



UNIVERSIDADE DA BEIRA INTERIOR  
Ciências

# Preparação de Derivados Bioativos de Dammaranos

**Tiago Alexandre Pereira Abrantes**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em  
**Química Industrial**  
(2º ciclo de estudos)

Orientador: Professor Doutor Jesus Miguel Lopez Rodilla  
Co-orientador: Professor Doutor Pedro Miguel de Mendonça Rocha

**Covilhã, Outubro de 2014**



# Dedicatória

Dedico este trabalho aos meus pais, à minha namorada, à família e aos meus amigos que foram determinantes para todo o meu sucesso acadêmico. Em especial dedico este trabalho ao meu falecido avô que tanto me ensinou e serviu de fonte de inspiração.



# Agradecimentos

Depois de tanto esforço e dedicação chega a altura emocionante em que se relembra todos os momentos passados, bem ou mal, no desenvolvimento deste Projeto e tanto há para agradecer a todos o que tornaram isto possível e estiveram lá nas alturas mais necessárias, por isso aqui vai o meu obrigado...

Em primeiro lugar agradecer ao Professor Doutor Jesus Rodilla, por toda a sua orientação científica e disponibilidade para ajuda deste Projeto sem o qual não seria possível a sua conclusão. Agradeço também ao Professor Doutor Pedro Rocha por todo o apoio e material disponibilizado e o incentivo em momentos menos positivos, que foram mais do que importantes para o término deste trabalho. Obrigado

Tenho também agradecer a todos os colegas do Laboratório BR - Laboratório Ambiental e Alimentar Lda, à Doutora Celina, Diana, Estela e Rui por todas as horas despendidas para me ajudar e todos os momentos de convívio em tardes de muito trabalho. Agradeço também à Andreia pelos momentos de descompressão e convívio sem os quais não era capaz de passar. A todas o meu Obrigado

Agradeço também aos meus colegas de laboratório dos Produtos Naturais, em especial à Sofia que me ajudou e orientou na conclusão deste projeto, desde já, o meu Obrigado.

Agradeço as palavras de incentivo e todo o apoio da Equipa em que iniciei funções recentemente da SGS ICS Portugal, em especial à Marlene Nunes, por todo o conhecimento e sabedoria que me transmite para o bom sucesso da minha função. A Todos o maior sucesso no futuro próximo e o meu Obrigado-.

Não podia deixar de agradecer aos meus amigos e o quanto eles são importantes na minha vida. Aos grandes companheiros que encontrei no R/C direito e que foram a minha família em todos estes anos. André, Marcelo, Amílcar, Liliana, Gonçalinho, Fani, Zimbas, Fábio, Zenaide, David e Carlos o meu grande e caloroso obrigado a todos. Não podia esquecer também grandes amigos que fiz no curso em especial agradecer à Tânia, ao Nuno que foi companheiro de grande lutas e desafios, ao Duarte que esteve sempre presente e ao Pias que foi amigo de longa data. Agradeço também a todos que fizeram parte da minha direção enquanto Presidente do UBIQuímica, em especial à Andreia Alves, Beatriz Reis, João Marques, Matilde Silva, Daniela Marques, Petra Grilo, Filipa Monteiro, Mariana Marques, Raquel Fernandes, Gregory Dutra, Marco Freitas e João Henggeler.

Agradeço por ultimo à equipa que integro com muito orgulho da AAUBI, comandada pelo amigo Marco Saldanha onde todos foram um ponto de estabilidade para o meu sucesso, por isso ao Marco Saldanha, Gonçalo Camarinhas, Miguel Castello Branco, Anícia Pontes, Bruno Xavier, José Marques, José Carlos, Diogo Gonçalves, Ricardo Silva, Raquel Faro, Rafael Ferreira, Jorge Pereira, Marta Maciel, João Vasco e Gil dias o meu Obrigado sincero por tudo!

Não podia faltar nestes agradecimentos, o mais especial e que mais vem do fundo do coração e com todo sentimento à Patrícia Raquel Nascimento Pinto, a melhor pessoa que eu podia ter encontrado e que me apoia e esta a meu lado com todo o carinho e afeto que sempre precisei e que não hesita em me dar. Sabes o quanto gosto de ti e que sem ti nada é possível. Fazes me muito feliz, obrigado!

A toda a minha família por todos estes anos de apoio, o meu obrigado em especial aos meus avos que adoro e amo muito, apesar de ter sido o ano que nos separamos pelo curso normal da vida a memória fica intacta. E ao meu tio Damião que sempre esteve la quando precisei. Obrigado.

Por fim, o agradecimento mais do que especial e o mais importante por ventura, aos meus pais, José Abrantes e Licínia Abrantes, que sem eles nada disto era possível e por muitas brigas e chatices que tivemos e muitas etapas que ultrapassamos nesta luta mas que sabem que mais do que tudo que os amo e que mais do que o orgulho que eles têm por mim, sinto um orgulho enorme em poder demonstrar isto por eles. Sem vocês isto não era possível e quero-vos a meu lado para sempre! OBRIGADO!

***Não depende das palavras mostrar os nossos atos, mas sim deixar nestas marcadas o sentimentos em que mim permanece. Por isso assim agradeço a todos o apoio e tudo o que me deram a todos vos, O meu muito obrigado!***

“Quase todos os homens são capazes de suportar adversidades, mas se quiserem por à prova o caráter de um homem, dê-lhe poder.”

Abraham Lincoln



## Resumo

Com o início da civilização moderna o uso das plantas, para fins medicinais tornou-se cada vez mais usual, o que levou a uma investigação mais acentuada sobre os seus efeitos biológicos para o ser humano. Sendo esta uma indústria em crescimento exponencial, a procura de novos métodos de síntese orgânica e de biotransformação, demonstra como esta é uma alternativa económica e ecológica com viabilidade para o futuro.

Para este trabalho foi feito o planeamento de uma síntese para um derivado da planta *Cistus Libanotis*, o composto 3-Dammaranona, no qual se tentou alterar a sua estrutura inicial com vista a obter compostos de elevado interesse científico. Para isso, utilizou-se uma variedade de reagente sendo depois feita a separação através de coluna cromatográfica (coluna de sílica gel) e os mesmos foram caracterizados por diferentes técnicas espectroscópicas. Foram realizados espectros de ressonância magnética nuclear de protão e de carbono, bem como espectros de massa, através de cromatografia gasosa.

Foi também utilizado dois fungos, o *Rhizophus stonolifer* e o *Aspergillus niger*, para se proceder à biotransformação do composto 3-Dammaranona.

A Biotransformação ocorreu durante 10 dias de incubação, sendo acompanhada por cromatografia de camada fina. Depois deste período de tempo foi feita a extração dos produtos com solventes orgânicos.

Procedeu-se à evaporação do solvente e foi obtida uma mistura de compostos. A separação foi efetuada através de uma coluna cromatográfica (coluna de sílica gel) e os mesmos foram caracterizados por diferentes técnicas espectroscópicas. Foram realizados espectros de ressonância magnética nuclear de protão e de carbono (1H-RMN e 13C-RMN).

Não foi possível obter nenhum produto de biotransformação para ambos os fungos, sendo que foi recuperado parte do produto de partida e é notória a presença de ácidos gordos. Concluindo assim que a biotransformação do composto 3-Dammaranona não foi efetiva.

## Palavras-chave

Síntese Orgânica, 3-Dammaranona, Biotransformação, *Cistus Libanotis*, *Rhizophus stonolifer*, *Aspergillus niger*



# Abstract

With the beginning of modern civilization, the use of plants for medicinal purposes has become increasingly common, leading to a stronger research on their biological effects to humans. Since this is an industry in exponential growth, the demand for new methods of organic synthesis and biotransformation, demonstrates how this is an economic and environmentally friendly alternative to viability for the future.

For this work was done the planning of a synthesis for a derivative of the plant *Cistus Libanotis*, the compound 3-Dammaranone in which it tried to change its original structure in order to obtain compounds of high scientific interest. For this, we used a variety of reagent being taken after separation by chromatographic column (silica gel), and the same were characterized by various spectroscopic techniques. Nuclear magnetic resonance spectra for proton and carbon were performed, and mass spectra, by gas chromatography.

We also used two molds, the *Rhizophus stonolifer* and *Aspergillus niger* to proceed with the biotransformation of compound 3-Dammaranone.

The Biotransformation took place over 10 days of incubation, being followed by thin layer chromatography. After this time the extraction of the product with organic solvents was made.

Proceeded to the evaporation of the solvent and a mixture of compounds was obtained. The separation was performed using a chromatographic column (silica gel), and they were characterized by various spectroscopic techniques. Nuclear magnetic resonance spectra for proton and carbon ( $^{13}\text{C}$ -NMR and  $^1\text{H}$ -NMR) spectra were performed.

Unable to get any product of biotransformation for both species, and was part of the recovered starting material and is notorious for the presence of fatty acids. Thus completing the biotransformation of compound 3-Dammaranone was not effective.

## Keywords

Organic Synthesis, 3-Dammaranone, Biotransformation, *Cistus Libanotis*, *Rhizophus stonolifer*, *Aspergillus niger*



# Índice

<b>1.Introdução .....</b>	<b>1</b>
<b>2.Revisão Bibliográfica.....</b>	<b>3</b>
2.1.Produtos Naturais .....	3
2.2.Óleos essenciais.....	4
2.2.1.Definição e composição de óleos essenciais .....	4
2.2.2.Métodos de extração de óleos essenciais .....	5
2.2.3.Terpenos .....	6
2.2.3.1. Monoterpenos .....	7
2.2.3.2. Diterpenos.....	9
2.2.3.3.Triterpenos.....	9
2.3. <i>Cistus Libanotis</i> .....	11
2.4. Microbiologia .....	13
2.4.1.Classificação de microrganismos .....	13
2.4.2.Nutrição microbiana .....	14
2.4.3. Crescimento microbiano .....	15
2.5.Fungos .....	20
2.5.1.Meio de crescimento para fungos .....	21
2.5.2. <i>Rhizophus stolonifer</i> .....	22
2.5.3. <i>Aspergillus niger</i> .....	23
2.6.Biotransformação .....	25
2.6.1.Biotransformação por <i>Rhizophus stolonifer</i> .....	26
2.6.2.Biotransformação por <i>Aspergillus niger</i> .....	27
<b>3.Materiais e métodos .....</b>	<b>29</b>
3.1.Material vegetal.....	29
3.2.Equipamentos .....	29
3.3.Técnicas cromatográficas .....	30
3.3.1.Cromatografia de camada fina .....	30
3.3.2.Cromatografia em coluna em pressão moderada .....	30
3.3.3.Separação de componentes .....	31
3.3.4.Caracterização dos produtos .....	31
3.4.Biotransformação .....	32
3.4.1.Culturas de trabalho – fungos <i>Rhizophus stolonifer</i> e <i>Aspergillus niger</i> .....	32
3.4.2.Meio de cultura e respetivo procedimento da Biotransformação .....	32
3.4.3.Extração dos produtos da Biotransformação .....	33

<b>4.Resultados e Discussão.....</b>	<b>35</b>
4.1.Processo de síntese com 3-Dammaranona.....	35
4.2.Biotransformação.....	45
4.2.1.Biotransformação com <i>Rhizophus stolonifer</i> .....	45
4.2.2.Biotransformação com <i>Aspergillus niger</i> .....	50
<b>5.Considerações finais.....</b>	<b>55</b>
5.1.Perspectivas futuras .....	56
<b>6.Referencias bibliográficas.....</b>	<b>57</b>
<b>Apêndice A .....</b>	<b>60</b>
<b>Apêndice B .....</b>	<b>63</b>

# Lista de Figuras

**Figura 1** – Vias de obtenção do IPP, a unidade básica de biossíntese de terpenos

**Figura 2** – Estrutura química de  $\alpha$ -pineno do qual se pode obter elevadas concentrações de Cineole presente me variadas arvores.

**Figura 3** – Vitamina A, um dos mais conhecidos Diterpenos.

**Figura 4** – Triterpeno – Lupeol.

**Figura 5** – Triterpeno com <C30 – Limonina

**Figura 6** – *Cistus Libanotis*.

**Figura 7** – Curva representativa do crescimento microbiano

**Figura 8** – Efeito da temperatura na velocidade de crescimento microbiano – (a) processos de transporte lento, impedindo o crescimento; (b) reações enzimáticas ocorrem à velocidade máxima; (c) desnaturação proteica, colapso da membrana e lise celular.

**Figura 9** – O oxigénio como fator condicionante do crescimento microbiano

**Figura 10** – Espécies dos seis grandes grupos de fungos: Chytridiomycota (a), Zygomycota (b), Glomeromycota (c), Ascomycota (d), Basidiomycota e Microsporidia (f).

**Figura 11** - O fungo *Rhizopus stolonifer* no pão. A parte preta são os esporângios e o branco as hifas.

**Figura 12** – Ciclo de vida do fungo *Rhizopus stolonifer*.

**Figura 13** – *Aspergillus niger* onde se observa a estrutura reprodutora, asco.

**Figura 14** – Possível relação tridimensional entre o local de ligação do substrato e o local de hidroxilação.

**Figura 15** - Molécula 3-Dammaranona usada como produto de partida da síntese deste projeto.

**Figura 16** – Composto de partida da síntese, 3-Dammaranona.

**Figura 17** – Processo de síntese planejado com a 3-Dammaranona.

**Figura 18** - Espectro de  $^1\text{H}$ -RMN para o composto obtido da primeira reação.

**Figura 19** - Espectro de  $^{13}\text{C}$ -RMN para o composto obtido da primeira reação.

**Figura 20** – Estrutura obtida (composto 2) da reação de oxidação da 3-Dammaranona com Benzeno e tetracetato de chumbo.

