mostra o espectro de absorção do composto β -O-4 I degradado por P.chrysosporium observando-se um comportamento semelhante à C.sitophila. Análise por HPLC mostra o aparecimento do composto β -O-4 II (IV) a 8,4 min, guaiacol (XVI) a 4,7 min e álcool veratrílico (XI) a 3,7 min (Figura 27(B)).

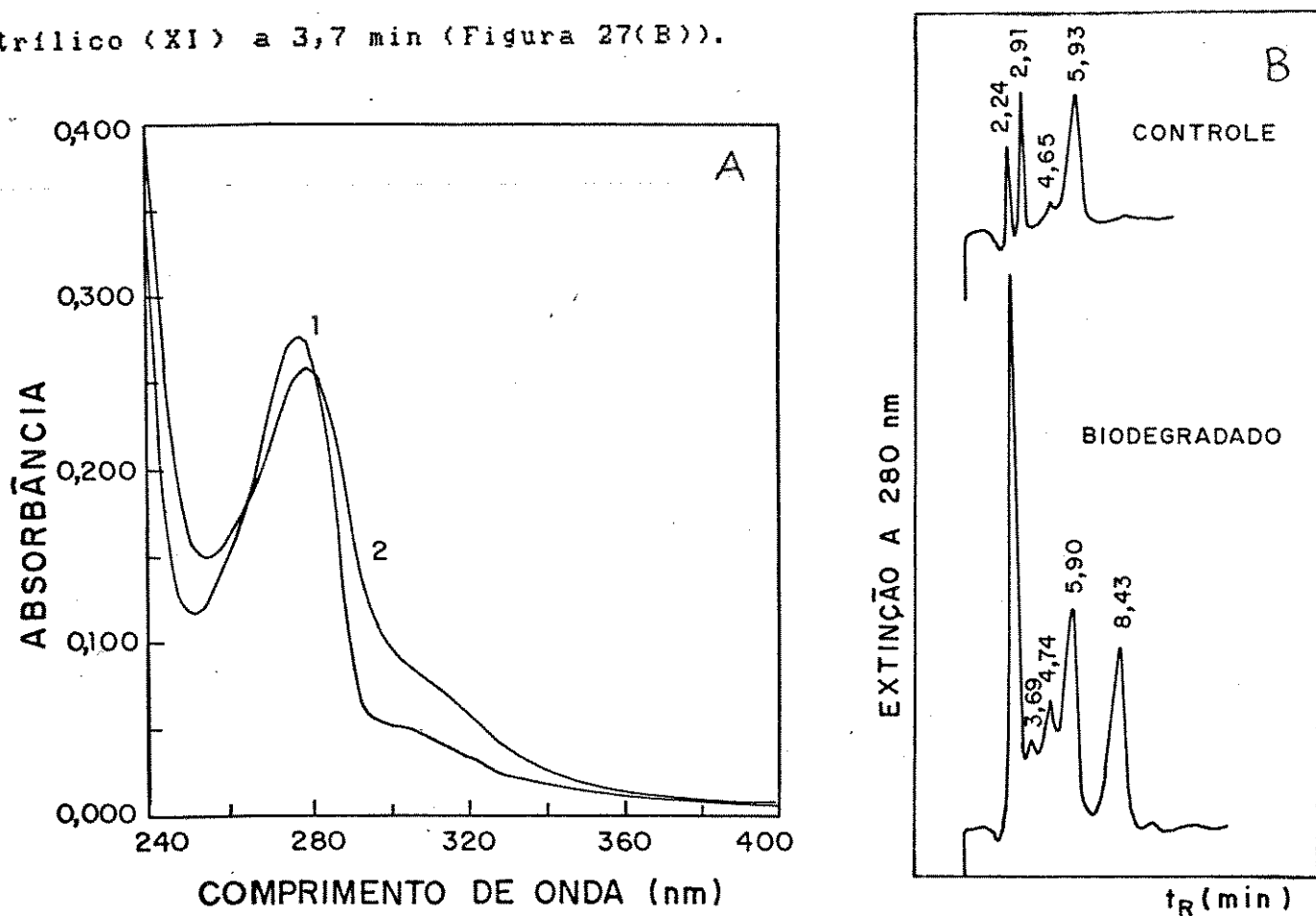


Figura 27-(A) Espectro de absorção no ultravioleta do composto β -O-4 I (V), controle (1) e após 6 dias de biodegradação (2) por P.chrysosporium.

(B) HPLC do composto β -O-4 I controle e biodegradado.

A degradação de β -O-4 I (V) por C.sitophila é semelhante à degradação por P.chryso sporium para os quais foram observados produtos provenientes de quebra da ligação β -O-4.

Na degradação do composto β -O-4 II (IV) por C.sitophila, o espectro de ultravioleta após biodegradação mostra uma diminuição da banda a 310 nm (figura 28(A)). Análise por HPLC (figura 28(B)) mostra o aparecimento de dois produtos, guaiacol a 4,61 min, e de outro a 6,6 min. Espectro ultravioleta do composto com tempo de retenção 6,6 min, mostrado na figura 28(C) apresenta máximo de absorção a 277 nm e 306 nm e razão $A_{277}/A_{306} = 1,27$. Espectro de ultravioleta com características semelhantes é encontrado para 3,4-dimetoxiacetofenona (XII) com máximo de absorção a 272 nm e 303 nm e razão $A_{272}/A_{303} = 1,38$. Sugere-se então que a degradação de β -O-4 II (IV) se dê em duas etapas (figura 29) sendo o produto final, 3,4-dimetoxiacetofenona(XII), proveniente da perda de CH_2O do cetol (XVII) correspondente também ao produto da degradação de β -O-4 I (V), com tempo de retenção 7,32 min (figura 26).

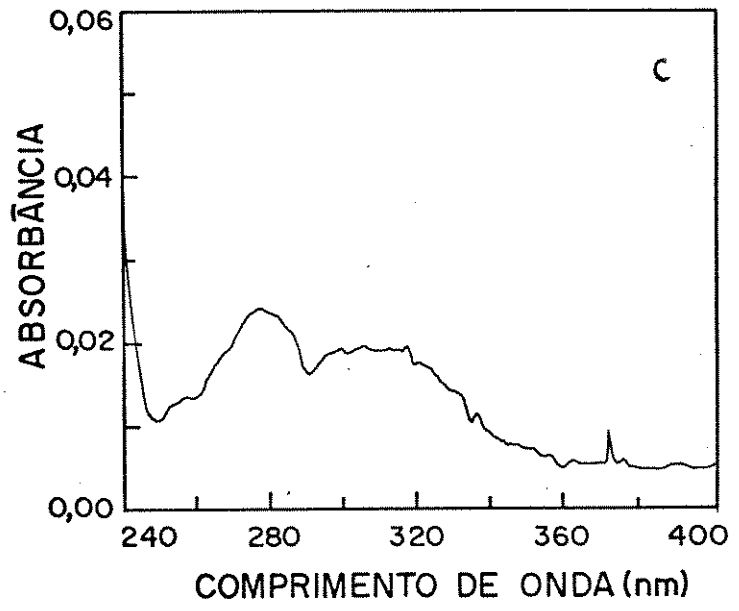
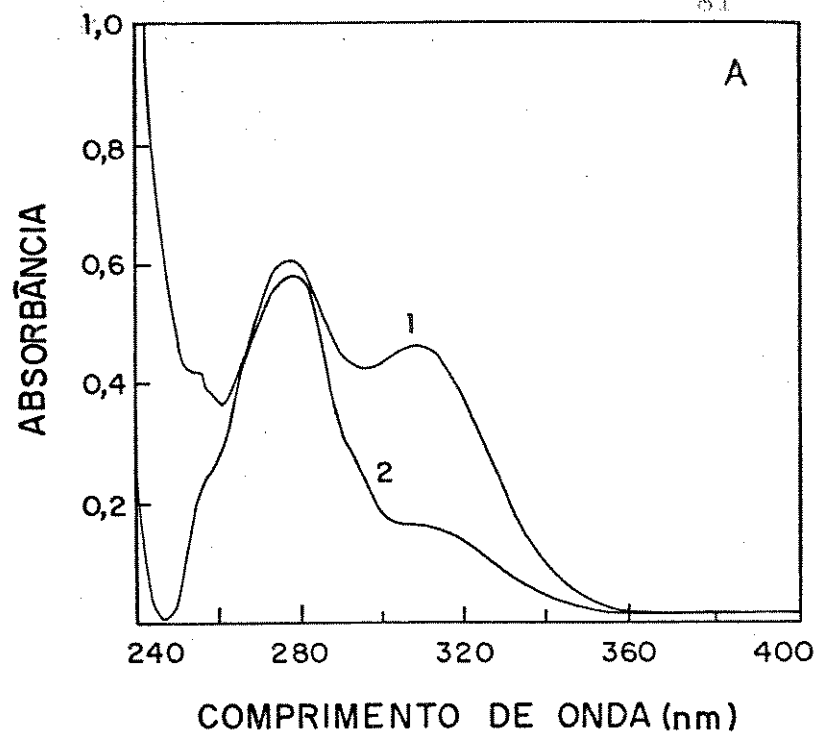
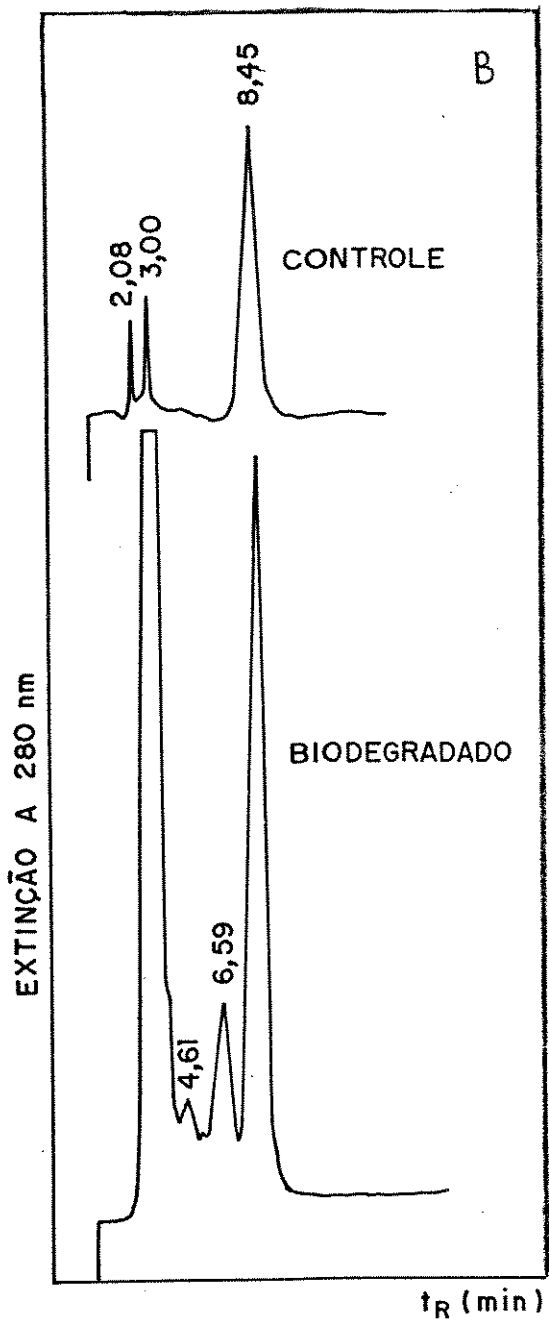


