

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS



DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**Bioxidação Fúngica de
Valenceno a Nootkatona,
Bioflavorizante de *Grapefruit***

**Instituto de Química - UNICAMP
Departamento de Química Orgânica**

**LaBioSin - Laboratório de Biocatálise
e Síntese Orgânica**

Orientador: Prof. Dr. José Augusto R. Rodrigues

Aluno: Luiz Arthur Zampieri

Campinas, 28 de julho de 2006

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE QUÍMICA DA UNICAMP

Z14b

Zampieri, Luiz Arthur.
Bioxidação fúngica de valenceno a nootkatona,
bioflavorizante de *grapefruit* / Luiz Arthur Zampieri. -
- Campinas, SP: [s.n], 2006.

Orientador: José Augusto Rosário Rodrigues.

Dissertação - Universidade Estadual de Campinas,
Instituto de Química.

1. Biocatálise. 2. Lacase. 3. Mediadores de lacase.
4. *Trametes versicolor*. I. Rodrigues, José Augusto
Rosário. II. Universidade Estadual de Campinas.
Instituto de Química. III. Título.

Título em inglês: Bioxidation Valencene a Nootkatone, a *grapefruit* natural flavor substance

Palavras-chaves em inglês: Biocatalysis, Laccase, Laccase mediators, *Trametes versicolor*

Área de concentração: Química Orgânica

Titulação: Mestre em Química na Área de Química Orgânica

Banca examinadora: Prof. Dr. José Augusto Rosário Rodrigues (Orientador), Prof. Dr. Sebastião Ferreira Fonseca (IQ-UNICAMP), Prof. Dr. André Luiz Meleiro Porto (IQ-USP, São Carlos), Prof. Dr. Leandro Helgueira de Andrade (IQ-USP, São Paulo, suplente), Prof. Dr. Nelson Eduardo Durán Caballero (IQ-UNICAMP, suplente)

Data de defesa: 28/07/2006

À minha família que tanto me incentivou e apoiou no decorrer deste trabalho.

Dizem ?

Fernando Pessoa

Dizem ?

Esquecem.

Não dizem ?

Disseram.

Fazem ?

Fatal.

Não fazem ?

Igual.

Por quê

Esperar ?

Tudo é

Sonhar

DAS UTOPIAS

Mario Quintana

Se as coisas são inatingíveis... ora!

Não é motivo para não querê-las...

Que tristes os caminhos se não fora

A mágica presença das estrelas!

Mãos dadas

Carlos Drummond de Andrade

Não serei o poeta de um mundo caduco.

Também não cantarei o mundo futuro.

Estou preso à vida e olho meus companheiros

Estão taciturnos mas nutrem grandes esperanças.

Entre eles, considere a enorme realidade.

O presente é tão grande, não nos afastemos.

Não nos afastemos muito, vamos de mãos dadas.

Não serei o cantor de uma mulher, de uma história.

Não direi suspiros ao anoitecer, a paisagem vista na janela.

Não distribuirei entorpecentes ou cartas de suicida.

Não fugirei para ilhas nem serei raptado por serafins.

O tempo é a minha matéria, o tempo presente, os homens presentes,
a vida presente.

Ao CNPq e FAPESP pelo suporte financeiro.

Ao Prof. Dr. José Augusto R. Rodrigues, meu orientador, pelo apoio irrestrito e pelas orientações fundamentais, principalmente naqueles momentos mais críticos.

Ao Prof. Dr. Ronei Jesus Poppi, do Departamento de Química Analítica do IQ-UNICAMP, pelo apoio fundamental na execução do planejamento fatorial e no traçado da superfície de resposta.

À Profa. Dra. Renata P. Limberger (Faculdade de Farmácia, UFRGS), responsável pelos trabalhos exploratórios sobre o tema durante seu pós-doutoramento em nosso grupo de pesquisa.

A todos os colegas do laboratório pela amizade e camaradagem em todos os momentos, além dos conselhos e discussões. Também aos vários outros colegas de pesquisa que trabalham em outros laboratórios do IQ/UNICAMP, que tanto contribuíram em várias partes deste estudo.

A todos os funcionários do IQ que permitiram e contribuíram de maneira direta ou indireta para esse trabalho, como o pessoal da manutenção, eletrônica, marcenaria, vidraria, RMN e, em particular, às técnicas dos nossos laboratórios Dona Alice (do bloco I) e Andréia (do bloco K).

Nome: Luiz Arthur Zampieri

1 - Formação acadêmica:

Mestrado:

Departamento de Química Orgânica - Instituto de Química - UNICAMP

Bioxidação Fúngica de Valenceno a Nootkatona, bioflavorizante de *grapefruit*

Período: dezembro de 2004 a julho de 2006

Orientador: Prof. Dr. José Augusto R. Rodrigues

Graduação:

Química - Modalidade Tecnológica - Instituto de Química - UNICAMP

Período: março de 1999 a novembro de 2003

2 - Trabalhos em congressos

I Workshop de Biocatálise

fevereiro de 2002 - Instituto de Química - Universidade de São Paulo (IQ/USP) - São Paulo, Paineis P-035

Título: Hidroxilação Enantiosseletiva de Hidrocarbonetos por Bactérias
Zampieri, L.A.; Conceição da, G.J.A.; Moran, P.J.S.; Rodrigues, J.A.R.

25ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química,

20 a 23 de maio de 2002 - Poços de Caldas, Painel QO-095

Título: Hidroxilação Benzílica de Arenos por Bactérias
Zampieri, L.A.; Conceição da, G.J.A.; Moran, P.J.S.; Rodrigues, J.A.R.

III Workshop de Biocatálise e II Encuentro Regional de Biocatálisis y Biotransformaciones

7 a 10 de fevereiro de 2006 - Instituto de Química - Universidade de São Paulo (IQ/USP) - São Paulo, Painel P-090

Título: Biooxidação Fúngica de Valenceno a Nootkatona por Laccase Mediator System

Zampieri, L.A.; Limberger, R.P.; Durán, N.; Moran, P.J.S.; Rodrigues, J.A.R..

29ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química

19 a 22 de maio de 2006 - Águas de Lindóia, Painéis QO-205 e QO-206

Painel QO-205, Título: Biooxidação de Valenceno a Nootkatona por LMS

Zampieri, L.A.; Limberger, R.P.; Durán, N.; Moran, P.J.S.; Rodrigues, J.A.R.
Painel QO-206, Título: Biooxidação do Hidrocarboneto Valenceno Utilizando Diferentes Mediadores Lacase

Zampieri, L.A.; Moran, P.J.S.; Rodrigues, J.A.R..

XIV Jornada de Jovens Pesquisadores da AUGM

(Associação das Universidades do Grupo de Montevideu)

13 a 15 de setembro de 2006 - UNICAMP, Campinas, Painel ND-5012

Título: Produção de bioflavorizante por biotransformação utilizando enzima lacase de fungos

Zampieri, L.A.; Linberger, R.P.; Durán, N.; Moran, P.J.S.; Rodrigues, J.A.R.

3 - Cursos

* - Curso “Fundamentos Teóricos dos Métodos de Biologia Molecular Aplicada à Pesquisa e ao Diagnóstico Clínico”, com a Profa. Dra. Nancy Amaral Rebouças - Instituto de Ciências Biomédicas/ICB-USP - Departamento de Fisiologia e Biofísica, Universidade de São Paulo – 08 a 12 de dezembro de 2003.

* - Curso “Princípios de Ressonância Magnética Nuclear” com os Profs. Drs. João Pedro Simon Farah e Vicente de Paulo Emerenciano (do IQ/USP), patrocinado pela comissão de treinamento do IQ/USP – 16 a 20 de novembro de 1998.

* - Curso “Espectrometria de Absorção Atômica com Atomização em Chama e em Forno de Grafita” com os Drs. Pedro Vitoriano de Oliveira e Eduardo Mathias Richter, no IQ/USP, patrocinado pela comissão de treinamento do IQ/USP – 07 a 11 de novembro de 1998.

* - Curso de “Ressonância Magnética Nuclear” com o Prof. Dr. Alberto Spini, da Universidade de Parma – Disciplina regular de pós-graduação em Fármacos e Medicamentos da FCF/USP. 1º semestre de 1997 (como aluno especial).

* - Curso “HTML Avançado e CGI” (para confecção de home-pages), patrocinado pelo IQ/USP no Centro de Ensino de Computação do Instituto de Matemática e Estatística/USP – setembro e outubro de 1997.

* - Curso “Noções Básicas de Primeiros Socorros”, patrocinado pela Divisão de Higiene, Segurança e Medicina do Trabalho da USP – de 04 a 08 de agosto de 1997.

* - Curso “Segurança em Laboratórios” da Isolab Consultoria Ltda., patrocinado pelo IQ/USP - outubro de 1996.

* - Curso “Aplicações da Espectrometria de Massas na Detecção de Drogas de Abuso” com o Prof. Dr. Ovandir Alves Silva, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas/USP – promovido pela Sociedade Brasileira de Toxicologia - agosto de 1996.

4 - Estágios e Monitorias

* - Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética (da UNICAMP) – Projeto Genoma – Laboratório de Sequenciamento - Laboratório do Prof. Dr. Paulo Arruda, de 02/01/2001 a 30/01/2001.

* - Estágio de Iniciação Científica em Biocatálise e Síntese Orgânica utilizando Bactérias e Fungos, Laboratório do Prof. Dr. José Augusto R. Rodrigues - IQ/UNICAMP, 2002-2003.

* - Monitoria no Projeto “Ciência e Arte nas Férias”, Instituto de Química/UNICAMP, dezembro de 2005 a janeiro de 2006.

**BIOXIDAÇÃO DE VALENCENO A NOOTKATONA,
BIOFLAVORIZANTE DE GRAPEFRUIT**

Aluno: Luiz Arthur Zampieri
Orientador: Prof. Dr. José Augusto R. Rodrigues
Depto. de Química Orgânica - Instituto de Química - Unicamp

Palavras-chave: Biocatálise, lacase, mediadores de lacase, *Trametes versicolor*.

Neste trabalho estudou-se a biooxidação do sesquiterpeno valenceno ($C_{15}H_{24}$), produzindo o bioflavorizante nootkatona ($C_{15}H_{22}O$), buscando as condições ótimas para obtenção do máximo rendimento. Esta reação foi realizada utilizando dois sistemas enzimáticos distintos: o sistema lacase/mediador (LMS) de *Trametes versicolor* com mediador HBT (hidroxibenzotriazol) ou TEMPO (tetrametilpiperidin-N-oxil) e o sistema utilizando o complexo enzimático do citocromo P-450 de *Chaetomium globosum*. Outros microrganismos testados foram *Botrytis cinerea*, *Mortierella isabellina* e *Mortierella ramaniana*. As diversas variáveis (pH, tempo de reação, concentrações de enzima, mediadores e indutores, condições de aeração, entre outras) envolvidas nas respectivas reações foram estudadas através de planejamento fatorial e modelagem de superfície de resposta. A utilização do sistema LMS de *Trametes versicolor* mostrou ser uma ferramenta viável para a obtenção de nootkatona a partir de valenceno, embora tenhamos obtido rendimento inferior (17%, agitador orbital em pequena escala e 15 % em escala preparativa, sob aeração externa) descrito na literatura (25 %, sob aeração, escala preparativa), o que torna nosso procedimento pouco viável para utilização em maior escala, apesar disso, os resultados foram condizentes com os obtidos em reações semelhantes descritos na literatura científica, onde o rendimento de sistemas LMS dificilmente ultrapassa os 15

%. O sistema enzimático CYP-450 apresentou rendimento inferior ao sistema lacase/mediador e, este último sistema, HBT mostrou ser um mediador mais eficiente que TEMPO.

**VALENCENE A NOOTKATONE, A GRAPEFRUIT
NATURAL FLAVOR SUBSTANCE**

Student: Luiz Arthur Zampieri
Advisor: Prof. Dr. José Augusto R. Rodrigues
Departamento de Química Orgânica - Instituto de Química - Unicamp
(*Department of Organic Chemistry – Chemistry Institute – Unicamp*)

Key-words: Biocatalysis, laccase, mediators, *Trametes versicolor*.

In this work, we study the sesquiterpene valencene biooxidation ($C_{15}H_{24}$), which produces the nootkatone biological flavor substance ($C_{15}H_{22}O$), in an attempt to achieve the best conditions for optimum yield. This reaction was carried out using two different enzymatic systems: the *Trametes versicolor* laccase-mediator system with HBT mediators (hydroxybenzotriazol), or TEMPO (tetramethyl-piperidine-*N*-oxide), and the system using the *Chaetomium globosum* cytochrome P-450 enzymatic complex. Other microorganisms were tested, such as *Botrytis cinerea*, *Mortierella isabellina* and *Mortierella ramaniana*. The different variables involved in the respective reactions were studied by means of factorial planning and modeling the response system. The use of the *Trametes versicolor* LMS system proved to be a viable tool to obtain nootkatone from valencene, although we have obtained an inferior yield (17% with orbital agitator in small scale and 15% in preparatory scale, under external aeration) in comparison with the highest value described in literature (25% under aeration). Thus, our procedure presents little viability for large scale use, although results were in agreement with those obtained in similar reactions described in scientific literature, in which the yield produced by LMS systems rarely exceeds 15%. The CYP-450 enzymatic system presented lower yield in comparison with the laccase-mediator system and in the latter, HBT turned out to be more efficient than TEMPO.

Lista de figuras

Figura 1 - Substrato de partida - sesquiterpeno valenceno (1)	1
Figura 2 - Produto de bioxidação - nootkatona (3)	3
Figura 3 - Foto do grapefruit, fonte natural de nootkatona	4
Figura 4 - Foto de <i>T. versicolor</i> em ocorrência natural	8
Figura 5 - Foto de <i>T. versicolor</i>	8
Figura 6 - Foto de <i>T. versicolor</i>	8
Figura 7 - Foto de <i>T. versicolor</i>	8
Figura 8 - Foto de <i>T. versicolor</i>	8
Figura 9 - Estrutura da lignina	10
Figura 10 - Representação esquemática dos centros cobre das lacases (TvL)	11
Figura 11 - Esquema da vista espacial dos cobres T2/T3 e seu entorno	12
Figura 12 - Diagrama de fitas de TvL mostrando os canais levando ao cluster T2/T3	13
Figura 13 - Esquema geral do sistema lacase-mediador	14
Figura 14 - Vários mediadores de LMS	17
Figura 15 - Mediador HBT (hidroxibenzotriazol)	17
Figura 16 - Mediador tempo (tetrametil-piperidin-N-oxil)	18
Figura 17 - Ciclo catalítico da lacase	19
Figura 18 - Indutor 2,5-xilidina (2,5-dimetilanilina; 2,5-dimetilfenilamina)	25
Figura 19 - Esquema da produção do bioflavorizante nootkatona	26
Figura 20 - Esquema do mecanismo de decomposição do hidróperóxido de valenceno	27
Figura 21 - Fungos na decomposição de compostos recalcitrantes	30
Figura 22 - Fungo <i>Chaetomium globosum</i> ao microscópio	31
Figura 23 - Esquema da biotransformação de valenceno (1) em hidróperóxido (2)	34
Figura 24 - Esquema da biotransformação de hidróperóxido (2) em nootkatona (3)	34
Figura 25 - Esquema da biotransformação de valenceno em nootkatona por CYP450	38
Figura 26 - Foto de meio de crescimento <i>T. versicolor</i> com indutor cobre	56
Figura 27 - Foto de meio de crescimento <i>T. versicolor</i> após crescimento	57
Figura 28 - Foto de biooxidações LMS/TvL sob agitação magnética	58
Figura 29 - Foto de biooxidações LMS/TvL sob agitação mecânica	58
Figura 30 - Foto de bateria de biooxidações LMS/Tv por planejamento fatorial	59
Figura 31 - Foto de extração de biooxidação em funil de separação	60
Figura 32 - Foto de extração de biooxidação em extrator contínuo	60
Figura 33 - Numeração adotada para os carbonos de (3) na atribuição de RMN	62
Figura 34 - Reação monitorada em UV para atividade de lacase	71
Figura 35 - Foto de extrações em bateria de alíquotas de biooxidações	74

Lista de tabelas

Tabela 1 - Interações medicamentosas do suco de grapefruit	5
Tabela 2 - Reações reportadas de oxidação/polimerização de lacase na ausência de mediadores	22
Tabela 3 - Reações reportadas de oxidação de lacase na presença de mediadores	24
Tabela 4 - Biooxidações iniciais com <i>T.versicolor</i> (via LMS) e <i>C. globosum</i> (via CYP450)	35
Tabela 5 - Biooxidações com <i>C. globosum</i> - pH, indutor, componente do meio e condições de aeração...39	39
Tabela 6 - Biooxidações LMS - pH, indutor, componente do meio e condições de aeração	41
Tabela 7 - Biooxidações LMS - planejamento fatorial 5 ² para triagem de variáveis	44
Tabela 8 - Biooxidações LMS em mais níveis para superfície de resposta	47
Tabela 9 - Biooxidações LMS -Comparando eficiência de dois mediadores : HBT e TEMPO	48

Lista de gráficos

Gráfico 1 - Comparação de biooxidações utilizando Cg em diferentes condições	40
Gráfico 2 - Comparação de biooxidações utilizando Tv em diferentes condições	42
Gráfico 3 - Comparação de biooxidações utilizando Tv por planejamento fatorial	45
Gráfico 4 - Comparação de biooxidações utilizando Tv por planejamento fatorial	45
Gráfico 5 - Gráfico da superfície de resposta da biooxidação LMS	48
Gráfico 6 - Biooxidação comparativa utilizando HBT e TEMPO	49
Gráfico 7 - Curva de calibração cromatográfica	72
Gráfico 8 - Padronização interna cromatográfica	73

Lista de espectros

E.01 - Espectro de RMN ^1H de nootkatona obtida por LMS/Tv	82
E.02 - Espectro de RMN ^{13}C de nootkatona obtida por LMS/Tv	83
E.03 - Espectro de RMN DEPT 90/135 de nootkatona obtida por LMS/Tv	84
E.04 - Espectro no Infra-Vermelho do valenceno	85
E.05 - Espectro no Infra-Vermelho de nootkatona obtida por LMS/Tv	86
E.06 - Espectro de RMN ^1H de nootkatona obtida por CYP-450/Cg	87
E.07 - Espectro de Ultra-Violeta de ensaio para determinação de atividade de lacase	88
E.08 - Cromatograma Iônico de bioxidação LMS/Tv sem padrão interno, 1 hora de reação	89
E.09 - Cromatograma Iônico de bioxidação LMS/Tv sem padrão interno, 8 horas de reação	89
E.10 - Cromatograma Iônico de bioxidação LMS/Tv sem padrão interno, 18 horas de reação	90
E.11 - Cromatograma Iônico de bioxidação LMS/Tv sem padrão interno, 36 horas de reação	90
E.12 - Espectro de Massas de bioxidação LMS/Tv sem padrão interno, pico valenceno	91
E.13 - Espectro de Massas de bioxidação LMS/Tv sem padrão interno, pico nootkatona	91
E.14 - Cromatograma Iônico de bioxidação LMS/Tv com padrão interno, 10 horas de reação	92
E.15 - Cromatograma Iônico de bioxidação LMS/Tv com padrão interno, 15 horas de reação	92
E.16 - Cromatograma Iônico de bioxidação LMS/Tv com padrão interno, 20 horas de reação	93
E.17 - Cromatograma Iônico de bioxidação LMS/Tv com padrão interno, 30 horas de reação	93
E.18 - Espectro de Massas de bioxidação LMS/Tv com padrão interno, pico valenceno	94
E.19 - Espectro de Massas de bioxidação LMS/Tv com padrão interno, pico nootkatona	94

Lista de abreviaturas, siglas e símbolos

AcOEt	Acetato de Etila
CC	Cromatografia em Coluna
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
CDCl_3	Clorofórmio Deuterado
CG/EM	Cromatografia Gasosa acoplada ao Espectrômetro de Massas
<i>d</i>	dublete
DEPT	(Distortionless Enrichment by Polarization Transfer) Espectro de RMN ^{13}C intensificado sem distorção por transferência de polarização
eV	elétron Volt
Hex	Hexano
Hz	Hertz
IV	Infra-Vermelho
<i>J</i>	Constante de acoplamento
<i>m</i>	múltiplo
M.M.	Massa Molecular
M^{+}	Íon Molecular
MHz	Megahertz
<i>m/z</i>	relação massa por carga
ppm	parte por milhão
<i>s</i>	singleto
TMS	Tetrametilsilano
w/w	relação de massa por massa
δ	deslocamento químico em ppm
ν	frequência de absorção

TÍTULO	i
FICHA CATALOGRÁFICA	ii
FOLHA DE APROVAÇÃO	iii
DEDICATÓRIA	v
AGRADECIMENTOS	vii
CURRÍCULO	ix
RESUMO	xv
ABSTRACT	xix
LISTAS	xxi
SUMÁRIO	xxv
1 - INTRODUÇÃO	1
1.1 - Substrato de partida e produto da reação, o bio-flavorizante	1
1.2 - As interações medicamentosas do suco de <i>grapefruit</i>	4
1.3 - Os fungos lignolíticos e o basidiomiceto <i>Trametes versicolor</i>	7
1.4 - Enzimas Lacase	9
1.5 - LMS - Sistema Lacase Mediador (<i>Laccase Mediator System</i>)	14
1.6 - Mediadores	15
1.7 - Sistema Lacase-Mediador - Ciclo catalítico e mecanismo	18
1.8 - Aplicações das Lacases	20
1.9 - Indutores, inibidores e outros participantes da reação	25
1.10 - O bioflavorizante a partir da biooxidação por LMS	26
1.11 - Química verde - Processos biológicos utilizando lacases em compostos tóxicos ...	28
1.12 - Ascomiceto <i>Chaetomium globosum</i> - biooxidação via CYP-450	30
2 - OBJETIVOS.....	32
3 - RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	33
3.1 - Primeira etapa: experimentos iniciais.....	33
Tabela 4 - Biooxidações iniciais.....	35
3.2 - Segunda etapa: biooxidação com <i>Chaetomium. globosum</i>	38
Gráfico 1. Biooxidações com <i>Chaetomium globosum</i>	40
3.3 - Terceira etapa: biooxidação com <i>Trametes versicolor</i>	41
Gráfico 2. Biooxidações com <i>Trametes versicolor</i> (<i>Tv</i>).....	42
3.4 - Quarta etapa: planejamento fatorial para LMS de <i>Tv</i> /HBT	43
Gráfico 3 e 4. Biooxidações por planejamento fatorial	45
3.5 - Quinta etapa: planejamento fatorial “em estrela” para traçar superfície de resposta...46	
Gráfico 5. Superfície de resposta para LMS de <i>Tv</i> /HBT.....	48
3.6 - Estudo comparativo entre LMS de <i>Tv</i> /HBT e <i>Tv</i> /TEMPO.....	48
Tabela 9 e Gráfico 6. Comparação entre HBT e TEMPO	49
4 - CONCLUSÃO.....	53
5 - PARTE EXPERIMENTAL.....	55
5.1 - Roteiro da parte experimental	55
6 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	76
7 - APÊNDICE - ESPECTROS	82

1 - INTRODUÇÃO	1
1.1 - Substrato de partida e produto da reação, o bio-flavorizante.....	1
1.2 - As interações medicamentosas do suco de grapefruit	4
1.3 - Os fungos lignolíticos e o basidiomiceto <i>Trametes versicolor</i>	7
1.4 - Enzimas Lacase	9
1.5 - LMS - Sistema Lacase Mediador (Laccase Mediator System)	14
1.6 - Mediadores	15
1.7 - Sistema Lacase/Mediador - Ciclo catalítico e mecanismo	18
1.8 - Aplicações de Lacase.....	20
1.9 - Indutores, inibidores e outros participantes da reação.....	25
1.10 - O bioflavorizante a partir da biooxidação por LMS.....	26
1.11 - Química verde - Processos biológicos utilizando lacases em compostos tóxicos	28
1.12 - Ascomiceto <i>Chaetomium globosum</i> - biooxidação via CYP-450.....	30

Lista de figuras (aqui, só as da introdução)

FIGURA 1 - SUBSTRATO DE PARTIDA - SESQUITERPENO VALENCENO (1).....	1
FIGURA 2 - PRODUTO DE BIOXIDAÇÃO - NOOTKATONA (3).....	3
FIGURA 3 - FOTO DO <i>GRAPEFRUIT</i> , FONTE NATURAL DE NOOTKATONA	4
FIGURA 4 - FOTO DE <i>T. VERSICOLOR</i> EM OCORRÊNCIA NATURAL.....	8
FIGURA 5 - FOTO DE <i>T. VERSICOLOR</i>	8
FIGURA 6 - FOTO DE <i>T. VERSICOLOR</i>	8
FIGURA 7 - FOTO DE <i>T. VERSICOLOR</i>	9
FIGURA 8 - FOTO DE <i>T. VERSICOLOR</i>	9
FIGURA 9 - ESTRUTURA DA LIGNINA	10
FIGURA 10 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DOS CENTROS COBRE DE LACASE (TvL)	11
FIGURA 11 - ESQUEMA DA VISTA ESPACIAL DOS COBRES T2/T3 E SEU ENTORNO NA TvL (DISTÂNCIAS EM Å) ¹⁵	12
FIGURA 12 - DIAGRAMA DE FITAS DE TvL MOSTRANDO OS CANAIS LEVANDO AO CLUSTER T2/T3	13
FIGURA 13 - ESQUEMA GERAL DO SISTEMA LACASE-MEDIADOR	14
FIGURA 14 - VÁRIOS MEDIADORES DE LMS	17
FIGURA 15 - MEDIADOR HBT (HIDROXIBENZOTRIAZOL)	17
FIGURA 16 - MEDIADOR TEMPO (TETRAMETIL-PIPERIDINA-OXIDO)	18
FIGURA 17 - CICLO CATALÍTICO DA LACASE ¹⁸	19
FIGURA 18 - INDUTOR 2,5-XILIDINA (2,5-DIMETILANILINA; 2,5-DIMETILFENILAMINA).....	25
FIGURA 19 - ESQUEMA DA PRODUÇÃO DO BIOFLAVORIZANTE NOOTKATONA	26
FIGURA 20 - ESQUEMA DO MECANISMO DE DECOMPOSIÇÃO DO HIDROPERÓXIDO DE VALENCENO.....	27
FIGURA 21 - FUNGOS NA DECOMPOSIÇÃO DE COMPOSTOS RECALCITRANTES	30
FIGURA 22 - FUNGO <i>CHAETOMIUM GLOBOSUM</i> AO MICROSCÓPIO	31

1 - INTRODUÇÃO

A oxidação de ligações saturadas (em C-sp³) de hidrocarbonetos é uma das mais importantes, embora difíceis, tarefas sintéticas em química orgânica,¹ permitindo a transformação de compostos simples e de baixo custo em intermediários sintéticos ou produtos de alto valor agregado², através da oxifuncionalização de centros não ativados.

1.1 - Substrato de partida e produto da reação, o bioflavorizante

O substrato de partida, o valenceno, C₁₅H₂₄ (Figura 1), é encontrado em pequena concentração em plantas cítricas, sendo produzido biosinteticamente a partir do difosfato de farnesila pela rota bioquímica do mevalonato.³

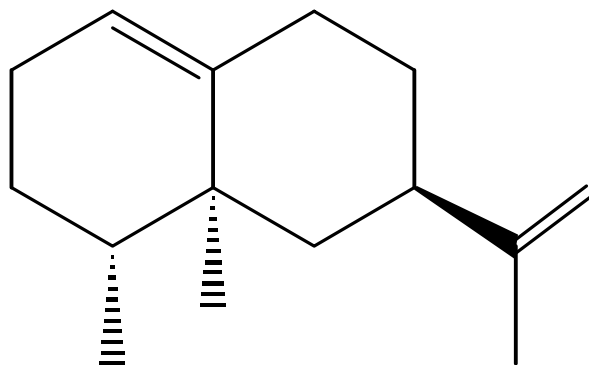


Figura 1 - Substrato de partida - sesquiterpeno valenceno (1)

1. Labinger, J.A.; Bercaw, J.E. *Nature* **2002**, Understanding and exploiting C–H bond activation, 417, 507-514.

2. Berger, R.G.; Kaspera, R.; Krings, U.; Nanzad, T. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2005**, Bioconversion of (+)-valencene in submerged cultures of the ascomycete *Chaetomium globosum*, 67, 477-483.

3. Chappell, J. *Trends Plant Sci.* **2004**, Valencene synthase - a biochemical magician and harbinger of transgenic aromas, 9, 6, 266-269.

Apesar de ser conhecida a sequência genética que expressa a proteína valenceno sintase, as tentativas de super expressão desta ainda não foram efetivamente atingidas, indicando que a acumulação de valenceno em plantas pode ser feita em células específicas, em glândulas ou ainda sacos e que essas células específicas já funcionam em sua capacidade máxima.³ O produto da bioxidação do valenceno é a nootkatona, flavorizante natural (Figura 2).

Flavorizantes são extremamente importantes para as indústrias de alimentos, rações, cosméticos, químicas e farmacêuticas. A maior parte dos flavorizantes disponíveis é atualmente produzida por síntese química ou por extração de plantas, sendo que os processos químicos podem ter a indesejável característica de formar misturas racêmicas, além de contarem com a aversão dos consumidores frente aos “químicos” adicionados aos alimentos, cosméticos ou outros produtos. Isto tem causado um aumento da atenção a compostos flavorizantes de origem biológica, também chamados flavorizantes naturais ou bioflavorizantes.

Até o momento, as plantas têm sido uma importante fonte de óleos essenciais e flavorizantes, entretanto, compostos ativos são freqüentemente encontrados em pequenas quantidades ou em forma ligada ou ainda podem ser encontrados em plantas exóticas, tornando o isolamento difícil muito caro.