**Figura 21** - Espectro de  $^1\text{H}$ -RMN para o composto obtido da reação.

**Figura 22** - Espectro de  $^{13}\text{C}$ -RMN para o composto obtido da reação.

**Figura 23** – Espectro de massa do produto 3

**Figura 24** – Estrutura obtida (composto 3) da reação de cloreto de mesilo com cloreto de metilo

**Figura 25** - Cultura de trabalho de *Rhizophus stolonifer* em PDA e erlenmeyers com meio de cultura e o fungo.

**Figura 26** - Cromatografia em camada fina da biotransformação ao longo do tempo.

**Figura 27** – Extração líquido-líquido, com a separação evidente da fase aquosa a castanho e a fase orgânica incolor.

**Figura 28** - Resultado da biotransformação pelo fungo *Rhizophus stolonifer*.

**Figura 29** - Espectro de  $^1\text{H}$ -RMN para a biotransformação com *Rhizophus stolonifer*.

**Figura 30** - Espectro de  $^{13}\text{C}$ -RMN para a biotransformação com *Rhizophus stolonifer*.

**Figura 31** - Cultura de trabalho de *Aspergillus niger* em PDA e erlenmeyers com meio de cultura e o fungo.

**Figura 32** - Cromatografia em camada fina da biotransformação ao longo do tempo.

**Figura 33** - Resultado da biotransformação pelo fungo *Aspergillus niger*.

**Figura 34** - Espectro de  $^1\text{H}$ -RMN para a biotransformação com *Aspergillus niger*.

**Figura 35** - Espectro de  $^{13}\text{C}$ -RMN para a biotransformação com *Aspergillus niger*.



# Lista de Tabelas

**Tabela 1** – Diferente combinações das fontes de carbono e energia.

**Tabela 2** – Proposta de um meio para crescimento e isolamento de fungos.

**Tabela 3** – Dois tipos de biotransformação onde foi usado o fungo *Aspergillus*.

**Tabela 4** – Mistura de eluentes usado na primeira reação de oxidação.

**Tabela 5** – Pesos das frações mais significativas da coluna cromatográfica.

**Tabela 6** – Dados de  $^{13}\text{C}$ -RMN para o composto obtido, separado na coluna cromatográfica.

**Tabela 7** – Dados de  $^1\text{H}$ -RMN para o composto obtido, separado na coluna cromatográfica.

**Tabela 8** – Mistura de eluentes usado na reação do composto 2 com cloreto de mesilo em cloreto de metilo.

**Tabela 9** – Pesos das frações mais significativas da coluna cromatográfica.

**Tabela 10** – Dados de  $^{13}\text{C}$ -RMN para o composto obtido, separado na coluna cromatográfica.

**Tabela 11** – Dados de  $^1\text{H}$ -RMN para o composto obtido, separado na coluna cromatográfica.

**Tabela 12** – Mistura de eluentes usado na coluna cromatográfica.

**Tabela 13** – Pesos das frações mais significativas da coluna cromatográfica.

**Tabela 14** – Mistura de eluentes usado na coluna cromatográfica.

**Tabela 15** – Pesos das frações mais significativas da coluna cromatográfica.

**Tabela 16** – Frações Obtidas da coluna cromatográfica da reação de Tetracetato de Chumbo e Benzeno, á temperatura de 40 °C – 50° C.

**Tabela 17** – Frações Obtidas da coluna cromatográfica de uma segunda reação de Tetracetato de Chumbo e Benzeno, á temperatura de 40 °C – 50° C.

**Tabela 18** – Frações Obtidas da coluna cromatográfica da primeira reação do Composto 2 com cloreto de mesilo em cloreto de metileno, à temperatura ambiente.

**Tabela 19** – Frações Obtidas da coluna cromatográfica de uma terceira reação de Tetracetato de Chumbo e Benzeno, á temperatura de 40 °C – 50° C.

**Tabela 20** – Frações Obtidas da coluna cromatográfica da segunda reação do Composto 2 com cloreto de mesilo em cloreto de metileno, à temperatura ambiente.

# Lista de Acrónimos

<sup>1</sup>H-RMN - Ressonância Magnética Nuclear de Protão

<sup>13</sup>C-RMN - Ressonância Magnética Nuclear de Carbono

CC -Cromatografia em Coluna

CECT -Colección Española de cultivo tipo - Coleção Espanhola de cultura

FDA - Food & Drugs Administration

GC-MS - Cromatografia gasosa com espectrometria de massa

GGPP - Pirofosfato de geranylgeranilo

IPP - Pirofosfato de 3-isopentenilo

MEP - Fosfato de metileritrato

*Spp* - *Espécie*

TLC - Thin Layer Chromatography - Cromatografia em camada fina



# Capítulo 1

---

## 1. Introdução

Procurando à nossa volta, nota-se o quanto a química está presente no nosso dia-a-dia, influenciando o crescimento das sociedades e mudando hábitos comuns do ser humano, sendo possível mostrar a aplicação prática da investigação, nomeadamente em química orgânica, para obtenção de produtos, tais como os combustíveis até ao mais complexo fármaco usado no tratamento do cancro ou no tratamento de pandemias do mundo moderno.

Desde os primórdios que todas as civilizações estão associadas ao uso de plantas, com mais ou menor intensidade e procuram nelas a cura para algumas das doenças desconhecidas da época. Hoje em dia, o uso das plantas tornou-se muito mais abrangente e exigente e, a prova disso é as áreas de atuação dos produtos naturais e de todos os seus derivados.

Atualmente, são conhecidas mais 500 mil espécies de plantas, o que levou a uma nova perspectiva do seu uso e aplicação, sendo que o uso de microrganismos, com a sua capacidade de alterar quimicamente alguns compostos orgânicos, pode obter-se novos métodos para a simplificação e entreaajuda na obtenção de novos produtos com potencial químico. Nos últimos anos, a indústria de fragâncias tomou uma aproximação primária de prevenção através das atividades biológicas dos óleos essenciais das plantas - particularmente na área antibacterial, antifúngica e propriedades inseticidas - sujeitando-se a uma grande área de pesquisa, demonstrando a sua importância no isolamento e identificação destes produtos e das suas atividades.

Em variadas áreas da síntese orgânica e a biotransformação oferecem-se como métodos para a produção, farmacêutica e agroquímica, de compostos ativos, considerando ser uma rotina economicamente e ecologicamente competitiva. Sendo uma forma atrativa de obter diversas estruturas, a bio-hidroxilação constitui a ferramenta mais poderosa de síntese para introduzir funções em sítios inacessíveis das moléculas, em condições suaves. As condições são mais propícias que nos métodos químicos convencionais, o que faz com que estas sejam escolhidas em detrimento das transformações químicas habituais.

Para a obtenção de produtos naturais derivados de terpenóides, este processo de introdução de grupos funcionais, através do método químico-microbiológico, mostra ser uma via alternativa para a obtenção de novos compostos polioxygenados.

Assim, pode-se dizer-se, que este trabalho divide-se em dois capítulos fundamentais. No primeiro, faz-se uma abordagem lógica e específica sobre os produtos naturais, fundamentalmente, no grupo dos terpenos e na *Cistus Libanotis*. No segundo, pode encontrar-se uma breve descrição da microbiologia para conhecimento das condições de

nutrição de microrganismos e fungos e, por ultimo uma abordagem geral da Biotransformação.

## Capítulo 2

---

### 2. Revisão bibliográfica

#### 2.1. Produtos Naturais

Os produtos naturais marcaram uma posição muito importante no desenvolvimento da química medicinal. Hoje em dia, um grande número de novas entidades químicas tem aparecido frequentemente como a ajuda dos produtos naturais. Seguindo uma estratégia convencional, os medicamentos são isolados de material de plantas desde a antiguidade mas, mais tarde, o homem aprendeu a usar o método da fermentação para o fabrico destes mesmo agentes e, nas últimas décadas, os métodos da biologia molecular têm sido programados para a produção de células de várias variantes de compostos já conhecidos. Estas diferentes aproximações não são alternativas, mas um complemento para dar aos produtos naturais ou à química medicinal, um largo espectro de ferramentas para trabalhar. [Koskiniem *et al*,1995]

A síntese demonstrou ser uma ferramenta abrangente nos produtos naturais. Até à evolução da espectroscopia, a síntese independente de compostos demonstrou ser a peça fundamental para determinar estes produtos. De certa maneira, pode dizer-se que, na maioria dos casos, o método instrumental providencia um rápido conhecimento da estrutura do novo composto, levando a uma questão interessante neste caso, em que será necessário dar uma resposta positiva de como a síntese terá um papel contínuo e chave na química dos produtos naturais. Como já foi possível perceber, uma pequena modificação pode causar drásticas mudanças nas características da molécula, cabendo assim, à química, desenhar nas linhas para descobrir propriedades da molécula que lhe permitam ser usada para fins com alto grau de sofisticação para vários propósitos. [Koskiniem *et al*,1995]

Para a utilização destes produtos naturais devemos esperar-se muito da natureza, uma vez que, o número excessivo de estruturas que é precioso testar está muito longe daqueles que se pode obter de fontes naturais. Para isto, é necessário ter acesso à sua síntese e a todo o trabalho que usualmente é requerido para chegar a este mesmo trabalho. [Rodilla *et al*,2010]

## 2.2 Óleos essenciais

### 2.2.1 Definição e Composição de Óleos Essenciais

Para a obtenção de óleos essenciais a partir das plantas são usadas variadas técnicas para a sua produção, onde está dependente a finalidade para qual a sua produção é destinada. Os constituintes que determinam certas características das plantas, tais como a fragrância, podem ser isolados na forma de misturas denominadas de óleos essenciais, que nada mais são que frações líquidas voláteis, normalmente responsáveis pelo aroma das plantas que posteriormente são usados nas mais variadas indústrias transformadoras destes óleos essenciais. [Cunha et al, 2006]

Os óleos essenciais além de serem uma mistura natural muito complexa, que contém cerca de 20 a 60 componentes de diferentes concentrações, podem ser caracterizados por apresentarem dois ou três componentes maioritários em elevadas concentrações (proporções de 20-70% em certos casos) comparados com outros que aparecem apenas em quantidades vestigiais. As quantidades maioritárias são as que em grande parte determinam as propriedades biológicas dos óleos essenciais. [Bakkali et al, 2008] Os óleos essenciais podem ser também classificados através de critério relacionados com a consistência, origem e natureza química dos componentes que determinam estas suas propriedades biológicas. [Cunha et al, 2006]

A consistência destes óleos são classificados em essências líquidas, balsamos e óleos das resinas. As essências líquidas são voláteis à temperatura ambiente, enquanto os balsamos são espessos e pouco voláteis. Os balsamos podem também sofrer reações de polimerização mas os óleos de resinas são concentrados e tem o aroma das plantas e tem uma viscosidade intermedia entre as essências líquidas e os balsamos. [Cunha et al, 2006]

Os componentes dos óleos essências podem ser divididos em dois grupos de origem biossintética bastante distinta, onde se tem em conta que o composto principal dos óleos essenciais é terpenos, ou também denominados terpenóides, e o outro os constituintes aromáticos e alifáticos, sendo que todos são caracterizados com base no seu baixo peso molecular. [Bakkali et al, 2008]

### 2.2.2 Métodos de Extração de Óleos Essenciais

Desde a antiguidade que é empregada a extração de óleos essenciais e os produtos obtidos não eram totalmente puros bem como as quantidades obtidas de cada componente nem sempre eram significativas. Com o aparecimento da tecnologia foi possível abordar esta área de maneira diferente, e nos dias de hoje é possível a obtenção de óleos essenciais tão puros e concentrados e de mais variadas essências para aplicação na indústria. Dependentes do método utilizado para a extração, as características químicas podem ser alteradas o que leva que os fins terapêuticos dos óleos essenciais também sejam alterados.

Para um uso de base comercial, a destilação a vapor é o método mais usado para a produção dos óleos essenciais, mas a extração através de dióxido de Carbono líquido a baixa temperatura e alta temperatura é o que produz um perfil organolético mais natural mas é também o mais dispendioso para a produção destes óleos. Pode também ser usado os métodos de hidrodestilação; supercrítico; prensagem a frio; turbo destilação e hidrofusão; enfloração; fitóis ou florasóis. [Cunha et al, 2006]

#### Destilação a Vapor Vs Extração por Solvente

A diferença para obtenção dos óleos por estes dois meios influencia depois no seu perfil organolético, indicando a diferença obtida pela extração por solvente ao contrário da destilação influenciando assim as suas propriedades. Este paralelismo pode ser confirmado a quando a extração com hexano, onde estes óleos apresentam atividades maiores, nomeadamente atividades microbianos, do que destilados a vapor. Para manterem também estas propriedades e prevenir as alterações que este possa sofrer, estes devem ser armazenados no escuro. [Brut, 2004]

Por um lado, a destilação a vapor é empregada para se obter óleos essenciais de folhas e ervas, mas pode não ser o mais indicado para extrair os óleos essenciais de sementes, raízes, madeiras e algumas flores. Algumas flores devido à pressão a que são sujeitas, aliadas ao calor empregado, podem sofrer destruição das suas moléculas aromáticas levando a perder todo o seu princípio ativo. A destilação ocorre num alambique onde se coloca as folhas da planta, sendo que estas podem ser folhas jovens ou já previamente secas. O vapor ao passar pelas folhas provoca a quebra das bolsas intercelulares e assim libertam o óleo essencial, mas com o evoluir do tempo do processo o óleo evapora junto com o vapor de água e passam por um processo de arrefecimento numa serpentina e condensam depois juntamente com a água que existe no sistema. [Cunha et al, 2007]

No fim, a água é separada do óleo essencial por decantação, sendo que esta ainda possui algumas propriedades terapêuticas da planta podendo ser depois usada como tratamento de hidrossóis. [Cunha et al, 2007]

Por outro lado, a extração por solventes de óleos essenciais é usada para plantas com folhas mais delicadas. O solvente, como é exemplo o hexano que já foi mencionado anteriormente, faz a extração dos compostos aromáticos presentes na planta, sendo que o produto obtido tem o nome de concreto, o qual é depois dissolvido em álcool de cereais para remover o hexano ou outro tipo de solvente usado neste processo. Após a evaporação, temos o produto absoluto, mas este método pode acarretar problemas de resíduos que podem ficar agregados no absoluto e causar efeitos colaterais. [Cunha et al, 2007]

### 2.2.3 Terpenos

Os terpenos são uma larga classe de produtos naturais, sendo a grande diversidade de estruturas um desafio para a síntese química, através da descoberta de novos tipos de esqueletos de compostos. Os terpenos encontram-se em abundância nas plantas, sendo as fragâncias mais comuns um exemplo destes compostos, sendo que, o crescimento da técnica de cultura de plantas para gerar terpenóides, contribui em larga escala para este número. [Muffler et al, 2011]

A biossíntese dos terpenos nas plantas acontece por duas vias: por um lado pela via do ácido mevalônico e por outro pela via do fosfato de metileritritol (MEP), onde se produz o IPP como podemos ver na figura seguinte. [Cowan,1999]