Figura 28-(A) Espectro de absorção no ultravioleta do composto β -O-4 II (IV), controle (1) e após 7 dias de biodegradação (2) por *C. sitophila*.

(B) HPLC do composto IV, controle e biodegradado.

(C) Espectro de absorção no ultravioleta do composto com tempo de retenção 6,6 min.

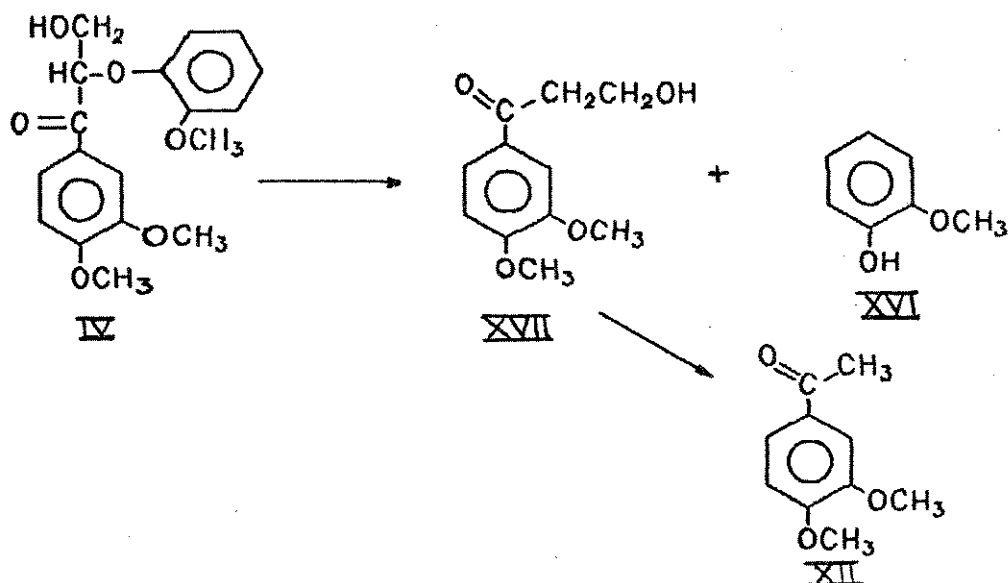


Figura 29-Possíveis etapas propostas para a degradação de β -O-4 II (IV)

Mediante resultados obtidos na degradação de β -O-4 I e II (compostos IV e V), é mostrado na figura 30 um esquema geral da degradação de composto-modelo β -O-4 por *C. sitophila*.

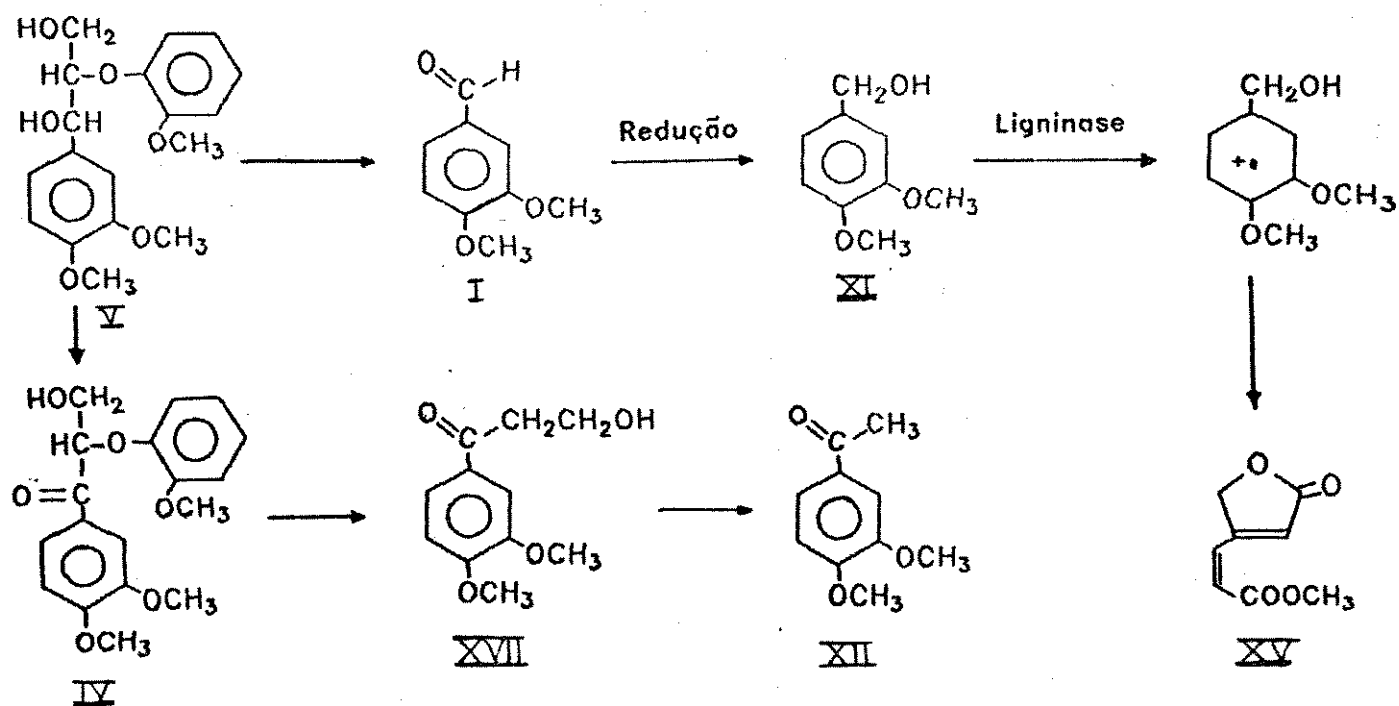


Figura 30-Degradação hipotética de composto β -O-4 por *C. sitophila*

III.3- DEGRADAÇÃO BIOMIMÉTICA DE COMPOSTOS-MODELO POR HEMINA

Para estudar a atividade mimética de ligninase foram feitos experimentos utilizando hemina/ H_2O_2 . Na degradação de álcool veratrílico (XI), observa-se no espectro de absorção no ultravioleta (figura 31(A)) o aumento da absorbância a 280 nm e o aparecimento de um ombro em 310 nm. Na análise por HPLC (figura 31(B)) foi observado o aparecimento de aldeído veratrílico (5,16 min) e possivelmente um produto de abertura de anel a 2,16 min.