Apesar de haver técnicas sendo desenvolvidas para utilizar células de plantas na síntese destes compostos, estas ainda necessitam de um maior desenvolvimento, já sendo uma alternativa viável a síntese de flavorizantes baseada em processos microbiológicos (bactérias, fungos e leveduras).⁴

A nootkatona ou (4*R*,4*aS*,6*R*)-4,4*a*,5,6,7,8-hexahidro-4,4*a*-dimetil-6-(1-metiletenil)naftalen-2(3*H*)-ona, de fórmula molecular C₁₅H₂₂O (Figura 2), é o

4. Janssens, L.; De pooter, H.L.; Schampa, N.M.; Vandamme, E.J. *Process Biochem.* **1992**, Production of flavours by microorganisms, 27, 4, 195-215.

flavorizante principal de *Citrus paradisi*⁵ (grapefruit, Figura 3) sendo uma cetona sesquiterpênica, da classe do valenceno, que foi isolada pela primeira vez do cedro do Alasca em 1962⁶ e faz parte, em pequenas quantidades, de diversos óleos de cítricos. Apresenta potente efeito cupincida (onde parece estar envolvida atividade receptor específica) e também como potente repelente de vários insetos,^{7,8} não sendo tóxica para humanos.⁵

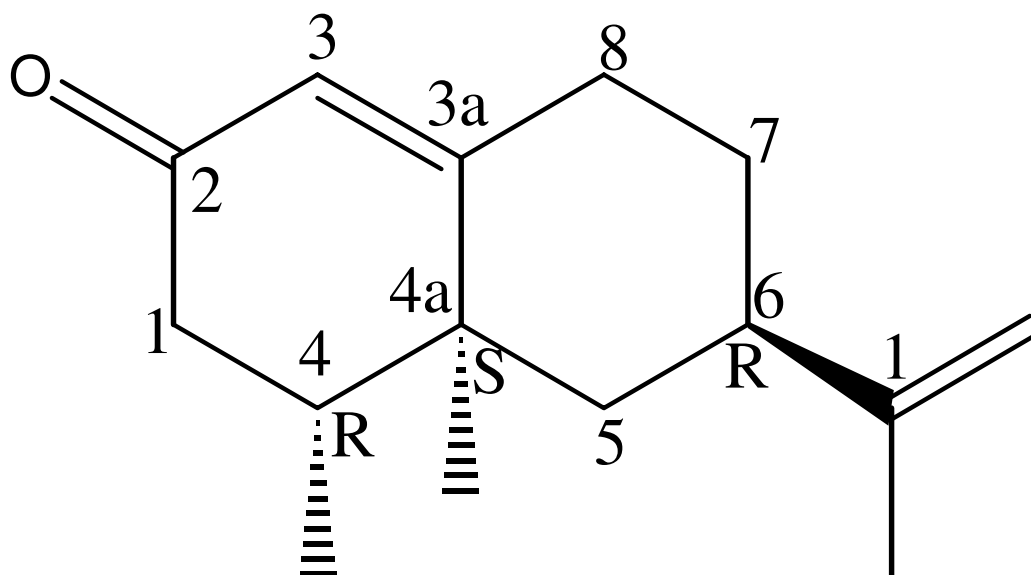


Figura 2 - Produto de bioxidação - $C_{15}H_{22}O$, Nootkatona (3)

Nootkatona é produzida comercialmente principalmente através da extração do fruto *grapefruit*, porém, essa forma de obtenção é problemática, pois as concentrações encontradas no fruto são muito baixas (0,05 a 0,2 %) e a oferta do fruto é limitada e irregular, tornando o processo caro. A utilização do

5. Sauer, A.M.; Fronczek, F.R.; Zhu, B.C.R.; Crowe, W.E.; Henderson, G.; Laine, R.A. *Acta Cryst.* **2003**, The sesquiterpenoid nootkatone and the absolute configuration of a dibromo derivative, *C59*, 254-256.

6. Erdtman, H.; Hirose, Y. *Acta. Chem. Scand.* **1962**, *16*, 1311-1314.

7. Zhu, B.C.R.; Henderson, G.; Chen, F.; Fei, H.; Laine, R.A. *J. Chem. Ecol.*, **2001**, Evaluation of Vetiver Oil and Seven Insect-Active Essential Oils Against the Formosan Subterranean Termite, *27*, 1617-1625.

8 - Zhu, B.C.R.; Henderson, G.; Chen, F.; Fei, H.; Maistrello, L.; Laine, R.A. *J. Chem. Ecol.* **2001**, Nootkatone is a Repellent for Formosan Subterranean Termite (*Coptotermes formosanus*), *27*, 523-531.

suco de *grapefruit* íntegro em processos alimentícios também é problemática pois o mesmo apresenta várias e importantes interações medicamentosas.⁹



Figura 3 - Foto do *grapefruit*, fonte natural de nootkatona

1.2 - As interações medicamentosas do suco de *grapefruit*

O suco de *grapefruit* apresenta diversas interações medicamentosas, sendo mais de 30 drogas já comprovadas (Tabela 1), de diversas classes, podendo intensificar a disponibilidade oral de algumas classes de drogas e/ou seus efeitos adversos, sendo esta interação causada por compostos presentes no suco, principalmente por furanocumarinas (6',7'-dihidroxi-bergamotina, bergamotina) mas também por flavonóides (naringina, naringenina) através da inibição do metabolismo pré-sistêmico de drogas mediado pelas enzimas do complexo citocromo P450 (com especial intensidade o CYP3A4), tendo efeito mais agudo em drogas que apresentam forte degradação de primeira passagem, o que pode gerar importante aumento na concentração sanguínea além de maior tempo para eliminação/metabolização. Também pode ser

9. Lohezic, L.D.F.; Marigny, K.; Doucet, M.; Javaudin, L. *Therapie* **2002**, Grapefruit juice and drugs: a hazardous combination ?, 57, 5, 432-445.

afetada a proteína intestinal P-glicoproteína, permitindo que algumas classes de drogas tenham seus efeitos terapêuticos diminuídos.⁹

Tabela 1 - Interações medicamentosas do suco de *grapefruit*¹⁰

Classes de drogas	Drogas que interagem com suco de <i>grapefruit</i>	Características da interação	Implicações da interação
Anti-arrítmicos	Amiodarona	Aumento de 50% de AUC (área sob a curva de disponibilidade) e de 84 % no plasma sanguíneo	Possível arritmia e toxicidade
	Quinidina	Diminuição da absorção de quinidina e inibição do metabolismo do metabólito ativo	Significância clínica é desconhecida
Anti-convulsivantes	Carbamazepina	Aumento de AUC, do pico e concentração média de 40%	Sintomas de toxicidade, como dor de cabeça, ataxia, náusea, vômito, tremor e agitação.
Anti-depressivos	Sertralina Trazodona Nefazodona Clomipramina	Aumenta a concentração no plasma	Sintomas de aumentos em efeitos colaterais
Anti-histamínicos	Fexofenadina	Pode diminuir a absorção oral e o nível no sangue por inibição do ânion orgânico transportador de polipeptídeo	O significado clínico é desconhecido
Anti-hipertensivos	Carvedilol	Aumento de 16 % da biodisponibilidade de uma dose simples	O significado clínico é desconhecido
	Losartan	Pode reduzir AUC do principal metabólito ativo	Pode reduzir o losartan, mas promove a necessidade de estudos para determinação de sua significância
Ansiolíticos e hipnóticos	Diazepam Midazolam	Aumenta a	Possível sintoma é o aumento na sedação

10. Shimomura, S.; Wanwimolruk, S.; Chen, J.J. *Pharmacy Times* **2003**, Drug Interactions with Grapefruit Juice: An Evidence-Based Overview, 919-926.

e Cafeína	Alprazolam Triazolam Buspirona	concentração do plasma Diminuição da eliminação da cafeína	Possível sintoma é o aumento de efeitos colaterais assim como nervosismo e insônia
Bloqueadores de canais de cálcio	Felodipina Nicardipina Nifedipina Nimodipina Isradipina Verapamil	Aumenta a concentração no plasma	Sintomas de toxicidade, taquicardia e hipertensão
Corticosteróides	Metilprednisolona oral	Aumenta a concentração no plasma	Consumo de quantidades grandes de suco do <i>grapefruit</i> pode aumentar o risco de efeitos adversos
	Budesonida	Aumento da absorção oral	Sintoma de hipercorticismo
Estrogênios	Etinil estradiol	Aumenta a concentração no plasma	O significado clínico é desconhecido

A nootkatona produzida por bioxidação permite contornar as diversas interações medicamentosas do suco de *grapefruit*, além de evitar os efeitos indesejáveis da síntese química, já que nootkatona produzida por bioxidação é considerada como produto natural e não como produto de síntese química, o que permite sua utilização sem restrições como flavorizante em produtos alimentícios. Buscando essa bioxidação, diversas tentativas foram feitas recentemente, utilizando culturas de células de algas verdes, de células vegetais superiores, de fungos e bactérias, além do uso de lacases fúngicas, isoladas ou não,² como neste trabalho.

1.3 - Os fungos lignolíticos e o basidiomiceto *Trametes versicolor*

A degradação de lignina (polímero natural presente na estrutura de plantas superiores) por fungos de degradação branca (*white-rot fungi*) tem sido estudada há mais de meio século. Foi somente no início dos anos 80, entretanto, que uma melhor compreensão sobre o mecanismo da degradação da lignina foi conseguido. Os fracassos em identificar alguma enzima capaz de, sozinha, despolimerizar lignina, levou à proposta de que a decomposição da mesma não fosse o resultado da ação de uma enzima sobre a lignina mas sim que espécies reativas de oxigênio, produzidas extra-celularmente, poderiam ser responsáveis pela degradação. O processo envolve a ação de pelo menos 3 conjuntos de enzimas: LiP (Lignina Peroxidase), MnP (Manganês Peroxidase) e Lac (Lacase), sendo que os dois primeiros (LiP e MnP) são considerados o núcleo do sistema de degradação de lignina, sendo a importância das lacases para a degradação de lignina pobremente compreendida, sendo algumas vezes mesmo subestimada.¹¹

O fungo *Trametes versicolor* faz parte da família dos fungos lignolíticos, sendo por isso bastante estudado no setor de papel e celulose. É um dos fungos mais comuns encontrados em madeira. O seu nome vem do padrão das bandas dos corpos de frutificação (fino e multicolorido). As cores das bandas podem variar, dependendo da carga genética do organismo e do seu meio ambiente. A maior parte das bandas é negra ou marrom clara, alternadas com cores mais claras que podem variar de branco a cinza, ou mesmo bandas azuis, alaranjadas ou outras (Figuras 4, 5, 6, 7 e 8). É dos

11. Cameron, M.D.; Timofeevski, S.; Aust, S.D. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2000**, Enzymology of *Phanerochaete chrysosporium* with respect to the degradation of recalcitrant compounds, 54, 751-758.

fungos mais comumente encontrados. A espécie tem uma larga distribuição, estando presente na maior parte dos países tropicais.



Figura 4 - Foto de *T. versicolor* em ocorrência natural



Figura 5 - Foto de *T. versicolor*



Figura 6 - Foto de *T. versicolor*



Figura 7 - Foto de *T. versicolor*Figura 8 - Foto de *T. versicolor*

1.4 - Enzima Lacase

Lacases são enzimas multicobre-oxidases, que catalisam a redução de 4 elétrons de oxigênio molecular para água.¹² São produzidas por diversos organismos mas ocorrem em grande quantidade em fungos lignolíticos (*white rot fungi*), como *T. versicolor*, bastante estudado no setor papelheiro (deslignificação), têxtil (tratamento de efluente industrial) e de biorremediação (de hidrocarbonetos poliaromáticos - os PAHs, petróleo e outros).²

Lacase (benzenodiol oxigênio oxidoredutase, EC 1.10.3.2), uma fenol oxidase com massa molecular de cerca de 70 kDa, catalisa a oxidação de uma larga faixa de substratos tais como polifenóis, fenóis metoxi-substituídos, diaminas e alguns compostos inorgânicos.¹³ Desde seu descobrimento há mais de um século na planta japonesa *Rhus venicifera*,¹⁴ lacase tem sido encontrada em grande quantidade de plantas, onde elas estão envolvidas na deslignificação e síntese de lignina.¹⁵ Lignina é um componente estrutural da parede celular de plantas (Figura 9), sendo um biopolímero heterogêneo e

12. Solomon, E.I.; Sundaram, U.M.; Zhang, H.H.; Hedman, B.; Hodgson, O. *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, Spectroscopic Investigation of Peroxide Binding to the Trinuclear Copper Cluster Site in Laccase: Correlation with the Peroxy-Level Intermediate and Relevance to Catalysis, *119*, 12525-12540.

13. Xu, F. *Biochemistry* **1996**, Oxidation of Phenols, Anilines, and Benzenethiols by Fungal Laccases: Correlation between Activity and Redox Potentials as Well as Halide Inhibition, *35*, 7608-7614.

14. Yoshida, H. *J. Chem. Soc.* **1883**, Chemistry of lacquer (Urushi).Part I. Communication from the Chemical Society of Tokio, *43*, 472-486.

15. Piontek, K.; Antorini, M.; Choinowski, T. *J. Biol. Chem.* **2002**, Crystal Structure of a Laccase from the Fungus *Trametes versicolor* at 1,90-Å Resolution Containing a Full Complement of Coppers, *277*, 40, 37663-37669.

complexo, que consiste de unidades fenil-propanóides ligadas por várias ligações não hidroxiláveis C-C e C-O.¹⁶

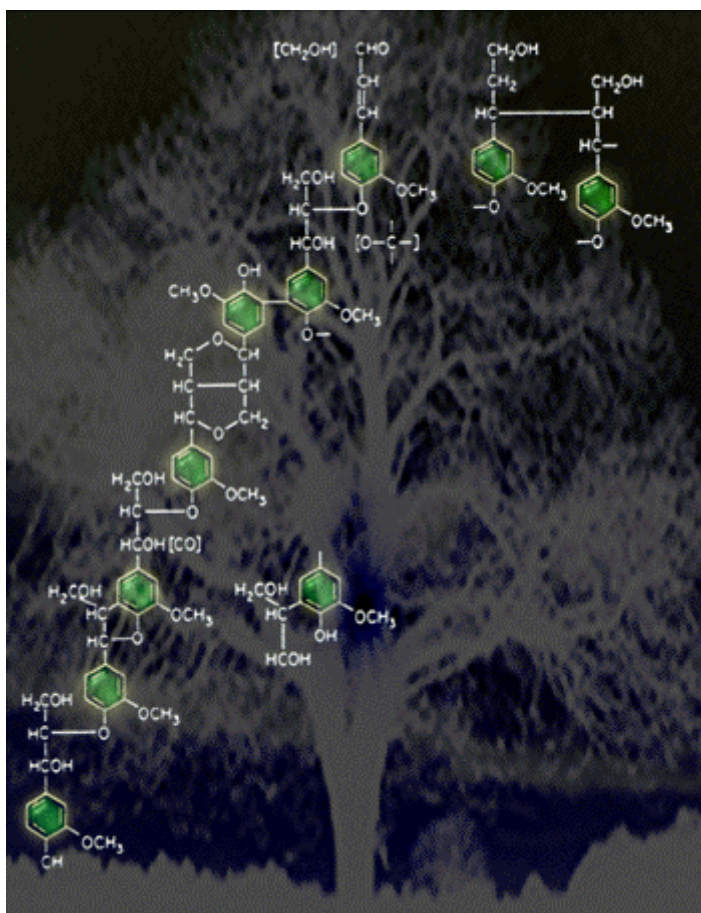


Figura 9 - Estrutura da lignina

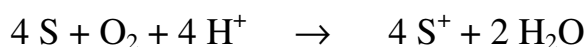
Como a lacase sozinha é incapaz de clivar ligações não fenólicas de lignina, esta enzima não era considerada como um componente significativo do sistema lignolítico, apesar de ser comum a secreção de grande quantidade de lacases por fungos lignolíticos. Bourbonnais e Paice mostraram¹⁷ que lacase pode catalisar a oxidação de substratos não fenólicos na presença de um mediador (molécula que atua como carreador de elétrons).

16. Evans, C.S. *FEMS Microbiol. Lett.* **1985**, Laccase activity in lignin degradation by *Coriolus versicolor* *in vivo* and *in vitro* studies, 27, 339-343.

17. Bourbonnais, R.; Paice, M.G. *FEBS Lett.* **1990**, Oxidation of non-phenolic substrates. An expanded role for laccase in lignin biodegradation, 267, 99-102.

O sítio ativo da lacase é formado por 4 átomos de cobre (Figura 10), sendo estes divididos em 3 grupos, determinados em função de suas características espectroscópicas, que refletem seus diferentes papéis durante o processo enzimático. Por convenção, um cobre é designado do tipo 1 (T1), dois cobres são do tipo 3 (T3) e um quarto é do tipo 2 (T2).

É na região do cobre T1 que ocorre a oxidação do substrato, sendo os elétrons recebidos por este cobre transferidos para o cluster trinuclear formado por dois átomos T3 e um cobre de T2 (Figura 11), onde ocorre a redução do oxigênio molecular, segundo a reação genérica abaixo:



(S = molécula que é oxidada pela lacase no processo)

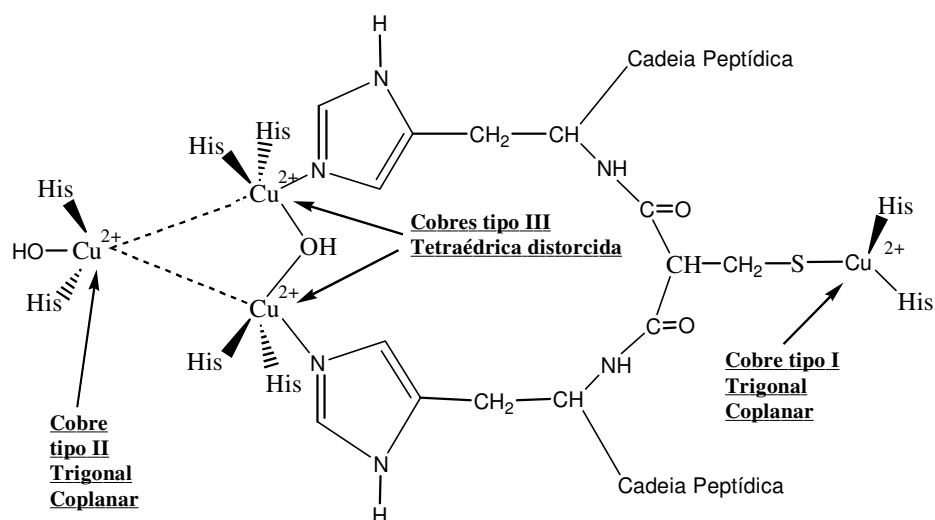


Figura 10 - Representação esquemática dos centros cobre de lacase (TvL)¹⁸ e indicação das geometrias obtidas por cristalografia¹⁵

18. Durán, N.; Rosa, M.A.; D'Annibale, A.; Gianfreda, L. *Enzym. Microb. Technol.* **2002**, Applications of laccases and tyrosinases (phenoloxidases) immobilized on different supports: a review, *31*, 910.

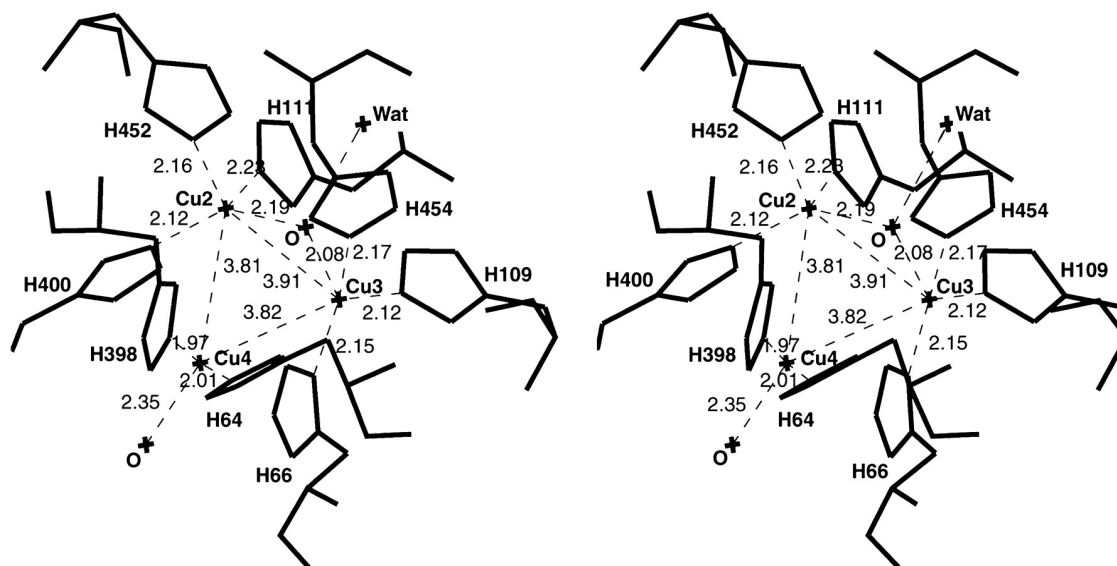


Figura 11 - Esquema da vista espacial dos cobres T2/T3 e seu entorno na TvL (distâncias em Å)¹⁵

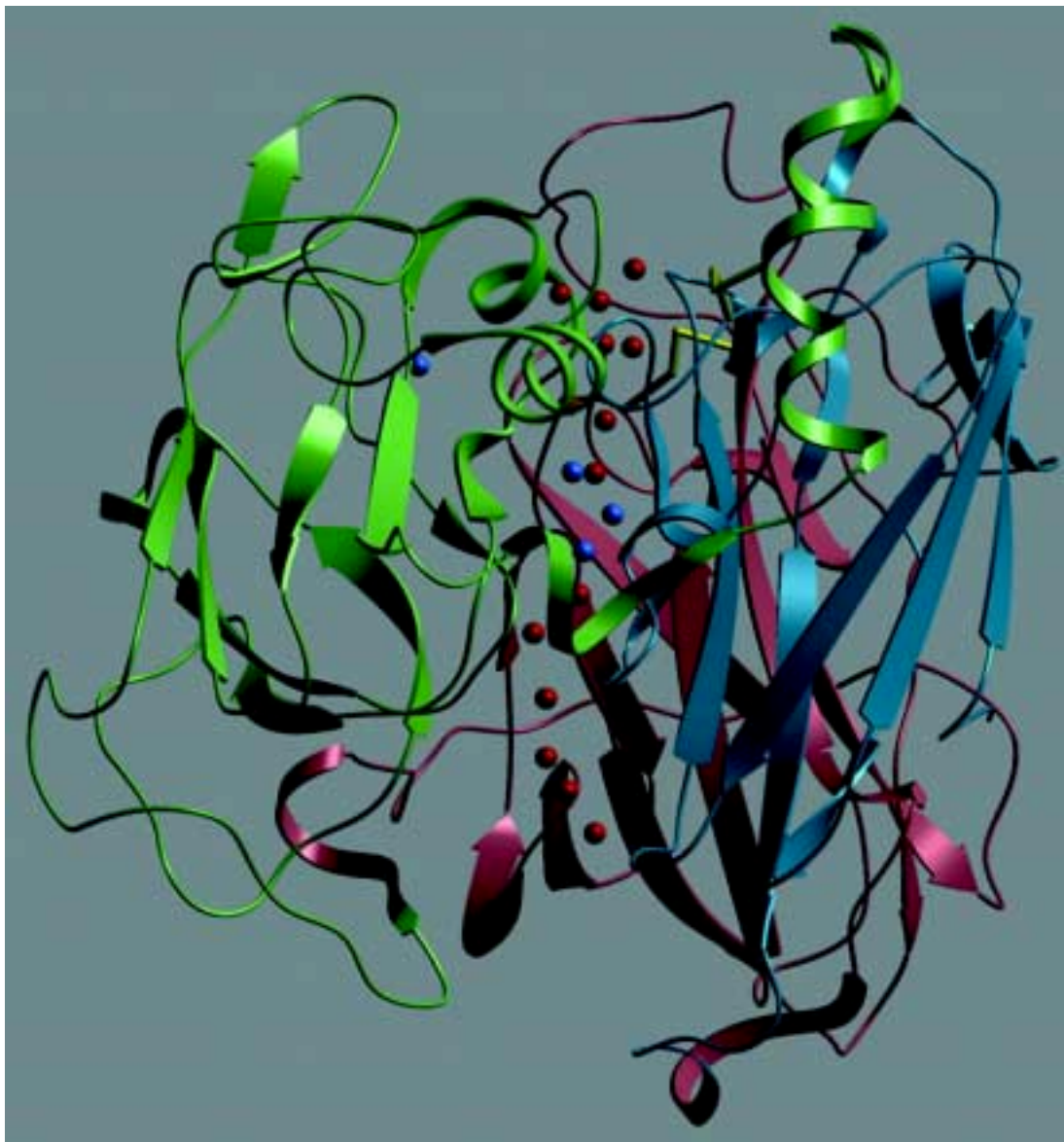


Figura 12 - Diagrama de fitas de TvL mostrando os canais levando ao cluster T2/T3 (moléculas de água são mostradas como esferas vermelhas e íons cobre são mostrados como esferas azuis)¹⁵

1.5 - LMS - Sistema Lacase Mediador (*Laccase Mediator System*)

A oxidação enzimática de compostos aromáticos inertes em sistemas biológicos está intimamente relacionada com a ação de enzimas que possuem um potencial de oxidação muito alto e que normalmente atuam intracelularmente. Enzimas como lacases, com seu baixo potencial redox (cerca de 0,6-0,8 V) estão restritas a reagir com substâncias facilmente oxidáveis, como fragmentos fenólicos de lignina, por exemplo.¹⁹

Apesar disso, a inclusão de substâncias oxidáveis apropriadas de baixo peso molecular, conhecidas como mediadores, expande a atividade catalítica das lacases (Figura 13) frente a grupos funcionais mais difíceis de oxidar, incluindo álcoois ou éteres benzílicos e alílicos.^{20, 21}

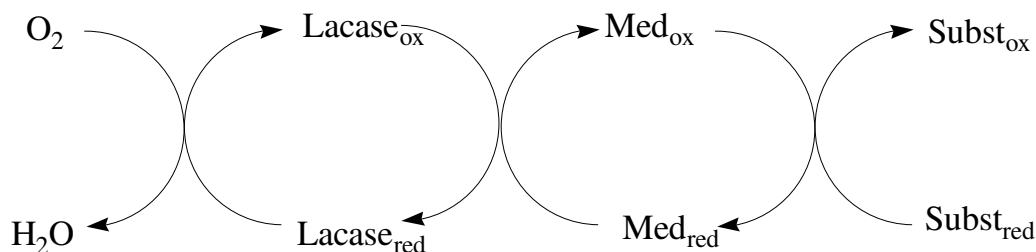


Figura 13 - Esquema geral do sistema lacase mediador

19. Have, R.; Teunissen, P.J.M. *Chem. Rev.* **2001**, Oxidative Mechanisms Involved in Lignin Degradation by White-Rot Fungi, *101*, 3397-3413.

20. Bourbonnais, R.; Paice, M.G. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **1992**, Demethylation and delignification on kraft pulp by *Trametes versicolor* in presence of 2,2'-azinobis-(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonate), *36*, 823-827.

21. Potthast, A.; Rosenau, T.; Chen, C.L.; Gratzl, J.S. *J. Org. Chem.* **1995**, Selective Enzymatic Oxidation of Aromatic Methyl Groups to Aldehydes, *60*, 4320-4321.

O sistema depende de muitas variáveis (como concentração, temperatura, tempo de reação, condições de aeração, adição de indutores ou inibidores, etc), em função do mediador específico sendo utilizado. O pH ótimo para cada transformação depende diretamente do mecanismo do mediador e das características do substrato mas, em termos gerais, existe um compromisso entre inibição da redução inicial do cobre T1 pelo substrato em pH ácido e a inibição da atividade do cluster trinuclear (dois T3 e um T2) em pH mais alcalino.²² Apesar deste “equilíbrio” anterior, quando o pH sobe além de 7 a atividade da Lacase diminui drasticamente.²³

1.6 - Mediadores

Um mediador é uma pequena molécula que atua como um tipo de carregador de elétrons. Após ser oxidado pela enzima, ele difunde-se para fora do sítio ativo e então oxida o substrato que, devido ao seu tamanho, não poderia entrar diretamente no sítio ativo da enzima²⁴ (Figura 14).

Este processo pode levar a um mecanismo de oxidação que não seria possível para a enzima sozinha, seja por parâmetros estéricos, como citados anteriormente, seja por parâmetros termodinâmicos, já que os mediadores podem apresentar potenciais de redução diferentes da enzima, estendendo portanto a faixa de substratos oxidáveis.²³

22. Xu, F. *J. Biol. Chem.* **1997**, Effects of Redox Potential and Hydroxide Inhibition on the pH Activity Profile of Fungal Laccases, 272, 2, 924-928.

23. Cantarella, G.; Galli, G.; Gentili, C. *J. Mol. Catal. B: Enzymatic* **2003**, Free radical versus electron-transfer routes of oxidation of hydrocarbons by laccase/mediator systems, Catalytic or Stoichiometric procedures, 22, 135-144.

24. Banci, L.; Ciofi-Baffoni, S.; Tien, M. *Biochemistry* **1999**, Lignin and Mn Peroxidase-Catalyzed Oxidation of Phenolic Lignin Oligomers, 10, 38, 3205-3210.

Há muitos mediadores disponíveis (Figura 14) e um dos mais comuns e eficazes é o HBT -Hidroxibenzotriazol- (Figura 15), utilizado como mediador principal neste trabalho, além de TEMPO - tetrametil-piperidin-N-oxil (Figura 16). Para cada tipo de mediador é possível associar um tipo de mecanismo mais provável, de acordo com as propriedades químicas do mediador e do substrato que está sendo oxidado. Basicamente, há três alternativas: um mecanismo iônico, possível para espécies radicais persistentes $\text{>N-O}^\bullet$ (como TEMPO) que possam ser convertidos em sua forma $\text{>N}^+=\text{O}^\bullet$ (ou seja, forma oxidada do mediador) por uma oxidação monoeletrônica num potencial redox acessível para a lacase e, portanto, não excedendo 1 V; um segundo mecanismo radical por abstração de hidrogênio (rota HAT) é a alternativa para mediadores que a lacase converte oxidativamente em intermediários radicais de vida curta, (como de >N-OH para $\text{>N-O}^\bullet$), sendo que é a energia liberada para a re-ligação NO-H que provê a energia necessária (de 80 kcal.mol^{-1} ou superior) para a abstração do átomo de hidrogênio do substrato; um terceiro mecanismo, de tipo redox, é possível para espécies como o ABTS (Figura 13), que são facilmente oxidáveis por lacase.²⁵

25. Astolfi, P.; Brandi, P.; Galli, C.; Gentili, P.; Gerini, M.F.; Greci, L.; Lanzalunga, O. *New J. Chem.* **2005**, New mediators for the enzyme laccase: mechanistic features and selectivity in the oxidation of non-phenolic substrates, 29, (10), 1308-1317.