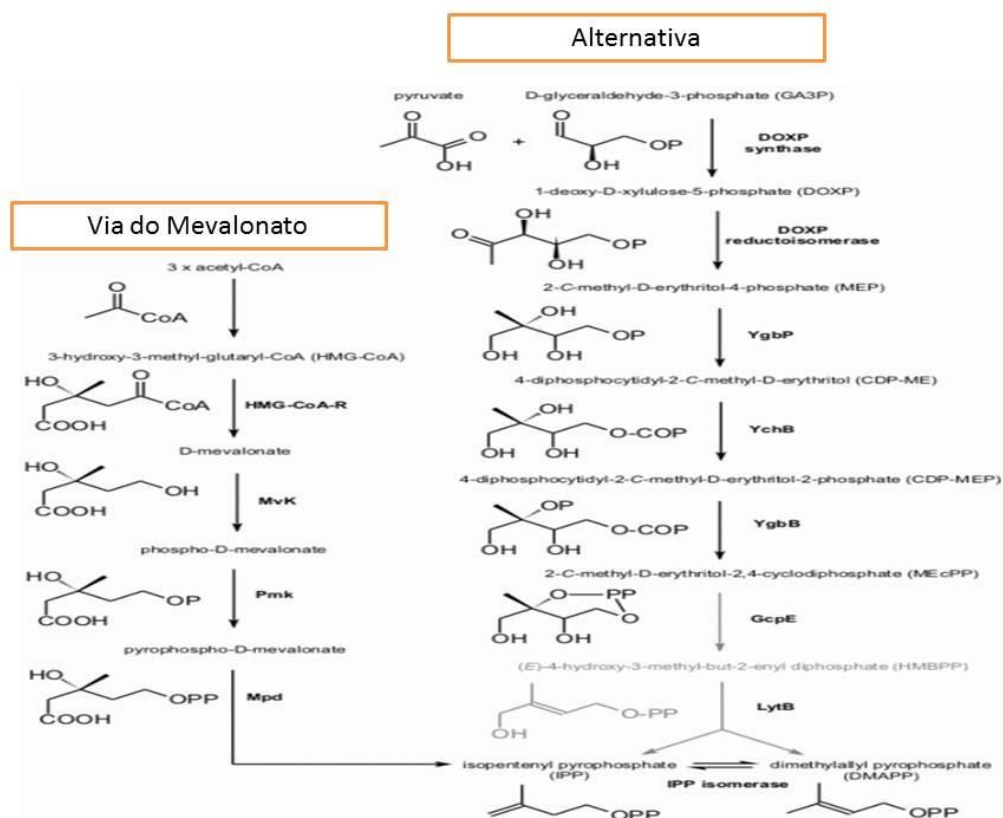


Figura 1 - Vias de obtenção do IPP, a unidade básica de biossíntese de terpenos. (consultado em <http://www.ugr.es/~quired/pnatu/terpenoides.htm> a 15 de Abril de 2014)

A Biossíntese consiste na síntese do precursor do Difosfato de Isopentenil (IPP) através de adições sucessivas de IPP para formar um novo precursor denominado de prenildifosfato, que se divide por várias classes de terpenos que é modificação do prenildifosfato alílico por sintetases específicas para formar o esqueleto de terpeno e, por fim, a modificação enzimática secundária que obtém as propriedades funcionais dos diferentes terpenos. [Bakkali et al, 2008]

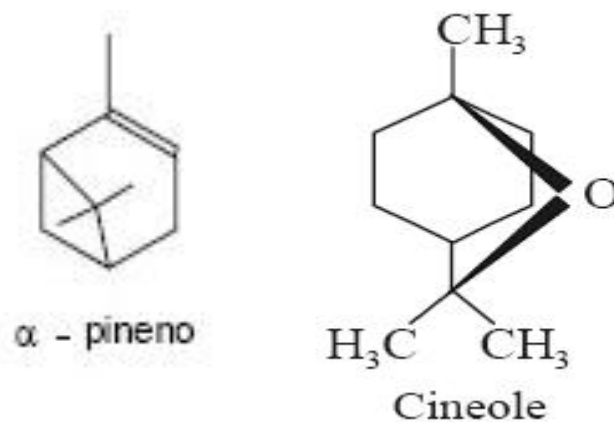
Os terpenos que contêm oxigénio são denominados de terpenóides. Estes, são sintetizados a partir de unidades de acetato e partilham as suas origens com os ácidos gordos, podem ser diferenciados dos ácidos gordos pela extensa ramificação e serem ciclizados, sendo também ativos contra bactérias, fungos, vírus e protozoários. [Cowan, 1999]

Os compostos são formados por isoprenos ( $C_5$ ) ligados entre si, da cabeça até à cauda. Mas esta definição na generalidade falha, mas mostra ser muito útil na maioria dos casos. Os terpenos mais simples, monoterpenos ( $C_{10}$ ), têm sido objecto de interesse desde o nascimento da química moderna, por causa da sua importância comercial. Muitos monoterpenos e alguns sesquiterpenos ( $C_{15}$ ) já foram isolados e estudados no século XIX, propondo a regra do isopreno, segundo a qual os monoterpenos eram construídos, hipoteticamente, ligando duas unidades de isopreno. De aqui procede a designação de isoprenóides. [Muffler et al, 2011]

### 2.2.3.1 Monoterpenos

Ao longo de várias décadas, o interesse pela área dos monoterpenos tem sofrido um aumento considerável e assim contribuído também para um desenvolvimento económico dos próprios países. A volatilidade dos monoterpenos é um grande contributo para o sabor e aroma dos alimentos e plantas e assim são uma base fundamental da indústria da perfumaria mas, a sua área de atuação é mais específica quando aliada à Biotransformação através de microrganismos, onde se produzem muitos compostos para uso na indústria de fragâncias e a cultura de células de plantas produzem formas e transformam os monoterpenos. [Gomes et al, 2005]

A quantidade de monoterpenos produzidos pelas plantas é bastante significativa. Os diferentes aromas produzidos pelas plantas é resultado da emissão dos diferentes monoterpenos voláteis como é exemplo o  $\alpha$ -pineno (figura 2) onde em várias florestas mundiais este produz altas concentrações de 1,8-cineole, como é demonstrado na figura 2, através das árvores de eucalipto. [Gomes et al, 2005]



**Figura 2-** Estrutura química do  $\alpha$ -pineno do qual se pode obter elevadas concentrações de Cineole, presente em variadas arvores. (Consultado em <http://commons.wikimedia.org/wiki/File:1,8-Cineol.svg> em 15 de Abril de 2014)

As variadas funções dos monoterpenos ainda nos dias de hoje são alvo de debate por vários especialistas desta área mas, sabe-se que as plantas sintetizam e acumulam no seu complexo secretório estes compostos em específico, e possuem a capacidade de sintetizar e regular a produção dos seus próprios monoterpenos. [Gomes et al, 2005]

Na maioria dos monoterpenos estes são formados pela união de duas unidades de isoprenos (C10). Estes são também as moléculas mais representativas dos óleos essenciais (cerca de 90%) o que permite ter, uma grande variedade de estruturas e de funções como são os seguintes exemplos:

- **Lineares:**  
Mirceno, linanol, geranio, citrinelal;
- **Monocíclicos:**  
Limoneno, mentol, timol
- **Bicíclicos:**  
 $\alpha$ -pineno, cânfora, eucliptol

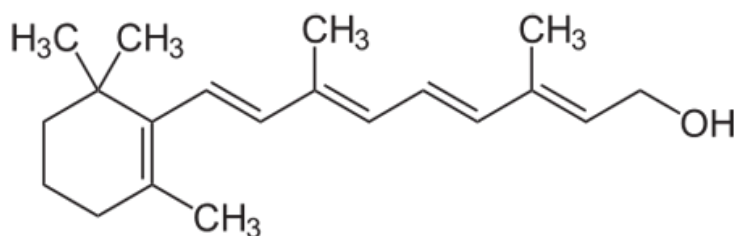
Toda a química dos monoterpenos é suporte para outros terpenos mais complexos mas, serve também para fins comerciais e sendo que a perfumaria depende bastante destes compostos. [Gomes et al, 2005]

### 2.2.3.2 Diterpenos

Os diterpenos são formados por quatro unidades de isopreno (C<sub>20</sub>), o que consiste na fórmula química de C<sub>40</sub>H<sub>64</sub>.

Estas moléculas apresentam como precursor o pirofosfato de geranylgeranilo, GGPP, onde estes apresentam-se como sólidos cristalinos, o que contrasta com outros compostos, como os monoterpenos, que são líquidos. [Gil, 2002]

A forma como o seu precursor se apresenta, provoca diferença de compostos, uma vez, que se altera o seu estereocentro, o que faz com sistema bicíclico formado inicialmente tem as mais variadas formas. Os diterpenos são também a base de muitos dos compostos biológicos, e como exemplo disso, é a Vitamina A ou retinol (figura 3), que desempenha funções importantíssimas no processo da visão. [Gil,2002]



**Figura 3-** Vitamina A, um dos mais conhecidos Diterpenos. (Consultado em <http://www.sulinformacao.pt/2013/01/do-atomo-intimo-de-bohr-a-descoberta-da-vitamina-a-em-1913/estrutura-molecular-da-vitamina-a/> a 15 de Abril de 2014)

### 2.2.3.3 Triterpenos

Os triterpenos são a junção de 6 unidades de isoprenos e tem a fórmula molecular de C<sub>60</sub>H<sub>100</sub>. Até agora, mais de 40000 triterpenos resultantes de forma natural foram isolados e identificados. O percurso da sua cadeia carbonada é o esqualeno, onde a sua ciclização dá origem a esqueletos carbonados básicos de triterpenos. O exemplo deste tipo de compostos é o lupeol (figura 4), que tem origem natural nas sementes de tremço amarelo e pelo descrito na literatura tem atividade antitumoral. [Lobo et al, 2007]

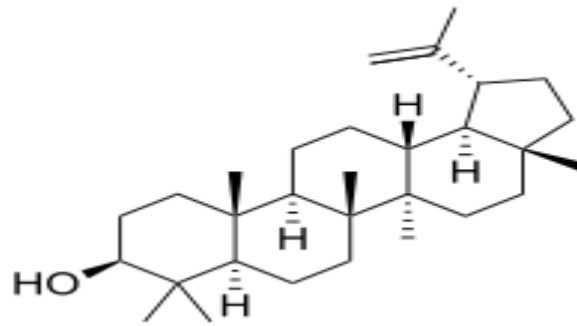


Figura 4- Triterpeno - Lupeol. [Adaptado de Lobo et al, 2007]

A determinado momento no processo de síntese, pode-se observar a degradação do esqueleto carbonado o que origina alguns triterpenos modificados <C30. Um exemplo do descrito é a limonina como podemos ver pela estrutura na figura 5. [Gil,2002]

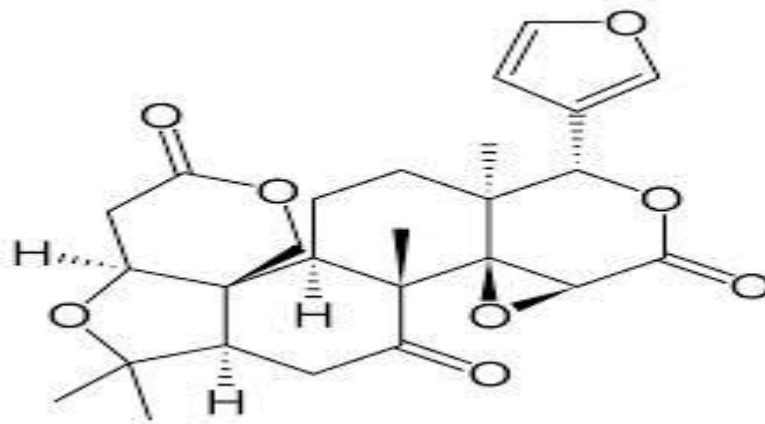


Figura 5- Triterpeno com <C30 - limonina. [Adaptado de Gil,2002]

## 2.3 *Cistus Libanotis*

Esta planta, com predominância em forma de arbusto e cerca de 1 metro de altura, é característica do barlavento algarvio em zonas arenosas como são as zonas perto de Torrão (Alcácer do Sal) e de Montemor-o-Novo onde se faz sentir mais a influência marítima no crescimento da mesma. [Pereira et al, 2008]

Com folhas estreitas, de cor verde-escuro na parte superior mas brancas na parte inferior, esta planta apresenta 3 a 6 pétalas brancas e com o interior de aparência amarela, esta tem os seus frutos encapsulados dando-lhe a aparência como podemos observar na figura 6.