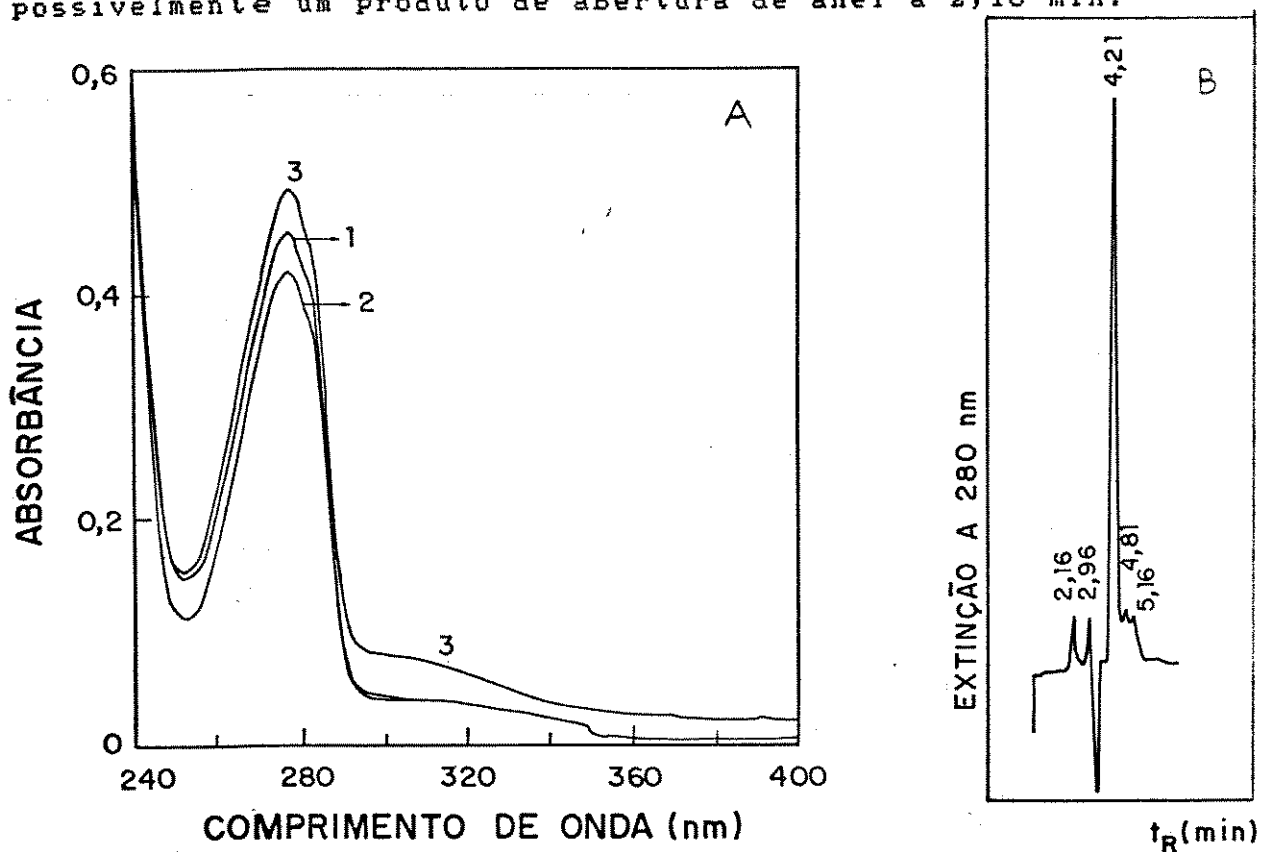


Figura 31-(A) Espectro de absorção no ultravioleta da reação de álcool veratrílico com hemina na presença de H_2O_2 (3), controle sem H_2O_2 (2) e controle sem hemina (1). (B) HPLC de produtos da reação de álcool veratrílico com hemina na presença de H_2O_2 .

Na degradação do composto β -O-4 I (V) por hemina, observa-se no ultravioleta uma diminuição da absorbância a 280 nm e na análise por HPLC, foi encontrado um novo pico correspondente a guaiacol (4,17min) após 1,5 horas de reação ao ar (figura 32).

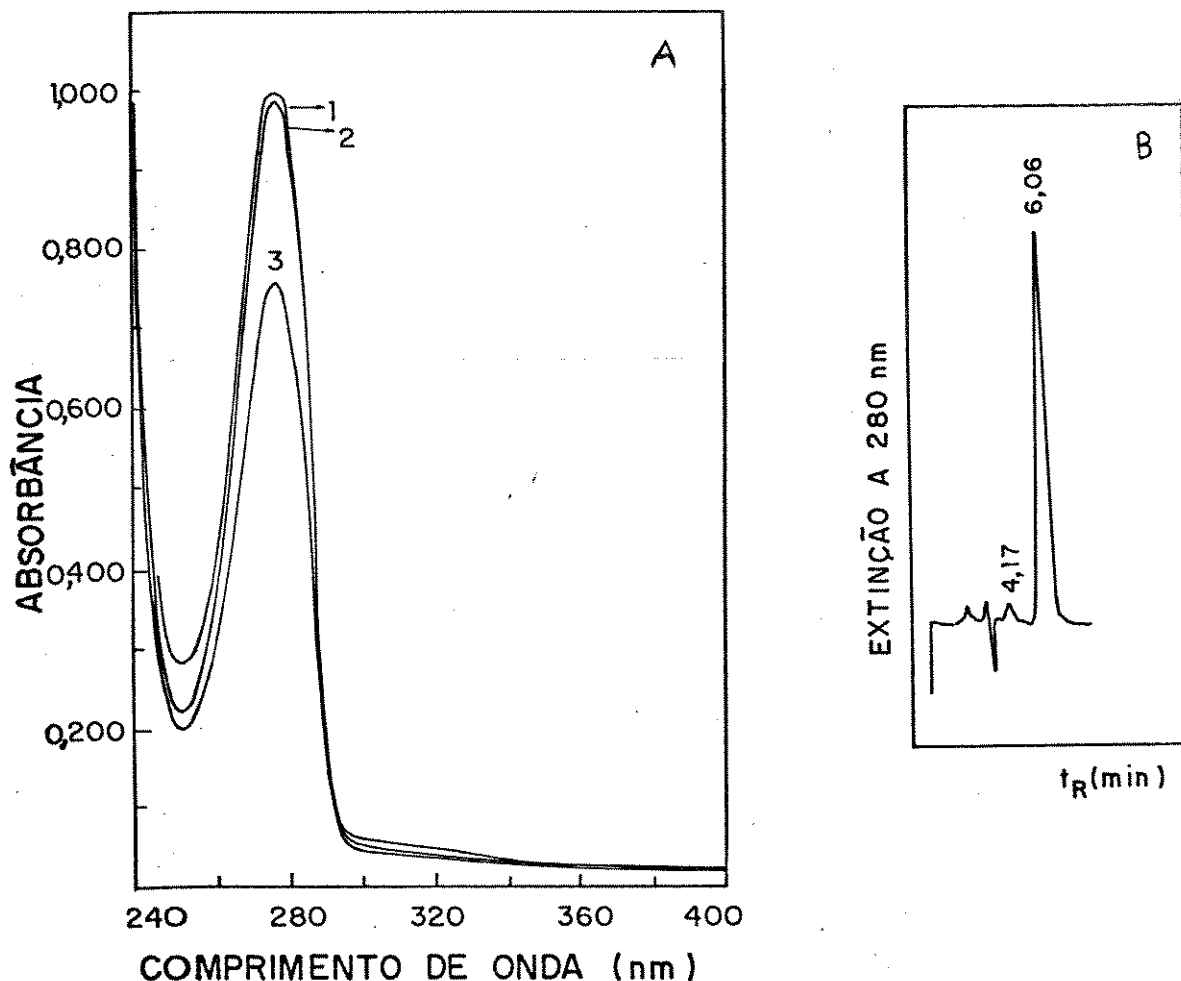


Figura 32-(A)Espectro de absorção no ultravioleta da reação de β -O-4 I (V) com hemina na presença de H₂O₂(3), controle sem H₂O₂(2) e controle sem hemina(1).
(B)HPLC de produtos da reação de β -O-4 I com hemina na presença de H₂O₂.

CAPITULO IV-CONCLUSES

IV-CONCLUSÕES

Considerando os dados relativos ao crescimento de C. sitophila em diferentes compostos-modelo, existe um efeito inibidor do crescimento causado por compostos monoméricos que contêm carbonila α , mais acentuado na concentração de 0,3% que 0,1%. Entre os demais compostos, alguns estimularam o crescimento como álcool vanílico (VI) e β -O-4 I (V) e outros mantiveram o crescimento comparável ao controle sem substrato.

Os compostos monoméricos estudados que não contêm carbonila α apresentaram diminuição na concentração após biodegradação, não sendo detectados produtos naquelas condições, com exceção de álcool veratrílico onde uma lactona foi detectada. A ausência de produtos sugere que estes compostos estejam sendo metabolizados intracelularmente a este estágio de crescimento ou que um processo de mineralização ocorre.

A degradação dos dímeros β -O-4 I e II por C. sitophila leva a concluir que esta é semelhante à causada por P. chrysosporium para o mesmo tipo de composto, detectando-se produtos como guaiaacol, o que sugere reação do tipo quebra β -aril-éter (β -O-4).

Oxidação $C\alpha$ de β -O-4 I é outro tipo de reação que ocorre, sendo que o produto desta, continua a ser degradado como foi observado na degradação de β -O-4 II.

Quanto à hemina, esta catalisou reação de quebra da ligação β -O-4 do composto β -O-4 I (V) e também abertura de anel aromático do álcool veratrílico na presença de H_2O_2 , não ocorrendo porém oxidação $C\alpha$ de β -O-4 I nestas condições.

Estes resultados de degradação de compostos-modelo por C.sitophila são a primeira tentativa de esclarecer o mecanismo pelo qual este fungo atua sobre compostos-modelo.

A partir deste estudo, outros objetivos podem ser visados como reação dos compostos com enzima isolada e purificada do fungo.