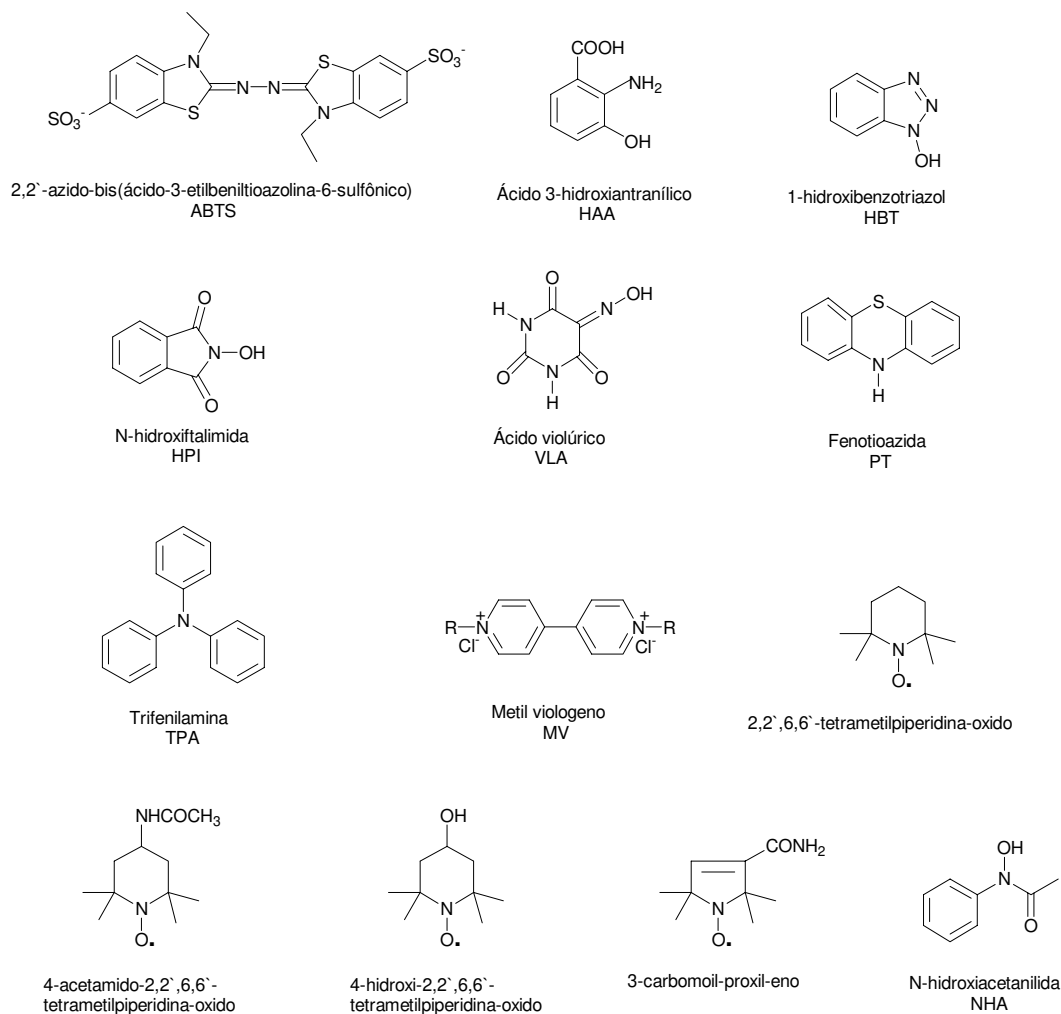


Figura 14 - Vários mediadores de LMS ²⁶

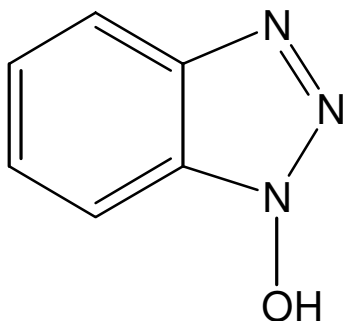


Figura 15 - Mediador HBT (Hidroxibenzotriazol)

26. Fabbrini, M.; Galli, C.; Gentili, P. *J. Mol. Catal. B: Enzymatic* **2002**, Comparing the catalytic efficiency of some mediators of laccase, *16*, 231-240.

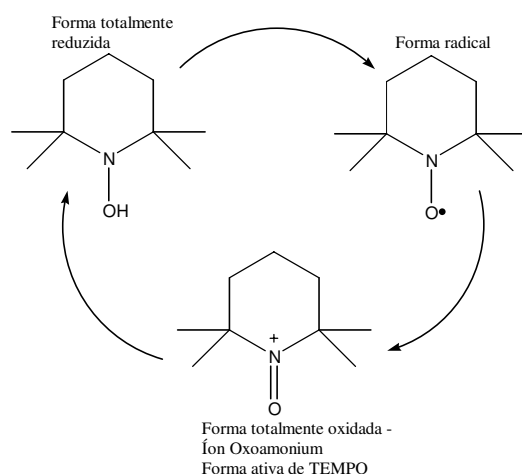


Figura 16 - Mediador TEMPO (tetrametil-piperidina-óxido)

1.7 - Sistema lacase/mediador - ciclo catalítico e mecanismo

Embora o mecanismo reacional em sistemas mediador/lacase permaneça não completamente elucidado, o mecanismo catalítico aceito atualmente é derivado da proposta de Messerschmidt,²⁷ baseado em dados cinéticos, sugerindo um mecanismo “bi-bi ping-pong em dois locais”. De acordo com esta proposta mecanística, a enzima ao final ficaria com todos os 4 átomos de cobre de seu sítio ativo na forma oxidada (Figura 17). A catálise começaria com a oxidação de uma molécula simples do substrato redutor pelo cobre T1, com a subsequente transferência do elétron extraído para o cluster T2/T3. Sucessivas oxidações de um elétron ocorreriam na região do cobre T1, deixando a enzima totalmente reduzida e os elétrons seriam acumulados na região T2/T3, onde a redução do oxigênio molecular ocorre.

27. Messerschmidt, A. “Multi-copper Oxidases” 1997, World Scientific, Singapore, referência retirada de: Garavaglia, S.; Cambria, M.T.; Miglio, M.; Ragusa, S.; Iacobazzi, V.; Palmieri, F.; D’Ambrosio, C.; Scaloni, A.; Rizzi, M. *J. Mol. Biol.* **2004**, 342, 1519-1531.

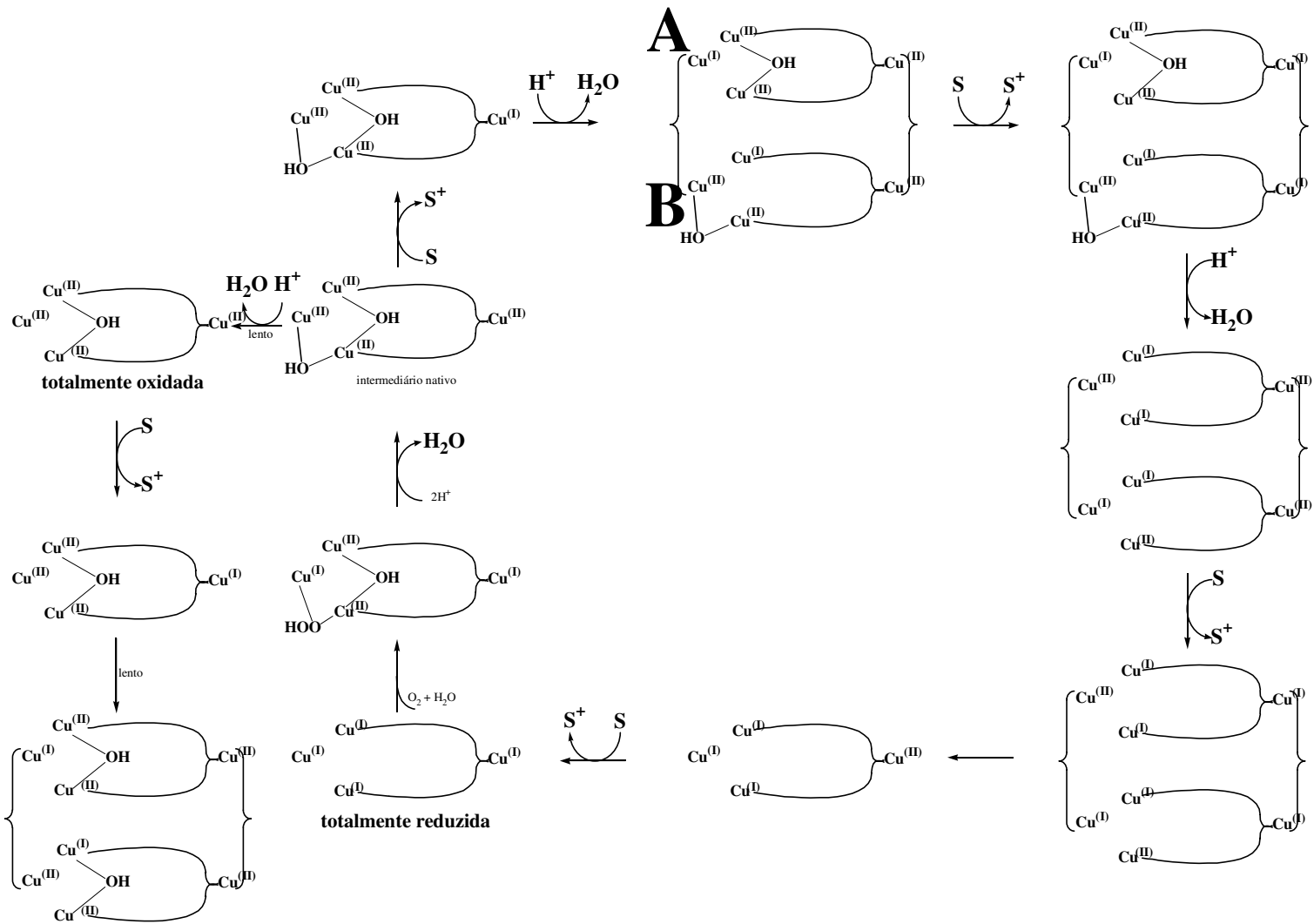


Figura 17 - Ciclo catalítico da laccase ¹⁸

Enquanto a catálise no centro cobre T1 é razoavelmente bem compreendida, a descrição detalhada dos eventos catalíticos que ocorrem na região de redução do dioxigênio, região do cluster de três átomos de cobre (um T2 e dois T3) é assunto de intenso debate.²⁸

1.8 - Aplicações de Lacase

Lacases são importantes enzimas para aplicações biotecnológicas^{29, 30} e por isso estas enzimas tem sido objeto de intensa investigação, buscando compreender tanto seu mecanismo catalítico como os determinantes moleculares que modulam a larga faixa de substrato. Tais informações são de importância fundamental para futura manipulação racional da enzima por engenharia genética para aplicações biotecnológicas específicas.

As aplicações de lacases são muito amplas, tendo utilização no setor de papel e celulose (como clareador, potencial substituta do cloro, que é ambientalmente nocivo devido à geração de compostos clorados altamente tóxicos); no tratamento de efluentes para remoção de compostos polifenólicos ou descoloração de água de efluente industrial, principalmente do setor têxtil;

28. Garavaglia, S.; Cambria, M.T.; Miglio, M.; Ragusa, S.; Iacobazzi, V.; Palmieri, F.; D'Ambrosio, C.; Scaloni, A.; Rizzi, M. *J. Mol. Biol.* **2004**, The Structure of *Rugidoporus lignosus* Laccase Containing a Full Complement of Copper Ions, Reveals an Asymmetrical Arrangement for the T3 Copper Pair, *342*, 1519-1531.

29. Xu, F.; Berka, R.M.; Wahleithner, J.A.; Nelson, B.A.; Shuster, J.R.; Brown, S.H. et al. *Biochim. J.* **1998**, Site-directed mutations in fungal laccase: effect on redox potential, activity and pH profile, *334*, 63-70.

30. Mayer, A.M.; Staples, R.C. *Phytochemistry* **2002**, Laccase: new functions for an old enzyme, *60*, 551-565.

na produção de biosensores amperométricos para detecção de fenol e muitos usos no processamento de alimentos e bebidas.³¹

Lacases catalisam a oxidação de vários compostos orgânicos, como metoxifenóis, fenóis, *o*- e *p*-difenois, aminofenóis, polifenóis, poliaminas e moléculas semelhantes a lignina. Elas também catalisam a desmetilação de lignina, ácidos metoxifenóis, metoxiaromáticos, a polimerização de compostos semelhantes a lignina ou monômeros e a co-polimerização de lignina com fenóis e acrilamida. Grande números de aplicações de lacase foram sugeridos baseadas nesta a reatividade.³²

A descoloração de corantes aromáticos, atribuídas a reações de *N*-desmetilação³³ e despolimerização de frações lignínicas e não lignínicas em resíduos de polpa e papel³⁴ são ambos sistemas que ilustram o significativo potencial de lacase em biorremediação. Portanto, lacase pode ser usada na quebra de ligações carbono-carbono em uma larga faixa de polímeros aromáticos, incluindo degradação de substratos não fenólicos de lignina.³⁵

Na presença de mediadores, as lacases podem catalisar a oxidação de muitos outros compostos (Tabelas 2 e 3) que tem potenciais de redução

31. Arends, I.W.C.; Li, Y.X.; Ausan, R.; Sheldon, R.A. *Tetrahedron* **2006**, Comparison of TEMPO and its derivatives as mediators in laccase catalysed oxidation of alcohols, *62*, 6659-6665.

32. Burton, S.G. *Curr. Org. Chem.* **2003**, Laccases and Phenol Oxidases in Organic Synthesis - a Review, *7*, 1317-1331.

33. Solomon, E.I.; Sundaram, U.M.; Machonkin, T.E. *Chem. Rev.* **1996**, Multicopper Oxidases and Oxygenases, *96*, 2563-2606.

34. Tekere, M.; Mswake, A.Y.; Zvauya, R.; Read, J.S. *Enzym. Microb. Tech.* **2001**, Growth, dye degradation and ligninolytic activity studies on Zimbabwean white rot fungi, *28*, 420-426.

35. Bourbonnais, R.; Paice, M.G.; Freiermuth, B.; Bodie, E. *App. Environ. Microbiol.* **1997**, Reactivities of Various Mediators and Laccases with Kraft Pulp and Lignin Model Compounds, *63*, 4627-4632.

elevados, tais como álcoois em compostos aromáticos,³⁶ oxidação de alcenos³⁷ e mesmo de hidrocarbonetos.³⁸

Reações catalisadas por lacases na presença de mediadores têm significativo potencial na síntese de produtos que são inacessíveis através de rotas químicas tradicionais como, por exemplo, a produção de benzaldeído a partir de tolueno, usando *T. versicolor* na presença de ABTS³⁹ ou a oxidação de hidrocarbonetos poliaromáticos usando lacase na presença de HBT.⁴⁰

Tabela 2 - Reações reportadas de oxidação/polimerização de lacase na ausência de mediadores³²

Substratos e produtos	Fonte da enzima e apresentação	Comentários
Isoeugenol e álcool coniferílico	<i>Rhus vernicífera</i> e <i>Pycnoporus coccineus</i>	Meio aquoso/acetona
Ácidos siríngico, vanílico, protocateóico, ferrúlico para dímeros, trímeros	<i>Trametes versicolor</i>	Lacase em caldo enzimático bruto apresentou maior rendimento que purificada
<i>N</i> -(2-alquilamino-4-fenoxiimidazol-1-il)acetamida para imidazóis e oligômeros substituídos	<i>Trametes versicolor</i>	Lacase em caldo enzimático bruto apresentou maior rendimento que purificada
Metoxifenóis e clorofenóis	<i>Rhizoctonia praticola</i>	Reações favorecidas pela adição de mais

36. Srebotnik, E.; Hammel, K.E. *J. Biotechnol.* **2000**, Degradation of nonphenolic lignin by the laccase/1-hydroxybenzotriazole system, *81*, 179-188.

37. Johannes, C.; Majcherczyk, A. *App. Environ. Microbiol.* **2000**, Natural Mediators in the Oxidation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons by Laccase Mediator Systems, *66*, 524-538.

38. Huang et al. Process for the preparation of nootkatone by laccase catalysis. US Patent 6.200.786, **2001**.

39. Jonas, U.; Hammer, E.; Schauer, F.; Bollag, J. *Biodeg.* **1998**, Transformation of 2-hydroxydibenzofuran by laccases of the white rot fungi *Trametes versicolor* and *Pycnoporus cinnabarinus* and characterization of oligomerization products, *8(5)*, 321-327.

40. Xu, H.; Lai, Y.Z.; Slomczynski, D.; Nakas, J.P.; Tanenbaum, S.W. *Biotech. Lett.* **1997**, Mediator-assisted selective oxidation of lignin model compounds by laccase from *Botrytis cinerea*, *19*, (10), 957-960.

		outro substrato, como guaiacol ou ácido vanílico
Fenóis, anilinas, benzotióis, metoxifenóis	Lacases recombinantes	
Ácido 3-metil-4-hidroxiantranílico para ácido 2-amino-4,6-dimetil-3-fenoxiazinona-1,9-carboxílico (actinocina)	Lacase de <i>Trametes versicolor</i> imobilizada em poliacrilamida	Meio aquoso e 60 % MeCN
Difenóis, arildiaminas e aminofenóis	Várias lacases	K _M aprox. 1-10 mM
corantes azo-fenólicos para benzoquinonas e ácidos sulfônicos	<i>Pyricularia oryzae</i>	-
Ácido ferúlico para álcool coniferílico	células íntegras de <i>Trametes versicolor</i>	-
Ácido ferúlico para vanilina	<i>Pycnoporus cinnabarinus</i>	64 mg/L produzido mas lacase extracelular causou polimerização no meio
Polimerização de 1-Naftol para aplicação em fibras, laminados, etc	<i>Trametes versicolor</i>	Meio aquoso/acetona
Polimerização de seringaldazina, <i>o</i> -dianisidina, 2,6-dimetoxifenol para produtos poliméricos insolúveis	Lacase de <i>Pleurotus ostreatus</i> imobilizada em Eupergit [®]	Usado para remover poluentes fenólicos de soluções em sistemas de reação contínuos
Descoloração de efluentes	<i>Trametes versicolor</i> em esferas de alginato e co-polimerizado com L-tirozina para gerar esferas insolúveis	-
Copolimerização de acrilamida e lignina para formar fibras poliméricas	-	Em presença de peróxidos de dioxano
2-hidroxidibenzofurano para dímeros e trímeros hidrofóbicos e insolúveis	sobrenadante livre de células de meios de cultura de <i>Trametes versicolor</i> e <i>Pycnoporus cinnabarinus</i>	Usado crescimento em shaker com meio rico em nitrogênio

Tabela 3 - Reações reportadas de oxidação de lacase na presença de mediadores⁴¹

Substratos e produtos	Mediadores	Comentários
1-(3,4-dimetoxifenol)-1-propeno para 1-(3,4-dimetoxifenil)-1-propanodiol e 3,4-dimetoxibenzaldeído	TEMPO	Reação via epoxidação da dupla ligação
Alcoóis aromáticos para benzaldeídos	TEMPO	Método geral
Álcool 4-metoxibenzil para 4-metoxibenzaldeído	TEMPO	Lacase de <i>Trametes villosa</i> (Novo Nordisk) comparado com 12 outros mediadores
Alcoóis alifáticos polinsaturados e alcoóis alílicos aromáticos para aldeídos e cetonas. Menos reativos: éteres alílicos, hepteno e ciclohexeno. Geraniol para óxido linalool	HBT	Lacase de <i>Trametes hisutsu</i> Reações via mecanismo radicalar levando a oxidação alílica ou epoxidação
Álcool veratrílico para veratraldeído	ABTS, HBT, ácido 3-hidroxiantranílico	Análise do papel do mediador
Descoloração de corante diazo com grupo <i>p</i> -hidroxi, solúvel em água	HBT, ácido violúrico	Utilizou lacase recombinante, expressa em <i>Aspergillus</i>
Deslignificação e clareamento de polpa de papel	Polioxometalatos	-
Violaceína (1,3-dihidro-2- <i>H</i> -indol-2-ona)	HBT	-
Dimetoxitolueno para dimetoxibenzaldeído e metoxihidrotolueno para o dímero 5-5'	HBT	-
PAHs acenafteno e acenaftileno para 1,2-acenaftidiona e anidrido 1,8-naftalínico (dímero)	HBT	Baixo rendimento

1.9 - Indutores, inibidores e outros participantes da reação

A produção de lacase por fungos pode ser afetada por diversos fatores, tais como a composição do meio de cultura, concentração de nitrogênio e de carbono, pH, temperatura, aeração, metais pesados, etc. Além disso, diferentes compostos têm sido largamente utilizados para estimular a produção de lacase, como ácido gálico, sulfato de cobre, etanol, cloreto de amônio, ácido ferrúlico, guaiacol, xilidina (Figura 17), seringaldazina, álcool veratrílico, entre outros.^{41,42,43,44}

Também é comum a adição de emulsificante (por exemplo: *Tween 80*) ao sistema LMS, o que homogeneiza melhor o sistema e aumenta a quantidade de oxigênio dissolvido no meio líquido, facilitando a oxidação.

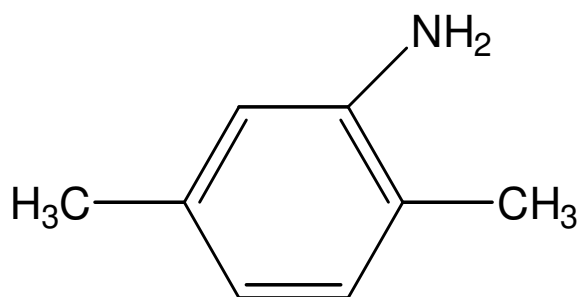


Figura 18 - Indutor 2,5-xilidina (2,5-dimetilanilina; 2,5-dimetilfenilamina)

41. Eggert., C.; Temp. U.; Eriksson, K.E.L. *Appl. Environ. Microbiol.* **1996**, The ligninolytic system of the white rot fungus *Pycnoporus cinnabarinus*: purification and characterization of the laccase, *62*, 115-1158.

42. Galhaup, C.; Haltrich, D. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2001**, Enhanced formation of laccase activity by the white-rot fungus *Trametes pubescens* in the presence of copper, *56*, 225-232.

43. Lee, I.Y.; Jung, K.H.; Lee, C.H.; Park, Y.H. *Biotechnol. Lett.* **1999**, Enhanced production of laccase in *Trametes versicolor* by addition of ethanol, *21*, 965-968.

44. Minussi, R.C. Tese de Doutorado, Faculdade de Engenharia de Alimentos, UNICAMP, Campinas, Brasil, **2002**, Produção, Purificação, Caracterização e Aplicação Industrial de Lacase Fúngica, 42-48.

A adição de indutores permite que a cultura de fungos apresente atividade enzimática muito superior à atividade na ausência destes compostos, o que pode ser a diferença entre a capacidade de conseguir ou não realizar um determinado tipo de reação, como ocorreu neste trabalho.

1.10 - O flavorizante a partir da biooxidação por LMS

A reação de biooxidação não levou diretamente à produção do produto desejado, a nootkatona, mas sim ao hidroperóxido de valenceno, que em uma etapa química foi decomposto para formar a cetona desejada através de aquecimento (Figura 18).

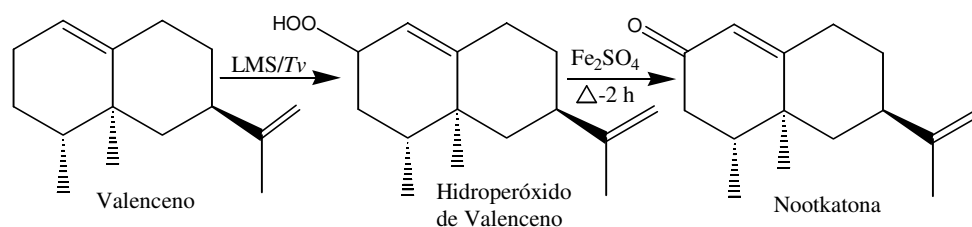


Figura 19 - Esquema da produção do bioflavorizante nootkatona

O mecanismo (Figura 19) proposto é:

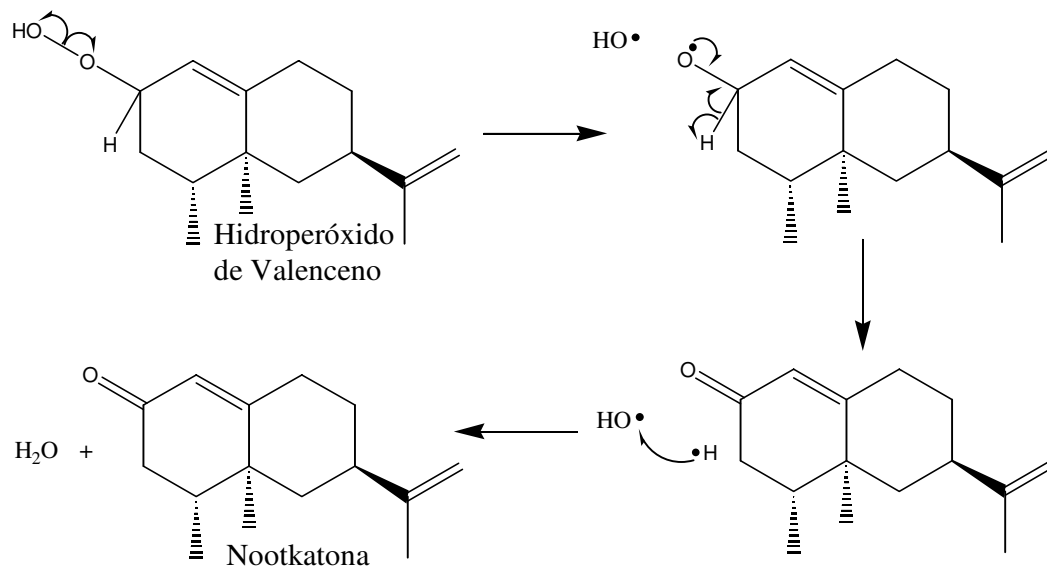
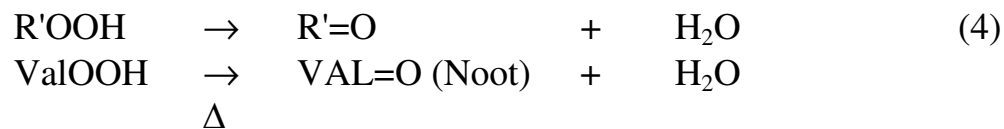
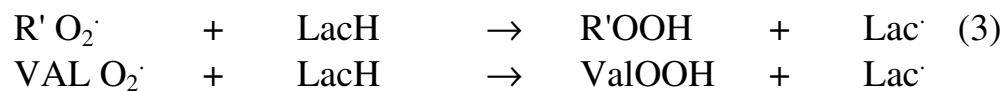
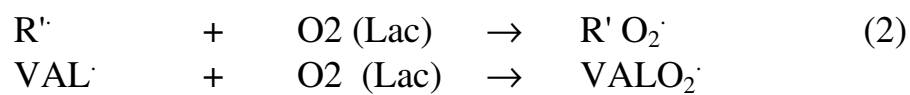
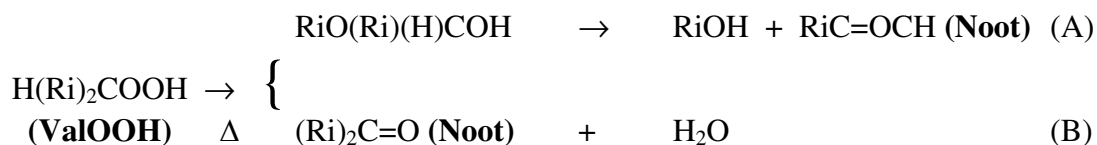


Figura 20 - Esquema do mecanismo de decomposição do hidroperóxido de valenceno

A proposta de mecanismo geral seria, portanto:



A decomposição do hidroperóxido (4), em maior detalhe: ⁴⁵



Hidroperóxidos primários e secundários sofrem decomposição através de dois caminhos paralelos, sob ação de ácidos próticos ou de Lewis, ou ainda por termólise. O aumento do caráter elétron doador do substituinte Ri, amplia a fração dos produtos de rearranjo com migração do grupo Ri (caminho A).⁴⁶ Em nosso estudo, o caminho (B) é preferencial.

1.11 - Química verde - Processos biológicos utilizando lacases em compostos tóxicos

A degradação de xenobióticos através da utilização de enzimas fúngicas é um método efetivo para a remoção destes poluentes do meio ambiente, recebendo o nome de biorremediação (Figura 20). Muitos compostos são passíveis de serem tratados desta forma, como hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (PAHs), benzeno-tolueno-etilbenzeno-xileno (BTEX), clorofenóis, bifenil-policlorados, resíduos de munições e pesticidas.⁴⁶

A utilização de microrganismos é uma possível alternativa para o tratamento de compostos como os PAHs, que são poluentes altamente tóxicos e largamente distribuídos em ambientes aquáticos e terrestres, sendo homólogos de benzeno com 2 ou mais anéis aromáticos fundidos e que são

45. Yablokv, V.A. *Rus. Chem. Rev.* **1980**, The Mechanisms of the Rearrangements of Peroxides, *49*, 9, 833-842.

46. Tortella, G.R.; Diez, M. C.; Durán, N. *Crit. Rev. Microbiol.* **2005**, Fungal Diversity and Use in Decomposition of Environmental Pollutants, *31*, 197-212.

formados principalmente como produtos da combustão incompleta de combustíveis fósseis.^{47, 48, 49, 50, 51}

Lacases fazem parte do grupo de enzimas utilizadas nos estudos de biorremediação. Embora tenham um mercado relativamente pequeno, estas enzimas são muito versáteis, devido à sua pequena especificidade de substrato, principalmente quando utilizada em sistemas lacase/mediador (LMS), e podem crescer em importância em alguns segmentos se a performance delas puder ser aperfeiçoada pelo uso de suportes sólidos ou em formulações detergentes.⁵² Trabalhos neste sentido apontaram boas perspectivas de sucesso.¹⁸

Outros estudos buscando otimizar e viabilizar a utilização industrial das lacases também estão em curso, como uma lacase termofílica de *Myceliphthora thermophila* (MtL), que foi tratada através de evolução dirigida *in vivo* e *in vitro* usando *Saccharomyces cerevisiae*, levando a um aumento de até 170 vezes na expressão desta enzima. Embora este trabalho ainda não tenha levado à produção comercial, ele poderia permitir a continuação do aprimoramento da enzima utilizando o versátil organismo modelo “hospedeiro” *Saccharomyces cerevisiae*.⁵²

47. Means, J.C.; Ward, S.G.; Hassett J.J., Banwart, W.L. *Environ. Sci. Technol.* **1980**, Sorption of polynuclear aromatic hydrocarbons by sediments and soils, *14*, 1524-1528.

48. Collins, P.J.; Kotterman, M.J.; Field, J.A.; Dobson, A.D. *Appl. Environ. Microbiol.* **1996**, Oxidation of anthracene and benzo(a)pyrene by laccases of *Trametes versicolor*, *62*, 4563-4567.

49. Johannes, C.; Majcherczyk, A.; Hüttermann, A. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **1996**, Degradation of anthracene by laccase of *Trametes versicolor* in the presence of different mediator compounds, *46*, 313-317.

50. Majcherczyk, A.; Johannes, C.; Hüttermann, A. *Enzyme Microb. Technol.* **1998**, Oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) by laccase of *Trametes versicolor*, *22*, 335-341.

51. Gibson, D.T.; Subramanian, V. “Microbial degradation of organic compounds”, Marcel Dekker, Inc, New York, **1984**, Microbial degradation of aromatic hydrocarbons, 181-252.

52. Cherry, J.R.; Fidantsef, A.L. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2003**, Directed evolution of industrial enzymes: an update, *14*, 438-443.