**Figura 6** - *Cistus Libanotis* (Retirado de <http://jardin-sec.pagesperso-orange.fr/Pages%20photos/Cistus%20populifolius.htm> consultado em 12 de Abril de 2014)

A *Cistus Libanotis* é um género da pequena família da *Cistaceae*, onde as suas características morfológicas fazem com que esta esteja dividida em cinco géneros, mas este tipo de classificação não é seguida por muitos dos autores antigos, uma vez que estes continuam a incluir todos os seus subgéneros como são exemplo a *Cistus*, a *Leucocistus* e a *Halimioides*, dentro do próprio género da *Cistus*. [Ellul et al, 2002]

A relação estabelecida de forma taxonómica entre as variadas espécies do género *Cistus* está baseado em larga escala com as características que estas apresentam, mas esta relação não se torna empírica em medidas que estas características distintivas ocorrem naturalmente ou são originadas por convergências evolutivas, que atualmente ainda foi possível determinar. [Ellul et al, 2002]

Na medicina tradicional, a *Cistus* é usada para vários fins terapêuticos, dos quais são destaque os tratamentos como anti-inflamatório, doenças da pele, antimicrobianos, citotóxico e vasodilatador. Atualmente, o óleo essencial da *Cistus* é aprovado pelo Food & Drugs Administration (FDA) como um corante e conservante alimentar, mas também pode ser

usado como um suplemento alimentar, como é oferecido por vários produtores, para uma dieta variada, nomeadamente na forma de chá obtido das suas infusões e podendo ser utilizado para prevenir doenças crónicas. [Loizzo et al, 2013]

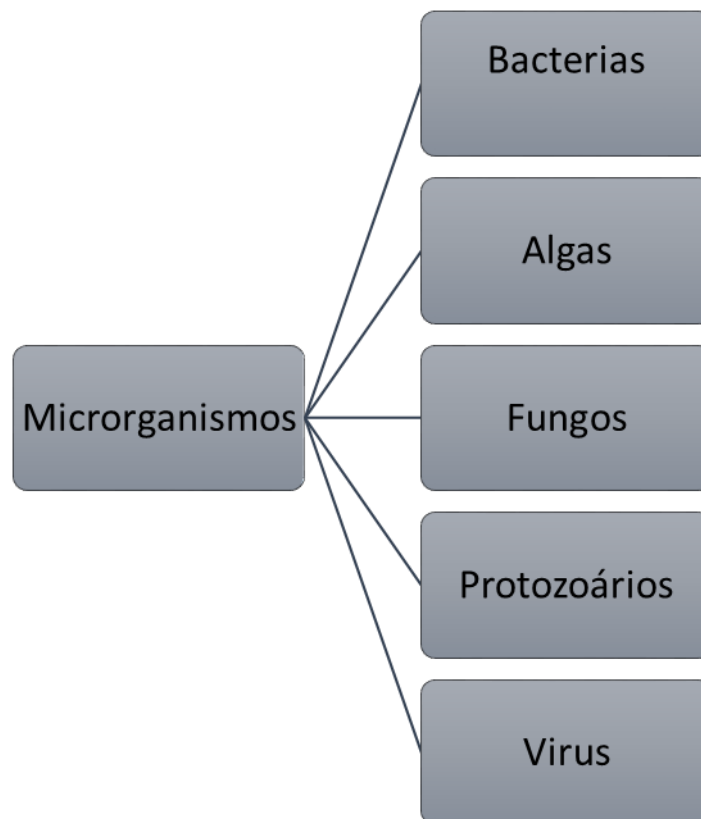
## 2.4 Microbiologia

A microbiologia é a ciência que estuda os seres vivos de dimensões microscópicas. O seu nome deriva de três vocábulos gregos: mikrós (pequeno), bios (vida) e logos (ciência). Porém, o que determina que os microrganismos façam parte da microbiologia são, sem dúvida, as suas dimensões reduzidas utilizando diversas áreas, técnicas e métodos para a sua cultura, isolamento e identificação. [Ferreira et al,2010]

Os microrganismos são indispensáveis ao ecossistema, responsáveis pela realização de vários de ciclos e encontrados em vários habitats, onde se apresentam uma vasta gama de organismos e cujas atividades são grandemente condicionadas pelas suas propriedades físicas e químicas. [Ferreira et al,2010]

### 2.4.1 Classificação de Microrganismos

O mais importante e atrativo neste apelativo mundo microbiano é a sua diversidade, em que a natureza experimentou, praticamente, todas as formas, tamanhos, fisiologias e estilos de vida. Em poucas décadas, um grande progresso tem sido feito nesta área, que afetou muito a classificação dos microrganismos (Diagrama 1).



**Diagrama 1** - Os variados microrganismos encontrados na Natureza [Adaptado de Prescott et al, 2008]

Posteriormente, serão analisados com mais detalhe, os fungos, uma vez que foram os microrganismos utilizados para a Biotransformação deste trabalho.

## 2.4.2 Nutrição Microbiana

A grande parte dos estudos microbiológicos dependem da capacidade e habilidade de cultivar microrganismos em laboratório, e isto apenas se torna possível se os meios de cultura estiverem disponíveis. Para se compreender esta necessidade, estas preparações usadas para o crescimento dos microrganismos são designadas meios de cultura. [Ferreira et al,2010]

Os microrganismos apresentam características nutricionais notáveis que residem na diversidade única no que diz respeito à utilização de fontes de carbono e de energia. Estes organismos vivos são os mais versáteis nas suas exigências nutricionais, e alguns, mostram-se mais “exigentes” que outros animais ou o próprio homem. [Ferreira et al,2010] Apesar destas características notáveis vistas nos microrganismos, a maior parte deles pode ser colocado numa das cinco classes nutricionais, baseado na sua fonte primária de carbono, energia e eletrões. Na tabela 1, encontra-se uma classificação quanto à sua necessidade nutricional. A maioria dos microrganismos estudados são fotoautotróficos e quimiolitotrófico. [Prescott. et al,2008]

**Tabela 1** - Diferentes combinações das fontes de carbono e energia [adaptado de Prescott et al, 2008]

**Tipos Nutricionais dos Microrganismos**

<b>Categorias</b>	<b>Fonte de Energia</b>	<b>Fonte de Carbono</b>	<b>Exemplos</b>
<b>Fotoautotróficos</b>	Luz	CO <sub>2</sub>	Algas, Bactérias
<b>Fotoheterotróficos</b>	Luz	Compostos Orgânicos	Bactérias Fotossintéticas, Arqueobactérias Halófilas
<b>Quimiolitotrófico</b>	Inorgânica	CO <sub>2</sub>	Eubactérias oxidantes do enxofre
<b>Quimilitoheterotrófico</b>	Inorgânica	Compostos Orgânicos	Algumas arqueobactérias metanogénicas
<b>Quimiorganoautotróficos</b>	Orgânica	CO <sub>2</sub>	Eubactérias metilotróficas autotróficas
<b>Quimiorganoautotróficos</b>	Orgânica	CO <sub>2</sub>	Eubactérias metilotróficas autotróficas
<b>Quimiorganoheterotrófico</b>	Orgânica	Compostos Orgânicos	Fungos, Protozoários

O crescimento revela-se um processo dinâmico, em que a análise da composição celular mostra que 95% do peso seco da célula deve-se a uma elevada quantidade de elementos, tais como: Carbono (C), Oxigénio (O), Hidrogénio (H), Azoto (N), Enxofre (S), Fosforo (P), Potássio (K), Cálcio (Ca), Magnésio (Mg) e Ferro (Fe). Estes elementos são requeridos em grandes

quantidades pelos microrganismos e designados macronutrientes. Os primeiros elementos são componentes dos hidratos de carbono, lípidos, proteínas e ácidos nucleicos. Os restantes existem nas células e desempenham várias funções. O potássio (K<sup>+</sup>) revela-se necessário para várias enzimas envolvidas na síntese proteica e o cálcio essencial à resistência térmica dos endósporos bacterianos [Ferreira et al,2010].

Os micronutrientes são, no entanto, como os macronutrientes, igualmente necessários para as células. Os micronutrientes são essencialmente elementos metálicos como: Magnésio (Mn), Zinco (Zn), Cobalto (Co), molibdénio (Mo) e Cobre (Cu). Muitos destes têm um papel estrutural em várias enzimas.

Desta forma, para se cultivar com sucesso um determinado microrganismo, é necessário compreender as suas necessidades nutricionais de acordo com as suas características fisiológicas e bioquímicas, para um uso em laboratório que melhore e simule as condições naturais. [Ferreira et al,2010]

### 2.4.3 Crescimento microbiano

O crescimento dos microrganismos é afetado por variações nas condições físicas e químicas dos seus habitats naturais diferentes. Muitos são os fatores ambientais que podem ser considerados, no entanto, considera-se a temperatura, o pH, a disponibilidade da água e do oxigénio, a natureza e a concentração dos nutrientes, como sendo os fatores relevantes no controlo do crescimento microbiano. [Prescott et al,2008]

O crescimento exponencial em sistema fechado pode ser observado na figura 7, onde obtemos a relação do crescimento ao longo do tempo.

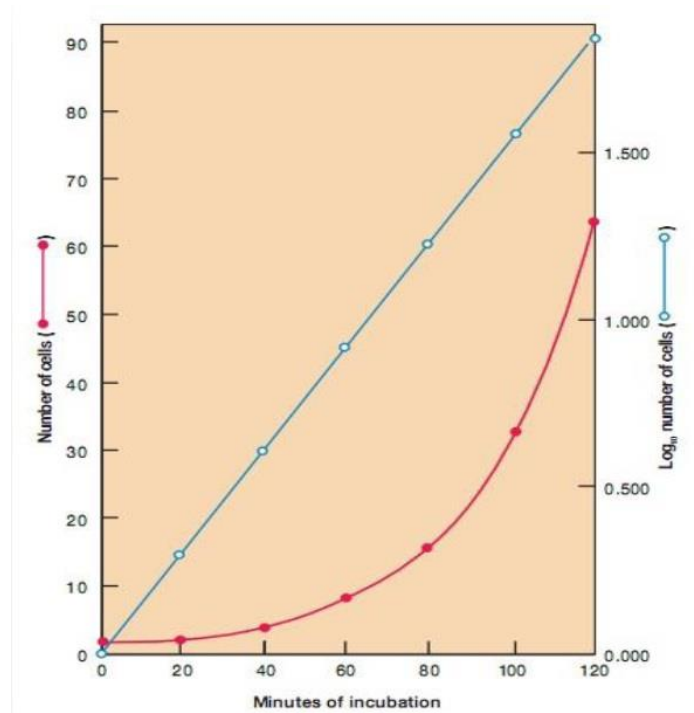


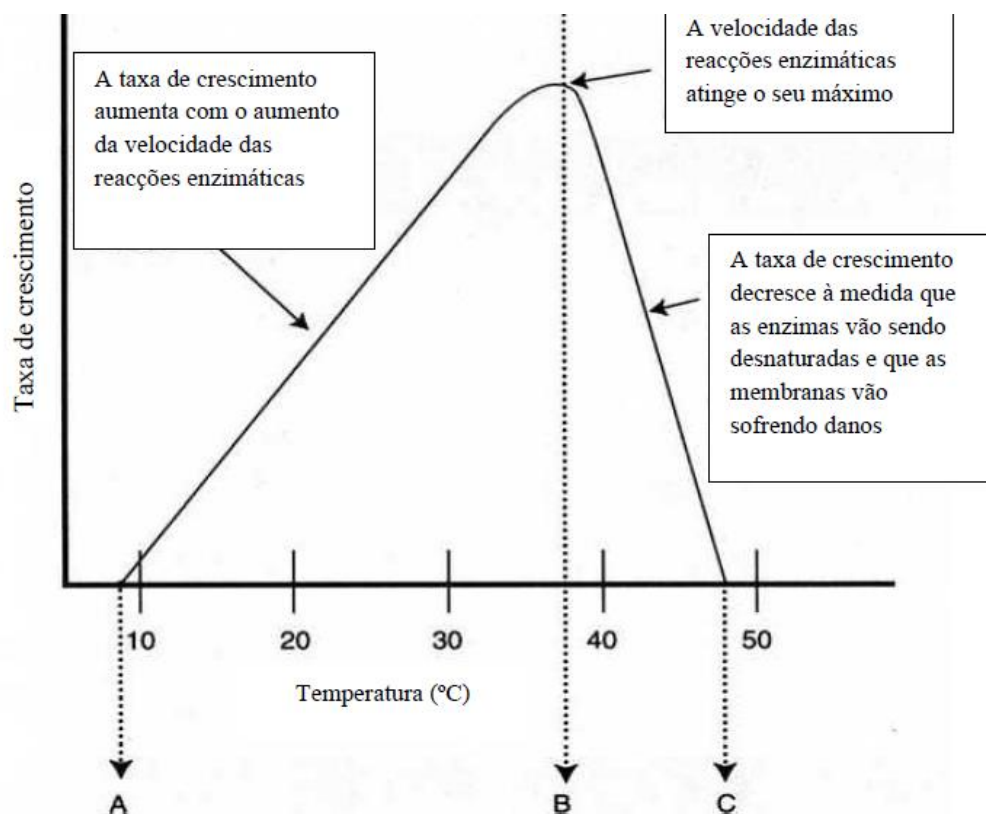
Figura 7 - Curva representativa do crescimento microbiano [adaptado de Prescott et al, 2008]

O ambiente físico e químico tem uma grande influência sobre o crescimento celular. Através do conhecimento das influências ambientais sobre um determinado microrganismo, pode estudar o seu crescimento e as distribuições ecológicas das espécies. Os principais fatores em causa são: [Tortora et al, 2000]

- **Temperatura**

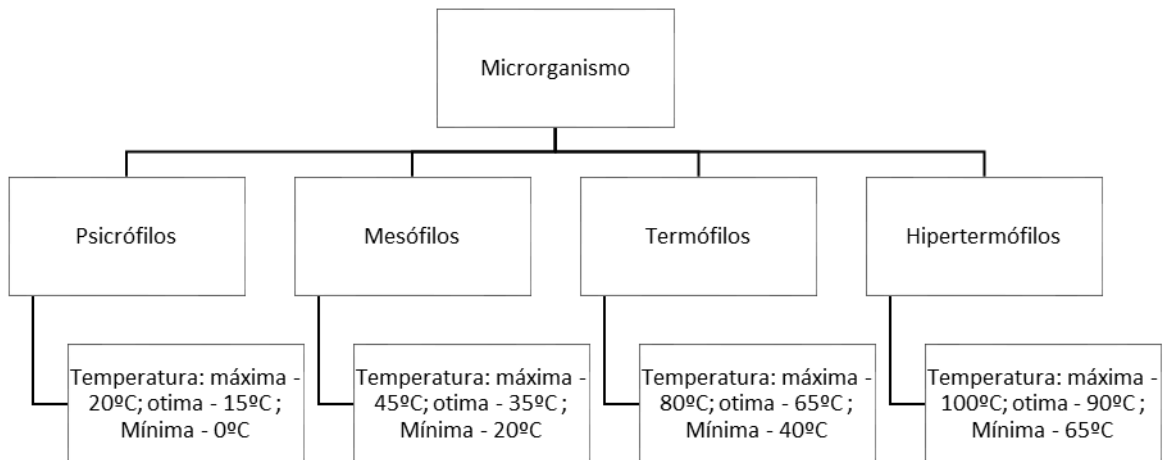
Os microrganismos são particularmente suscetíveis a temperaturas externas, uma vez que estes não conseguem regular a sua temperatura interna.

A figura 8 mostra um exemplo da temperatura no metabolismo microbiano, mas particularmente nas reações enzimáticas. Cada enzima tem uma temperatura em que a sua função é considerada ótima, em que o crescimento microbiano é máximo mas, de certa forma, a temperatura mínima de crescimento microbiano não é mensurável, e uma temperatura máxima acima da qual o crescimento do microrganismo não é possível. A temperatura ótima é sempre mais próxima da temperatura máxima do que da mínima. Estas três temperaturas, denominadas de Temperaturas cardiais, são específicas de cada microrganismo mas não são valores fixos, uma vez que podem ser modificados por outros fatores ambientais, tal como o pH ou os outros disponíveis. [Ferreira et al, 2010]



**Figura 8** - Efeito da temperatura na velocidade de crescimento microbiano - (a) processos de transporte lento, impedindo o crescimento; (b) reações enzimáticas ocorrem à velocidade máxima; (c) desnaturação proteica, colapso da membrana e lise celular. [Adaptado de Garbutt, 1997]

Em termos de temperatura ótima para o crescimento, podem distinguir-se até quatro grupos de microrganismos, como é descrito no diagrama 2:



**Diagrama 2** - Classificação de microrganismo quanto à sua gama de Temperaturas ótimas. [Adaptado de Prescott et al, 2008]

- **Oxigénio**

Os microrganismos diferem quanto às suas necessidades relativamente ao oxigénio (O<sub>2</sub>), podendo dividir-se em vários grupos, com base nos seus comportamentos em relação ao mesmo (Figura 9).