BIBLIOGRAFIA

BIBLIOGRAFIA

- Adler E.; Lindgren B.O. e Saeden U. (1952) Svensk Papperstidning 15:245-254
- Adler E. (1977) Wood Sci.Technol. 11:169-218
- Ander P. e Eriksson K.E. (1978) Progress in Industrial Microbiology 14:1-58
- Ander P.; Eriksson K.E. e Yu H-S. (1983) Arch.Microbiol. 136:1-6
- Ander P. e Eriksson K.E. (1985) Appl.Microbiol.Biotechnol. 21:96-102
- Betts W.B. e Dart R.K. (1988) J.Gen.Microbiol. 134:2413-2420
- Bjorkman A. e Person B. (1957) Svensk Papperstidn 60:158
- Buck J.S. (1943) Org.Syn.Coll. 2:619-621
- Campos V.; Salas E.; Durán N.; Rodríguez J. e Baeza J. (1986) Bol.Micol. (Chile) 2:161-165
- Crawford R.L. (1981) Lignin Biodegradation and Transformation (Crawford R.L.ed) New York: John Wiley p.99
- De Wulf O.; Renaud M. e Thonart Ph. (1987) Poster apresentado no "III Seminary of Enzymatic Hydrolysis of Biomass", Maringá, Brasil.
- Durán N.; Ferrer I. e Rodríguez J. (1987) Appl.Biochem.Biotechnol. 16:157-163
- Durán N.; Rodríguez J.; Gómez E.; Campos V. e Baeza J. (1988a) Biotechnol.Bioeng. 31:215-219
- Durán N.; Reyes J.L.; Baeza J. e Campos V. (1988b) Biotechnol. Bioeng. 32:564-568
- Enoki A. e Gold M.H. (1982) Arch.Microbiol. 132:123-130

- Eriksson K.E. (1987) Phil.Trans.R.Soc.Lond. A321:455-459
- Faison B.D. e Kirk T.K. (1985) Appl.Environ.Microbiol. 49:299-304
- Faix O.; Mozuch M.D. e Kirk T.K. (1985) Holzforschung 39:203-208
- Fardiaz D. e Markakis P. (1981) Journal of Food Science
46:1970-1971
- Fengel D. e Wegener G. (1984) Wood:Chemistry,ultrastructure,rea-
ctions Dietrich Fengel:Gerd Wegener-Berlin.
- Ferraz A. e Durán N. (1989) Rev.Microbiol. 20(2):240-245
- Fiechter A.; Leisola M. S. A.; Higuchi T.; Shimada M.; Hattori
T. e Umezawa T. (1988) Agric.Biol.Chem. 879-880
- Freudenberg K. e Neish A.C. (1968) Constitution and Biosynthesis
of Lignin (Freudenberg K. e Neish AC.Eds) Springer-Verlag
Berlin, Heidelberg, New York. 47-122
- Glenn J.K.; Morgan M.A.; Mayfield M.B.; Kuwahara M. e Gold M.H.
(1983) Biochem.Biophys.Res.Commun. 114:1077-1083
- Gold M.H.; Valli K. e Wariishi H. (1989) Biochemistry
28(14):6017-6023
- Habe T.; Shimada M. e Higuchi T.(1985) Mokuzai Gakkaishi
31(1)54-55
- Haemmerli S.D.; Leisola M.S.A. e Fiechter A. (1986) FEMS Micro-
biol. Lett. 35:33-36
- Haemmerli S.D.; Schoemaker H.E.; Shimidt H.W.H. e Leisola M.S.A.
(1987) FEBS Lett. 220(1):149-154
- Hattori T.; Shimada M.; Umezawa T.; Higuchi T.; Leisola M.S.A. e
Fiechter A. (1988) Agric.Biol.Chem. 52(3):879-880
- Higuchi T.(1985) Biosynthesis and Biodegradation of Wood Compo-
nents (Higuchi T. ed. Academic Press) 557-578

- Iyayi C.B. e Dart R.K. (1982) J.Gen.Microbiol. 128:1473-1482
- Janshekar H. e Fiechter A. (1983) Advan.Biochem.Eng.Biotechnol.
27:119-177
- Kamaya Y. e Higuchi T. (1984) Mokuzai Gakkaishi 30(3):237-239
- Kawai S.; Umezawa T.; Shimada M.; Higuchi T.; Koide K.; Nishida
T.; Morohoshi N. e Haraguchi T. (1987) Mokuzai Gakkaishi
33(10):792-797
- Kawai S.; Umezawa T. e Higuchi T. (1988) Arch.Biochem.Biophys.
262:99-110
- Kern H.W. (1989) Appl.Microb.Biotechnol. 32:223-234
- Kirk T.K. (1987) Phyl.Trans.R.Soc.Lond. A321:461-474
- Kirk T.K. e Farrel R. (1987) Ann.Rev.Microbiol. 41:465-505
- Kirk T.K. (1988) ISI Atlas of Science:Biochemistry 1(1):71-76
- Kuwahara M.; Glenn J.K.; Morgan M.A. e Gold M.H. (1984) FEBS
Lett. 169:247-50
- Leisola M.S.A.; Schmidt B.; Thanei-Wyss U. e Fiechter A. (1985)
FEBS Lett. 189(2):267-270
- Leisola M.S.A. e Fiechter B. (1985) Advan.Biotechnol.Proc.
5:59-89
- Leisola M.S.A.; Haemmerli S.D.; Waldner R.; Schoemaker H.E.; Sch
midt H.W.H. e Fiechter A. (1988) Cellulose Chem.Technol.
22:267-277
- Linko S. e Zhong L. C. (1987) Biotechnol.Technol. 1:251-256
- Lundquist K. e Kirk T.K. (1978) Phytochemistry 17:1676
- Lundquist K. e Kristerson P. (1985) Biochem.J. 229:277-279
- Nishida T.; Kashiro Y.; Mimura A. e Takahara Y. (1988) Mokuzai
Gakkaishi 34:530-536

- Nishida T.; Kashiro Y. Katayama Y.; Mimura A. e Takahara Y.
(1989a) Hokuzai Gakaishi 35(2):152-157
- Nishida T.; Kashino Y.; Katayama Y.; Mimura A. e Takahara Y.
(1989b) Hokuzai Gakaishi 35(2):144-151
- Palmer J.H.; Harvey P.J. e Shoemaker H.E. (1987) Phyl.Trans.
Soc.Lond. A321:495-505
- Rodríguez J. e Durán N. (1988) Brazilian J.Med.Biol.Res.
21:411-422
- Seebach D.; Sutter M. A.; Weber R. H. e Zuger M. F. (1985) Org.
Synth. 63:1-9
- Shimada M.; Nakatsubo F.; Kirk T.K. e Higuchi T. (1981) Arch.Mi-
crobiol. 129:321-324
- Shimada M.; Hattori T.; Umezawa T.; Higuchi T. e Uzura K. (1987a)
FEBS Lett. 221(2):327-331
- Shimada M.; Habe T.; Higuchi T.; Okamoto T. e Panijan B. (1987b)
Holzforschung 41:277-285
- Shmidt H.W.H.; Haemmerli S.D.; Schoemaker H.E. e Leisola H.S.A.
(1989) Biochemistry 28:1776-1783
- Tien M. (1987) CRC Critical Reviews in Microbiology 15:141-168
- Tien M. e Kirk T.K. (1983) Science 221:661-663
- Tien M. e Kirk T.K. (1984) Proc.Natn.Acad.Sci.USA 81:2280-2284
- Umezawa T.; Higuchi T. e Nakatsubo F. (1983) Agric.Biol.Chem.
47(12):2945-2948
- Umezawa T. e Higuchi T. (1985) FEBS.Lett. 192(1):147-150
- Vicuña R. (1988) Enzyme Microb.Technol. 10:646-655
- Wariishi H.; Valli K. e Gold M.H. (1989) Biochemistry
28:6017-6023