Figura 21 - Desenho ilustrando a capacidade dos fungos de decompor compostos recalcitrantes. No desenho, pentaclorofenóis

1.12 - Ascomiceto *Chaetomium globosum* - biooxidação via CYP-450

O fungo filamentoso ascomiceto *C. globosum*, foi testado para a realização da biooxidação de valenceno. Este fungo realiza a transformação do valenceno utilizando a bateria enzimática do seu citocromo P-450.²

As hidroxilações catalisadas pelo citocromo P-450 nas células vivas convertem compostos tóxicos para as mesmas em substâncias mais solúveis, facilitando sua excreção.

Esta reação utilizando *C. globosum* apresenta características muito particulares de execução devido à morfologia do fungo, que forma glóbulos de

1 a 3 mm nos quais o substrato de partida e alguns dos produtos de oxidação penetram por difusão passiva, dificultando o controle do processo.

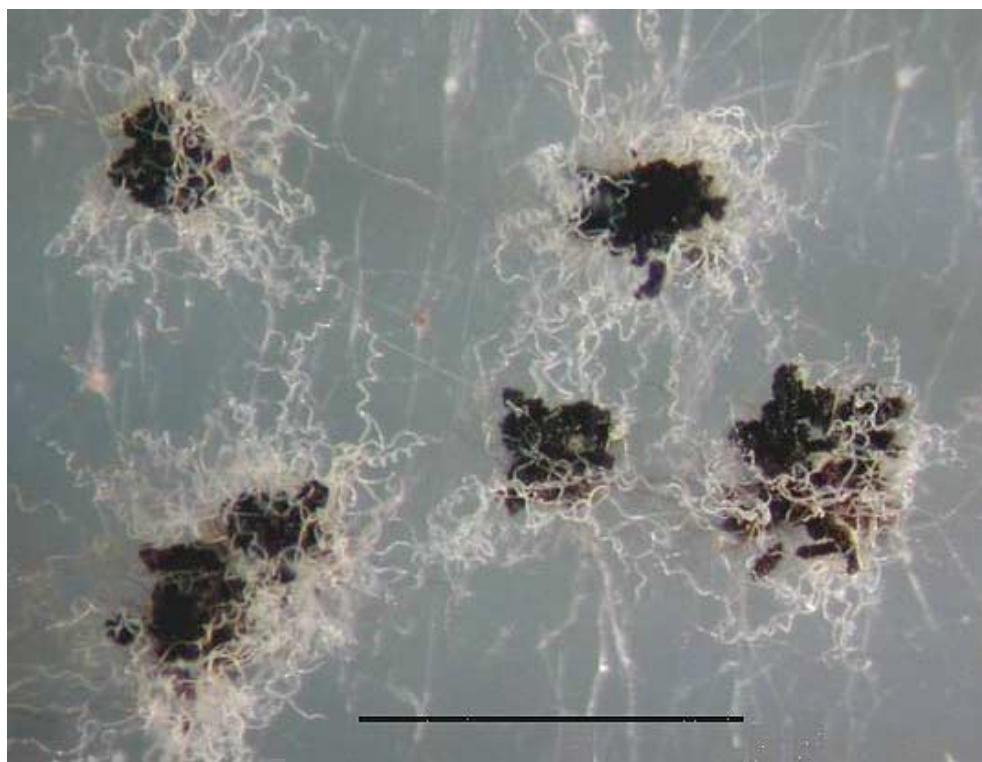


Figura 22 - Fungo *Chaetomium globosum* ao microscópio

2 – OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho foi investigar métodos de obtenção da nootkatona a partir do valenceno, visando um produto que atenda às exigências (de custo e segurança para os consumidores) da indústria alimentícia, contornando as dificuldades apresentadas pelo produto *in natura* (graves interações medicamentosas devido a furanocumarinas, dificuldade de obtenção e isolamento de fontes naturais acarretando alto custo). Os métodos utilizados foram o sistema sistema lacase/mediador (de *Trametes versicolor*, comparando HBT e TEMPO como mediadores) e o complexo enzimático do citocromo P-450 (de *Chaetomium globosum*), sendo estes otimizados através de planejamento fatorial buscando determinar as condições experimentais ótimas para atingir máximo rendimento.

3 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

O sistema LMS de *Trametes versicolor* e outros sistemas enzimáticos foram testados para a realização da biooxidação e os resultados estão listados a seguir.

O trabalho foi iniciado com o fungo *Botrytis cinerea* (CCT-1252), sendo testados na seqüência *Trametes versicolor* (CCT-4521), *Chaetomium globosum* (CCT-3249), *Mortierella isabellina* (CCT-3498), *Mortierella isabelina* (CCT-4054), *Mortierella ramaniana* (CCT-4428) e *Trametes versicolor* (CCT-4495). Destes microrganismos, somente *Trametes versicolor* (CCT-4521) e *Chaetomium globosum* foram capazes de realizar a transformação desejada.

O trabalho experimental sistemático foi iniciado com o fungo *T. versicolor* através da realização de baterias de reações para testar os parâmetros disponíveis na literatura,³⁸ que se mostraram insuficientes para obter os resultados desejados (Tabela 4), sendo então verificados estes e outros parâmetros reacionais.

A biooxidação por LMS/*Tv* não levou diretamente à formação de nootkatona (3) mas sim à formação do hidroperóxido de valenceno (2), sendo este decomposto termicamente (acima de 80°C) na presença de Fe^{+2} como catalisador em uma etapa subsequente³⁸ (Figuras 23 e 24).

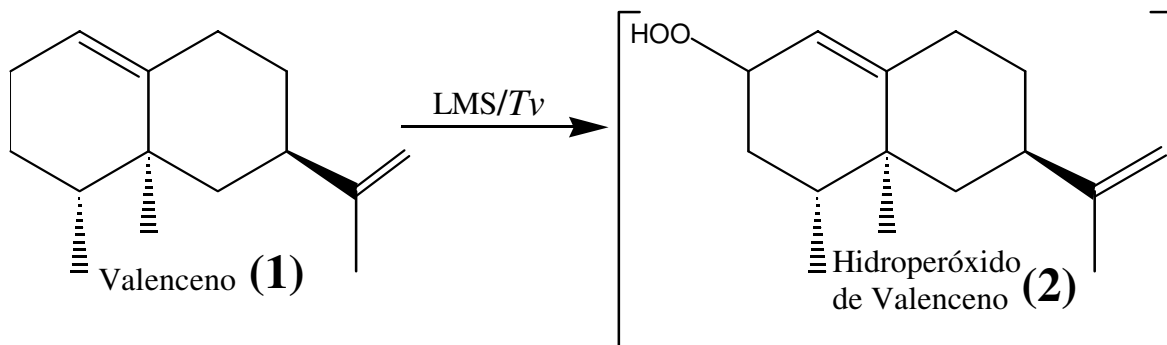


Figura 23 - Esquema da biotransformação de valenceno (1) em hidroperóxido (2)

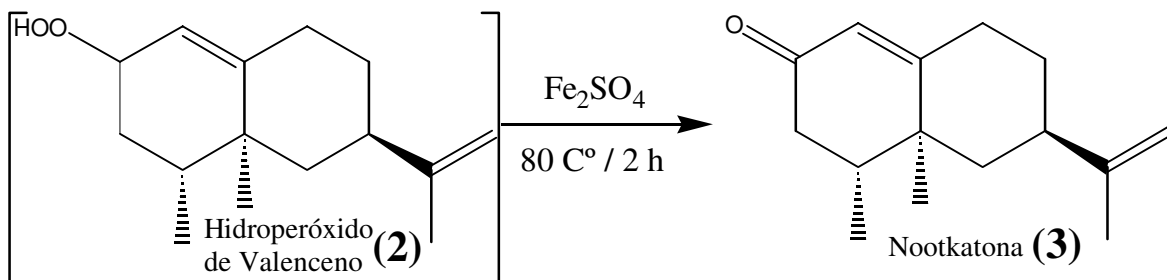


Figura 24 - Esquema da biotransformação de hidroperóxido (2) em nootkatona (3)

Os experimentos iniciais foram realizados em diferentes tempos de reação, assim como usando diferentes componentes da cultura enzimática (biomassa, caldo enzimático sobrenadante de centrifugação, meio de crescimento íntegro, além dos respectivos experimentos branco de controle), à temperatura ambiente ou controlada em banho maria, sob agitação magnética ou mecânica, sob aeração externa de ar comprimido em atmosfera sob pressão ou sob pressão ambiente, em diferentes pHs (3,5; 5,0; 6,5; 7,0 e 8,0) e em frascos de 0,5, 1, 2 ou 3 litros. Foram também testadas reações com ou sem indutor (inicialmente, CuSO_4 e depois outros indutores). Diferentes meios de cultura (Extrato Malte, Extrato de levedura e Meio Saboraud) foram testados para o crescimento de *T. versicolor* mas somente o Extrato Malte foi eficiente. Os resultados destes experimentos e de outros experimentos iniciais estão reunidos na Tabela 4.

Tabela 4 - Biooxidações iniciais em diversas condições (legendas ao final da tabela)

Número da bateria de reações - Fungo utilizado¹	Fungo - componente da cultura enzimática utilizada² - pH - forma de aeração³ - tempo de reação em dias (d)	Meio de crescimento⁴ - indutor⁵- mediador⁶	Rendimento/conversão⁷- (tempo de retenção - método-coluna)⁸
R 0 - TV	Tv - bio - 3,5 - ar - 7d Tv - bio - 3,5 - ar - 7d Tv - bra - 3,5 - ar - 7d Bc - bio - 3,5 - ar - 7d Bc - bio - 3,5 - ar - 7d Bc - bio - 3,5 - ar - 7d Bc - bio - 3,5 - ar - 7d	ME - ICu + IEt - HBT	3,1 ri - (4,6 - M2- DB5) 100 con 0,0 con 0,0 con 0,0 con 0,0 con 0,0 con
R 1 - TV	Tv - bio - 3,5 - ar - 6d Tv - bio - 3,5 - ar - 6d Tv - bra - 3,5 - ar - 6d Tv - cal - 3,5 - ar - 6d Tv ⁹ bio - 3,5 - ar- 6d	ME - IEt - HBT	100 con - (8,4 - M1- DB1) 8,0 ri - (4,6 - M2 - DB5) 0,0 con 8,5 ri - (4,6 - M2 - DB5) ND
R 2 - CG	Cg - who - 6,0 - ar - 7d Cg - who - 6,0 - ar - 7d Cg - who - 6,0 - agi -10d Cg -who - 6,0 - agi -13d	SD - IMt	0,0 con 0,0 con 80,0 con - (8,3 - M1 - DB1) 100 con - (8,3 - M1 - DB1)
R 3 ¹⁰	Mis - bio - 6,0 - sh - 2d Mis - bio - 6,0 - sh - 2d Mis - bio - 6,0 - sh - 2d Mr - bio - 6,0 - sh - 2d LIM-Mis - bio - 6,0 - sh - 2d LIM-Mis - bio - 6,0 - sh - 2d LIM-Mis - bio - 6,0 - sh - 2d	ME - IEt	0,0 con 0,0 con 0,0 con 0,0 con 0,0 decom ¹¹ 0,0 decom ¹¹ 0,0 decom ¹¹
R 4 - CG2	Cg - who - 6,0 - ar - 2d Cg - who - 6,0 - ar - 2d Cg - bra - 6,0 - ar - 2d Cg - who - 6,0 - sh - 5d Cg - who - 6,0 - sh - 5d LIM-Cg - who- 6,0 -sh - 2d LIM-Cg- who- 6,0 -ar - 2d Cg - who - 6,0 - sh - 5d LIM-Cg-who- 6,0 -sh -5d Cg - bra - 6,0 - sh - 5d	SD - IMt	ND ¹² ND ¹² ND ¹² 0,0 con 0,0 con 0,0 decom ¹¹ ND ¹² 0,0 con 0,0 decom ¹¹ 0,0 con
R 5 - LIM 2	Mis - who - 7,0 - sh - 2d Mis - who - 7,0 - sh - 2d Mis - who - 7,0 - sh - 2d Mis - who - 7,0 - sh - 2d Mis - who - 7,0 - sh - 2d	ME/YM - IEt	0,0 decom ¹¹ 0,0 decom ¹¹ 0,0 decom ¹¹ 0,0 decom ¹¹ 0,0 decom ¹¹
R 6 - CG3	Cg - who - 3,5 - ar - 8d Cg - who - 3,5 - ar - 8d LIM-Cg- who- 6,5 -ar- 8d Cg - who - 6,0 - agi -13d	SD - IMt	2,0 ri - (8,3 - M1 - DB1) 2,0 ri - (8,3 - M1 - DB1) 0,0 decom ¹¹ 10,0 con - (4,6 - M2 - DB1)
R 7 - CG4	Cg - who - 6,0 - sh - 7d Cg - who - 7,0 - ar - 7d Cg - who - 5,0 - agi - 7d	SD - IMt SD	2,5 ri - (4,6 - M2 - DB5) 2,5 ri - (4,6 - M2 - DB5) 100 con - (4,6 - M2 - DB5)

	Cg - who - 6,0 - sh - 7d		100 con - (4,6 - M2 - DB5)
R 8 - CG5	Cg - cal - 5,0 - sh - 10d Cg - bio - 6,0 - sh - 10d Cg - bra - 5,0 - sh - 10d Cg - who - 5,0 - sh - 10d Cg - who - 5,0 - sh - 10d Cg - who - 6,0 - sh - 10d Cg - who - 6,0 - sh - 10d Cg - bra - 6,0 - sh - 10d Cg - who - 6,0 - ar - 10d Cg - who - 6,0 - agi - 10d Cg ¹⁵ - who - 6,0 - sh - 10d Cg ¹⁵ - who - 6,0 - sh - 10d Cg ¹⁵ - who - 6,0 - sh - 10d	SD - IMt + IEt	2,0 ri - (4,7 - M2 - DB5) 100 con - (4,7 - M2 - DB5) 30 con - (4,7 - M2 - DB5) 60 con - (4,7 - M2 - DB5) 100 con - (4,7 - M2 - DB5) 100 con - (4,7 - M2 - DB5) 90 con - (4,7 - M2 - DB5) 25 con - (4,7 - M2 - DB5) 3,0 ri - (4,6 - M2 - DB1) 90 con - (4,6 - M2 - DB1) ND ND ND
R 9 - CG6	Cg - who - 3,5 - ar - 7d Cg - who - 8,0 - ar - 7d Cg - who - 6,0 - ar - 7d Cg - who - 6,0 - sh - 7d	SD - IMt + IEt	2,0 ri - (4,7 - M2 - DB5) 1,0 ri - (4,7 - M2 - DB5) 2,0 ri - (4,7 - M2 - DB5) 100 con - (4,7 - M2 - DB5)
R 10 - TV3	Tv - who - 5,0 - ar - 11d	ME - ICu + IEt - HBT	10 ri - (4,7 - M2 - DB5)
R 11 - CG7	Cg - who - 6,0 - sh - 9d Cg - who - 6,0 - sh - 9d Cg - who - 6,0 - sh - 9d Cg - who - 6,0 - sh - 9d Cg - who - 6,0 - sh - 9d Cg - who - 6,0 - sh - 9d Cg - who - 6,0 - sh - 9d Cg - who - 6,0 - sh - 9d	SD - IEt + IMt	ND ¹³
R 12 - CG8	Cg - who - 6,0 - sh - 6d	SD - IEt + IMt	ND ¹⁴
R 13 - TV4	Tv - bio - 6,5 - ar - 7d Tv - bio - 6,5 - ar - 7d Tv - cal - 3,5 - ar - 7d Tv - cal - 5,0 - ar - 7d Tv - cal - 6,5 - ar - 7d Tv - bio - 3,5 - ar - s/Cu - 7d	ME - IEt + ICu - HBT	9,2 ri - (4,7 - M2 - DB1) 11,0 ri - (4,7 - M2 - DB1) 12,8 ri - (4,7 - M2 - DB1) 14,7 ri - (4,7 - M2 - DB1) 15,7 ri - (4,7 - M2 - DB1) 0,0 con
R 14 - TV5	Tv - cal - 6,5 - sh - 7d Tv - cal - 6,5 - sh - 7d Tv - cal - 6,5 - sh - 7d Tv - cal - 3,5 - sh - 7d Tv - cal - 3,5 - sh - 7d Tv - cal - 3,5 - sh - 7d Tv - cal - 3,5 - sh - 7d Tv - cal - 3,5 - sh - 7d Tv - cal - 6,5 - sh - 7d Tv - cal - 6,5 - sh - 7d Tv - cal - 6,5 - sh - 7d Tv - cal - 6,5 - sh - 7d Tv - cal - 6,5 - sh - 7d Tv - cal - 6,5 - sh - 7d (sem mediador) Tv - cal - 6,5 - sh - 7d	ME - IEt + ICu - HBT/TEMPO	100 con - (4,7 - M2 - DB5) 100 con - (4,7 - M2 - DB5) 11,7 ri - (4,7 - M2 - DB5) 100 con - (4,7 - M2 - DB5) 100 con - (4,7 - M2 - DB5) 100 con - (4,7 - M2 - DB5) 100 con - (4,7 - M2 - DB5) 100 con - (4,7 - M2 - DB5) 100 con - (4,7 - M2 - DB5) 100 con - (4,7 - M2 - DB5) 100 con - (4,7 - M2 - DB5) 100 con - (4,7 - M2 - DB5) 100 con - (4,7 - M2 - DB5) 100 con - (4,7 - M2 - DB5) 0,0 con - 100 con - (4,6 - M2 - DB5) 100 con - (4,7 - M2 - DB5)

	(10 vezes menos mediador) Tv - cal - 6,5 - sh - 7d (10 vezes mais mediador)		
--	---	--	--

1 - Número da bateria de reações - Fungo utilizado:

R representa reação, seguida do número da bateria. As letras seguintes são as iniciais do fungo que está sendo testado, com seu cardinal, sendo Tv = *Trametes versicolor*, Cg = *Chaetomium globosum*, Mis = *Mortierella isabelina*. Bc = *Botrytis cinerea*, Mr = *Mortierella ramaniana*

2 - Componente da cultura enzimática utilizada:

bio = biomassa centrifugada, cal = caldo sobrenadante de centrifugação, who = meio de cultura íntegro, bra = branco/tampão

3 - Forma de aeração:

ar = ar comprimido ; agi = agitação vigorosa ; sh = incubadora.

4 - Meios de crescimento:

ME = Extrato Malte ; YM = Extrato de levedura ; SD = Meio Sabraud.

5 - Indutores:

ICu = Indutor Cobre ; IXi = Indutor Xilidina ; IEt = Indutor Etanol ; IMt = Indutor solução de metais.

6 - Mediadores:

HBT = Mediador Hidroxibenzotriazol ; TMP = Mediador TEMPO

7 - Rendimento/Conversão:

O rendimento ou conversão são do produto nootkatona em relação ao substrato de partida valenceno, onde:

ri = rendimento isolado por cromatografia em coluna seguida de CCD ;

rc = rendimento cromatográfico obtido por integração de espectros de CG/EM (curva de calibração externa de nootkatona);

con = conversão do substrato de partida em % por integração dos espectros de CG/EM.

8 - Tempo de retenção - método cromatográfico e coluna capilar utilizada:

Tempo de retenção é o tempo de retenção cromatográfica (tr) em CG/EM, em minutos;

São dois métodos cromatográficos: M1 e M2, variando somente a rampa cromatográfica (de aquecimento do forno do CG) entre eles. Os métodos estão detalhados no capítulo referente à parte experimental.

São duas colunas cromatográficas utilizadas: DB-5 e DB-1 (detalhes na parte experimental).

9- Utilizada outra linhagem de *Trametes versicolor* (CCT-4495).

10 - Biooxidação testada também com candidato a substrato modelo, o Limoneno. Neste experimento foram testados também outros três microrganismos (Mis): *Mortierella isabelina* (CCT-4054), *Mortierella isabelina* (CCT-3498) e *Mortierella ramaniana* (CCT-4428), que foram experimentos de investigação.

Defeito no termostato da incubadora inviabilizou essa bateria exploratória.

11- Candidato a substrato modelo apresentou decomposição rápida gerando diversos subprodutos, não sendo detectada formação do produto de oxidação esperado.

12 - Sob agitação vigorosa combinada com aeração intensa e sem reposição do volume perdido os frascos a, b, c e g secaram completamente, inviabilizando estas reações, que foram substituídas.

13 - Frascos de reação, aparentemente, sofreram contaminação na incubadora.

14 - Experimento de investigação utilizando duas fases imiscíveis para buscar diminuir efeito da difusão passiva do substrato para o interior do micélio fungal.

A análise dos resultados obtidos nesta etapa permitiu identificar os parâmetros principais das biooxidações com *T. versicolor* e averiguar a viabilidade de testar outros microrganismos. Dos microrganismos investigados, apenas *T. versicolor* e *C. globosum* foram capazes de realizar a biooxidação nas condições testadas. Os testes com molécula modelo (limoneno) foram improdutivos pois esta sofreu decomposição no meio reacional gerando vários sub-produtos, inviabilizando-a como modelo da reação.

Esta primeira etapa do trabalho tornou possível conhecer as principais variáveis envolvidas na realização das biorreações com o fungo *T. versicolor*, sendo dado prosseguimento à investigação utilizando o fungo *C. globosum*.

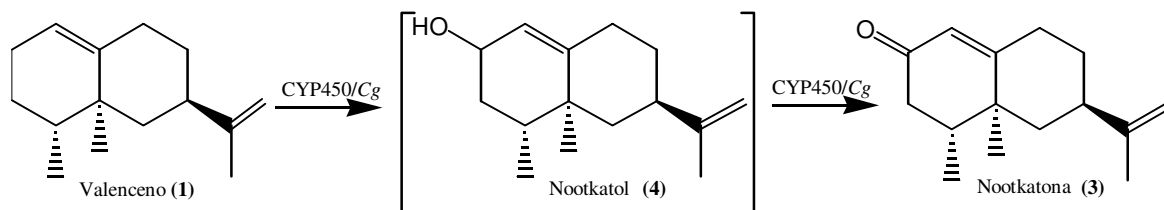


Figura 25 - Esquema da biotransformação de valenceno em nootkatona passando por nootkatol por ação do citocromo P-450 de *C. globosum* ²

A seguir, foram realizados experimentos sob agitação magnética e também mecânica, com e sem aeração externa de ar comprimido, em frascos de 1, 2 e 0,5 litros. (Tabela 5 e Gráfico 1).

**Tabela 5 - Biooxidações com *C. globosum* (via CYP-450) -
Teste de pH, indutor, componente do meio e condições de aeração**

pH	Indutor ¹	Componente do meio utilizado ²	Condições de aeração ³	Rendimento (% w/w) ⁴
3,5	Não	Biomassa	ar comprimido	zero
3,5	Não	Meio íntegro	ar comprimido	zero
5,0	Não	Biomassa	ar comprimido	zero
5,0	Não	Meio íntegro	ar comprimido	zero
6,5	Não	Biomassa	ar comprimido	zero
6,5	Não	Meio íntegro	ar comprimido	zero
3,5	Sim	Biomassa	ar comprimido	zero
3,5	Sim	Meio íntegro	ar comprimido	zero
3,5	Sim	Meio íntegro	agitação vigorosa	zero
5,0	Sim	Biomassa	ar comprimido	2,0
5,0	Sim	Meio íntegro	ar comprimido	3,0
5,0	Sim	Meio íntegro	agitação vigorosa	2,5
6,5	Sim	Biomassa	ar comprimido	1,8
6,5	Sim	Meio íntegro	ar comprimido	1,7
6,5	Sim	Meio íntegro	agitação vigorosa	1,8

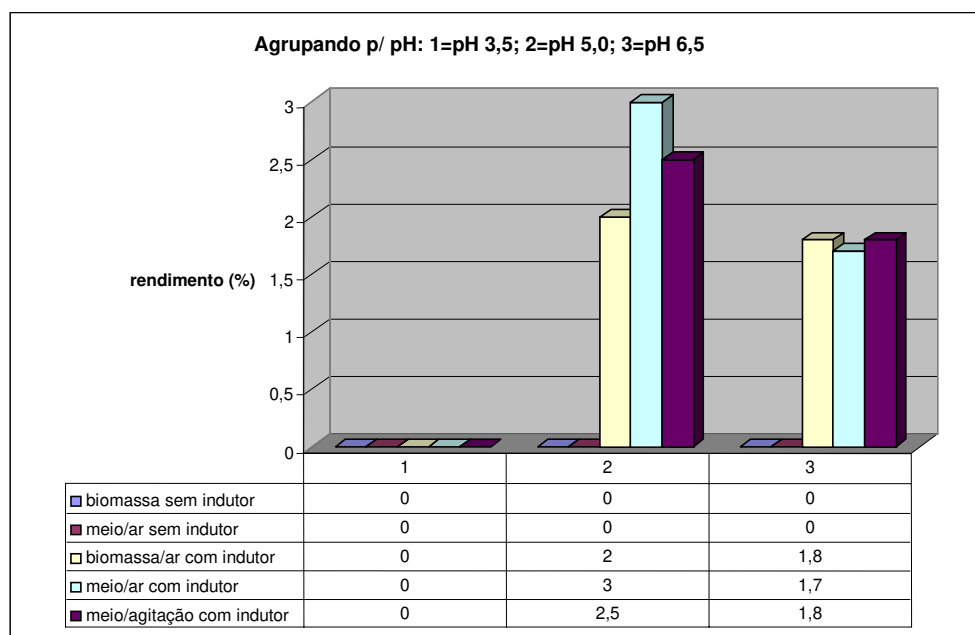
1 - Indutor de CYP-450 - Traços de vários metais: adição de 1 mL.L⁻¹ da seguinte solução: FeCl₃.6H₂O (80 mg.L⁻¹), ZnSO₄.7H₂O (90 mg.L⁻¹), MnSO₄.H₂O (30 mg.L⁻¹), CuSO₄.5H₂O (5 mg.L⁻¹)

2 - Componente do meio utilizado: parte das culturas celulares foi centrifugada a 5.000 RPM por 15 minutos e o precipitado é a biomassa. As demais reações foram realizadas com os meios íntegros, sem centrifugar ou filtrar.

3 - Condições de aeração: alguns experimentos tiveram, além da agitação magnética, um tubo com fluxo de ar comprimido adaptado e fechado com rolha de borracha e o fluxo de saída foi borbulhado em tolueno sob banho de gelo. Os outros foram realizados apenas com agitação vigorosa, sem aeração adicional.

4 - O rendimento foi obtido através de isolamento cromatográfico com sílica *Flash* e CCD (cromatografia em camada delgada - placas preparativas).

Gráfico 1 - Comparação de biooxidações com *C. globosum* em diferentes condições



A análise dos resultados obtidos apontou que a biooxidação ocorreu em baixo rendimento e somente quando foi adicionado coquetel de metais/traços, que atuaram como indutor de atividade do citocromo P-450 (CYP-450). Em pH 3,5 a reação também não ocorreu, mesmo quando foi adicionado indutor, indicando inibição da atividade do complexo CYP-450. A aparente contradição entre alto consumo do substrato de partida e baixa produção do produto final ocorreu devido a uma combinação de decomposição e difusão passiva do substrato para dentro do micélio do fungo, de onde é dificilmente extraído.

Frente ao baixo rendimento obtido com *C. globosum* (Tabela 5 e Gráfico 1), a utilização deste microrganismo foi suspensa e foi retomado o

trabalho com *T. versicolor*, cujos dados obtidos estão reunidos na Tabela 6 e Gráfico 2.

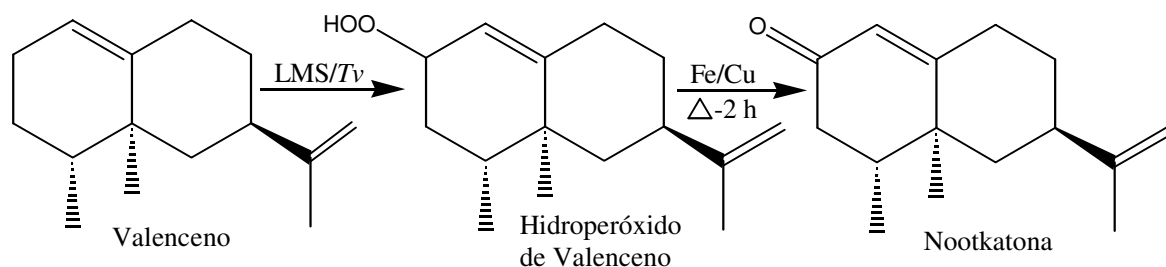


Figura 25 - Esquema da biotransformação de valenceno em nootkatona passando or nootkatol por ação do citocromo P-450 de *C. globosu*

Figura 1 - Valenceno - Hidroperóxido - Nootkatona - Esquema de LMS/Tv

Tabela 6 - Biooxidações com *T. versicolor* (Tv) (via LMS) -

Teste de pH, indutor, componente do meio e condições de aeração

pH	Indutor (CuSO ₄) ¹	Componente do meio utilizado ²	Condições de aeração ³	Rendimento (% w/w) ⁴
3,5	Não	Biomassa	ar comprimido	zero
3,5	Não	Caldo	ar comprimido	zero
5,0	Não	Biomassa	ar comprimido	zero
5,0	Não	Caldo	ar comprimido	zero
6,5	Não	Biomassa	ar comprimido	zero
6,5	Não	Caldo	ar comprimido	zero
3,5	Sim	Biomassa	ar comprimido	8,0
3,5	Sim	Caldo	ar comprimido	11,5
3,5	Sim	Caldo	agitação vigorosa	7,0
5,0	Sim	Biomassa	ar comprimido	10,0
5,0	Sim	Caldo	ar comprimido	11,7
5,0	Sim	Caldo	agitação vigorosa	7,5
6,5	Sim	Biomassa	ar comprimido	11,0
6,5	Sim	Biomassa	agitação vigorosa	9,2
6,5	Sim	Caldo	ar comprimido	15,7
6,5	Sim	Caldo	agitação vigorosa	12,8

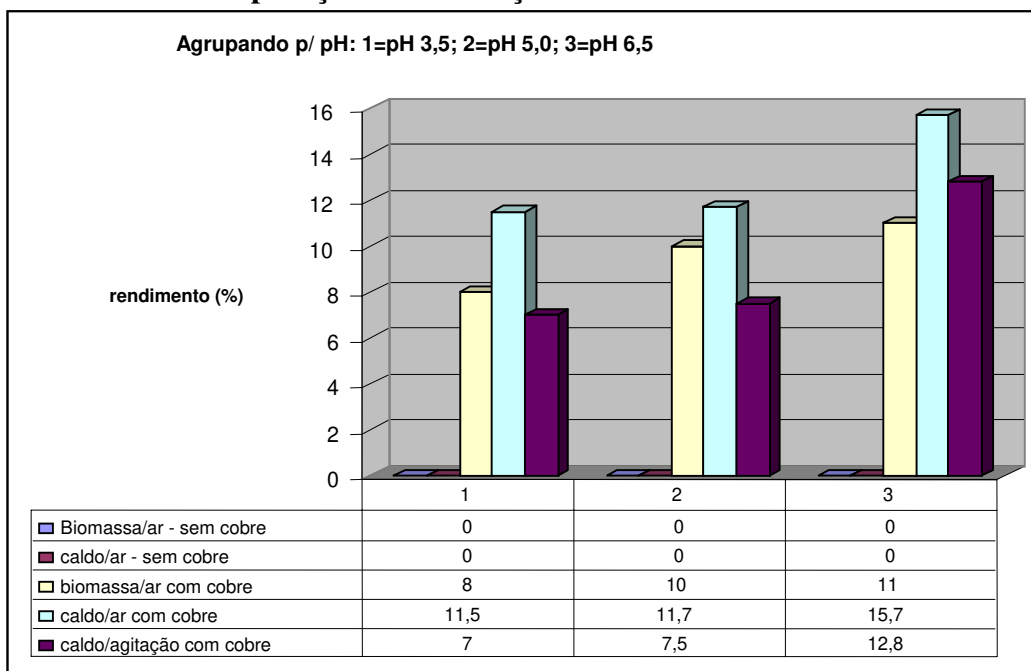
1 - Indutor de lacase - Cobre: adição de CuSO₄ (até 0,4 mM.L⁻¹) durante o crescimento celular, após pré-cultura sem cobre, para induzir atividade de lacase

2 - Componente do meio utilizado: as culturas celulares foram centrifugadas a 5.000 RPM por 55 minutos e o sobrenadante foi chamado de caldo enzimático enquanto o precipitado foi chamado de biomassa.