## Efeito do oxigênio no crescimento microbiano



Figura 9

**Figura 9** - O oxigênio como fator condicionante do crescimento microbiano. [Adaptado de Prescott et al, 2008]

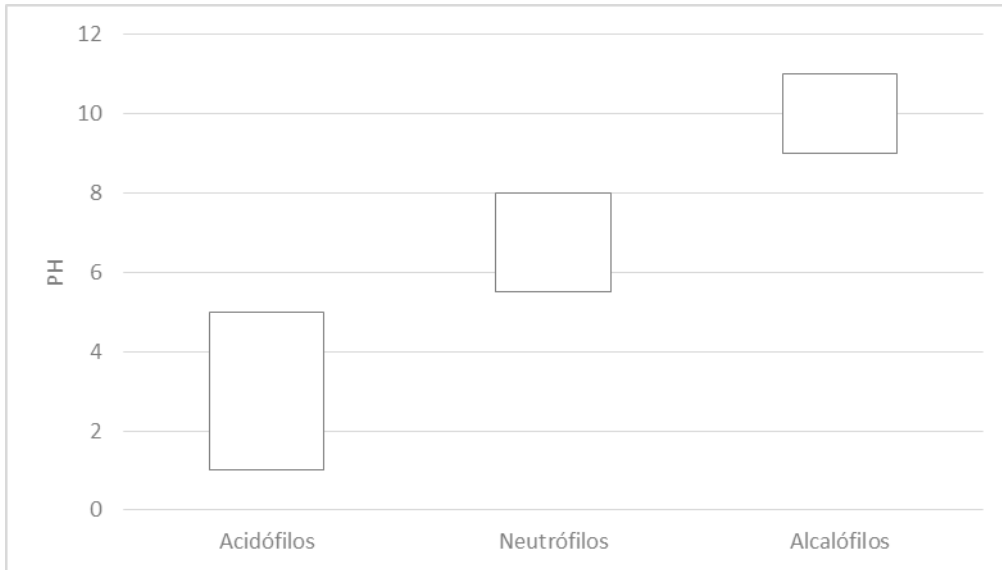
Os microrganismos aeróbios estritos (ou obrigatórios) são capazes de proliferar na presença de tensões de  $O_2$ . Estes são dependentes da respiração aeróbia para fazer face às suas exigências energéticas. Neste grupo têm-se, também, os microaerofílicos que requerem  $O_2$  mas em quantidades de tensão menores, devido a uma capacidade limitada para respirar devido a conterem algumas moléculas, como enzimas sensíveis ao  $O_2$ . Muitos destes aeróbios também são facultativos, apesar de proliferarem melhor na presença de  $O_2$ , são capazes de crescer na ausência da sua presença, usando processos bioenergéticos como a fermentação ou a respiração anaeróbia. [Ferreira et al,2010]

Para estes sistemas, existem microrganismos que não precisam de  $O_2$  para obter energia em vários processos, sendo designados de anaeróbios. Existem dois tipos de microrganismos anaeróbios: os aerotolerantes, que utilizam a energia exclusivamente para um processo fermentativo, não sendo sensíveis à presença de  $O_2$ ; e os estritos, para os quais o oxigênio provoca a inibição ou a morte celular. A razão pela qual a presença de oxigênio é letal para os anaeróbios estritos deve-se aos factos destes microrganismos não serem capazes de remover os produtos tóxicos, como peróxidos e radicais livres, que contrariamente aos anaeróbios, como a superoxidodismutase, a catalase e a peroxidase, decompõem estes produtos. [Ferreira et al,2010]

- pH

O pH de cada espécie tem um intervalo, com um valor, à qual a taxa específica de crescimento é máxima.

No geral, a maior parte das bactérias e protozoários são neutrófilos, enquanto que os fungos e as algas preferem ácidos (pH entre 4,0-6,0). Apesar de os microrganismos serem capazes de proliferar em intervalos de pH mais largos, e afastados do seu pH ótimo, existem limites para as suas tolerâncias. Esses intervalos são descritos no Gráfico 1 com os respectivos valores:



**Gráfico 1** - Classificação de microrganismos quanto à gama de pH. [Adaptado de Prescott et al, 2008]

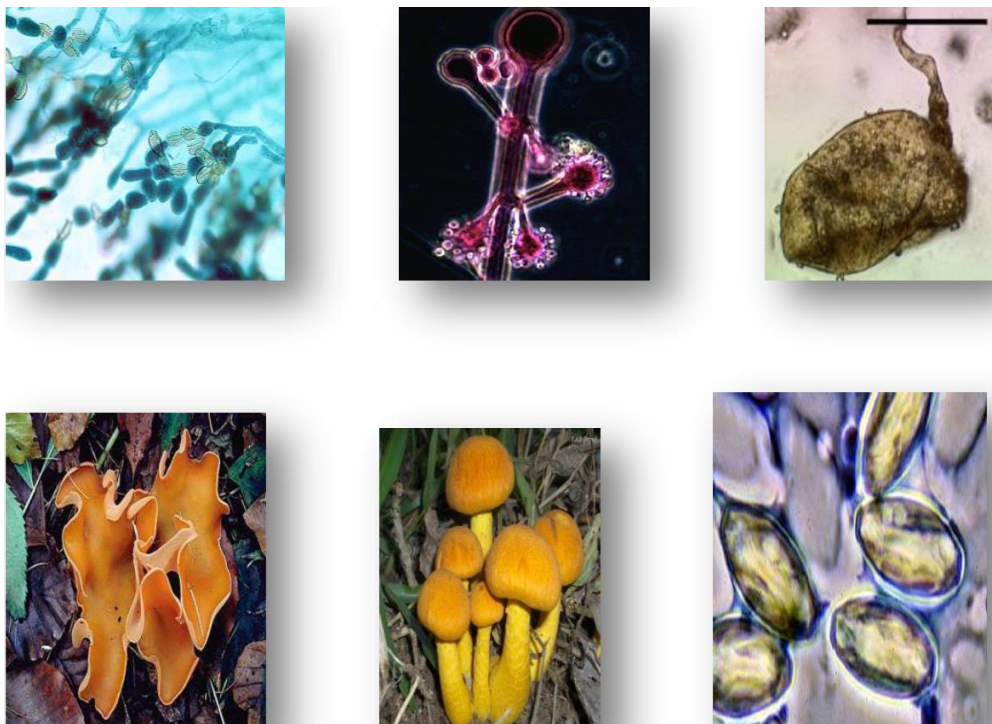
Os acidófilos apresentam um crescimento ótimo para valores de pH entre 0,0-1,0 e 5,5 (exemplo: *Cyanidium caldarium*); neutrófilos, para valores de pH entre 5,5 e 8,0 (exemplo: *E. Coli*); os alcalófilos, para valores de pH entre 8,5 e 11,5. [Prescott et al, 2008]

## 2.5 Fungos

O termo micologia deriva do grego, mykes (cogumelo) + logos, que significa o estudo dos cogumelos, que foram, durante muitos anos, os únicos fungos conhecidos. Hoje em dia, esta ciência estuda os fungos, palavra derivada do latim, fungus. [Prescott et al,2008]

Os fungos são seres ubiqüitários que têm um papel fundamental na vida do homem, quer de uma maneira benéfica, quer de um modo prejudicial. São capazes de decompor a matéria orgânica, interferindo no ciclo do carbono, do azoto e outros nutrientes da biosfera. Nas últimas duas décadas, os fungos apareceram como os grandes causadores de infeções humana graves, em especial entre indivíduos imunocomprometidos. Os fungos são usados em numerosos processos industriais com o fabrico de pão, cerveja, vinhos e determinados tipos de queijos. São também usados na produção comercial de muitos ácidos orgânicos, fármacos, tais como a cortisona e a ergometrina. [Ferreira et al,2010]

Estima-se que existam mais de 1.5 milhões de espécies de fungos, das quais, 90 mil deste enorme grupo de organismos, já tenham sido descritas. Não é surpresa nenhuma que a taxonomia destes organismos tenha sido revista várias vezes, e, mais recentemente, técnicas moleculares combinadas com condições morfológicas e ambientais tenham sido consideradas para um melhor entendimento da relação filogenética entre os vários grupos de fungos. A sociedade internacional de microbiologia classificou estes eucariontes em seis grandes grupos (Figura 10): Chytridiomycota (a), Zygomycota (b), Glomeromycota (c), Ascomycota (d), Basidiomycota (e) e Microsporidia (f). [Prescott et al,2008]



**Figura 10** - Espécies dos seis grandes grupos de fungos: Chytridiomycota (a), Zygomycota (b), Glomeromycota (c), Ascomycota (d), Basidiomycota (e) e Microsporidia (f). [Adaptado de Prescott et al, 2008]

### 2.5.1 Meio de Crescimento para fungos

Tal como as bactérias, os fungos também absorvem nutrientes, não ingerindo os mesmos. Esta absorção é feita por enzimas segregadas para o meio ambiente, quebrando as moléculas orgânicas em moléculas mais pequenas que passam rapidamente para o interior da célula. Todos os fungos são heterotróficos, podendo crescer em laboratório com uma simples mistura de um açúcar com uma fonte de azoto inorgânico ou uma orgânica simples, e alguns minerais, podendo alguns requerer apenas um meio mais complexo, que contenha uma grande variedade de compostos orgânicos, promovidos pela peptona ou pelo extrato de carne. [Morri et al,1989]

Para o crescimento fúngico, utiliza-se, em geral, uma elevada concentração de açúcar, cerca de 4%, e uma gama de pH baixo, entre os 3.8 e 5.6, em comparação com os meios de crescimento microbiano, que se situam normalmente entre os 6.5 e os 7.5. Este facto pode ser observado no nosso dia-a-dia, particularmente no crescimento de bactérias no leite e carnes, enquanto os fungos crescem em frutos citrinos e produtos de panificação. [Morri et al,1989]

Na Tabela 2, propõem-se um meio para o crescimento de fungos saprófitas, ou seja, que vivem na matéria orgânica morta. Observa-se a quantidade de glucose elevada e o pH ajustado a 5.6, relativamente baixo, inibindo, assim, o crescimento de bactérias. [Pelczar et al, 1993]

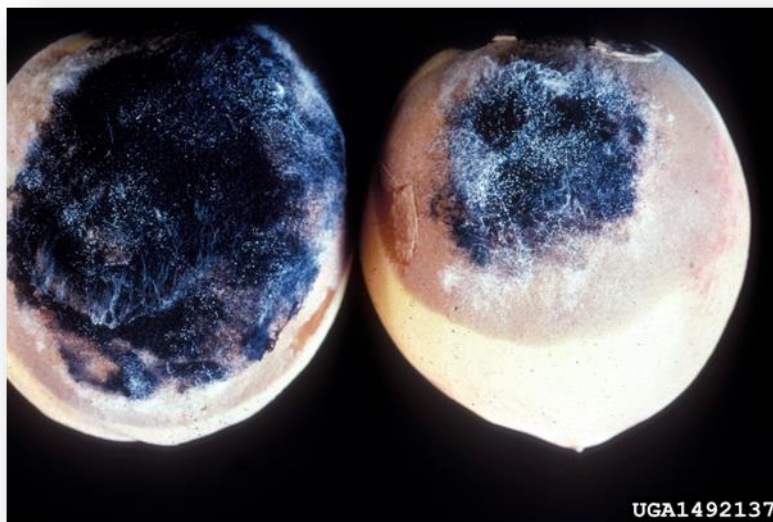
**Tabela 2-** Proposta de um meio para crescimento e isolamento de fungos [Adaptado de Pelczar et al, 1993]

Ingrediente	Função	Quantidade
Peptona	Fonte de C, N e de Nutrientes	10 g
Glucose	Fonte C e energia. Elevada concentração para o crescimento fúngico e não bacteriano	40 g
Agár	Agente de Solidificação	15 g
Água	Solvente	1000 mL
pH	pH baixo para suprimir o crescimento bacteriano	5.6

### 2.5.2 *Rhizopus stolonifer*

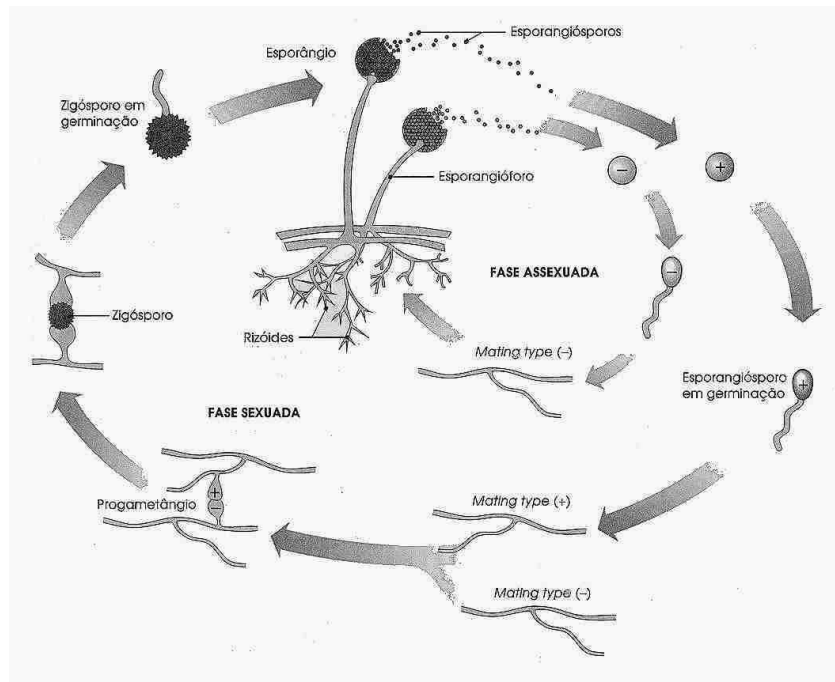
O *Rhizopus stolonifer* é um membro do grupo de fungos *Zygomycota*, informalmente denominado *Zygomycetes*. Este fungo cresce na superfície de frutos, vegetais e alimento ricos em hidratos de carbono, como por exemplo o pão (Figura 11). O *Rhizopus* usualmente reproduz-se assexuadamente (Figura 12), mas se a fonte de alimentação escasseia ou as condições ambientais são pouco favoráveis, então este reproduz-se sexuadamente. [Prescott et al, 2008]