Yokota S.; Umezawa T. e Higuchi T. (1988) Mokuzai Gakkaishi

34(1):65-74

ESPECTROS

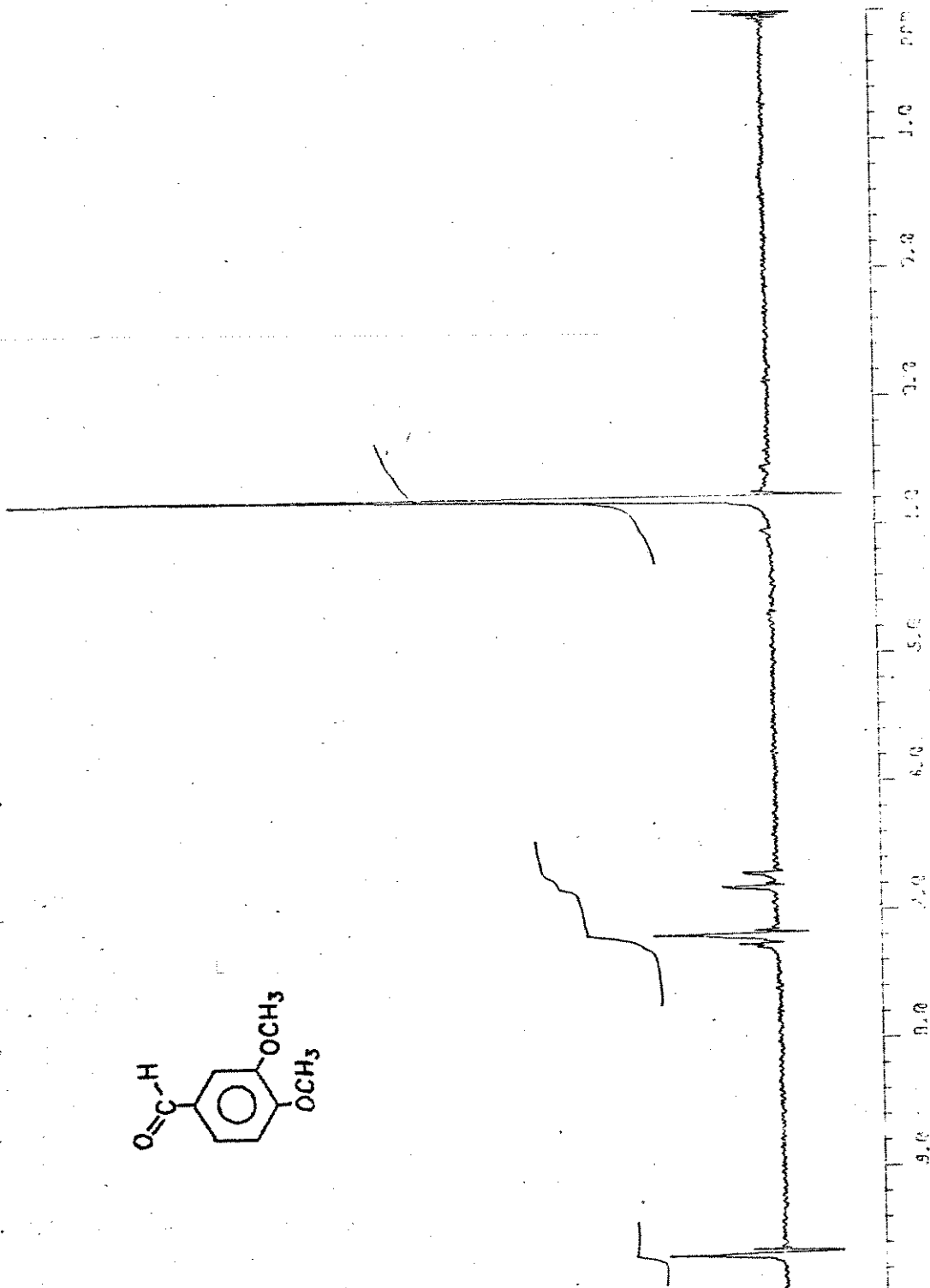
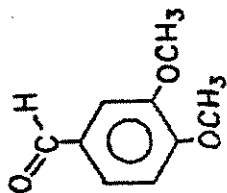
BRUKER AM-100

DATE 10-10-90

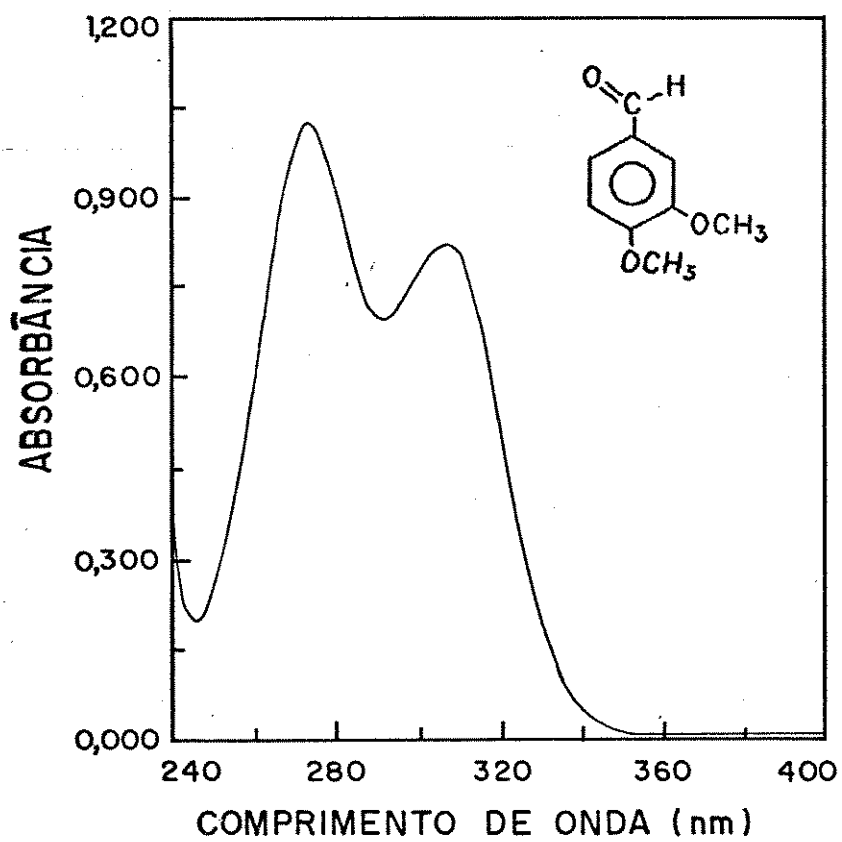
SPECTRUM:

TIME 250.0 SEC
POWER 21.0 DB
GAIN 2.0 DB
LINE WIDTH 0.2 HZ
SIGNS. J
LOCK 50.0 DB
POWER 21.0 DB
GAIN

40.00 HZ/CM



1-1H-NMR (80 MHz, CCl4) - composto (1) - (11.3.1, p.35)



2-UV (metanol) - composto (I), $8,76 \cdot 10^{-5}$ M

BRUKER AM-83

DATE 00-10-69

SPECTRUM:

TIME 250.0 SEC

POWER 10.5 DB

GAIN 9.4 DB

LINE BROAD 0.2 HZ

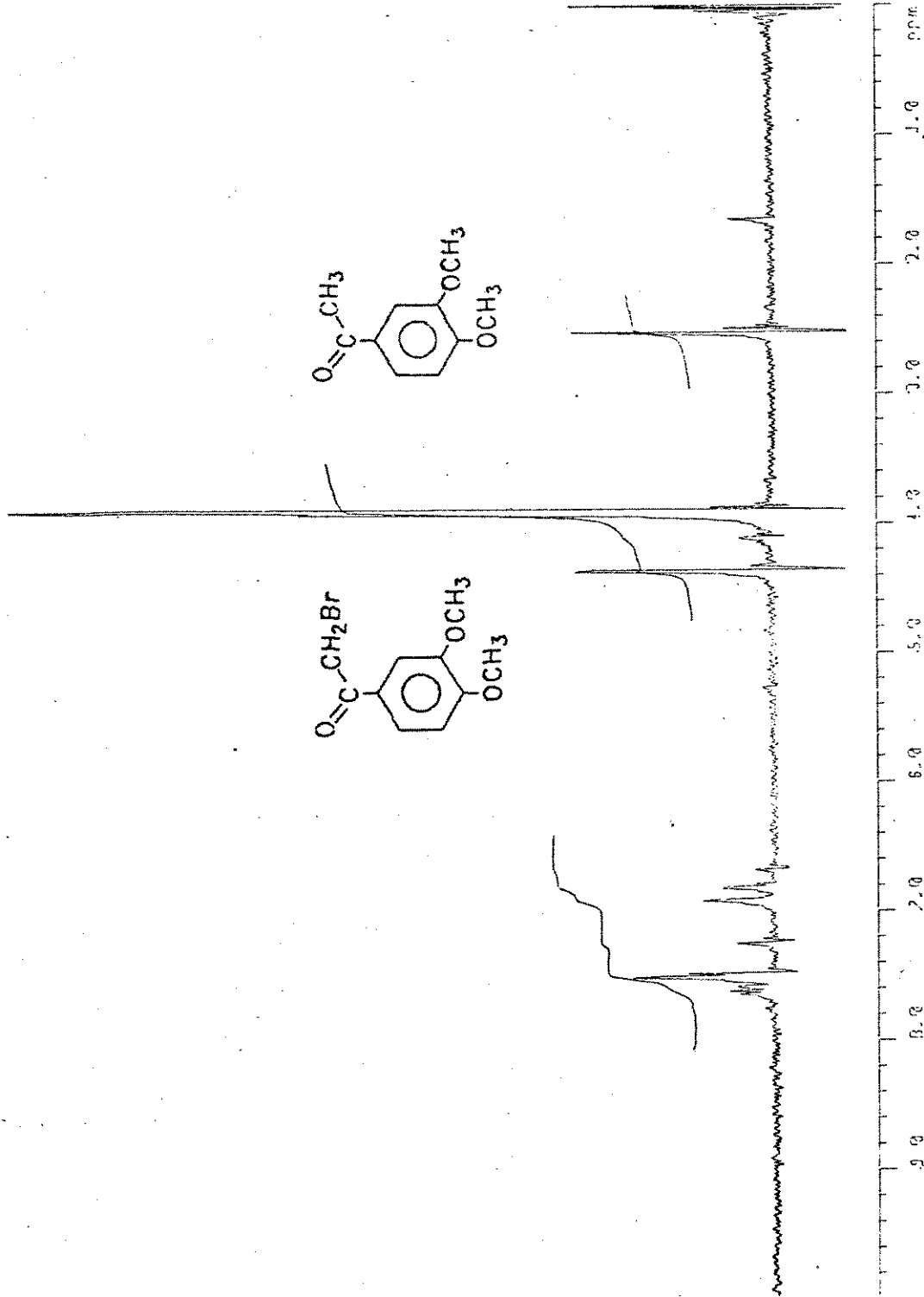
SCANS 1

LOCK:

POWER 25.4 DB

GAIN 20.5 DB

40.00 HZ/CM



3-1H-RMN (80 MHz, CCl4) - composto (II) - (II.3.2.1, p.37)

RUKER AU-80

DATE J2-J7-88

SPECTRUM:

TIME 250.0 SEC

POWER 02.0 DB

GAIN 10.0 DB

LINE WIDTH 0.2 HZ

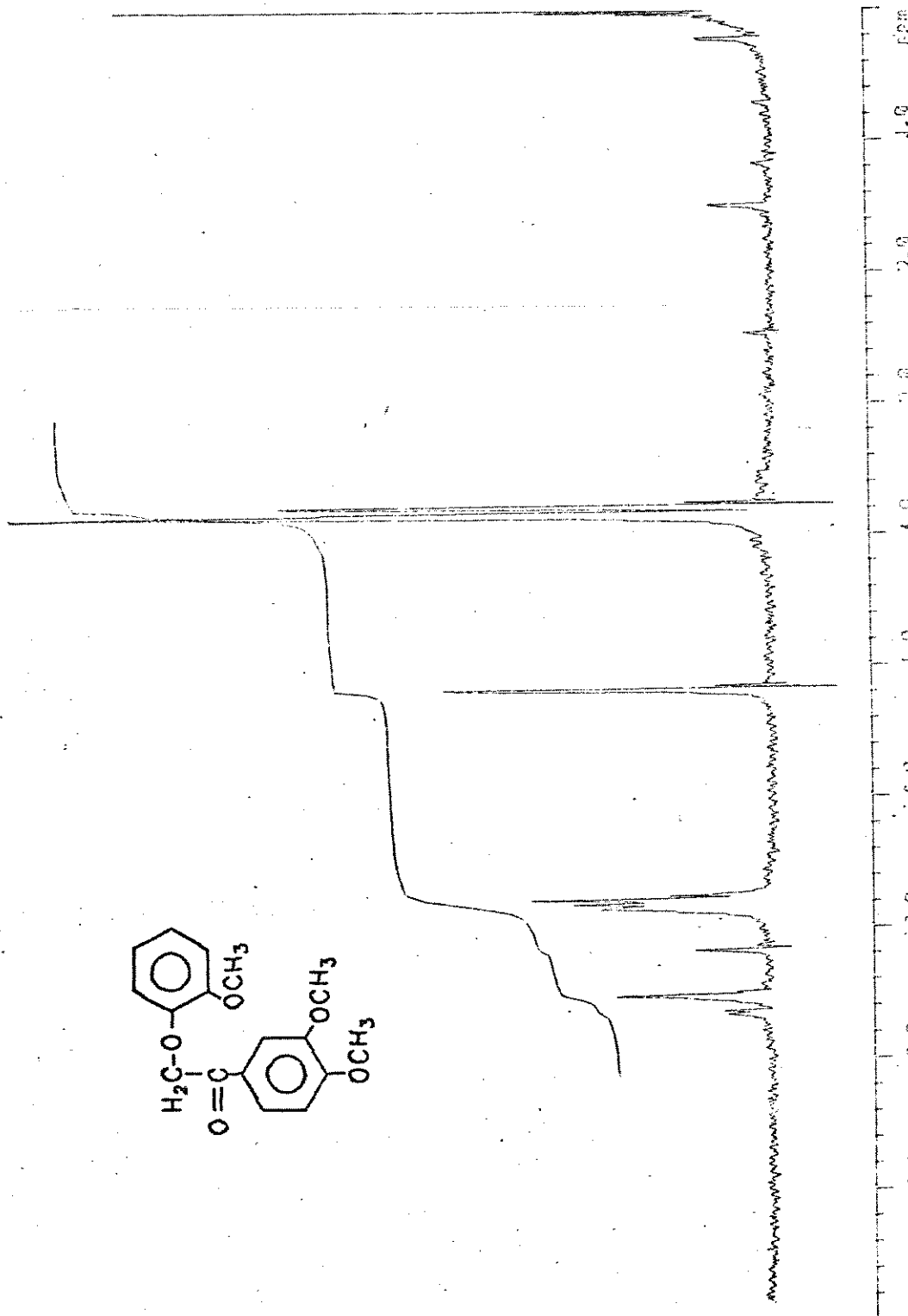
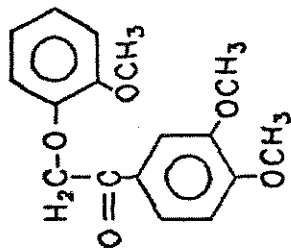
STANS J

LOCK

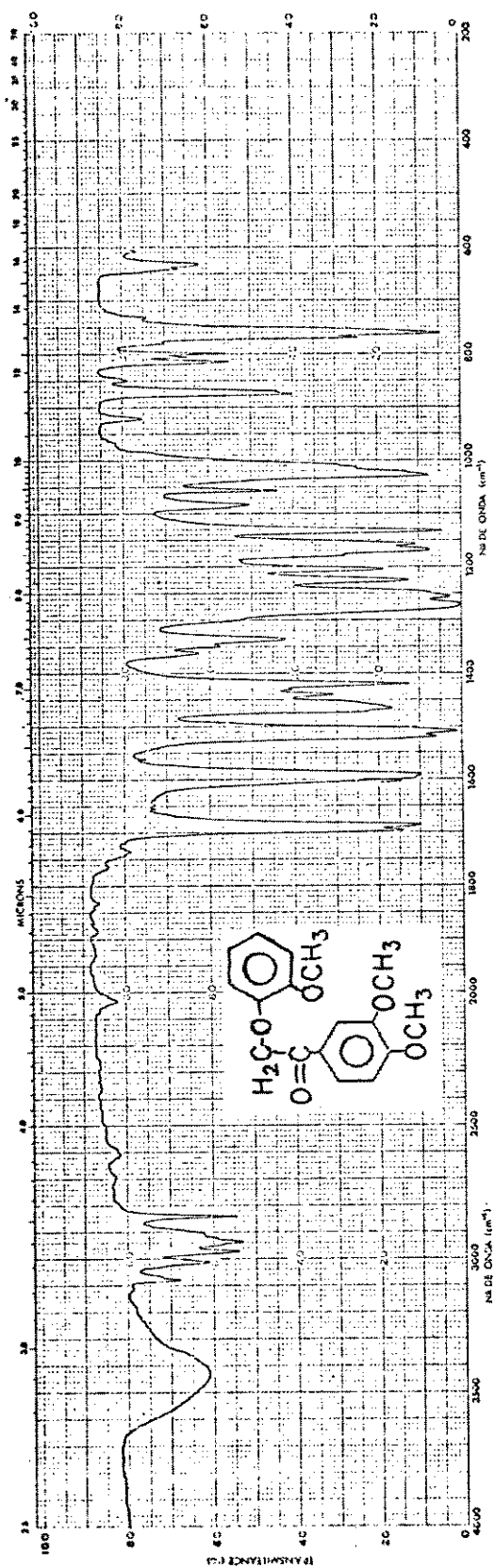
POWER 00.4 DB

GAIN 01.0 DB

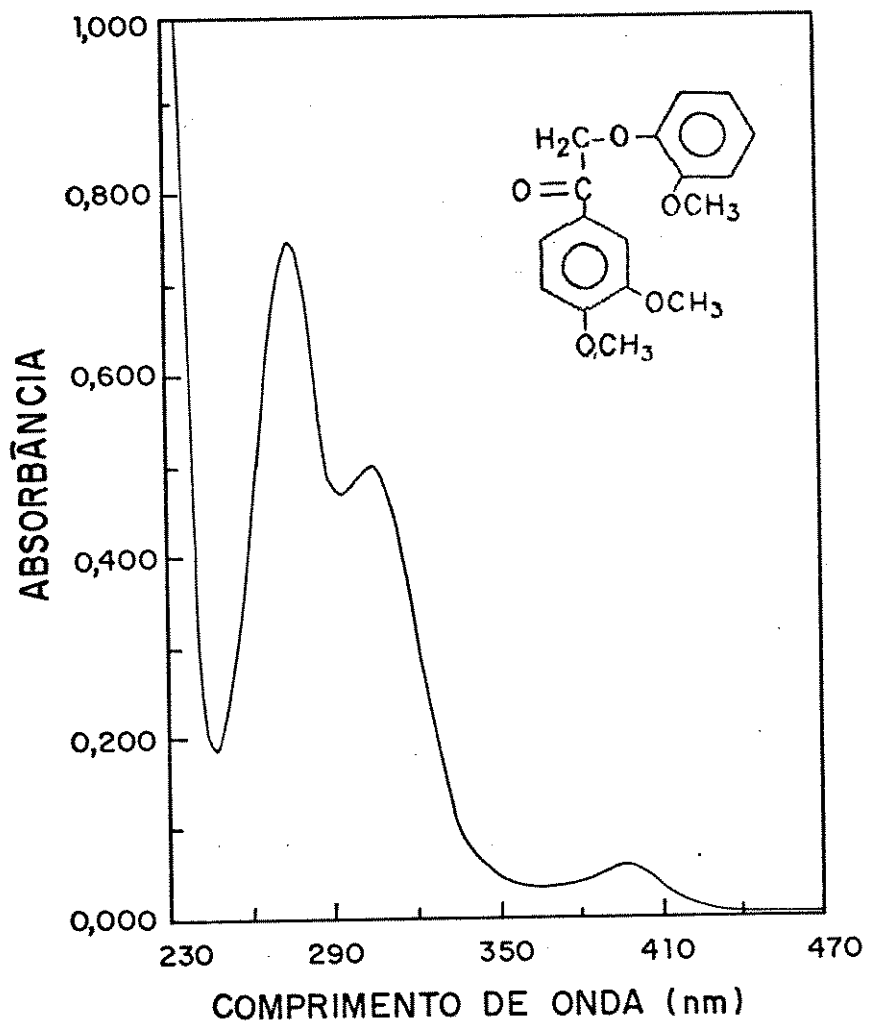
0.00 HZ-CM



4-1H-RHN (80 MHz, CDCl₃) - composto (III) - (II.3.2.2, p.38)