3 - Condições de aeração: alguns experimentos tiveram um tubo com fluxo de ar comprimido adaptado e fechado com rolha de borracha e o fluxo de saída foi borbulhado em tolueno sob banho de gelo. Os outros foram realizados com agitação vigorosa, sem aeração adicional.

4 - O rendimento (massa produto/massa substrato) foi obtido através de isolamento cromatográfico com sílica *Flash* e CCD, cromatografia em camada delgada (placas preparativas), sendo a massa inicial de substrato igual a 1,5 g.

Gráfico 2 - Comparação de biooxidações com *T. versicolor* em diferentes condições



Estes experimentos mostraram que a adição de indutor durante o crescimento (CuSO_4) foi fundamental para o processo, já que a atividade da lacase foi aumentada de cerca 900 U para 6.000 U (detalhes na parte experimental) e a reação simplesmente não ocorre se o fungo é crescido sem este indutor.

A comparação entre os experimentos com todo o restante das variáveis sendo mantidas constantes menos a forma de aeração, ou seja, comparando aeração externa sob pressão e agitação vigorosa, indicou que a aeração externa sob atmosfera com pressão aumentada elevou o rendimento.

A mesma comparação com todas as variáveis restantes constantes menos o componente do meio utilizado indicou que a melhor forma de realizar as biooxidações é utilizando o caldo enzimático sobrenadante da centrifugação, que produziu os melhores resultados e também apresentou menores dificuldades de separação durante as extrações para análise cromatográfica.

Fazendo a mesma comparação com todas as variáveis restantes constantes exceto o pH percebeu-se que o rendimento foi maior quando o pH foi aumentado mas a diferença entre eles foi pequena (Gráfico 2).

A evolução do trabalho indicou a necessidade de se utilizar ferramentas de modelagem empírica, com a finalidade de determinar as reais interações entre as muitas variáveis envolvidas, assim como determinar quais as mais importantes, o que foi feito através de planejamento fatorial 5^2 (5 fatores/variáveis, cada um destes analisado em dois níveis), e que exigiu 32 experimentos simultâneos,⁵³ impedindo a utilização do procedimento

53. Neto, B.B.; Scarminio, I.S.; Bruns, R.E., Como fazer experimentos: pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria, Editora da UNICAMP, Campinas, **2001**, Capítulo 5 -Como construir modelos empíricos, 201-300.

experimental até então utilizado, com agitação magnética e aeração externa e por isso as reações foram realizadas em agitador orbital, sem aeração externa.

Os experimentos foram realizados então em número maior mas em escala menor (Erlenmeyer de 125 mL), baseados no planejamento fatorial 5^2 (Tabela 7, Gráficos 3 e 4), buscando determinar quantitativamente o efeito de cada uma das muitas variáveis experimentais envolvidas no processo que já haviam sido exploradas na primeira etapa do trabalho.

Tabela 7 - Biooxidações com *T. versicolor* (via LMS) utilizando planejamento fatorial 5^2 para triagem de variáveis

Reação	Variáveis e níveis ¹	Rendimento % ⁷	Reação	Variáveis e níveis ¹	Rendimento % ⁷
1	-----	14,7	17	-----+	13,8
2	+-----	15,7	18	+----+	12,9
3	-+----	16,9	19	-+---+	14,4
4	++----	16,9	20	++---+	10,4
5	--+--	0,3	21	--++-	5,3
6	+--+--	0,3	22	+--+--	3,4
7	-++--	0,3	23	-++--	0,4
8	++++--	0,4	24	++++--	3,2
9	---+-	16,3	25	---++	13,5
10	+---+-	14,5	26	+---++	15,5
11	-+++-	9,9	27	-+++-	11,1
12	+++--	12,3	28	+++--	16,9

13	--++-	0	29	--++++	6,9
14	+---+	0,3	30	+-----	5,2
15	-++++	0,4	31	-+++++	3,7
16	++++-	0,6	32	+++++	7

1 - As variáveis e seus níveis são (na ordem em que aparecem nos símbolos acima, na coluna Variáveis e níveis):

VARIÁVEL	NÍVEL -	NÍVEL +
Cobre ²	0,04 mM	0,50 mM
Xilidina ³	0	1,0 mM
pH ⁴	3,5	6,5
HBT ⁵	2 mM	20 mM
[Lac] ⁶	10:20	20:10

2 - O Cobre varia de nível "de 1 em 1"

3 - A Xilidina varia de nível "de 2 em 2"

4 - O pH varia de nível "de 4 em 4", como as cores mostram:

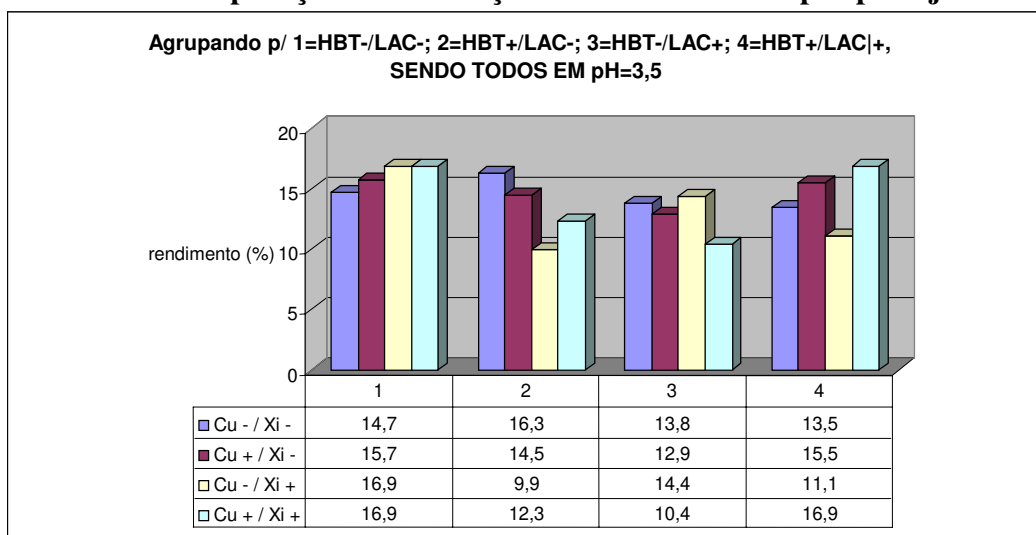
Em vermelho destacados os pHs - (3,5) e em azul os pHs + (6,5)

5 - O HBT varia de nível "de 8 em 8"

6 - A [Lac] varia de nível "de 16 em 16" e, portanto, de 1 a 16, a [Lac] é - e de 17 a 32 é [Lac] +

7 - Rendimento calculado por padronização interna usando mentol como padrão interno.

Gráfico 3 - Comparação de biooxidações com *T. versicolor* por planejamento fatorial ¹



1 - Os fatores e seus níveis são:

Cu - = 0,04 mM.L⁻¹

Xi - = ausente

HBT - = 2 mM.L⁻¹

[Lac] - = 10 mL caldo / 20 mL tampão

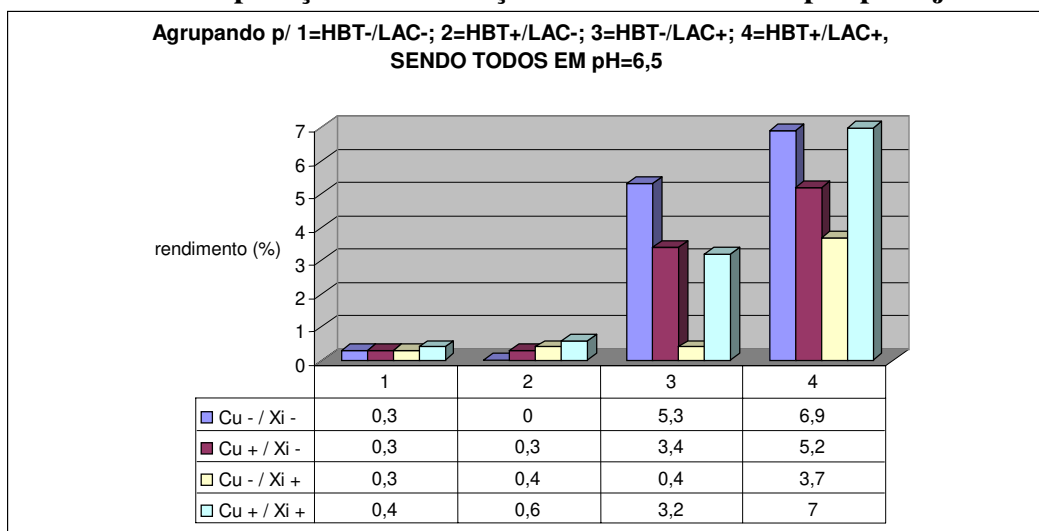
Cu + = 0,5 mM.L⁻¹

Xi + = 1,0 mM.L⁻¹

HBT + = 20 mM.L⁻¹

[Lac] + = 20 mL caldo / 10 mL tampão

Gráfico 4 - Comparação de biooxidações com *T. versicolor* por planejamento fatorial¹



1 - Os fatores e seus níveis são:

Cu - = 0,04 mM.L⁻¹

Cu + = 0,5 mM.L⁻¹

Xi - = ausente

Xi + = 1,0 mM.L⁻¹

HBT - = 2 mM

HBT + = 20 mM

[Lac] - = 10 mL caldo / 20 mL tampão

[Lac] + = 20 mL caldo / 10 mL tampão

A análise destes dados (Tabela 7, Gráficos 3 e 4) indicou que ocorre um compromisso entre a degradação do substrato de partida pelo sistema enzimático e a produção do produto de biooxidação.

A reação apresentou variação acentuada no rendimento quando o pH foi alterado, o que determinou a forma como os dados foram agrupados (Gráficos 3 e 4), enfatizando essa característica. De fato, o pH foi o fator que apresentou maior importância, sendo os outros menos relevantes. A variação da concentração de lacase é o segundo fator mais importante, sendo a concentração de mediador, do sal de cobre e a presença de xilidina, menos relevantes. A presença de xilidina e uma maior concentração de cobre produziu elevação da atividade da enzima mas esse aumento não representou um crescimento significativo no rendimento, aparentemente por interferir também no equilíbrio entre formação de produto e degradação do substrato.

O rendimento foi mais baixo quando o pH é 6,5 (Gráfico 4) mas ocorreu aumento destes valores quando a concentração da enzima foi aumentada, o que indicou que a elevação do pH do meio poderia estar inibindo a ação da enzima mas este efeito pode ser atenuado quando a concentração desta é bem maior.

O experimento com 5 fatores e dois níveis mostrou que dois fatores são os mais relevantes (pH e concentração de lacase) e que a condição ótima é quando a inibição da enzima é mínima (pH 3,5) e quando a degradação do substrato é mínima (menor concentração de enzima). Buscando ajustar mais precisamente os valores destes níveis (valor de pH e concentração de lacase) foi construído um planejamento fatorial em estrela, com duas variáveis em cinco níveis (Tabela 8 e Gráfico 5)⁵⁴, com estes dois fatores mais relevantes, para viabilizar o traçado da superfície de resposta da biooxidação com o sistema LMS de *T. versicolor*/HBT.

Tabela 8 - Biooxidações com *T. versicolor* (via LMS) com 2 fatores em 5 níveis*, para construir a modelagem “em estrela”, e poder traçar a superfície de resposta

Reação	pH ¹	[Lacase] ²	Rendimento (%) ⁴
1	-	-	15,2
2	+	-	0,3
3	-	+	13,3
4	+	+	4,4
5	0	0	11,1
6	- $\sqrt{2}$	0	6,4
7	0	+ $\sqrt{2}$	0
8	+ $\sqrt{2}$	0	0
9	0	- $\sqrt{2}$	16,2

* - Os dois fatores e seus 5 níveis avaliados são os mesmos do Gráfico 5, da superfície de resposta (a seguir) e são:

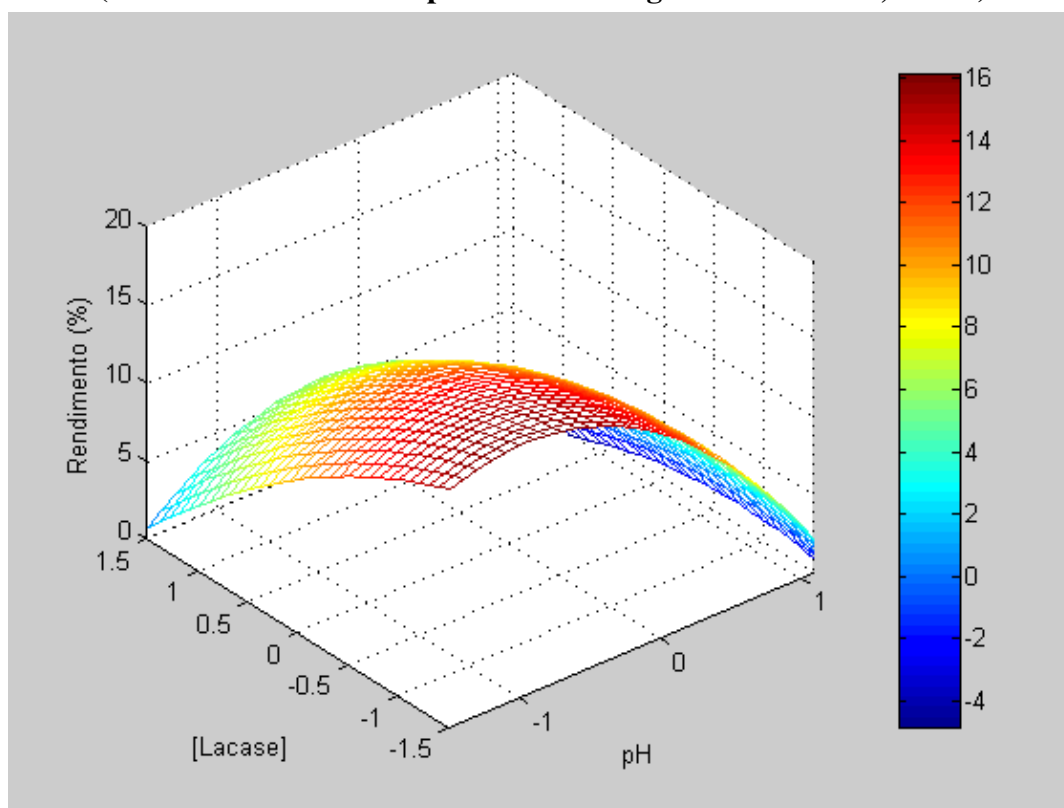
54. Neto, B.B.; Scarminio, I.S.; Bruns, R.E., Como fazer experimentos: pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria, Campinas, **2001**, Editora da UNICAMP, Cap. 6 - Andando na superfície de resposta, 251-263.

2 Fatores	5 Níveis				
	$-\sqrt{2}$	- 1	0	+ 1	$+\sqrt{2}$
1 - pH	2,88	3,5	5	6,5	7,12
2 - [Lacase] ³	0,26	0,33	0,5	0,66	0,73

3 - os valores de [Lacase] correspondem à relação entre caldo enzimático e solução tampão.

4 - Rendimento calculado por padronização interna usando mentol como padrão interno.

Gráfico 5. Gráfico da Superfície de Resposta da Bioxidação com *Trametes versicolor* (escala em coordenadas padronizadas seguindo a tabela 8, acima)



Buscando aprofundar o conhecimento sobre o sistema, particularmente sobre os mediadores, foi realizado estudo comparativo entre o mediador HBT e o mediador TEMPO (Tabela 9 e Gráfico 6).

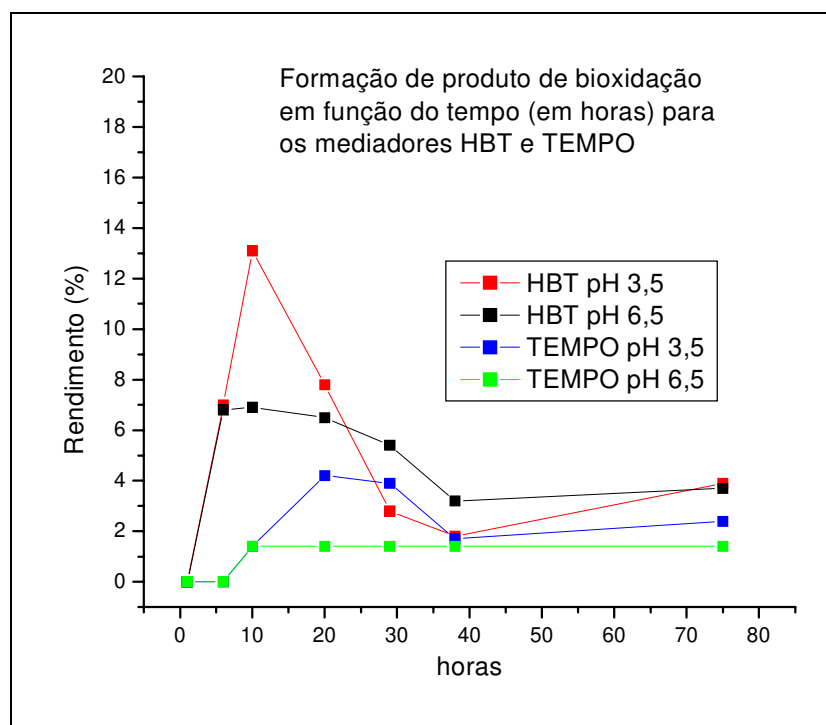
Tabela 9 - Biooxidações com *T. versicolor* (via LMS)
Comparando eficiência de dois mediadores : HBT e TEMPO

Mediador / pH ¹	Rendimento (% w/w) em função do tempo (h) ²						
	1 h	6 h	10 h	20 h	29 h	38 h	75 h
HBT							
pH 3,5	0	7,0	13,1	7,8	2,8	1,8	3,9
pH 6,5	0	6,8	6,9	6,5	5,4	3,2	3,7
TEMPO							
pH 3,5	0	0	1,3	4,2	3,9	1,7	2,4
pH 6,5	0	0	1,4	1,4	1,4	1,4	1,4

1 - As outras variáveis foram mantidas constantes nesta comparação, segundo os valores otimizados no planejamento fatorial.

2 - Rendimento calculado por padronização interna usando mentol como padrão interno.

Gráfico 6 - Biooxidações em agitador orbital utilizando HBT e TEMPO



Os experimentos utilizando o mediador TEMPO apresentaram rendimento (4 %) muito inferior ao HBT, e também exigiram maior tempo de reação, confirmando a lentidão deste radical neste tipo de sistema quando utilizado sem a adição de compostos de efeito sinérgico⁵⁵, embora as condições utilizadas tenham sido aquelas otimizadas para HBT, após muitas reações anteriores, o que mantém a possibilidade de que TEMPO possa realizar a reação em maior rendimento sob condições otimizadas.

Portanto, a análise minuciosa dos diversos resultados obtidos nas biooxidações realizadas apontou para um sistema bastante complexo, onde muitas variáveis estão envolvidas na obtenção do máximo rendimento.

A complexidade do sistema residiu no fato de não haver dados conclusivos na literatura sobre o mecanismo completo que opera, além de tratar-se de mistura de muitos componentes, muitos vindos do metabolismo do fungo, onde podem ocorrer distintas interações entre todos os integrantes, cada um deles sendo potencialmente um contribuinte para reações laterais indesejadas e desconhecidas.

Os próprios mediadores radicalares podem reagir de distintas maneiras dependendo das condições empregadas em cada caso, o que torna a sistematização teórica bastante complexa. A interação entre estes mediadores e a lacase ainda é motivo de pesquisa em outros grupos de estudo.

Nossos resultados indicaram atividade enzimática já que a reação não ocorreu em rendimentos significativos quando um dos componentes do sistema LMS não está presente (seja a enzima ou o mediador, Tabela 4).

As condições ótimas encontradas utilizando planejamento fatorial “em estrela” e modelagem da superfície de resposta para reações em incubador

55. Kulys, J., Vidziunaite, R. *J. Mol. Catal. B: Enzymatic* **2005**, Kinetics of laccase-catalysed TEMPO oxidation, 79-83.

orbital sem fluxo externo de oxigênio foram: pH 5,0 , [HBT] 20 mM, “[Lac]” 0,26 e adição de cobre ao meio de cultura como indutor durante o crescimento mostraram que estas variáveis são fundamentais. Destas variáveis estudadas e sob estas condições, o pH mostrou-se o fator mais importante, sendo que a reação praticamente não ocorreu quando o pH passa de 7,0 , indicando inibição do cluster de cobres tipo 2 e tipo 3.

A adição de cobre como indutor se mostrou uma necessidade fundamental do processo. Foi fator determinante para que a reação ocorresse, não havendo oxidação quando não houve adição de cobre. A adição de 2,5-xilidina como indutor de atividade enzimática de lacase mostrou ser eficiente neste sentido (aumentou a atividade média de 6.700 U para 10.300 U), porém, o aumento proporcionado pela adição da xilidina não foi determinante para o aumento do rendimento das biooxidações. De fato, o cálculo das interações entre os fatores mostrou que não faz diferença significativa para o aumento do rendimento o uso ou não da xilidina. O efeito de interação para o fator xilidina é menor que 0,8 , não sendo determinante para o aumento do rendimento. Além disso, o uso da xilidina traz também a desvantagem da adição de um composto extremamente tóxico ao processo, que pretende produzir bioflavorizante para consumo humano. A adição de etanol não apresentou sequer aumento detectável na atividade enzimática. O etanol continuou sendo utilizado mas apenas para aumentar a solubilidade do substrato no meio aquoso.

As reações realizadas sob pressão de aeração externa (ar comprimido) apresentaram uma menor dependência do pH quando comparadas com as reações realizadas em agitador orbital. Aparentemente, a inibição da redução do oxigênio molecular no cluster de cobres tipo 2 e tipo 3 é menos significativa quando o pH é elevado mas é garantido fluxo constante e elevado

de oxigênio. Apesar de não termos realizado modelagem para experimentos com aeração adicional, vários destes experimentos foram realizados e indicaram que a pressão de oxigênio é uma variável importante no processo reacional, que poderia trazer uma contribuição importante para a elucidação do mecanismo da reação. Constatamos que a velocidade das reações aumenta quando a pressão de oxigênio é aumentada, indicando que este deve tomar parte de uma etapa importante do ciclo catalítico, senão da própria etapa determinante da velocidade (o que não temos condições de afirmar). Determinar o papel da pressão de oxigênio nesta etapa da reação e a importância desta no processo geral poderia trazer importantes luzes sobre o mecanismo reacional. Limitações impostas pelo próprio processo (não foi possível montar aeração adicional dentro do agitador orbital) impedem a realização do número de experimentos necessários em planejamento fatorial em tempo hábil para esse tipo de condição, o que nos permitiria traçar a superfície de resposta com experimentos sob aeração externa.

A análise da composição dos *traps* com tolueno gelado mostrou que o substrato não estava sendo perdido por evaporação, já que o máximo que foi recuperado do *trap* com tolueno gelado foi de 5 % do total inicial de valenceno adicionado e, ainda assim, somente quando a aeração foi extremamente intensa, o que não foi a condição usual. O objetivo deste aprisionamento do vapor em banho de gelo era justamente confirmar a manutenção do substrato no frasco reacional após muitas horas sob aeração constante. O nível de solução foi mantido constante através da adição de mais solução tampão, já que a aeração constante e intensa causou evaporação acelerada da solução sob agitação.

A maior parte dos experimentos com aeração externa foi executada à temperatura ambiente mas foram também executados sob banho-maria com

temperatura controlada (30 °C), mostrando não haver diferenças significativas entre a execução das reações à temperatura ambiente (cerca de 20 °C) ou à temperatura constante nesta faixa (30 °C).

4 - CONCLUSÃO

A utilização do sistema LMS de *T. versicolor* mostrou ser uma ferramenta viável para a obtenção de nootkatona a partir de valenceno, apesar de obtermos rendimento inferior (17 % em agitador orbital em pequena escala e 15 % em escala preparativa sob aeração externa) ao maior valor descrito na literatura (patente, 25 %, sob aeração)³⁸, o que diminui a viabilidade de nosso procedimento para utilização em maior escala. Apesar disso, os resultados foram condizentes com os obtidos em reações semelhantes descritos na literatura científica, onde o rendimento de sistemas LMS dificilmente ultrapassa os 15 %.²⁴ Neste sentido, o objetivo do trabalho foi alcançado, sendo determinados os parâmetros ótimos (pH 5,0 , [HBT] 20 mM, “[Lac]” 0,26 e adição de cobre ao meio de cultura como indutor durante o crescimento) para a máxima obtenção do produto de biooxidação nas condições estudadas.

A comparação entre a biooxidação utilizando o sistema lacase/mediador de *T. versicolor* e a biooxidação utilizando o complexo enzimático do citocromo P-450 de *C. globosum* mostrou que o sistema lacase/mediador produz resultados superiores em termos de rendimento (15 % contra 3 %). A comparação entre os mediadores HBT e TEMPO mostrou que o primeiro é mais eficiente para a execução deste sistema LMS.

A análise minuciosa das diversas reações efetuadas utilizando o sistema LMS permitiu concluir que existe uma cadeia de reações simultâneas, onde as variáveis estudadas interferem em reações distintas desta cadeia dependendo do grau de alteração desta variável, resultando num equilíbrio entre a geração do produto de biooxidação desejado e a decomposição do substrato de partida por reações paralelas. A interferência de outras enzimas (algumas

competitivas) e outras substâncias presentes no caldo enzimático devem estar interferindo na reação desejada. O estudo do sistema LMS utilizando a enzima lacase isolada ao invés do caldo enzimático bruto pode ser uma alternativa para o aumento do rendimento da reação, já que as reações paralelas e indesejadas seriam eliminadas. Tal opção é uma alternativa viável em curto prazo já que a enzima lacase isolada já está comercialmente disponível (Aldrich).

A escolha de métodos de planejamento fatorial e de modelagem por superfície de resposta, buscando descrever algumas variáveis fundamentais, assim como seus graus de interação, permitiram um maior aprofundamento do conhecimento do sistema e uma perfeita descrição do efeito de cada variável estudada.

5 - PARTE EXPERIMENTAL

5.0 - Roteiro da parte experimental

5 - PARTE EXPERIMENTAL.....	55
5.1 - Procedimento típico de biorreação utilizando Trametes versicolor	56
5.2 - Procedimento típico de biorreação utilizando Chaetomium globosum.....	61
5.3 - Espectrometria de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN ¹ H).....	62
5.4 - Espectrometria de Ressonância Magnética Nuclear de Carbono (RMN ¹³ C).....	63
5.5 - Cromatografia Gasosa acoplada ao Espectrômetro de Massas (CG/EM)	64
5.6 - Espectrofotometria no Infravermelho (IV)	65
5.7 - Rotação óptica - $[\alpha]_D^{20}$	66
5.8 - Experimentos controle	66
5.9 - Aprisionamento de gases em Trap com tolueno gelado	67
5.10 - Microrganismos utilizados.....	67
5.11 - Meios de cultura	67
5.12 - Soluções	68
5.13 - Atividade de lacase	69
5.14 - Acompanhamento cromatográfico.....	71
5.15 - Curvas de calibração externa e curva de padrão interno	72
5.16 - Procedimento de extração em baterias de reações de planejamento fatorial.....	73
5.17 - Esterilização	74
5.18 - Outros.....	75

5.1 - Procedimento típico de biorreação utilizando *Trametes versicolor*

A linhagem do fungo *T. versicolor* fornecida em “slants” (tubos de ensaio contendo meio nutriente sólido em posição inclinada, inoculados com propágulos da linhagem) foi reativada transferindo-se (em condições assépticas, com auxílio de uma alça de platina em capela de fluxo laminar) uma pequena porção celular para um Erlenmeyer de 250 mL contendo 50 mL do caldo nutriente ME (“*Malte Extract broth*”), previamente autoclavado a 121° C por 15 minutos (Figura 26). As células foram pré cultivadas a 28°C por 7 dias, em agitador orbital (150 rpm) e então toda a suspensão celular foi transferida (em condições assépticas, em capela de fluxo laminar) diretamente para um erlenmeyer estéril de 2 L contendo 1 L de caldo nutriente ME (Figura 26).

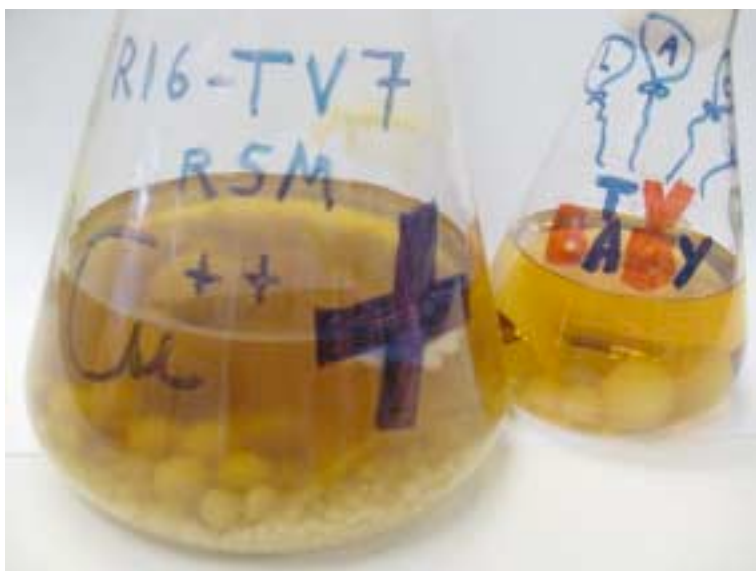


Figura 26 - Foto de meio de crescimento *T. versicolor* com indutor cobre (R16-TV7, RSM, Cu^{++} na foto) no início do crescimento e no pré-cultivo (TV-BABY, na foto)

Após incubação a 28°C por 21 dias em agitador orbital (150 rpm), o meio de crescimento (Figura 27) foi centrifugado a 5000 rpm por 55 minutos.