Tal como as bactérias, este fungo liberta exoenzimas hidrolíticas com as quais vai digerir os substratos externos, absorvendo os produtos. É quimiorganoheterotrófico e emprega compostos orgânicos como fonte de carbono, eletrões e energia. [Prescott et al, 2008]



**Figura 11** - O fungo *Rhizophus stolonifer* no pão. A parte preta são os esporângios e o branco as hifas.

[Adaptado de <http://objetoseducacionais2.mec.gov.br/bitstream/handle/mec/12120/1492137.jpg?sequence=1> consultado a 25 de Maio de 2014]



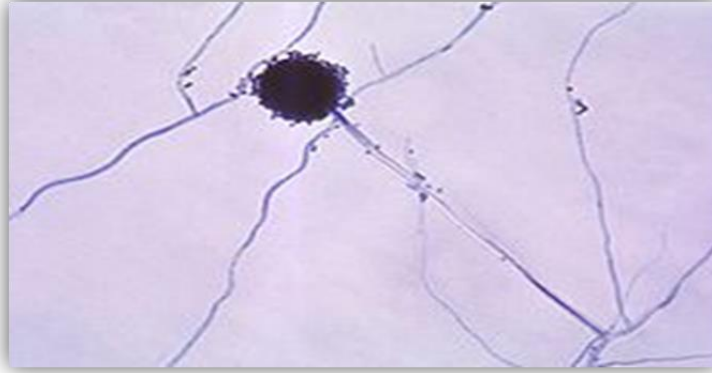
**Figura 12** - Ciclo de vida do fungo *Rhizopus stolonifer* [Adaptado de [http://alumnobioe.blogspot.pt/2013\\_03\\_01\\_archive.html](http://alumnobioe.blogspot.pt/2013_03_01_archive.html) e consultado a 25 de Maio de 2014]

### 2.5.3 *Aspergillus Niger*

O genero *Aspergillus* é responsável por vários casos de contaminação em alimentos como em animais. Com mais de 200 espécies identificadas na natureza, este pode ser encontrado em varias partes do mundo, nomeadamente nas estações do ano de temperatura mais baixo como é o Inverno e o Outono. [Rasooli et al, 2005]

O *Aspergillus niger* é aeróbio e saprófita, e capaz de crescer numa grande gama de substrato, sendo que é mais comum ser encontrado em ambientes onde existe abundancia de oxigénio. É considerado um fungo oportunista, sendo que é responsável por varias micoses e infeções nasais no ser humano, que em casos extremos pode provocar infeções pulmonares e cerebrais.

O *A. Niger* é um tipo de fungo filamentososo que pertence à família Ascomicota e tem um aspeto negro, devido às suas estruturas reprodutoras, ascos, como é visível na figura 13. [Baker, 2006]



**Figura 13** - *Aspergillus niger* onde se observa a estrutura reprodutora, asco. [Adaptado de [http://it.wikipedia.org/wiki/Aspergillus#mediaviewer/File:Aspergillus\\_niger\\_01.jpg](http://it.wikipedia.org/wiki/Aspergillus#mediaviewer/File:Aspergillus_niger_01.jpg) (Consultado em 26 de Agosto de 2014)].

O *Aspergillus niger* desempenha funções importantes em varias áreas de investigação, tal como, o estudo a secreção de proteínas eucarióticas, o efeito dos mais variados fatores ambientais na supressão de enzimas e em mecanismos onde estão envolvidos no controlo da morfologia fúngica. [Baker, 2006]

## 2.6 Biotransformação

A biotransformação consiste em conversões químicas de uma substância (material de partida) num produto, com o uso de microrganismos, contendo as enzimas necessárias ou através de enzimas isoladas. [Souza et al, 2008]

O metabolismo dos microrganismos pode prever determinadas reações, que induzem as alterações e modificações em certas moléculas, nomeadamente em grupos funcionais das mesmas. [Prescott et al,2008]

Esta utilização de microrganismos é favorável para a biotransformação, devido, principalmente, às quatro razões seguintes: [Souza et al, 2008]

### 1. Condições reacionais

As reações enzimáticas não induzem a destruição dos substratos sensíveis uma vez que estas são moderadas. Assim, podem combinar-se varias reações, utilizando espécies de microrganismos diferente, ou então, apenas uma etapa de fermentação com apenas um organismo com o sistema enzimático adequado. Os compostos sensíveis a ácidos, bases ou altas temperaturas, encontram, na biotransformação, as condições ideais para a sua subsistência. [Faber, 1997]

### 2. Especificidade do substrato

As enzimas apenas catalisam uma determinada etapa da reação, por isso, não há problema em alterar um certo grupo químico de uma molécula por outro semelhante, que não seja o pretendido. Assim, a utilização dos microrganismos na indústria permite a realização de reações difíceis por outros métodos. [Faber, 1997]

### 3. Estereoespecificidade

Quando se utiliza uma mistura racémica, o organismo apenas a utiliza de forma eficaz para a conversão de um dos isómeros. Isto permite, também, a introdução ou alteração estereoespecificamente de outros grupos substituintes para uma possível formação de centros ativos. [Faber, 1997]

### 4. Regioespecificidade

Estas transformações só afetam posições específicas de um determinado grupo funcional da molécula, mesmo na presença de grupos funcionais semelhantes. Assim, não parece ser necessário utilizar a proteção de grupos funcionais, que se usam em química orgânica, na síntese de moléculas. [Faber, 1997]

A biotransformação, hoje em dia, considera-se uma rotina economicamente competitiva e ecológica, através da qual se obtém produtos químicos novos. Vários estudos mostram que as biotransformações são um método eficiente para a obtenção de compostos com interesse comercial. Os compostos obtidos por ação microbiana podem ser considerados “naturais”, facto que promove grande aceitação por parte do consumidor, mostrando, assim, o grande valor dos compostos que utilizam estes compostos produzidos biotecnologicamente. [Martin et al, 2010]

Na totalidade destas biotransformações por sistemas enzimáticos, a hidroxilação de carbonos não ativados, tem sido desenvolvida com esteróides e terpenóides, devido a exigência industrial dos produtos finais. Como tal, a introdução de funções química em sítios inacessíveis das molecular e, também, melhorar propriedades já existentes, faz destes métodos-microbiológicos, uma óbvia alternativa para a obtenção de novos compostos polioxigenados a partir de produtos naturais. [Silva et al, 1999]

### 2.6.1 Biotransformação por *Rhizopus stolonifer*

As reações para a introdução de grupos hidroxilo são um passo altamente regio- e estéreo-seletivo num carbono inativado, mantendo-se desconhecido para o conhecimento químico. A incorporação da tecnologia biocatalítica oxidativa, usando espécies de *Rhizopus*, pode reduzir, em vários passos, todos estes processos de ativação e torná-la mais acessível para o público, em geral. [Martin et al, 2010]

Atualmente, do género *Rhizopus*, conhecem-se vários efeitos nas reações como, a hidroxilação em centro de carbonos saturados e insaturados, formação de epóxidos, reações redox, hidrólise de ésteres, reações de conjugação e degradação. Este género tem sido largamente utilizado na biotransformação de produtos naturais, incluindo esteróides, terpenóides e outros compostos, sendo as espécies *Rhizopus stolonifer* e a *Rhizopus oryzae* as mais usadas. [Granados et al,2009]

A pesquisa intensiva na literatura de todas as biotransformações, torna-se tediosa devido à grande investigação que ocorre neste campo, para aumentar a sua eficiência e encontrar microrganismos viáveis. [Granados et al,2009]

Acredita-se que o responsável pelas reações ocorridas nas biotransformações com *Rhizopus spp.* é o sistema enzimático citocromo P450 do mesmo (figura 14).

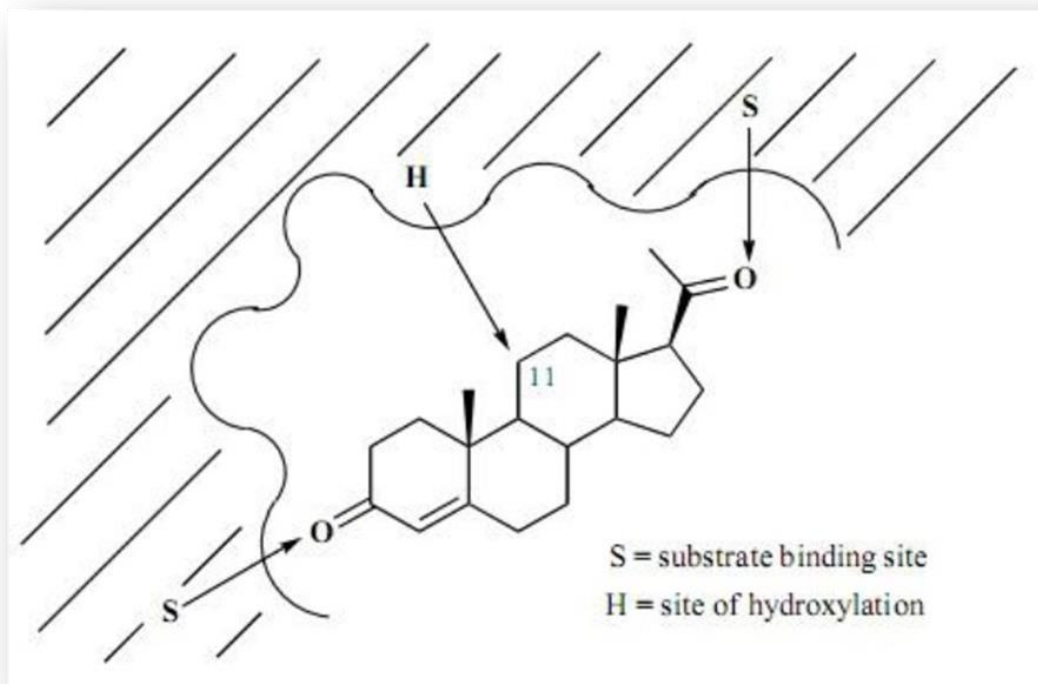


Figura 14 - Possível relação tridimensional entre o local de ligação do substrato e o local da hidroxilação [Adaptado de Martin et al, 2004]

### 2.6.2 Biotransformação por *Aspergillus niger*

Muito tem sido o trabalho desenvolvido com fungos e células vegetais *in vitro* devido as suas potencialidades na biotecnologia, inclusive no meio industrial. O uso na Biotransformação do *Aspergillus* é bastante conhecido e com capacidades para introduzir grupos funcionais, nomeadamente os oxigenados, em inúmeros substratos de terpenos. [Carvalho e Fonseca, 2006]

O *A. niger* é descrito na literatura para os mais variados substratos como é exemplo os esteroides, terpenos e alcaloides. Este fungo é utilizado para reduzir cetonas aos seus álcoois correspondentes e heterótomos oxidados. [Carvalho e Fonseca, 2006]

Como é exemplo da utilização do *Aspergillus* é os resultados descritos na tabela seguinte.

Tabela 3 - Dois tipos de Biotransformação onde foi usado o fungo *Aspergillus*

Composto	Tipo de reação	Produto (s)	Referencia
Limoneno	Hidroxilação	4-terpineol	Krings e Berger, 2010
Ácido Kaurenóico	Dihidroxilção	Dois metabolitos: um com a fórmula $C_{20}H_{30}O_4$ e outro com a fórmula $C_{20}H_{31}O_4$	Marquina et al , 2009

Tal como descrito anteriormente, esta hidroxilação e oxidação ocorre no sistema enzimático P450 do fungo, como acontece no género *Rhizopus*. [Martin et al, 2004]

Com a evolução da tecnologia e o uso das Biotransformação para os mais variados substratos, este tipo de produção pode ser muito viável economicamente para a produção dos mais variados compostos terpénicos. [Carvalho e Fonseca, 2006]

## Capítulo 3

---

### 3. Materiais e Métodos

#### 3.1 Material Vegetal

A *Cistus libanotis* pertence à família *Cistaceae*, que é uma família nativa da zona do mediterrâneo, com mais de 200 espécies conhecidas.

Muitos dos estudos já realizados sobre o género *Cistus*, revelaram um interesse maioritário na composição do seu óleo essencial. No entanto, muitos estudos publicados sugerem que este género apresenta na sua composição polifenólicos.

Na *Cistus Libanotis* os produtos que foram isolados em quantidade significativa foram triterpenos tetracíclicos do esqueleto de dammarano, como é o exemplo, a 3-dammaranona (figura 15), sendo este o composto utilizado com produto de partida para a síntese de outros compostos e para a Biotransformação.

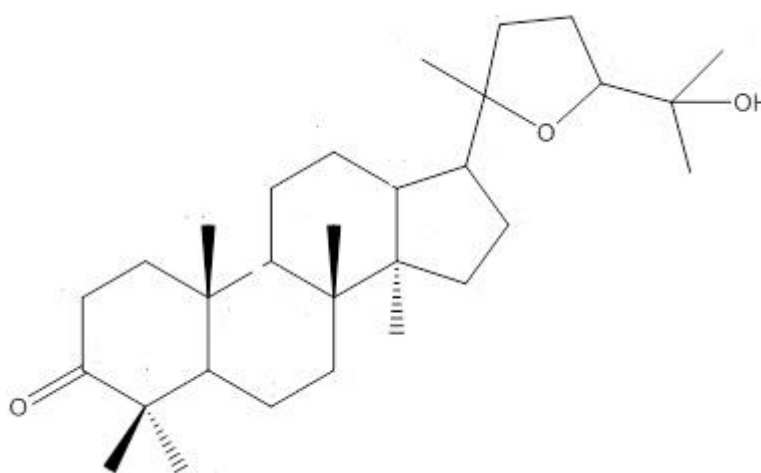


Figura 15 - Molécula 3-Dammaranona usado como produto de partida da síntese deste projeto.

#### 3.2 Equipamentos

**Esterilização:** Todo o material necessário para a realização dos procedimentos microbiológicos deste trabalho foi esterilizado numa autoclave Raypa® - Steam Sterilizer, fornecida pela firma Mc Sovela. O material foi colocado na autoclave e foi esterilizado durante 15 minutos, a 121 °C e a uma pressão de 18 psi. A autoclave é calibrada mensalmente.

**Incubadora Orbital:** A biotransformação foi realizada num incubadora orbital - Rotabit®, fornecido pela firma JP Selecta.