5-IV (KBr) - composto (III)



6-UV/VIS (metanol) - composto (III), $5,50 \cdot 10^{-5}$ M

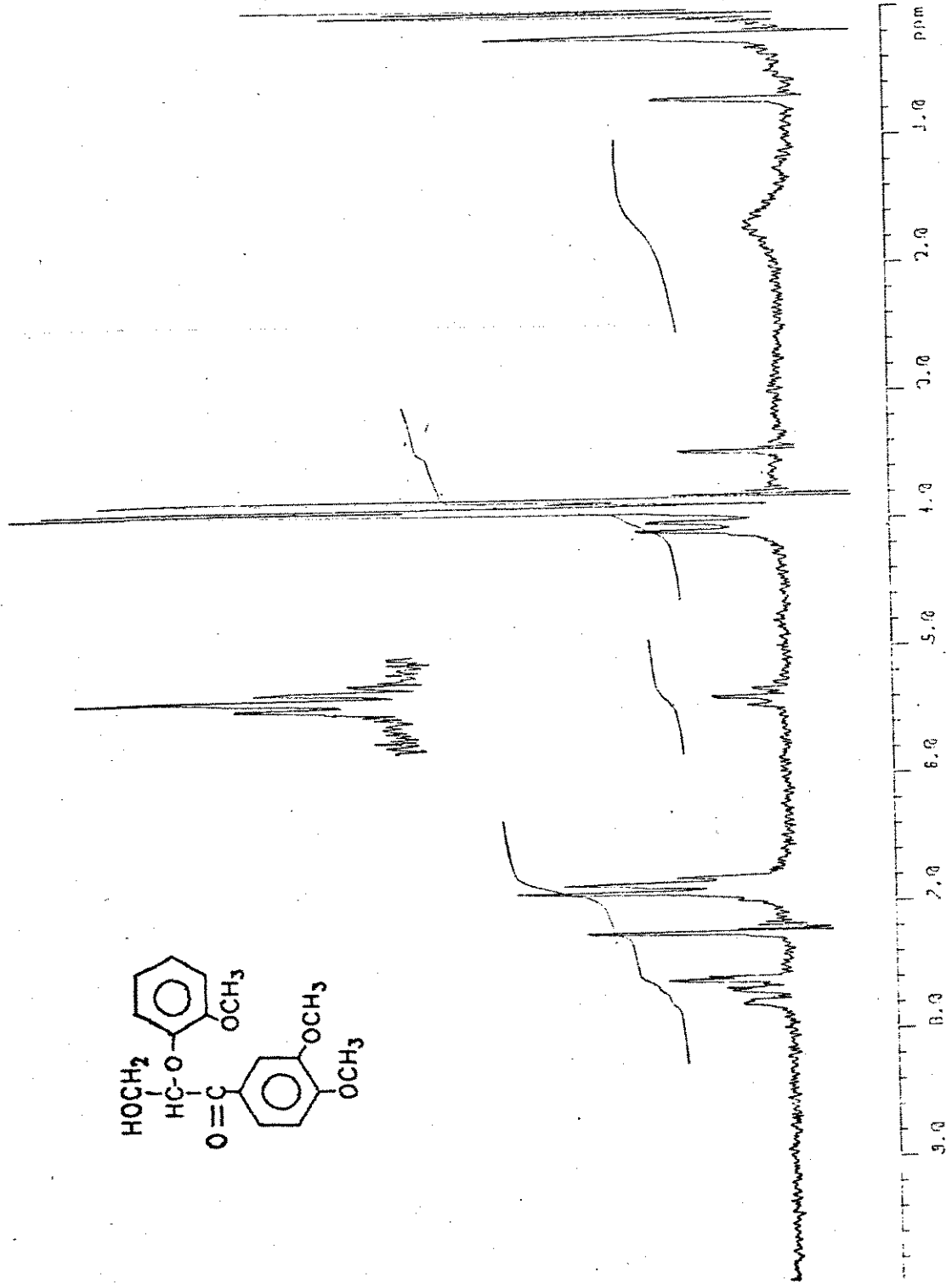
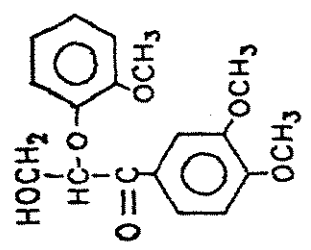
BRUKER AW-80

DATE 17-19-83

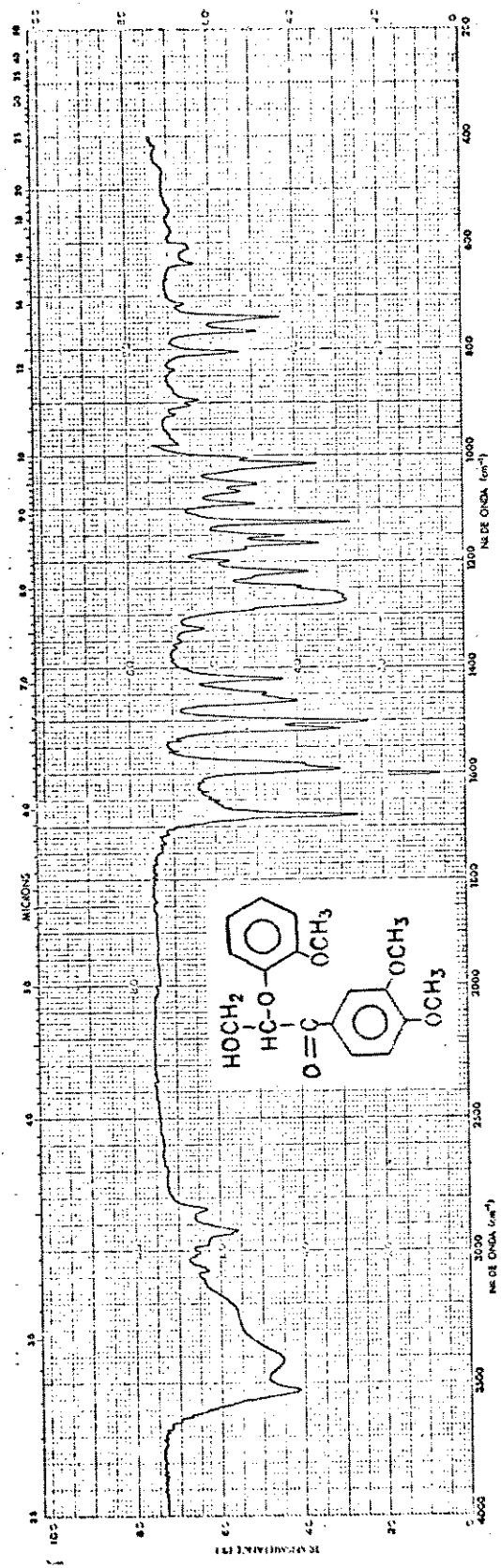
SPECTRUM:

TIME 150.0 SEC
POWER 25.0 DB
GAIN 14.5 DB
LINE BROAD 0.2 HZ
SCANS 2
LOCK:
POWER 29.0 DB
GAIN 22.5 DB

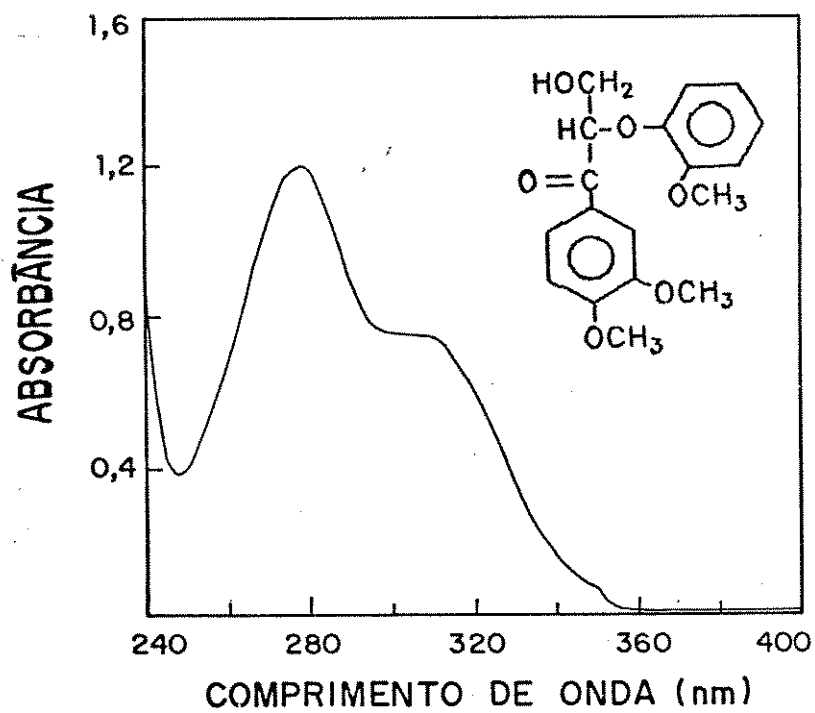
40.00 HZ/CM
40.00 HZ/CM



7-1H-NMN (80 MHz, CDCl₃) - composto (IV) - (11.3.2.3, p.39)



8-IV (KBr) - composto (IV)