Figura 27 - Foto de meio de crescimento *T. versicolor* com indutor cobre após crescimento por 20 dias, pronto para centrifugação

Certa quantidade de células, geralmente 100 g, em peso úmido foi colocada em frascos Erlenmeyers de 2 L, ressuspensas em 1,5 L de solução tampão citrato em pH apropriado (3,5; 5,0; 6,5 ou 8,0 sendo que estes valores não variam significativamente durante o período reacional) seguindo-se da adição de mediador apropriado (HBT ou TEMPO), emulsificante (Tween 80) e de substrato de partida valenceno (comumente 1,5 g) previamente diluído em 5 mL de etanol absoluto. Alternativamente à utilização da biomassa, foi utilizado o caldo enzimático sobrenadante da centrifugação, usualmente 150-250 mL de caldo para 1,5 L de solução tampão citrato.

Após a adição de todos os componentes o meio reacional foi colocado em agitador magnético por até 7 dias (Figura 28).



Figura 28 - Foto de Biooxidações LMS/TvL sob agitação magnética, com aeração externa de ar comprimido, sob pressão e com fluxo de saída sendo retido em *trap* com tolueno gelado (na foto, sem banho de gelo), temperatura ambiente



Figura 29 - Foto de biooxidações LMS/TvL sob agitação mecânica, com aeração de ar comprimido, pressão atmosférica e com temperatura controlada em banho maria

Alíquotas periódicas (0,5 mL) foram retiradas, extraídas com acetato de etila, metiladas com 1 mL de solução de diazometano utilizando banho de gelo, tratadas com sulfato de sódio e analisadas por CG/EM.

As biooxidações para o planejamento fatorial foram realizadas em agitador orbital utilizando frascos Erlenmeyers de 125 ou 250 mL, com adição de 100 mg de substrato de partida valenceno em 10,20 ou 30 mL de caldo enzimático com 10, 20 ou 30 mL de solução tampão citrato de pH apropriado (Figura 30).



Figura 30 - Bateria de biooxidações simultâneas LMS/TV por planejamento fatorial

Ao final do período reacional reação foi extraída em funil de separação (Figura 31) com acetato de sódio (5x70 mL) ou em extrator contínuo (Figura 32) com dicloro metano (3 a 5 dias) e evaporou-se o solvente à pressão

reduzida em rotavapor. O extrato foi eluído por coluna de alumina básica para remoção dos ácidos oriundos da cultura celular e depois foi secado com sulfato de sódio anidro, sendo purificado por cromatografia em coluna de sílica gel *flash* eluída com gradiente de hexano:acetato (0 a 50 %) e por cromatografia em camada delgada (CCD), com eluente de acetato:hexano 20 %).



Figura 31 - Foto de extração de bioxidação em funil de separação



Figura 32 - Foto de extração de bioxidação em extrator contínuo

5.2 - Procedimento típico de biorreação utilizando *Chaetomium globosum*

A linhagem do fungo *C. globosum* fornecida em “slants” (tubos de ensaio contendo meio nutriente sólido em posição inclinada, inoculados com propágulos da linhagem) foi reativada transferindo-se (em condições assépticas, com auxílio de uma alça de platina em capela de fluxo laminar) uma pequena porção celular para um frasco Erlenmeyer de 500 mL contendo 100 mL do caldo nutriente SDB (*Sabourad dextrose broth*) previamente autoclavado a 121° C por 15 minutos. Após incubação a 28°C por 5 dias em agitador orbital (150 rpm) foi adicionado tampão em pH apropriado (3,5; 5,0; 6,5 ou 8,0) e do substrato de partida valenceno (comumente 0,5 g) previamente diluído em 1 mL de etanol absoluto. Após a adição de todos os componentes o meio reacional foi levado ao agitador orbital a 28 °C por até 7 dias. Alíquotas (0,5 mL) diárias foram tomadas, extraídas com acetato de etila, metiladas com 1 mL de solução de diazometando utilizando banho de gelo, tratadas com sulfato de sódio e analisadas por CG/EM. Ao final do período reacional a reação foi extraída em funil de separação com acetato de etila (5x70 mL) ou em extrator contínuo com dicloro metano (3 a 5 dias) e evaporou-se o solvente a pressão reduzida em rotavapor. O extrato foi eluído por coluna de alumina básica para remoção dos ácidos oriundos da cultura celular e, então, secado com sulfato de sódio anidro, sendo purificado por cromatografia em coluna de sílica gel *flash* eluída com gradiente de hexano:acetato (0 a 50 %) e por cromatografia em camada delgada (CCD), com eluente de acetato:hexano 20%).

5.3 - Espectrometria de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN ^1H)

Os espectros de RMN ^1H foram registrados no espectrômetro Varian INOVA-500 (499,883 MHz).

Os deslocamentos químicos (δ) de hidrogênio foram registrados em ppm utilizando como referência interna tetrametilsilano (TMS, $\delta = 0,00$) e referência externa CDCl_3 ($\delta = 7,27$).

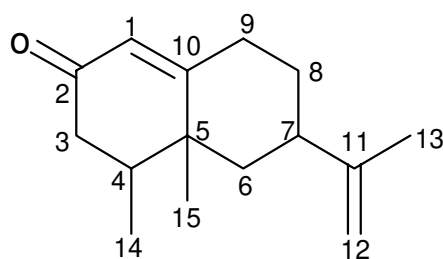


Figura 33 - Numeração adotada para os carbonos da molécula de nootkatona (3) na atribuição dos espectros de RMN⁵⁶

Nootkatona (**3**): (Apêndice - Espectros E.01 e E.06)

^1H RMN (500 MHz, CDCl_3 , Me_4Si)

δ : 0,97 (3H, d, $J=5,5$ Hz, H-14), 1,12 (3H, s, H-15), 1,54 (1H, H-4), 1,73 (3H, s, H-13), 1,84 (2H, H-6), 1,98 (2H, H-8), 2,20 (2H, H-9), 2,32 (2H, H-3), 2,55 (1H, H-7), 4,77 (1H, dq, H-12), 4,79 (1H, dq, H-12), 5,76 (1H, s, H-1).

56. a) Kraker, J.W.; Schurink, M.; Franssen, M.C.R.; König, W.A.; Groot, A.; Bouwmeester, H.J. *Tetrahedron* **2003**, Hydroxylation of sesquiterpenes by enzymes from chicory roots, 59, 409-418. b) Wong, L.L.; Sowden, R.J.; Yasmin, S.; Ress, N.H.; Bell, S.G. *Org. Biomol. Chem.* **2005**, Biotransformation of the sesquiterpene (+)-valencene by cytochrome P450_{CAM} and P450_{BM-3}, 3, 57-64. c) Sakamaki, H.; Itoh, K.; Taniai, T.; Kitanaka, S.; Takagi, Y.; Chai, W.; Horiuchi, C.A. *J. Mol. Catal. B: Enzymatic* **2005**, Biotransformation of valencene by cultured cells of *Gynostemma Pentaphyllum*, 32, 103-106. d) Berger, R.G.; Kaspera, R.; Krings, U.; Nanzad, T. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2004**, Bioconversion of (+)-valencene in submerged cultures of the ascomycete *Chaetomium globosum*, 67, 477-483.

Dado de RMN de (3) obtido da literatura:⁵⁷

¹H RMN (400 MHz, CDCl₃, Me₄Si)

δ: 0,97 (3H, s, H-14), 1,12 (3H, s, H-15), 1,74 (3H, s, H-13), 4,70 (2H, d, *J*=8 Hz, H-12), 5,77 (1H, s, H-1).

5.4 - Espectrometria de Ressonância Magnética Nuclear de Carbono (RMN ¹³C)

Os espectros de RMN ¹³C e DEPT foram registrados no espectrômetro Varian INOVA-500 (125,696 MHz).

Os deslocamentos químicos de carbonos foram registrados em ppm, sendo δ = 0,00 para o TMS e δ = 77,0 para CDCl₃.

Nootkatona (3):

¹³C RMN (500 MHz, CDCl₃, Me₄Si) (Apêndice - Espectro E.02)

δ: 14,9 (q, C-14), 16,8 (q, C-15), 20,7 (q, C-13), 31,6 (t, C-6), 32,9 (t, C-8), 39,3 (s, C-5), 40,3 (d, C-4), 40,4 (d, C-7), 42,0 (t, C-3), 43,9 (t, C-9), 109,2 (t, C-12), 124,6 (d, C-1), 149,0 (s, C-10), 170,4 (s, C-11), 199,6 (s, C-2).

DEPT 90/135 (500 MHz, CDCl₃, Me₄Si) (Apêndice - Espectro E.03)

δ: 15,3 (CH₃, C-14), 17,2 (CH₃, C-15), 21,4 (CH₃, C-13), 32,0 (CH₂, C-6), 33,3 (CH₂, C-8), 39,7 (C, C-5), 40,7 (CH, C-4), 40,8 (CH, C-7), 42,4 (CH₂, C-3), 44,3 (CH₂, C-9), 109,6 (CH₂, C-12), 124,9 (CH, C-1), 149,4 (C, C-10), 170,8 (C, C-11), 199,9 (C, C-2).

dado de RMN de (3) obtido da literatura 1:⁵⁷

¹³C RMN (400 MHz, CDCl₃, Me₄Si)

δ: 14,9 (CH₃, C-14), 16,9 (CH₃, C-15), 20,8 (CH₃, C-13), 31,6 (CH₂, C-6), 33,6 (CH₂, C-8), 39,3 (C, C-5), 40,3 (CH, C-4), 40,5 (CH, C-7), 42,1 (CH₂, C-3),

57. Sakamaki, H.; Itoh, K.; Taniai, T.; Kitanaka, S.; Takagi, Y.; Chai, W.; Horiuchi, C.A. *J. Mol. Catal. B: Enzymatic*. **2005**, Biotransformation of valencene by cultured cells of *Gynostemma pentaphyllum*, 32, 103-106.

43,9 (CH₂, C-9), 109,3 (CH₂, C-12), 124,7 (CH, C-1), 149,1 (C, C-10), 170,5 (C, C-11), 199,6 (C, C-2).

5.5 - Cromatografia Gasosa acoplada ao Espectrômetro de Massas (CG/EM)

Os espectros de massa foram obtidos em um dois espectrômetros: um aparelho Shimadzu GCMS QP5000 com coluna capilar de sílica fundida J & W Scientific DB-1 (30m x 0,25mm x 0,25µm) e um aparelho HP 5970-MSD com coluna capilar de sílica fundida DB-5 (30m x 0,25mm x 0,33µm). Ambos aparelhos foram operados com energia de ionização de 70 eV e injetores tipo “split” com hélio de alta pureza sendo utilizado como gás de arraste. A faixa de massas foi de 50 a 500 Da. As injeções das amostras foram de 1 µL na concentração de 1 a 5 mg/mL.

Fragmentação de massas de **(3)**: (Apêndice- Espectros de massas: E.13 e E.19)
EM m/z (%): 218 [M⁺] (26), 175 (58), 161 (72), 147 (100), 121 (76), 105 (50), 91 (72), 79 (63).

dado de fragmentação de **(3)** obtido da literatura 1⁵⁸
EM m/z (%): 218 [M⁺] (19), 175 (50), 161 (70), 147 (100), 121 (87), 105 (67), 91 (82), 79 (84).

Seguem as condições dos métodos utilizados para as análises de cromatografia gasosa:

58. Maupin, C; Gary, O. et al., United States Patent Application, **2004**, 20040077713, A1.

Método 1: gás de arraste: hélio; temperaturas iniciais: forno: 80 °C; injetor: 250 °C; detector: 270 °C. pressão na cabeça da coluna: 100 KPa; fluxo da coluna: 1,5 mL/min; *split ratio*: 1/30; fluxo total: 29,8 mL/min.

Programação da temperatura da coluna cromatográfica, método ARTHUR1:

Taxa de aquecimento (°C/min)	Temperatura (°C)	Tempo de equilíbrio (min.)
-	80	3
40	280	10

Tempo total: 18 minutos.

Método 2: gás de arraste: hélio; temperaturas iniciais: forno: 200 °C; injetor: 260 °C; detector: 270 °C; pressão na cabeça da coluna: 63,0 KPa; fluxo da coluna: 0,6 mL/min; *split ratio*: 1/30; fluxo total: 19,5 mL/min.

Programação da temperatura da coluna cromatográfica, método ARTRAP1:

Taxa de aquecimento (°C/min)	Temperatura (°C)	Tempo de equilíbrio (min.)
-	200	3
40	280	10

Tempo total: 12,0 minutos.

5.6 - Espectrofotometria no Infravermelho (IV)

Os espectros no infravermelho foram obtidos em um espectrômetro BOMEM MB Series Hartmann & Braun em filmes sobre cela NaCl.

IV de valenceno (**1**): (Apêndice - Espectro IV: E.04)

(filme sobre janela de cristal de NaCl): estiramento C=O ausente, $\nu = 2926 \text{ cm}^{-1}$ (estiramentos das metilas externas aos anéis).

IV de nootkatona (**3**): (Apêndice - Espectro IV: E.05)

(filme sobre janela de cristal de NaCl): $\nu = 1670 \text{ cm}^{-1}$ (estiramento C=O em conjugação com dupla ligação interna aos anéis), 2934 cm^{-1} (estiramentos das metilas externas aos anéis).

5.7 - Rotação óptica - $[\alpha]_D^{20}$

Os valores de rotação óptica foram determinados em um polarímetro LEP A-2 Carl Zeiss com lâmpada de sódio ($\lambda = 589 \text{ nm}$, precisão de $0,005^\circ$).

$[\alpha]_D^{20}$ de (**3**):

$[\alpha]_D^{20}$: $+187,0^\circ$ (c 0,45 CHCl_3)

dados de rotação óptica de (**3**) obtidos da literatura:⁵⁷

$[\alpha]_D^{20}$: $+191,0^\circ$ (c 0,45, CHCl_3)

5.8 - Experimentos controle

Com o objetivo de comprovar se a formação de hidroperóxido de valenceno (**2**) promovido pelo fungo *T. versicolor*, é um processo enzimático ou quimicamente induzido por algum componente do meio reacional, foram efetuados dois tipos de experimentos controle, com ausência total de enzima

lacase (na forma de biomassa ou de caldo sobrenadante) e com ausência total de mediador. Todos os outros parâmetros foram mantidos iguais ao procedimento típico de biorreação (ítem 5.1), não sendo constatada reação quando algum dos componentes está ausente.

5.9 - Aprisionamento de gases em *Trap* com tolueno gelado

Reações sob aeração externa de ar comprimido foram seladas com rolha de borracha e o fluxo de saída de ar foi borbulhado em um *trap* de vidro com tolueno gelado em banho de gelo. (Figura 28, porém, na foto, aparece sem o banho de gelo).

5.10 - Microrganismos utilizados

Os microrganismos utilizados neste trabalho foram adquiridos na Fundação Tropical “André Tosello” e são:

Trametes versicolor (CCT-4521), *Chaetomium globosum* (CCT-3249) *Botrytis cinerea* (CCT-1252), *Trametes versicolor* (CCT-4495), *Mortierela isabellina* (CCT-3498), *Mortierela isabellina* (CCT-4054), *Mortierela ramaniana* (CCT-4428).

5.11 - Meios de cultura

Meio SDB (*Saboraud dextrose broth*):

Para o preparo de 1 L de meio SDB, pesaram-se 10 g de dextrose anidra e 5 g de peptona bacteriológica e dissolveu-se em 1 L de água destilada e autoclavou-se.

Meio MEB (*Malte extract broth*)

Para o preparo de 1 L de meio MEB, pesaram-se 20 g de extrato de malte, 10 g de peptona bacteriológica, 10 g de dextrose anidra e dissolveu-se em 1 L de água destilada e autoclavou-se.

5.12 - Soluções

5.12.1 - Soluções tampão

Composição das soluções tampão:

Tampão citrato de sódio/ácido cítrico (1 L, para os meios de cultura):

pH 3,5: 26,0 g citrato/ 37,0 g ácido.

pH 5,0: 30 g citrato/10 g ácido.

pH 6,5: 40,0 g citrato/4,0 g ácido.

Tampão ácido cítrico/fosfato de sódio dibásico (1L, para medição espectrofotométrica de atividade de lacase):

pH 5,0: 19,2 g ácido cítrico e 53,6 g de fosfato de sódio dibásico em 1 L de água destilada.

5.12.2 - Solução etérea de diazometano

A solução etérea de diazometano foi preparada utilizando o procedimento descrito em Organic Syntheses, Collective Volume 2, p 165.

O procedimento geral é a reação de acetamida com bromo e NaOH produzindo acetil metil uréia, que é hidrolisada a metil uréia com HCl e, em seguida, é reagida com nitrito de sódio/ácido nitroso, produzindo nitroso metil uréia (sólido, explosivo a 30° C). Nitroso metil uréia é, cuidadosamente (vidraria específica, gelo seco e acetona, além de banho de gelo), reagida com KOH em éter para produzir o gás diazometano (explosivo sob aquecimento, luz ou contato com superfícies ásperas) que, por sua vez, é borbulhado em éter gelado, ao abrigo da luz, onde fica retido e estocado em freezer.

5.12.3 - Solução indutora pra *Chaetomium globosum*

A solução indutora de atividade do complexo citocromo P-450 de *C. globosum* foi preparada com as seguintes quantidades: $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O} = 80 \text{ mg.L}^{-1}$, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O} = 90 \text{ mg.L}^{-1}$, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O} = 30 \text{ mg.L}^{-1}$, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O} = 5 \text{ mg.L}^{-1}$.

5.13 - Atividade de lacase

1 U foi definido como 1 μM de seringaldazina sendo oxidado para quinona, por minuto, a 25°C , no comprimento de onda $\lambda = 525 \text{ nm}$, por litro de caldo enzimático.⁵⁹

Foi preparada uma solução alcoólica de seringaldazina 1 mM.L^{-1} (3,6 mg diluídos em 10 mL de etanol absoluto) e esta foi usada para acompanhamento espectrofotométrico da atividade de lacase dos meios de cultura. Utilizando-se pipetador automático (pois a mistura deve ser rápida), misturou-se 300 μL de tampão pH 5,0, 600 μL do caldo enzimático a ser testado e 100 μL da solução de seringaldazina e a reação de oxidação foi acompanhada por 5 minutos em comprimento de onda $\lambda = 525 \text{ nm}$, sendo monitorada a formação do produto de oxidação da seringaldazina. (Apêndice - Espectro UV= E.07). O caldo enzimático foi diluído em balões volumétricos de 50, 250 e 500 mL, de acordo com a atividade encontrada, de maneira a atingir a diluição que permitisse a medição da reação de oxidação de seringaldazina, já que o caldo original não permite tal medição, pois a concentração de enzima é tão alta que a mudança de coloração (fica violeta no visível, $\lambda = 525 \text{ nm}$, $\epsilon=65.000$) é instantânea.

59. Leonowicz, A.; Grzywnowicz, K. *Enzym. Microb. Technol.*, 1981, Quantitative estimation of laccase forms in some white-rot fungi using syringaldazine as a substrate, 3, 55-58.

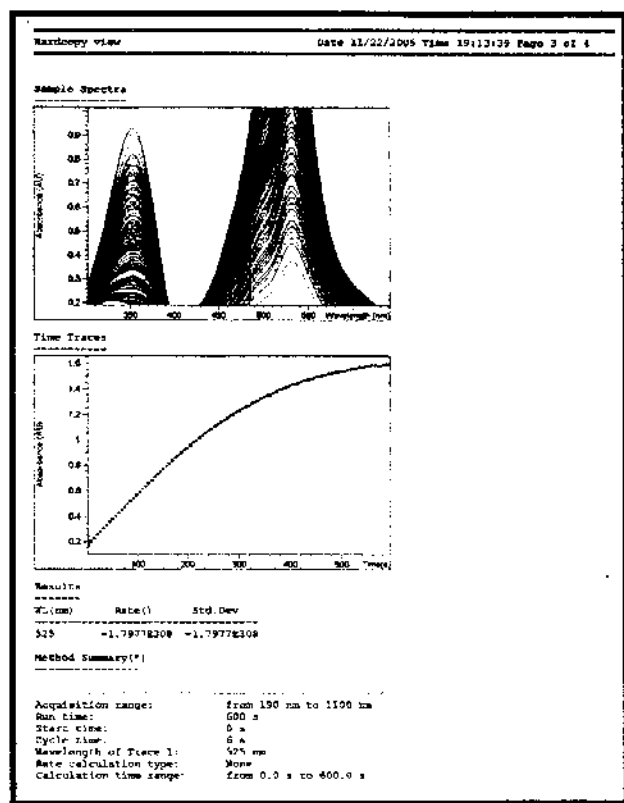


Figura 34 - Reação monitorada em UV para atividade de lacase

5.14 - Acompanhamento cromatográfico

As cromatografias em coluna (CC) foram realizadas com sílica gel 230-400 mesh, da marca Merck. O diâmetro e a altura das colunas variaram de acordo com a quantidade de material de partida. A proporção de sílica utilizada foi de aproximadamente 30 vezes o peso da amostra a ser purificada. As eluições dos compostos foram obtidas empregando-se solventes orgânicos em ordem de polaridade crescente. As placas cromatográficas em camada

delgada (CCD) foram preparadas com sílica gel G (15 g) e GF₂₅₄ (25 g) da marca Merck, com 0,50 mm de espessura, sobre placas de vidro 20 x 20 cm.

Todas as purificações realizadas em coluna foram acompanhadas em placa de CCD da marca Merck sobre suporte de alumínio com filme de sílica gel 60 F₂₅₄. A detecção nas placas dos compostos com grupos cromóforos foi feita utilizando-se a irradiação ultravioleta no equipamento marca Spectronics Corporation Wesbury, modelo Spectroline CM-10 Fluorescence analysis cabinet com irradiação no comprimento de onda de $\lambda = 254$ nm e/ou $\lambda = 365$ nm.

5.15 - Curvas de calibração externa e curva de padrão interno

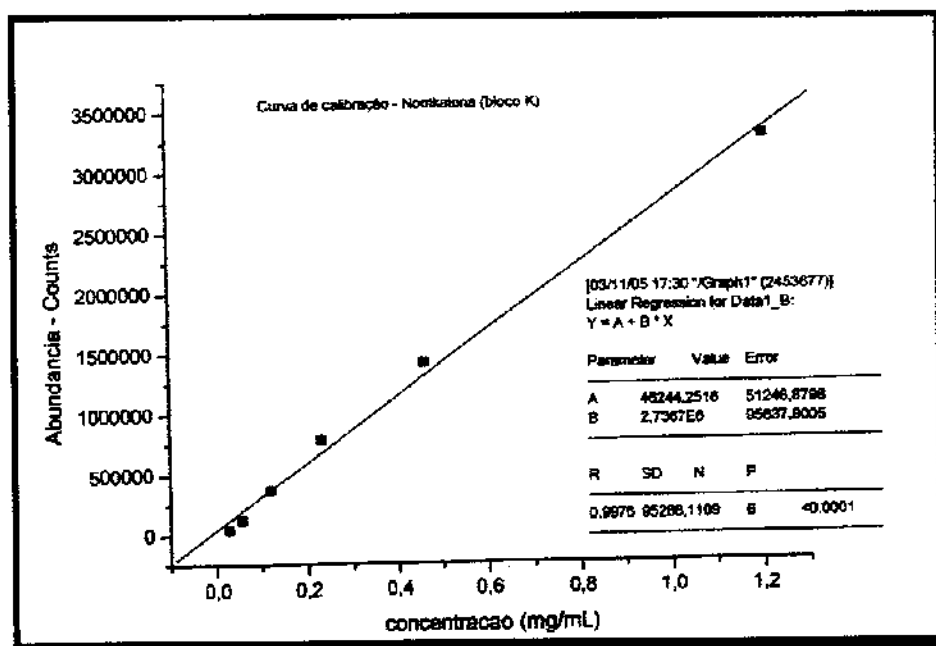
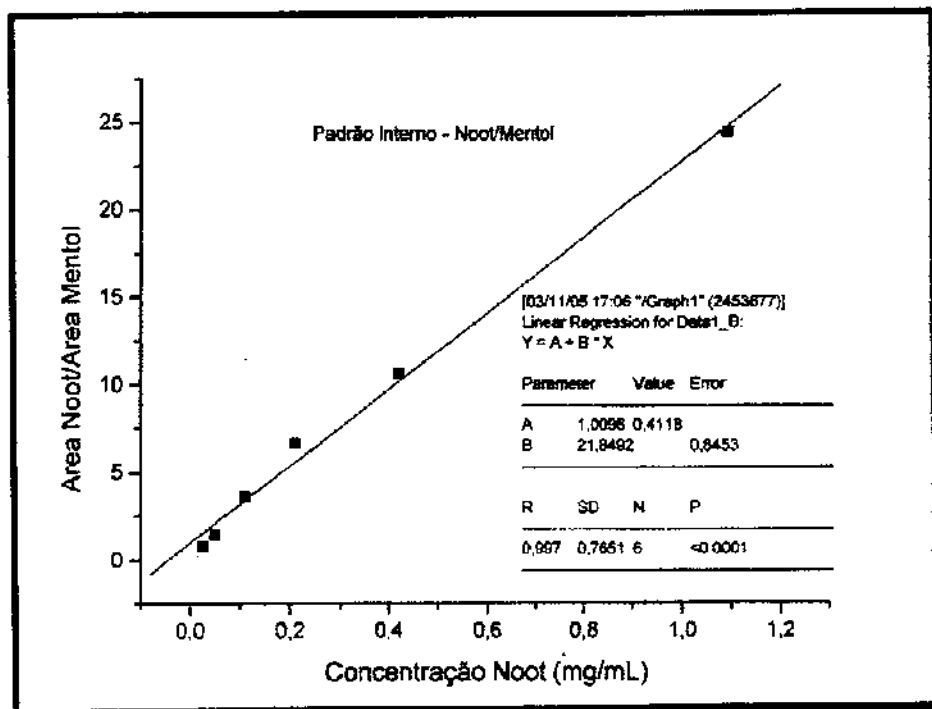


Gráfico 7 - Curva de calibração cromatográfica



5.16 - Procedimento de extração em baterias das reações para planejamento fatorial

As baterias das reações para planejamento fatorial foram amostradas e analisadas sempre simultaneamente, para evitar maiores variações devido a erros aleatórios. As amostras (0,5 mL) foram retiradas e transferidas com pipetador automático para frascos penicilina (10 mL), sendo extraídas 5 vezes com 0,5 mL de acetato de etila, utilizando agitador de tubos vortex, sendo o extrato orgânico transferido para frascos penicilina com sulfato de sódio e destes para frascos penicilina limpos e vazios, para então serem tratados com

solução etérea de diazometano, sob forte exaustão e banho de gelo (devido ao risco de explosão) e, posteriormente, secados novamente com sulfato de sódio anidro e analisadas por CG/EM.

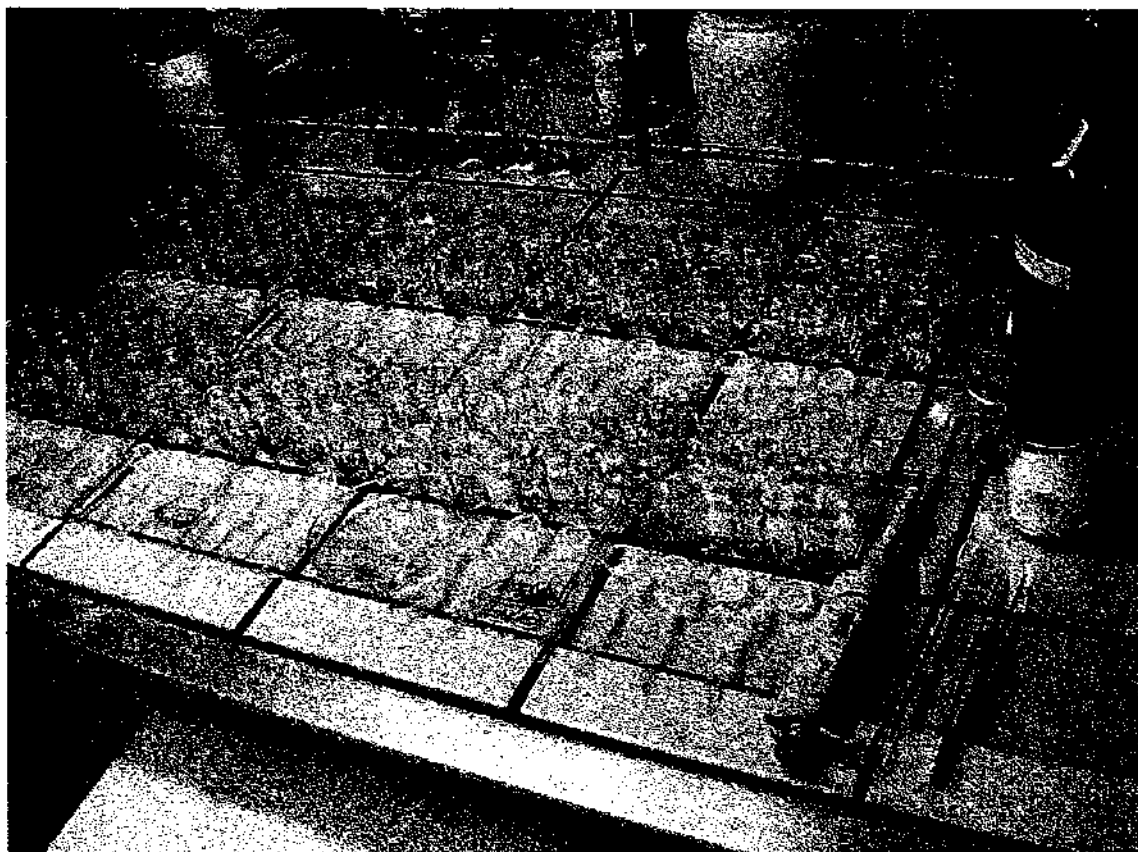


Figura 35 - Extrações de aliquotas de biooxidações em bateria

5.17 - Esterilização

Os meios de cultura, soluções, placas de Petri, tubos de ensaio, pipetas e outros materiais utilizados em contato direto com os microrganismos foram autoclavados (120°C, 15 min) ou então esterilizados em chama de bico de Bunsen ou sob radiação UV ou em soluções de etanol 70 % ou hipoclorito de sódio 0,2 %.

5.18 - Outros

Os reagentes e solventes utilizados foram analiticamente puros e/ou indicados pelos fabricantes para o uso em laboratório. Sempre que necessário os reagentes foram submetidos aos métodos gerais de purificação (Perrim & Perrim, 1980).