**Cromatografia em Coluna (CC):** A cromatografia em coluna a pressão moderada foi realizada utilizando uma bomba Buchi® pump controller C-610, e recolheram-se as frações com o colector automático Buchi® fraction Colector C-660.

**Evaporador rotativo:** O solvente das amostras foi evaporado num evaporador Buchi®, a pressão reduzida e a 40°C.

**Espectros de ressonância magnética nuclear de protão (<sup>1</sup>H - RMN):** Foram realizados num espectrofotómetro Bruker 400 (400 MHz). Os desvios químicos ( $\delta$ ) são expressos em partes por milhão (ppm). As amostras foram dissolvidas em clorofórmio deuterado e depois analisadas.

**Espectros de ressonância magnética nuclear de carbono 13 (<sup>13</sup>C - RMN):** Foram realizados num espectrofotómetro Bruker 400 (100,62 MHz). Os desvios químicos ( $\delta$ ) são expressos em partes por milhão (ppm). As amostras foram dissolvidas em clorofórmio deuterado e depois analisadas.

**Espectros de Massa (GC-MS):** foram realizados num espectrómetro de massa Simazu® QP 5000, associado a um cromatógrafo de gases.

### 3.3 Técnicas Cromatográficas

#### 3.3.1 Cromatografia de camada fina

Com esta técnica foi possível estudar as polaridades e comparar com as frações eluídas das colunas cromatográficas.

A cromatografia de camada fina (TLC) foi feita em placas de sílica gel de 0,2 mm. Os cromatogramas revelaram-se por imersão das placas numa solução de ácido fosfomolibdico dissolvido em etanol a 5%, sendo depois colocadas na estufa a aproximadamente 120°C, durante alguns minutos, para se revelarem os produtos.

#### 3.3.2 Cromatografia em Coluna a pressão moderada

Esta técnica é indicada para o fracionamento rápido de misturas. A cromatografia em coluna realizou-se com sílica gel flash de espessura de 0,04 - 0,06 mm, como solido absorvente. Para a fase móvel foi utilizado primeiramente n-hexano e, em seguida, uma mistura de n-hexano e

acetato de etilo em proporções de polaridades crescentes. No final, para a lavagem e remoção do que tenha ficado retido na coluna, utilizou-se metanol.

### **3.3.3 Separação de Componentes**

Realizou-se uma cromatografia em coluna (descrito no ponto 3.3.2) para a separação dos compostos de biotransformação. Para avaliar o grau de separação dos componentes realizaram-se cromatografias de camada fina, usando como eluente misturas de n-hexano e acetato de etilo com diferentes polaridades.

### **3.3.4 Caracterização dos Produtos**

Os diversos compostos presentes nos produtos foram caracterizados por técnicas de ressonância magnética nuclear de próton ( $^1\text{H-RMN}$ ) e de carbono 13 ( $^{13}\text{C-RMN}$ ).

## 3.4 Biotransformação

### 3.4.1 Culturas de Trabalho - Fungos *Rhizopus stolonifer* e *Aspergillus niger*

Neste trabalho vão ser utilizados os dois microrganismos (fungos), *Rhizopus stolonifer* CECT 2344 e *Aspergillus niger* CECT 2806.

Os microrganismos em estado liofilizado são cuidadosamente retirados segundo as instruções do fornecedor. Inocularam-se os microrganismos, por estrias, no meio de cultura sólido Agar Sabouraud Gentamicina Cloranfenicol 2, que é um meio seletivo e que inibe o crescimento bacteriano, ficando a cultura durante 72 horas a 30 °C (Cultura primária). Em seguida, retira-se uma pequena amostra do fungo da cultura primária e através do método de estrias em placa de petri no mesmo meio de cultura, volta-se a inocular nas mesmas condições (Cultura Secundária), sendo esta a cultura de Trabalho.

### 3.4.2 Meio de Cultura e respetivo procedimento Da Biotransformação

Para o sucesso da Biotransformação, o meio deve possuir uma fonte de carbono e de azoto que permita aos microrganismos se possa desenvolver.

Para 1 litro de meio a proposta de composição é:

- Glucose 20,0 gramas;
- Peptona 5,0 gramas;
- Hidrogenofosfato de potássio 5,0 gramas;
- Água 1 Litro.

Distribuir o meio de Cultura em 9 erlenmeyers (aproximadamente 100 mL) e esterilizar na autoclave. Após o arrefecimento do meio, procede-se ao inóculo do fungo, proveniente do crescimento da cultura de trabalho, através de uma ansa estéril para um dos erlenmeyers. Para se efetuar o inóculo passou-se com a ansa na placa de petri contendo o fungo, recolhendo uma pequena parte e inocula-se no meio previamente esterilizado.

Após proceder ao inóculo, coloca-se o erlenmeyer numa incubadora orbital a uma temperatura média de 30 °C durante 24 horas, com agitação de 180 rpm.

Depois deste período de incubação, pipeta-se 10 mL do meio deste erlenmeyer para os restantes 8 com o meio estéril. Colocam-se no incubador orbital a 30 °C e 180 rpm, durante 4 dias.

Ao fim deste tempo adiciona-se o produto a biotransformar numa proporção de 25 mg/100 mL de meio de cultura. O tempo de incubação da biotransformação foi variado, sendo que se situou entre os cinco e os treze dias.

Todo este procedimento deve ser seguido por TLC, retirando amostras a vários dias específicos para verificar a extensão da biotransformação.

Este procedimento deve ser executado para os dois fungos.

### **3.4.3 Extração dos produtos da Biotransformação**

Após o tempo de incubação testado, deve-se filtrar a biomassa a vácuo e lavar as células com acetato de etilo através do seguinte procedimento:

- Colocar a biomassa num erlenmeyer com acetato de etilo e utilizar ultrassons durante 10 minutos para extrair eventuais produtos que se encontrem no interior das células.
- Filtrar, lavar novamente a biomassa com acetato de etilo (500 mL aproximadamente) e juntar o filtrado das células com o filtrado obtido inicialmente.
- Realizar a extração numa ampola de decantação. Lavar a fase aquosa (3 x 500 mL) com acetato de etilo.
- Secar a fase orgânica com sulfato de sódio anidro para eliminar os resíduos de água, durante 12 horas.
- Filtrar a fase orgânica com um filtro de pregas e transferir o conteúdo para um balão de 250 mL.
- Evaporar o solvente, num evaporador rotativo de baixa pressão, a cerca de 220 mbar, a aproximadamente 40 °C.



# Capítulo 4

---

## 4 Resultados e Discussão

### 4.1 Processo de Síntese com 3-Dammaranona

O Substrato utilizado neste projeto, já como descrito anteriormente, foi a 3-Dammaranona (Figura 16).

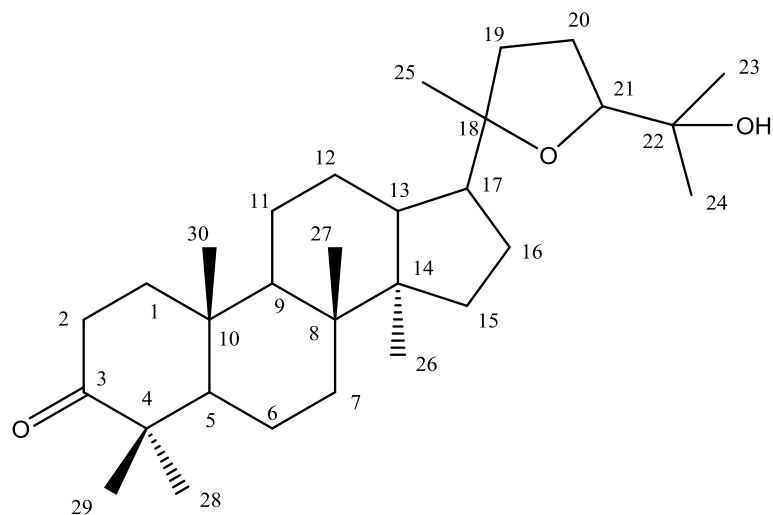


Figura 16 - Composto de Partida da síntese, 3-Dammaranona.

Foi feito um planejamento de uma síntese com este composto, no qual foi utilizado vários reagentes, de modo a obter-se um composto final de interesse científico (Figura 17). Realizaram-se diversas colunas cromatográficas para efetuar a separação dos mais variados compostos obtidos após cada etapa do processo.

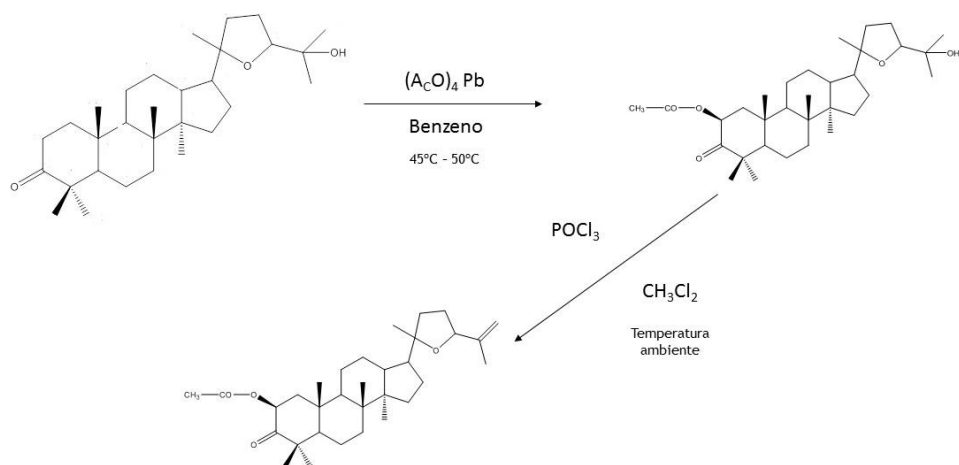


Figura 17 - Processo de Síntese planejado com a 3-Dammaranona.

Na Tabela 4 apresenta-se a mistura de eluentes usada na primeira reação de oxidação, com benzeno e Tetracetato de Chumbo, durante 24 horas a uma temperatura de cerca de 40 °C.

Tabela 4- Mistura de eluentes usado na primeira reação de oxidação.

Eluente/Porção	Volume/ mL
Hexano	600
98:2 (Hexano/Acetato)	1000
95:5 (Hexano/Acetato)	1000
90:10 (Hexano/Acetato)	1000
80:20 (Hexano/Acetato)	1000
70:30 (Hexano/Acetato)	1000
60:40 (Hexano/Acetato)	1000
Acetato	600

Controlou-se por cromatografia de camada fina o grau de separação dos compostos obtidos. Após isso, evaporou-se a mistura de solvente utilizada e controlou-se o peso das frações com vista a efetuar a sua caracterização.

A tabela 5 indica os valores de peso das frações mais significativas.



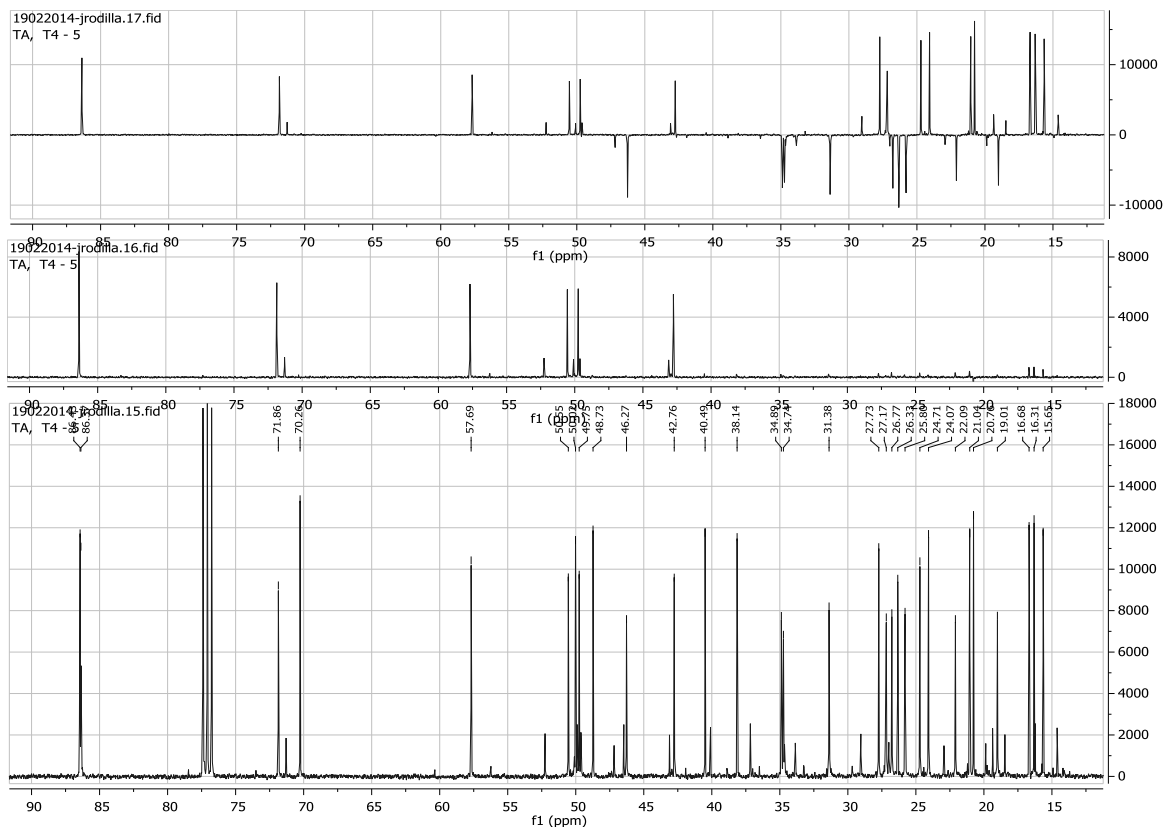


Figura 19 - Espectro de  $^{13}\text{C}$ -RMN para o composto obtido da primeira reação.

Na tabela 6 e 7 estão presentes os dados de  $^{13}\text{C}$ -RMN e de  $^1\text{H}$ -RMN para o composto obtido desta reação separado na coluna cromatográfica.