9-UV (etanol) - composto (IV), $1,36 \cdot 10^{-4}$ M

BRUKER

AW-00

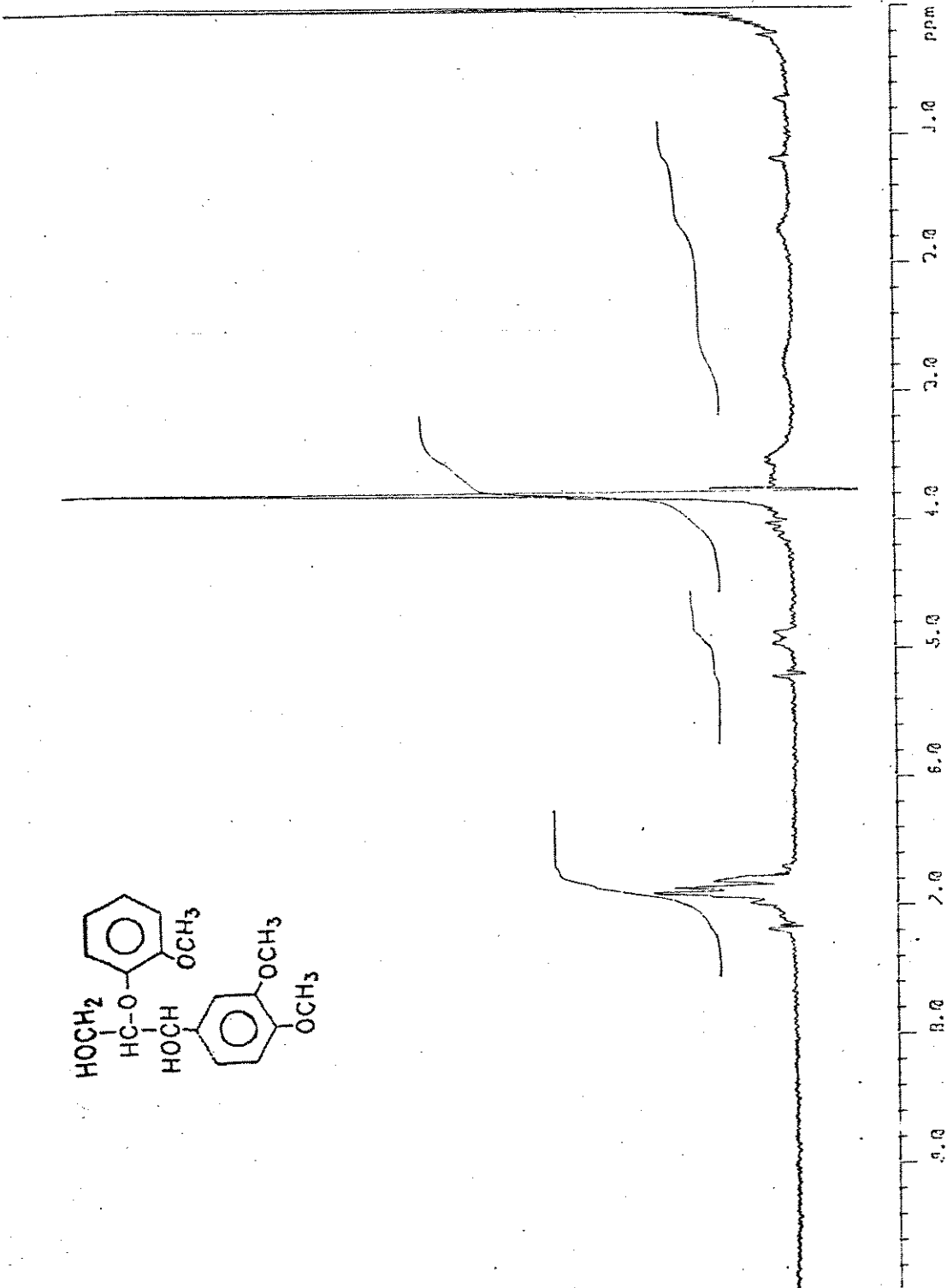
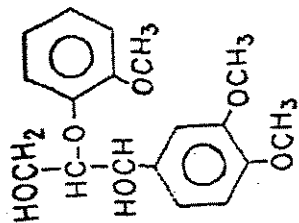
DATE 01-10-89

SPECTRUM 1

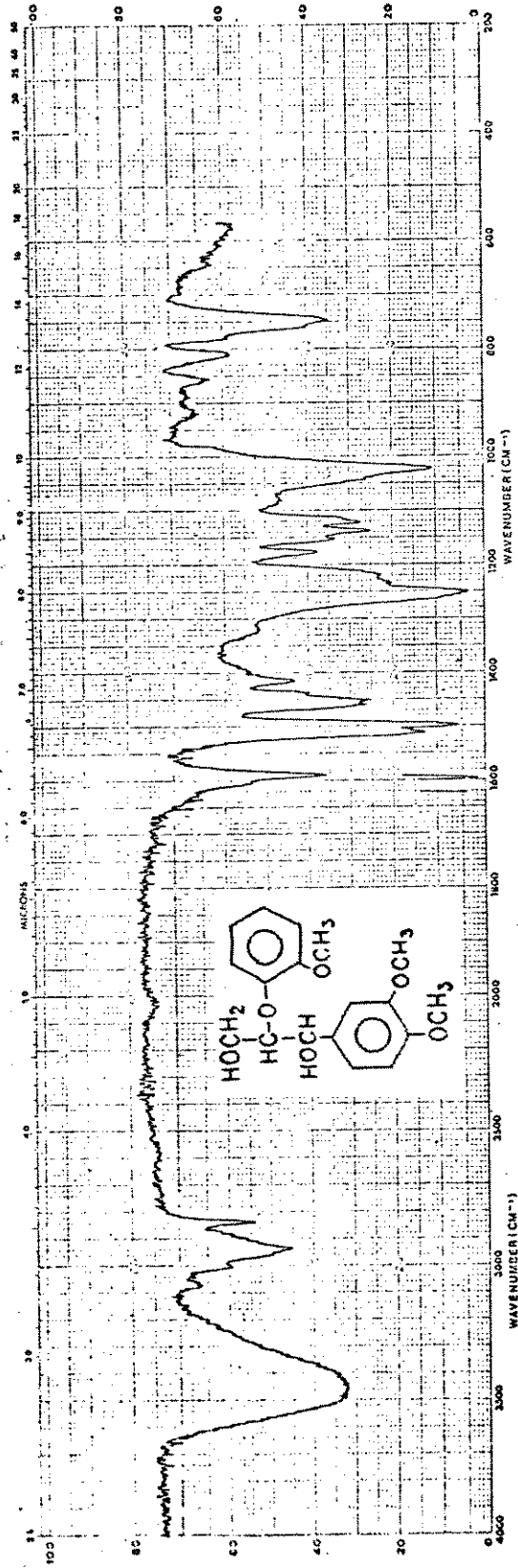
FINE 200.0 SEC
POWER 25.0 DB
GAIN 6.0 DB
LINE BROAD 0.2 HZ
SCANS 1

LOCK 1
POWER 24.1 DB
GAIN 25.9 DB

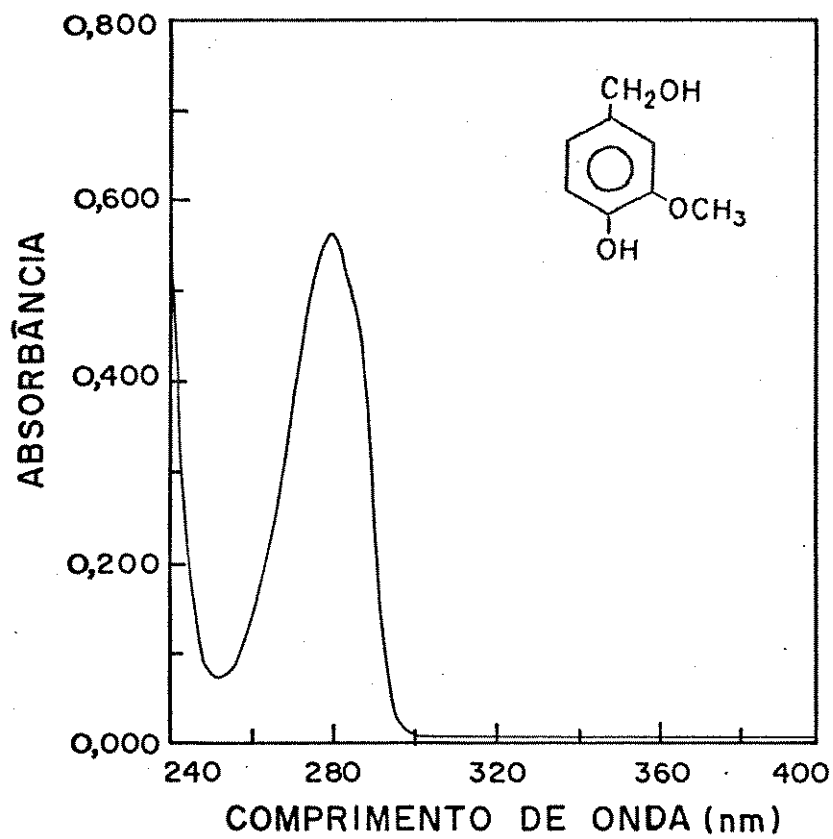
40.00 HZ/CM



10-¹H-NMR (80 MHz, CDCl₃) - composto (V) - (11.3.2.4, p.40)



11-IV (KBr) - composto (V)



15-UV (metanol) - composto (VI), $2,01 \cdot 10^{-4}$ M