Placas de Petri (vidro ou plástico), tubos de ensaio (vários diâmetros com ou sem tampa), tubo Eppendorf, “Schott Duran”, pipeta automática, pipeta Pasteur, ponteiras, agulha de inoculação, alça de platina, lâminas de vidro, autoclave Vac Cicloman, Forno microondas, capela de fluxo laminar VECO, Balança Mettler Monobloc PB8001s, Balança analítica Mettler Monobloc AB204s, Incubadora Marconi MA 420, geladeira e freezer Cònsul.

6 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Labinger, J.A.; Bercaw, J.E. *Nature* **2002**, Understanding and exploiting C–H bond activation, *417*, 507-514.
2. Berger, R.G.; Kaspera, R.; Krings, U.; Nanzad, T. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2005**, Bioconversion of (+)-valencene in submerged cultures of the ascomycete *Chaetomium globosum*, *67*, 477-483.
3. Chappell, J. *Trends Plant Sci.* **2004**, Valencene synthase - a biochemical magician and harbinger of transgenic aromas, *9*, 6, 266-269.
4. Janssens, L.; De pootera, H.L.; Schampa, N.M.; Vandamme, E.J. *Process Biochem.* **1992**, Production of flavours by microorganisms, *27*, 4, 195-215.
5. Sauer, A.M.; Fronczek, F.R.; Zhu, B.C.R.; Crowe, W.E.; Henderson, G.; Laine, R.A. *Acta Cryst.* **2003**, The sesquiterpenoid nootkatone and the absolute configuration of a dibromo derivative, *C59*, 254-256.
6. Erdtman, H.; Hirose, Y. *Acta. Chem. Scand.* **1962**, *16*, 1311-1314.
7. Zhu, B.C.R.; Henderson, G.; Chen, F.; Fei, H.; Laine, R.A. *J. Chem. Ecol.*, **2001**, Evaluation of Vetiver Oil and Seven Insect-Active Essential Oils Against the Formosan Subterranean Termite, *27*, 1617-1625.
- 8 - Zhu, B.C.R.; Henderson, G.; Chen, F.; Fei, H.; Maistrello, L.; Laine, R.A. *J. Chem. Ecol.* **2001**, Nootkatone is a Repellent for Formosan Subterranean Termite (*Coptotermes formosanus*), *27*, 523-531.
9. Lohezic, L.D.F.; Marigny, K.; Doucet, M.; Javaudin, L. *Therapie* **2002**, Grapefruit juice and drugs: a hazardous combination ?, *57*, 5, 432-445.
10. Shimomura, S.; Wanwimolruk, S.; Chen, J.J. *Pharmacy Times* **2003**, Drug Interactions with Grapefruit Juice: An Evidence-Based Overview, 919-926.
11. Cameron, M.D.; Timofeevski, S.; Aust, S.D. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2000**, Enzymology of *Phanerochaete chrysosporium* with respect to the degradation of recalcitrant compounds, *54*, 751-758.

12. Solomon, E.I.; Sundaram, U.M.; Zhang, H.H.; Hedman, B.; Hodgson, O. *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, Spectroscopic Investigation of Peroxide Binding to the Trinuclear Copper Cluster Site in Laccase: Correlation with the Peroxy-Level Intermediate and Relevance to Catalysis, *119*, 12525-12540.

13. Xu, F. *Biochemistry* **1996**, Oxidation of Phenols, Anilines, and Benzenethiols by Fungal Laccases: Correlation between Activity and Redox Potentials as Well as Halide Inhibition, *35*, 7608-7614.

14. Yoshida, H. *J. Chem. Soc.* **1883**, Chemistry of lacquer (Urushi).Part I. Communication from the Chemical Society of Tokio, *43*, 472-486.

15. Piontek, K.; Antorini, M.; Choinowski, T. *J. Biol. Chem.* **2002**, Crystal Structure of a Laccase from the Fungus *Trametes versicolor* at 1,90-Å Resolution Containing a Full Complement of Coppers, *277*, 40, 37663-37669.

16. Evans, C.S. *FEMS Microbiol. Lett.* **1985**, Laccase activity in lignin degradation by *Coriolus versicolor* *in vivo* and *in vitro* studies, *27*, 339-343.

17. Bourbonnais, R.; Paice, M.G. *FEBS Lett.* **1990**, Oxidation of non-phenolic substrates. An expanded role for laccase in lignin biodegradation, *267*, 99-102.

18. Durán, N.; Rosa, M.A.; D'Annibale, A.; Gianfreda, L. *Enzym. Microb. Technol.* **2002**, Applications of laccases and tyrosinases (phenoloxidases) immobilized on different supports: a review, *31*, 910.

19. Have, R.; Teunissen, P.J.M. *Chem. Rev.* **2001**, Oxidative Mechanisms Involved in Lignin Degradation by White-Rot Fungi, *101*, 3397-3413.

20. Bourbonnais, R.; Paice, M.G. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **1992**, Demethylation and delignification on kraft pulp by *Trametes versicolor* in presence of 2,2'-azinobis-(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonate), *36*, 823-827.

21. Potthast, A.; Rosenau, T.; Chen, C.L.; Gratzl, J.S. *J. Org. Chem.* **1995**, Selective Enzymatic Oxidation of Aromatic Methyl Groups to Aldehydes, *60*, 4320-4321.

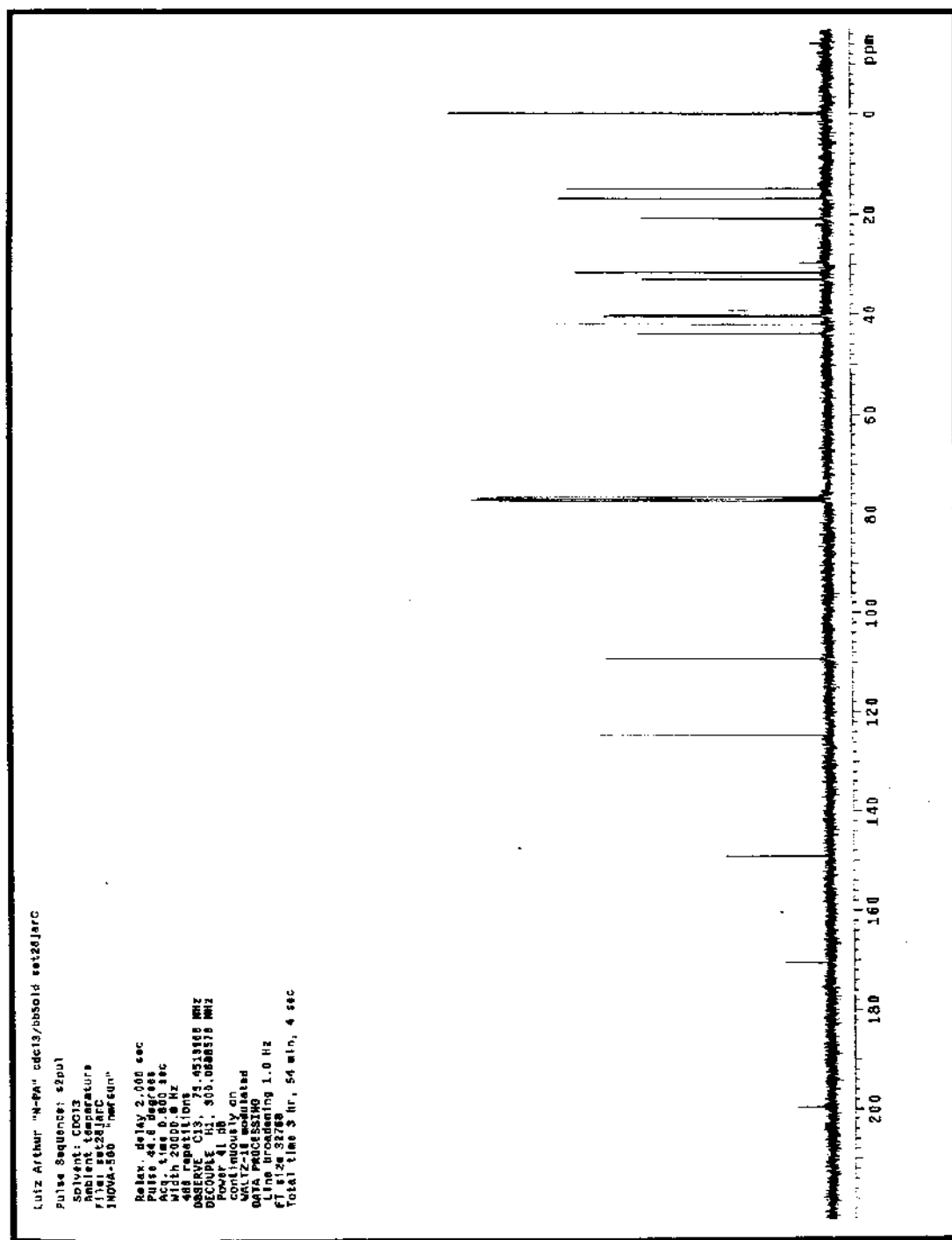
22. Xu, F. *J. Biol. Chem.* **1997**, Effects of Redox Potential and Hydroxide Inhibition on the pH Activity Profile of Fungal Laccases, *272*, 2, 924-928.

23. Cantarella, G.; Galli, G.; Gentili, C. *J. Mol. Catal. B: Enzymatic* **2003**, Free radical versus electron-transfer routes of oxidation of hydrocarbons by laccase/mediator systems, Catalytic or Stoichiometric procedures, 22, 135-144.
24. Banci, L.; Ciofi-Baffoni, S.; Tien, M. *Biochemistry* **1999**, Lignin and Mn Peroxidase-Catalyzed Oxidation of Phenolic Lignin Oligomers, 10, 38, 3205-3210.
25. Astolfi, P.; Brandi, P.; Galli, C.; Gentili, P.; Gerini, M.F.; Greci, L.; Lanzalunga, O. *New J. Chem.* **2005**, New mediators for the enzyme laccase: mechanistic features and selectivity in the oxidation of non-phenolic substrates, 29, 10, 1308-1317.
26. Fabbrini, M.; Galli, C.; Gentili, P. *J. Mol. Catal. B: Enzymatic* **2002**, Comparing the catalytic efficiency of some mediators of laccase, 16, 231-240.
27. Messerschmidt, A. "Multi-copper Oxidases" 1997, World Scientific, Singapore, referência retirada de: Garavaglia, S.; Cambria, M.T.; Miglio, M.; Ragusa, S.; Iacobazzi, V.; Palmieri, F.; D'Ambrosio, C.; Scaloni, A.; Rizzi, M. *J. Mol. Biol.* **2004**, 342, 1519-1531.
28. Garavaglia, S.; Cambria, M.T.; Miglio, M.; Ragusa, S.; Iacobazzi, V.; Palmieri, F.; D'Ambrosio, C.; Scaloni, A.; Rizzi, M. *J. Mol. Biol.* **2004**, The Structure of *Rugidoporus lignosus* Laccase Containing a Full Complement of Copper Ions, Reveals an Asymmetrical Arrangement for the T3 Copper Pair, 342, 1519-1531.
29. Xu, F.; Berka, R.M.; Wahleithner, J.A.; Nelson, B.A.; Shuster, J.R.; Brown, S.H. et al. *Biochim. J.* **1998**, Site-directed mutations in fungal laccase: effect on redox potential, activity and pH profile, 334, 63-70.
30. Mayer, A.M.; Staples, R.C. *Phytochemistry* **2002**, Laccase: new functions for an old enzyme, 60, 551-565.
31. Arends, I.W.C.; Li, Y.X.; Ausan, R.; Sheldon, R.A. *Tetrahedron* **2006**, Comparison of TEMPO and its derivatives as mediators in laccase catalysed oxidation of alcohols, 62, 6659-6665.

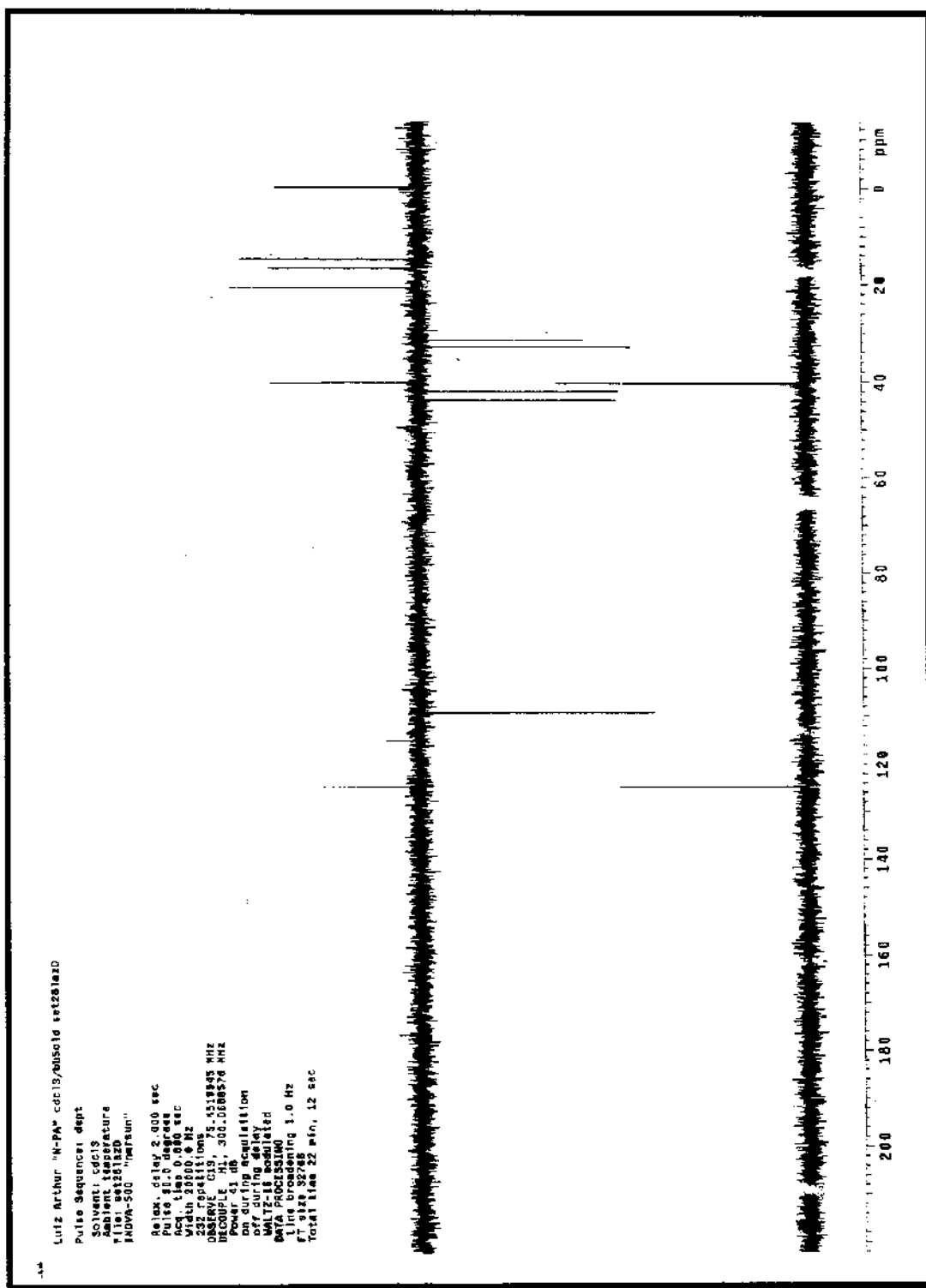
32. Burton, S.G. *Curr. Org. Chem.* **2003**, Laccases and Phenol Oxidases in Organic Synthesis - a Review, 7, 1317-1331.
33. Solomon, E.I.; Sundaram, U.M.; Machonkin, T.E. *Chem. Rev.* **1996**, Multicopper Oxidases and Oxygenases, 96, 7, 2563-2606.
34. Tekere, M.; Mswaka, A.Y.; Zvauya, R.; Read, J.S. *Enzym. Microb. Tech* **2001**, Growth, dye degradation and ligninolytic activity studies on Zimbabwean white rot fungi, 28, 420-426.
35. Bourbonnais, R.; Paice, M.G.; Freiermuth, B.; Bodie, E. *App. Environ. Microbiol.* **1997**, Reactivities of Various Mediators and Laccases with Kraft Pulp and Lignin Model Compounds, 63, 4627-4632.
36. Srebotnik, E.; Hammel, K.E. *J. Biotechnol.* **2000**, Degradation of nonphenolic lignin by the laccase/1-hydroxybenzotriazole system, 81, 179-188.
37. Johannes, C.; Majcherczyk, A. *App. Environ. Microbiol.* **2000**, Natural Mediators in the Oxidation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons by Laccase Mediator Systems, 66, 524-538.
38. Huang et al. Process for the preparation of nootkatone by laccase catalysis. US Patent 6.200.786, **2001**.
39. Jonas, U.; Hammer, E.; Schauer, F.; Bollag, J. *Biodeg.* **1998**, Transformation of 2-hydroxydibenzofuran by laccases of the white rot fungi *Trametes versicolor* and *Pycnoporus cinnabarinus* and characterization of oligomerization products, 8, 5, 321-327.
40. Xu, H.; Lai, Y.Z.; Slomczynski, D.; Nakas, J.P.; Tanenbaum, S.W. *Biotech. Lett.* **1997**, Mediator-assisted selective oxidation of lignin model compounds by laccase from *Botrytis cinerea*, 19, 10, 957-960.
41. Eggert., C.; Temp. U.; Eriksson, K.E.L. *Appl. Environ. Microbiol.* **1996**, The ligninolytic system of the white rot fungus *Pycnoporus cinnabarinus*: purification and characterization of the laccase, 62, 115-1158.

42. Galhaup, C.; Haltrich, D. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2001**, Enhanced formation of laccase activity by the white-rot fungus *Trametes pubescens* in the presence of copper, *56*, 225-232.
43. Lee, I.Y.; Jung, K.H.; Lee, C.H.; Park, Y.H. *Biotechnol. Lett.* **1999**, Enhanced production of laccase in *Trametes versicolor* by addition of ethanol, *21*, 965-968.
44. Minussi, R.C. Tese de Doutorado, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Unicamp, Campinas, Brasil, **2002**, Produção, Purificação, Caracterização e Aplicação Industrial de Lacase Fúngica, 42-48.
45. Yablokv, V.A. *Rus. Chem. Rev.* **1980**, The Mechanisms of the Rearrangements of Peroxides, *49*, 9, 833-842.
46. Tortella, G.R.; Diez, M. C.; Durán, N. *Crit. Rev. Microbiol.* **2005**, Fungal Diversity and Use in Decomposition of Environmental Pollutants, *31*, 197-212.
47. Means, J.C.; Ward, S.G.; Hasset J.J., Banwart, W.L. *Environ. Sci. Technol.* **1980**, Sorption of polynuclear aromatic hydrocarbons by sediments and soils, *14*, 1524-1528.
48. Collins, P.J.; Kotterman, M.J.; Field, J.A.; Dobson, A.D. *Appl. Environ. Microbiol.* **1996**, Oxidation of anthracene and benzo(a)pyrene by laccases of *Trametes versicolor*, *62*, 4563-4567.
49. Johannes, C.; Majcherczyk, A.; Hüttermann, A. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **1996**, Degradation of anthracene by laccase of *Trametes versicolor* in the presence of different mediator compounds, *46*, 313-317.
50. Majcherczyk, A.; Johannes, C.; Hüttermann, A. *Enzyme Microb. Technol.* **1998**, Oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) by laccase of *Trametes versicolor*, *22*, 335-341.
51. Gibson, D.T.; Subramanian, V. "Microbial degradation of organic compounds", Marcel Dekker, Inc, New York, **1984**, Microbial degradation of aromatic hydrocarbons, 181-252.

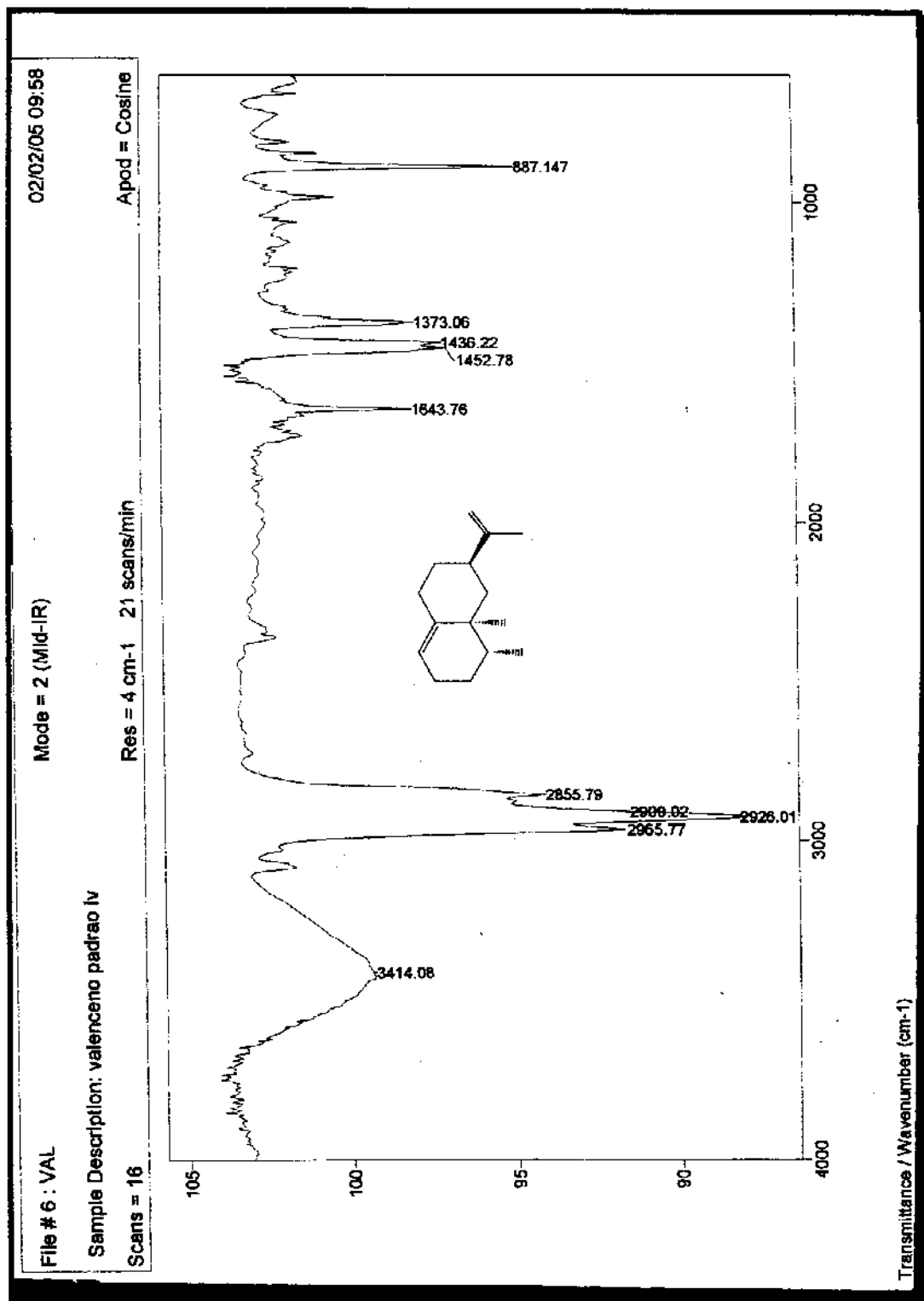
52. Cherry, J.R.; Fidantsef, A.L. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2003**, Directed evolution of industrial enzymes: an update, *14*, 438-443.
53. Neto, B.B.; Scarminio, I.S.; Bruns, R.E., Como fazer experimentos: pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria, Campinas, **2001**, Editora da UNICAMP, Cap. 5 - Como construir modelos empíricos, 201-300.
54. Neto, B.B.; Scarminio, I.S.; Bruns, R.E., Como fazer experimentos: pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria, Campinas, **2001**, Editora da UNICAMP, Cap. 6 - Andando na superfície de resposta, 251-263.
55. Kulys, J., Vidziunaite, R. *J. Mol. Catal. B: Enzymatic* **2005**, Kinetics of laccase-catalysed TEMPO oxidation, 79-83.
56. a) Kraker, J.W.; Schurink, M.; Franssen, M.C.R.; König, W.A.; Groot, A.; Bouwmeester, H.J. *Tetrahedron* **2003**, Hydroxylation of sesquiterpenes by enzymes from chicory roots, *59*, 409-418. b) Wong, L.L.; Sowden, R.J.; Yasmin, S.; Ress, N.H.; Bell, S.G. *Org. Biomol. Chem.* **2005**, Biotransformation of the sesquiterpene (+)-valencene by cytochrome P450_{CAM} and P450_{BM-3}, *3*, 57-64. c) Sakamaki, H.; Itoh, K.; Taniai, T.; Kitanaka, S.; Takagi, Y.; Chai, W.; Horiuchi, C.A. *J. Mol. Catal. B: Enzymatic* **2005**, Biotransformation of valencene by cultured cells of *Gynostemma Pentaphyllum*, *32*, 103-106. d) Berger, R.G.; Kaspera, R.; Krings, U.; Nanzad, T. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2004**, Bioconversion of (+)-valencene in submerged cultures of the ascomycete *Chaetomium globosum*, *67*, 477-483.
57. Sakamaki, H.; Itoh, K.; Taniai, T.; Kitanaka, S.; Takagi, Y.; Chai, W.; Horiuchi, C.A. *J. Mol. Catal. B: Enzymatic*. **2005**, Biotransformation of valencene by cultured cells of *Gynostemma pentaphyllum*, *32*, 103-106.
58. Maupin, C; Gary, O. et al., United States Patent Application, **2004**, 20040077713, A1.
59. Leonowicz, A.; Grzywnowicz, K. *Enzym. Microb. Technol.* **1981**, Quantitative estimation of laccase forms in some white-rot fungi using syringaldazine as a substrate, *3*, 55-58.



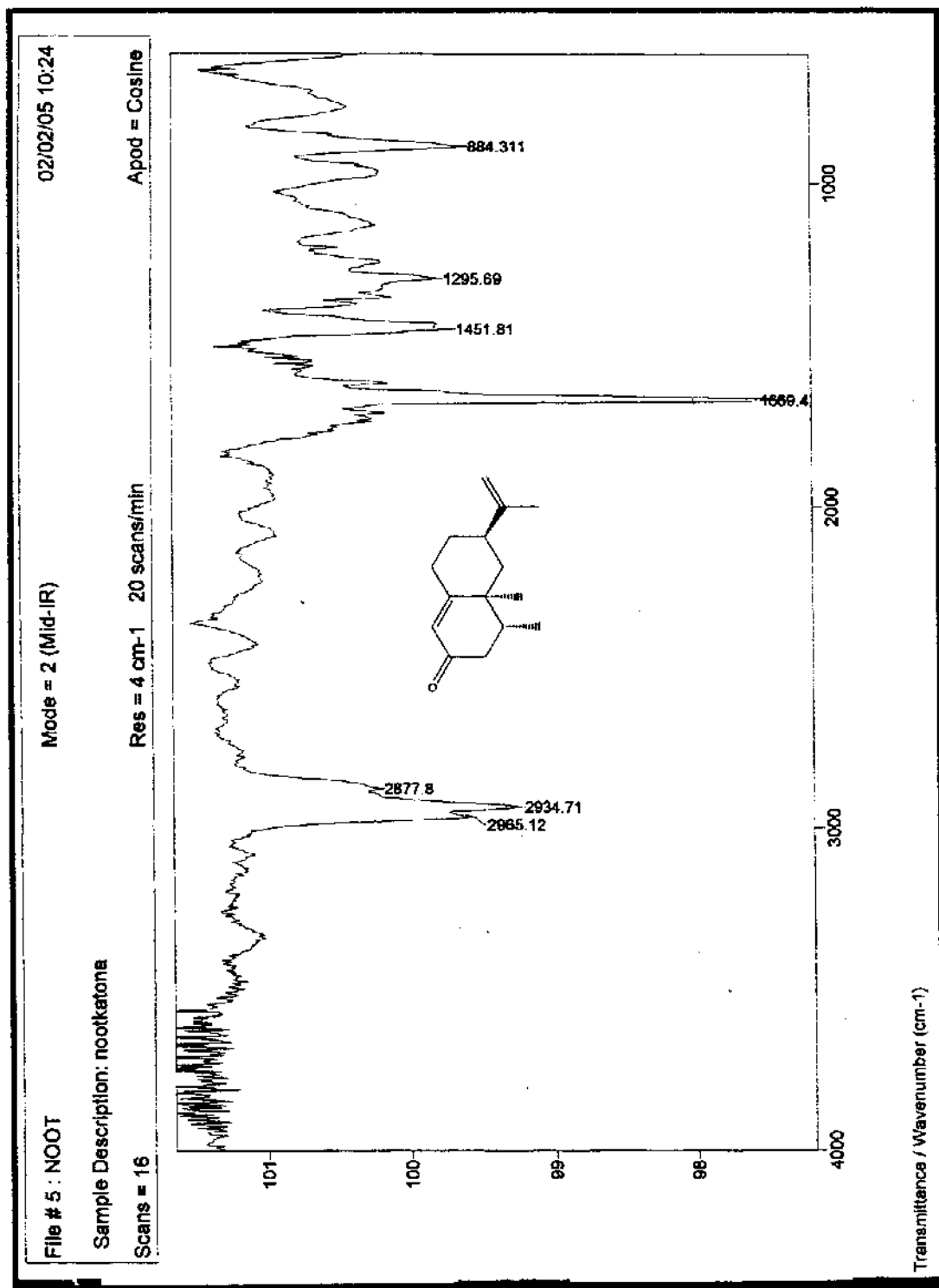
E.02 - Espectro de RMN ^{13}C de nootkatona (3) obtida por LMS/Tv



E.03 - Espectro de RMN DEPT 90/135 de nootkatona (3) por LMS/Tv

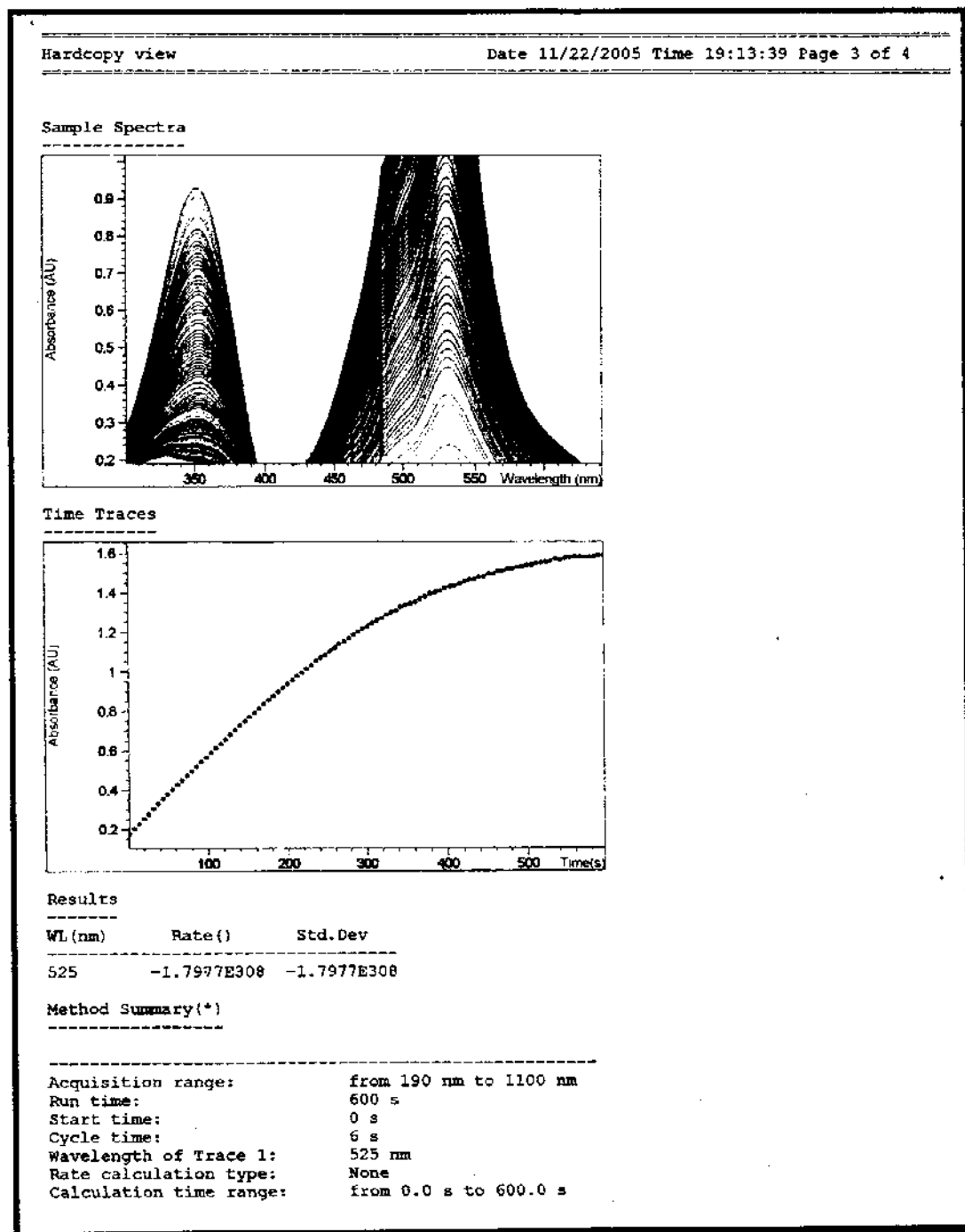


E.04 - Espectro no Infra-Vermelho de valenceno (1)

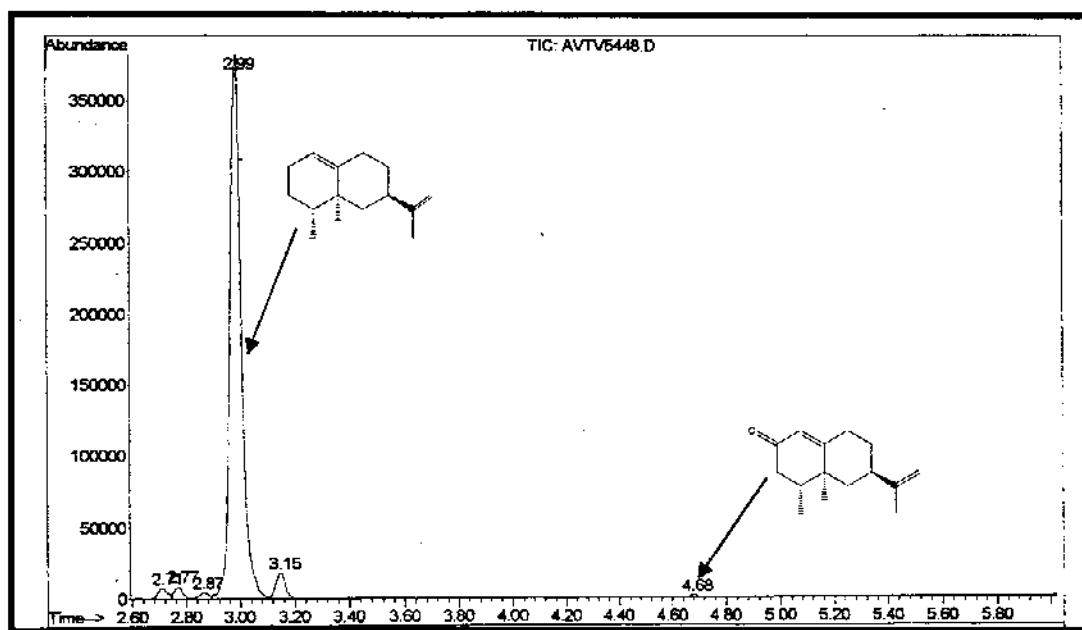


E.05 - Espectro no Infra-Vermelho de nootkatona (3) obtida por LMS/Tv

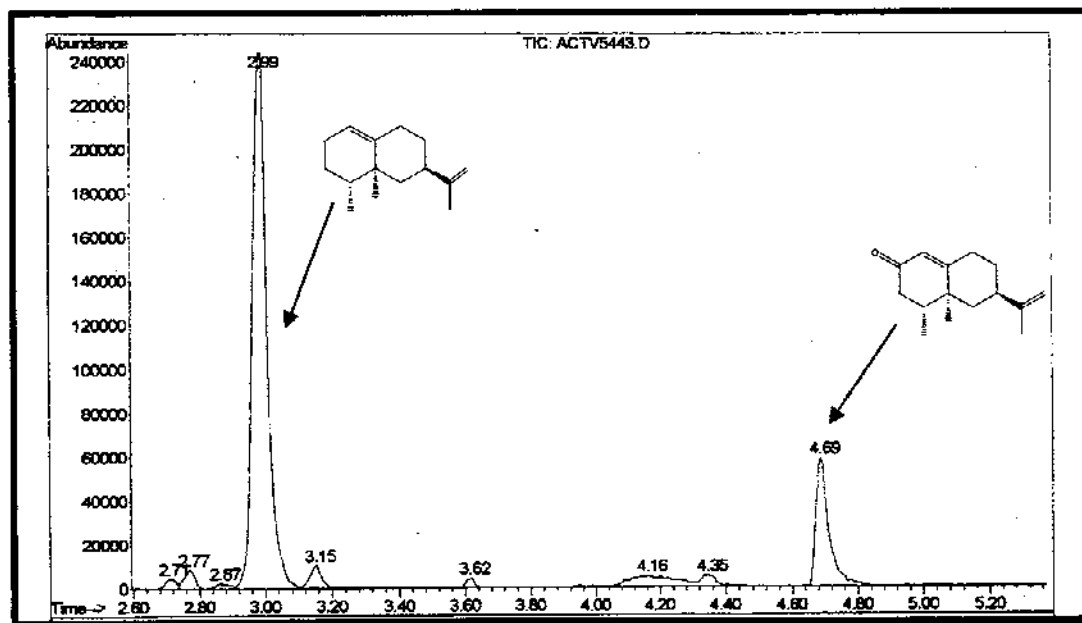




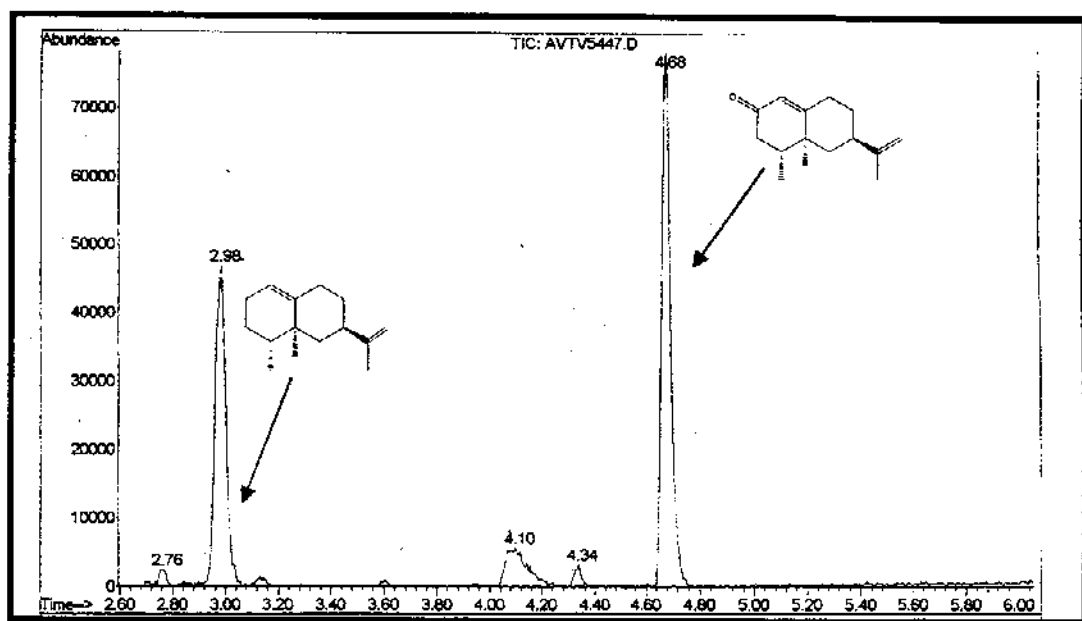
E.07 - Espectro de Ultra-Violeta de ensaio para determinação de atividade de lacase



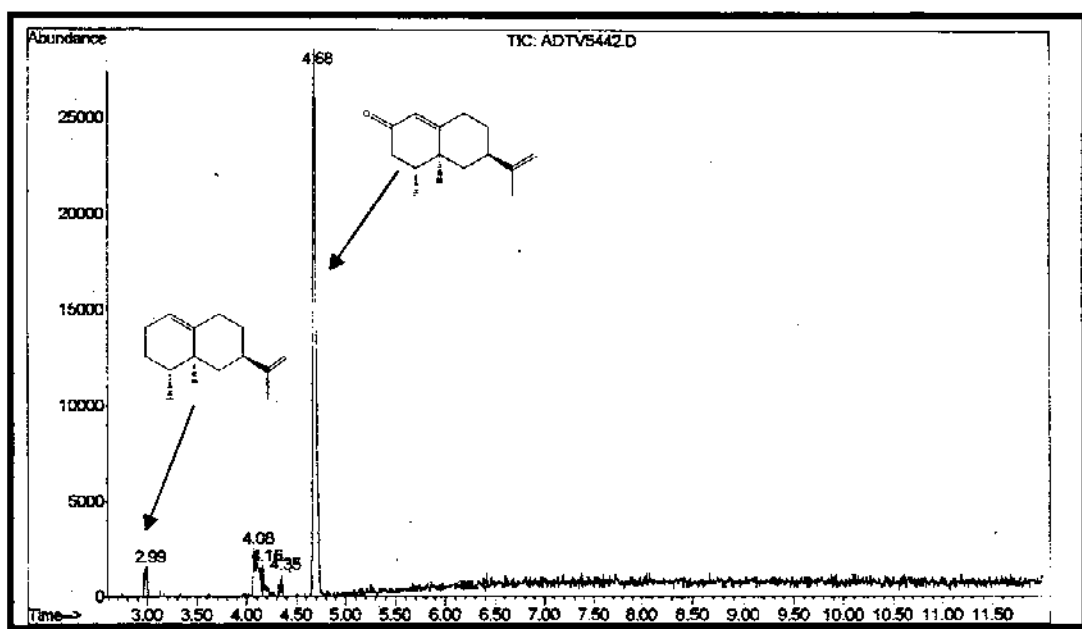
E.08 - Cromatograma Iônico de bioxidação LMS/*Tv* sem padrão interno, Método ARTRAP1, 1 hora de reação



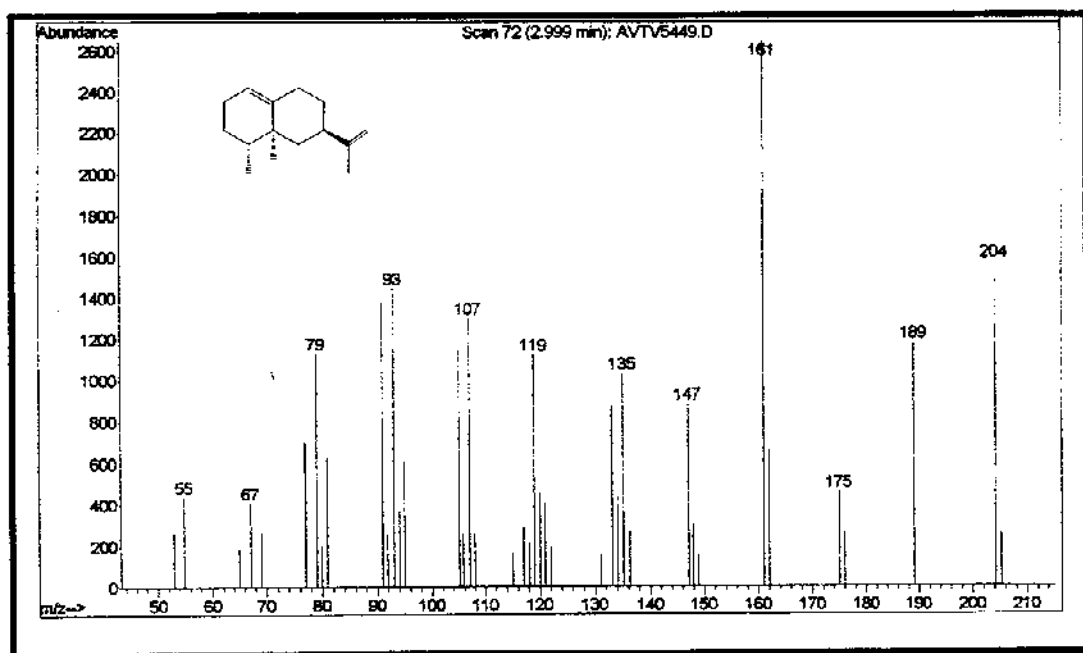
E.09 - Cromatograma Iônico de bioxidação LMS/*Tv* sem padrão interno, Método ARTRAP1, 8 horas de reação



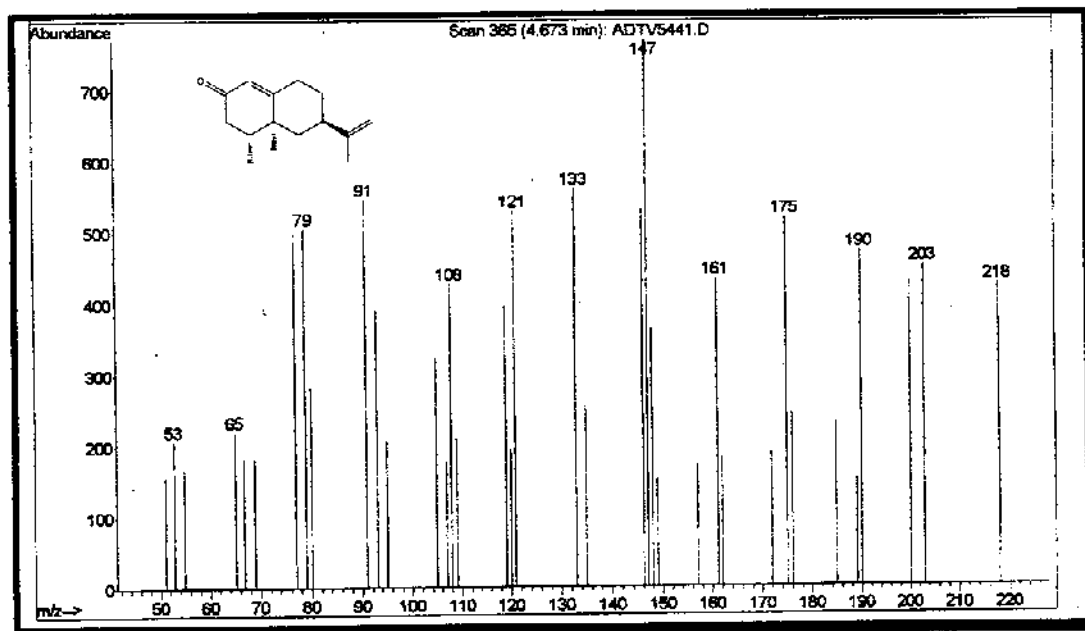
E.10 - Cromatograma Iônico de bioxidação LMS/*Tv* sem padrão interno, Método ARTRAP1, 18 horas de reação



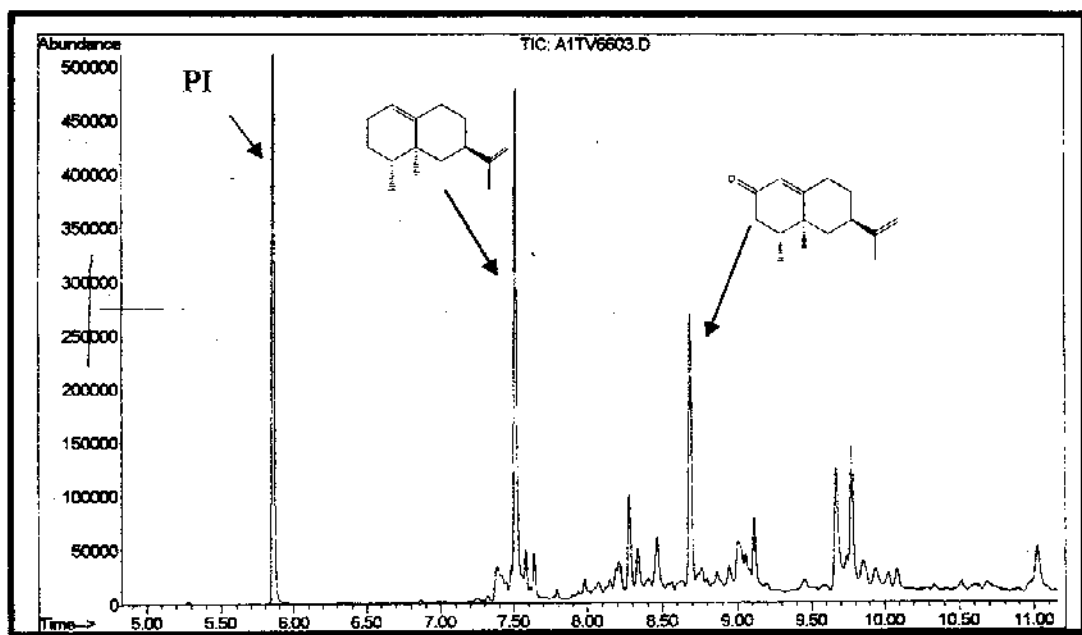
E.11 - Cromatograma Iônico de bioxidação LMS/*Tv* sem padrão interno, Método ARTRAP1, 36 horas de reação



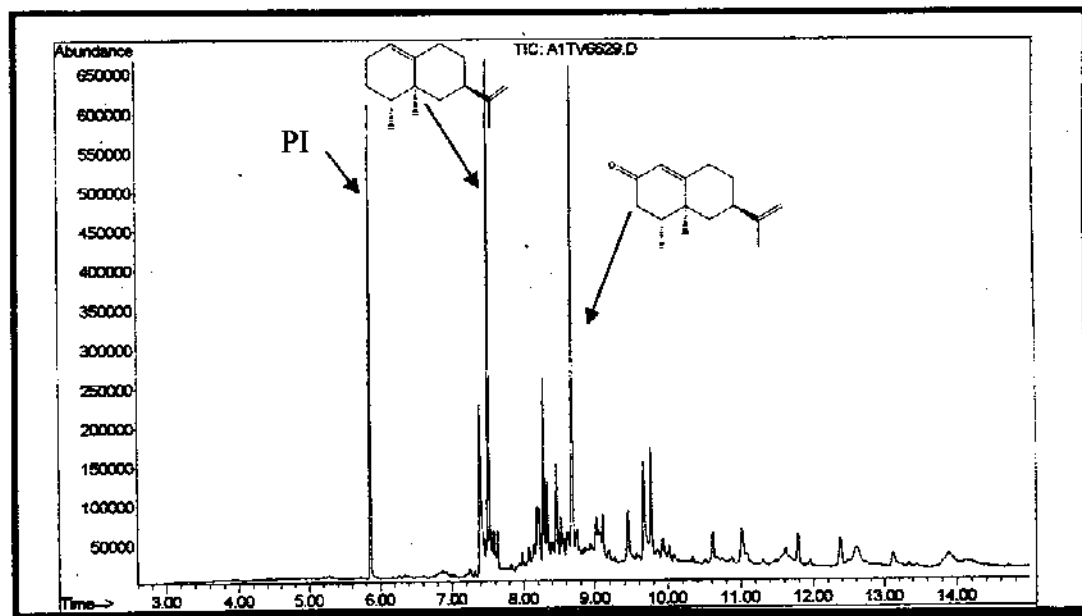
E.12 - Espectro de Massas de bioxidação LMS/Tv sem padrão interno, Método ARTRAP1, pico valenceno (1), $M^+=204$, Tr=2,99



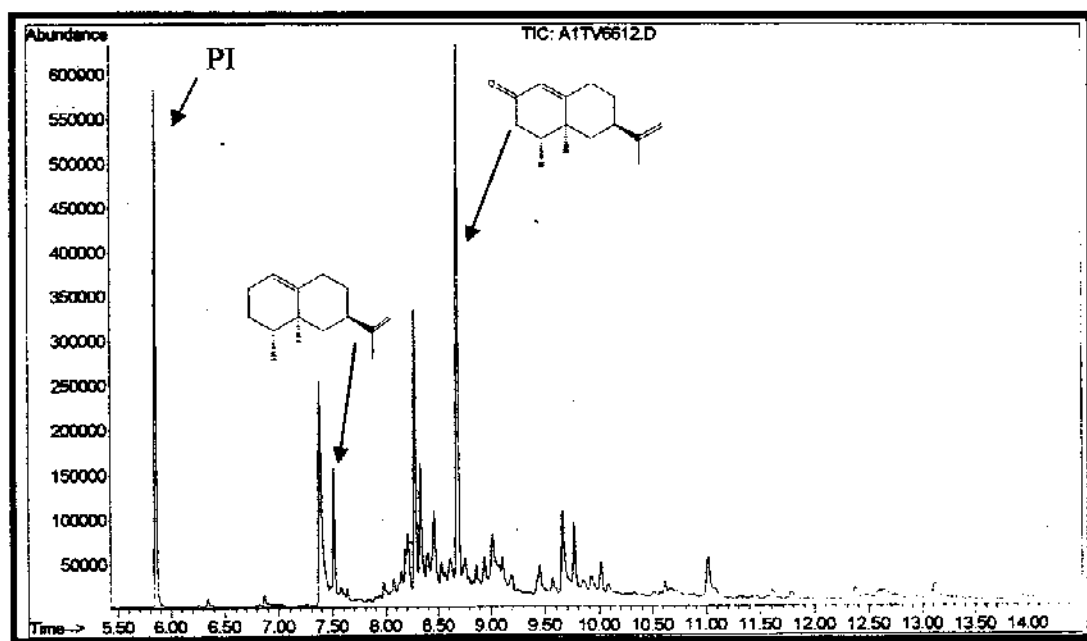
E.13 - Espectro de Massas de bioxidação LMS/Tv sem padrão interno, Método ARTRAP1, pico nootkatona (3), $M^+=218$, Tr=4,67



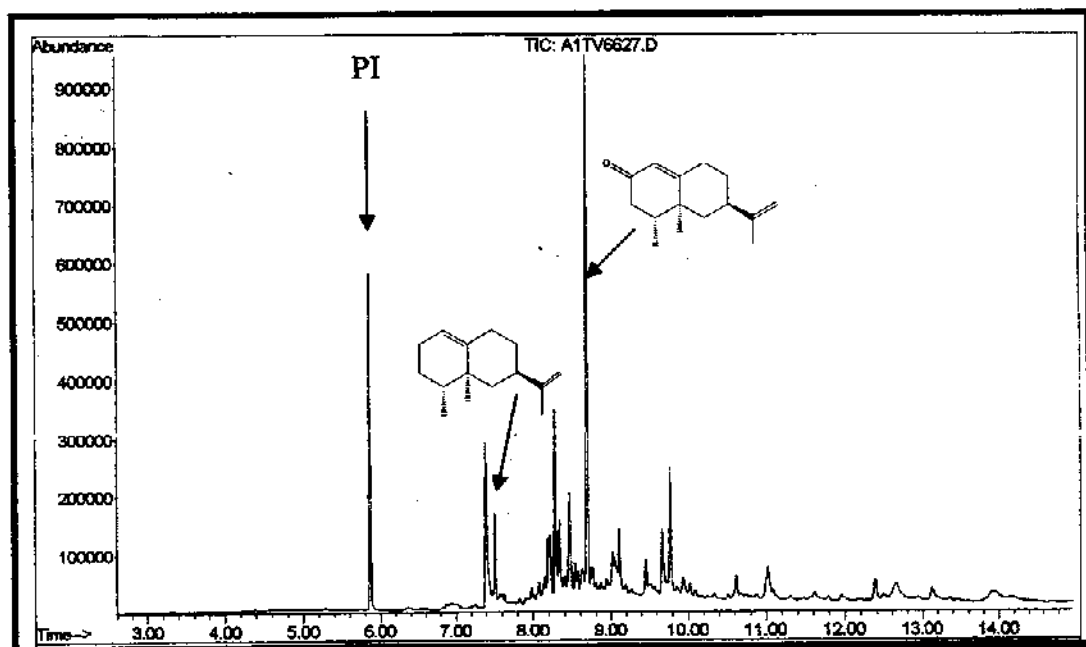
E.14 - Cromatograma Iônico de bioxidação LMS/Tv com padrão interno, Método ARTHUR1, 10 horas de reação



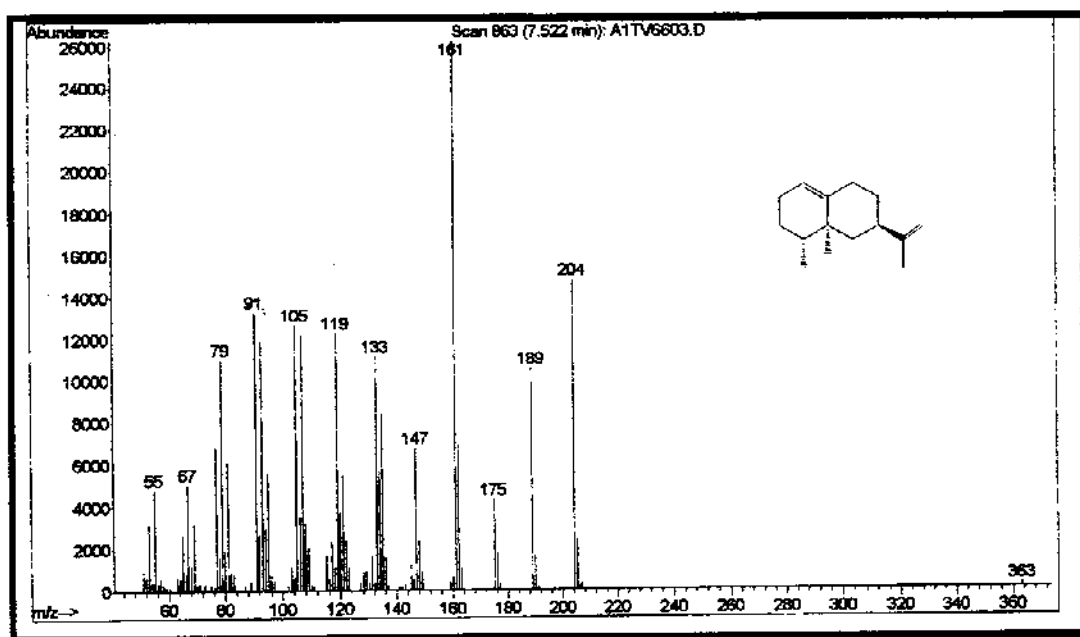
E.15 - Cromatograma Iônico de bioxidação LMS/Tv com padrão interno, Método ARTHUR1, 15 horas de reação



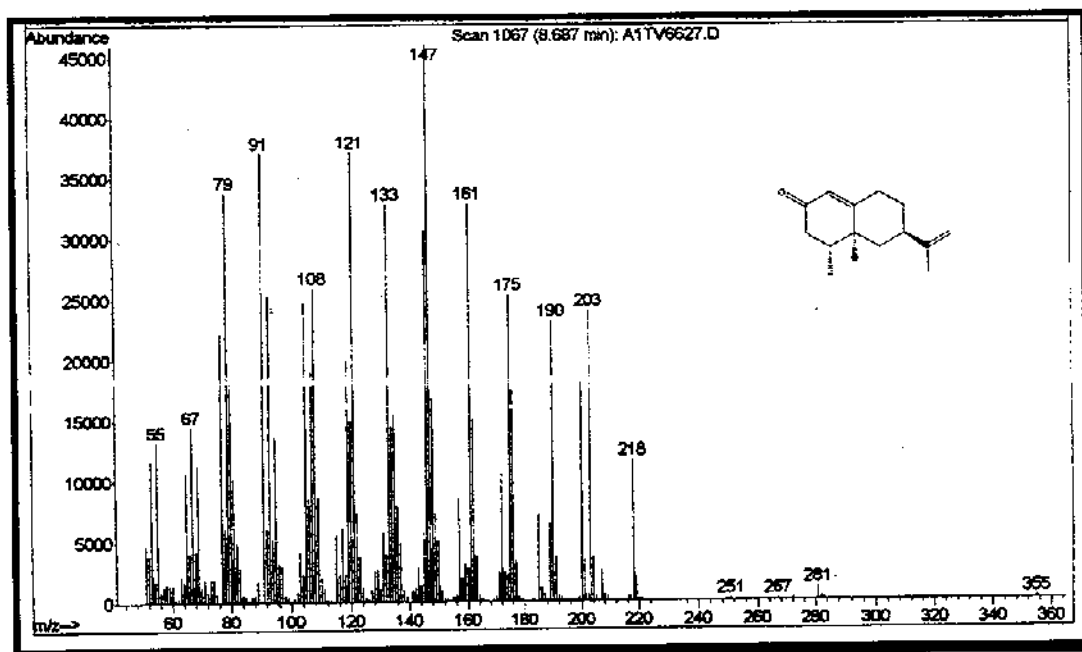
E.16 - Cromatograma Iônico de bioxidação LMS/Tv com padrão interno, Método ARTHUR1, 20 horas de reação



E.17 - Cromatograma Iônico de bioxidação LMS/Tv com padrão interno, Método ARTHUR1, 30 horas de reação



E.18 - Espectro de Massas de bioxidação LMS/Tv com padrão interno, Método ARTHUR1, pico valenceno (1), $M^+=204$, $T_r=7,52$



E.19 - Espectro de Massas de bioxidação LMS/Tv com padrão interno, Método ARTHUR1, pico nootkatona (3), $M^+=218$, $T_r=8,68$