Tabela 6 - Dados de  $^{13}\text{C}$ -RMN para o composto obtido, separado na coluna cromatográfica

Posição	$\delta\text{ C (ppm)}$	Tipo C
1	46,4	$\text{CH}_2$
2	72,0	CH
3	209,4	C
4	48,9	C
5	57,9	CH
6	19,2	$\text{CH}_2$
7	26,9	$\text{CH}_2$
8	50,2	C
9	50,7	CH
10	38,3	C
11	22,3	$\text{CH}_2$
12	25,9	$\text{CH}_2$
13	42,9	CH
14	40,6	C
15	31,5	$\text{CH}_2$
16	35,0	$\text{CH}_2$
17	49,9	CH
18	86,6	CH
19	34,9	$\text{CH}_2$
20	26,5	$\text{CH}_2$

21	86,5	CH <sub>2</sub>
22	70,4	C
23	27,9	CH <sub>3</sub>
24	24,2	CH <sub>3</sub>
25	27,3	CH <sub>3</sub>
26	16,8	CH <sub>3</sub>
27	15,8	CH <sub>3</sub>
28	24,9	CH <sub>3</sub>
29	20,9	CH <sub>3</sub>
30	16,5	CH <sub>3</sub>
CH <sub>3</sub> - COO	170,4	-
CH <sub>3</sub> - COO	21,2	-

Tabela 7 - Dados de <sup>1</sup>H-RMN para o composto obtido, separado na coluna cromatográfica.

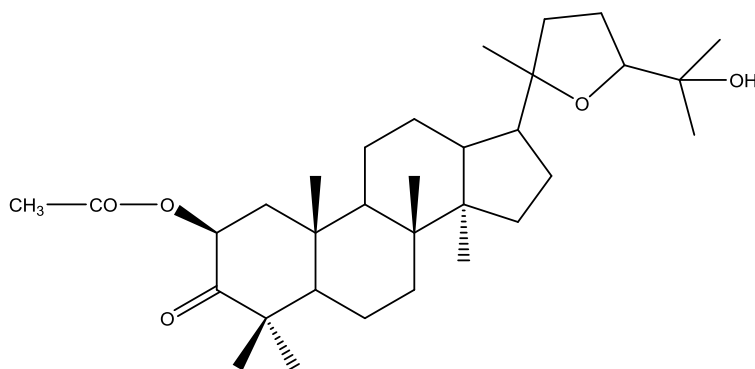
H	Composto 2
Grupo Acetato	2,13;3H;s
Me-30	1,22;3H; s
Me-23	1,18;3H;s
Me-25	1,14;3H;s
Me-29	1,13;3H;s
Me-28	1,11;3H;s
Me-24	1,10;3H;s
Me-27	1,02;3H; s
Me-26	0,85;3H; s

Ao analisar os dados de <sup>13</sup>C-RMN, podemos afirmar que o composto resultante desta reação, apresenta 30 átomos de carbono, o que confirma estarmos na presença de um triterpeno. É de contrastar também que possui 6 átomos de carbonos quaternários.

Este composto possui 6 sinais relativos a átomos de carbonos terciários, 10 sinais relativos a átomos de carbono secundários e 8 sinais relativos a átomos de carbono primários.

Quando analisamos os dados de <sup>1</sup>H-RMN vemos a presença de 8 singletos que correspondem aos prótons dos grupos metilos das posições 23 a 30, respetivamente. Também na posição dois, existe um singlete que indica a presença do grupo acetato da molécula.

O rendimento obtido nesta coluna cromatográfica foi de aproximadamente 21.4%, e depois de evaporado, o produto procurado (figura 20) foi removido com uma polaridade de 80:20 em hexano e acetato.



**Figura 20** - Estrutura obtida (composto 2) da reacção de oxidação da 3-dammarranona com benzeno e tetracetato de chumbo.

Após a obtenção desta estrutura procedeu-se à reacção de eliminação, com cloreto de mesilo e cloreto de metileno à temperatura ambiente, durante 24 horas. Na Tabela 8 apresenta-se a mistura de eluentes usada na coluna cromatográfica para separação dos compostos.

**Tabela 8** - mistura de eluentes usada na reacção do composto 2 com cloreto de mesilo em cloreto metilo.

<b>Eluente/Porção</b>	<b>Volume/ mL</b>
<b>Hexano</b>	500
<b>98:2 (Hexano/Acetato)</b>	1000
<b>95:5 (Hexano/Acetato)</b>	1000
<b>90:10 (Hexano/Acetato)</b>	1000
<b>80:20 (Hexano/Acetato)</b>	1000
<b>70:30 (Hexano/Acetato)</b>	1000
<b>60:40 (Hexano/Acetato)</b>	1000
<b>Acetato</b>	600

Controlou-se por cromatografia de camada fina o grau de separação dos compostos obtidos. Após isso, evaporou-se a mistura de solvente utilizada e controlou-se o peso das frações com vista a efetuar a sua caracterização.

A tabela 9 indica os valores de peso das frações mais significativas.

**Tabela 9** - Pesos das frações mais significativas da coluna cromatográfica.

<b>Fração</b>	<b>Polaridade (Hex:Acet)</b>	<b>Massa de Produto (mg)</b>
<b>25-30</b>	95:5	9.3
<b>36-43</b>	90:10	21
<b>44-50</b>	80:20	30



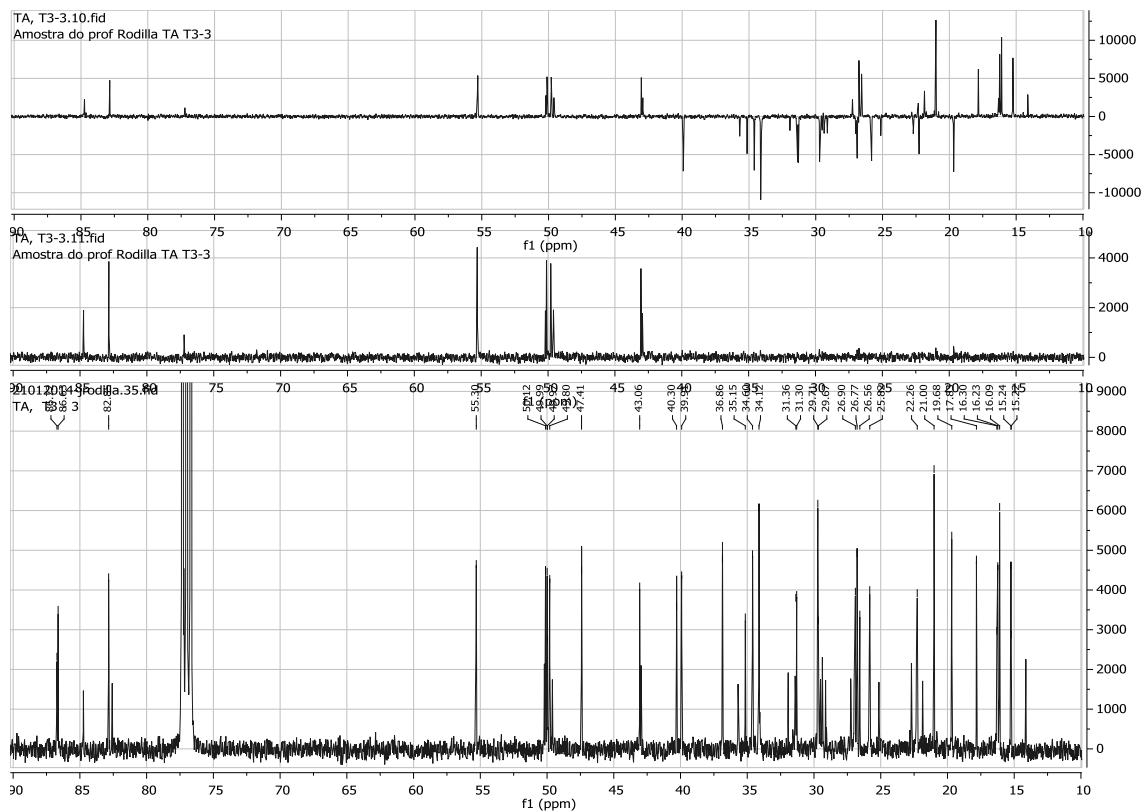


Figura 22 - Espectro de  $^{13}\text{C}$ -RMN para o composto obtido da reação.

Na tabela 10 e 11 estão presentes os dados de  $^{13}\text{C}$ -RMN e de  $^1\text{H}$ -RMN para o composto obtido desta reação separado na coluna cromatográfica.

Tabela 10 - Dados de  $^{13}\text{C}$ -RMN para o composto obtido, separado na coluna cromatográfica.

Posição	$\delta$ C (ppm)	Tipo C
1	40,1	CH <sub>2</sub>
2	77,4	CH
3	218,4	C
4	47,6	C
5	55,4	CH
6	19,8	CH <sub>2</sub>
7	27,0	CH <sub>2</sub>
8	49,9	CH
9	50,3	CH
10	37,0	C
11	22,4	CH <sub>2</sub>
12	26,0	CH <sub>2</sub>
13	43,2	CH
14	40,4	C
15	31,5	CH <sub>2</sub>
16	34,7	CH <sub>2</sub>
17	50,1	CH
18	86,8	C
19	34,3	CH <sub>2</sub>
20	29,8	CH <sub>2</sub>

21	83,0	CH
22	146,3	C
23	110,5	CH <sub>2</sub>
24	19,8	CH <sub>3</sub>
25	26,9	CH <sub>3</sub>
26	16,4	CH <sub>3</sub>
27	15,4	CH <sub>3</sub>
28	26,7	CH <sub>3</sub>
29	18,0	CH <sub>3</sub>
30	16,2	CH <sub>3</sub>
CH <sub>3</sub> - COO	173,4	-
CH <sub>3</sub> - COO	21,1	-

Tabela 11 - Dados de <sup>1</sup>H-RMN para o composto obtido, separado na coluna cromatográfica.

H	Composto 3
Metileno terminal	5,00;1H;s
Metileno terminal	4,78;1H;s
Grupo Acetato	2,14;3H;s
Me-23	1,71;3H;s
Me-30	1,46;3H;s
Me-29	1,27;3H;s
Me-24	1,23;3H;s
Me-25	1,14;3H;s
Me-28	1,11;3H;s
Me-27	1,03;3H;s
Me-26	0,85;3H;s

Ao analisar os dados de <sup>13</sup>C-RMN, podemos afirmar que o composto resultante desta reação, apresenta 30 átomos de carbono, o que confirma estarmos na presença de um triterpeno, mais uma vez. Este apresenta também 6 átomos de carbonos quaternários.

Este composto possui 7 sinais relativos a átomos de carbonos terciários, sendo que um destes se encontra sobre ligação dupla, 10 sinais relativos a átomos de carbono secundários e 7 sinais relativos a átomos de carbono primários.

Quando analisamos os dados de <sup>1</sup>H-RMN vemos a presença de 7 singletos que correspondem aos prótons dos grupos metilos das posições 24 a 30, respetivamente. Também na posição dois, existe um singleto que indica a presença do grupo acetato da molécula e os respetivos metilos terminais da molécula.

Também foi realizado um espectro de massa, por cromatografia gasosa de massa, devido à pouca quantidade de produto obtido, de modo a obter uma estrutura mais clara do composto.

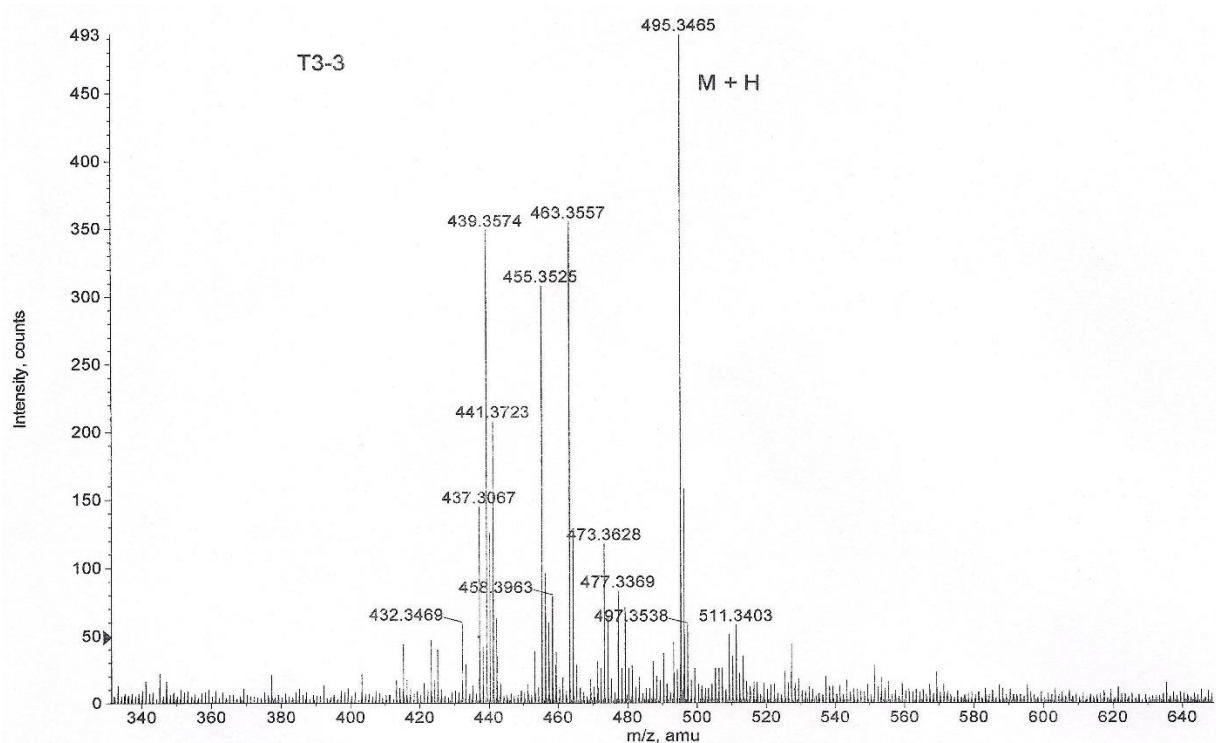


Figura 23 - Espectro de Massa do Produto 3.

Pela análise do espectro de massa, verificamos que o composto possui a massa de 495,34 g/mol, o que em comparação com o composto inicial ( $C_{30}H_{50}O_3$ ), possui uma massa de 443,37 g/mol, o que indica a presença do grupo acetato e possivelmente uma ligação dupla. Como tal, a fórmula do composto obtido será  $C_{32}H_{47}O_4$ , sendo este coincidente com a massa de 495,34 g/mol.

O rendimento obtido nesta coluna cromatográfica foi de aproximadamente 10.6%, e depois de evaporado, o produto procurado (figura 24) foi removido com uma polaridade de 95:5 em hexano e acetato.

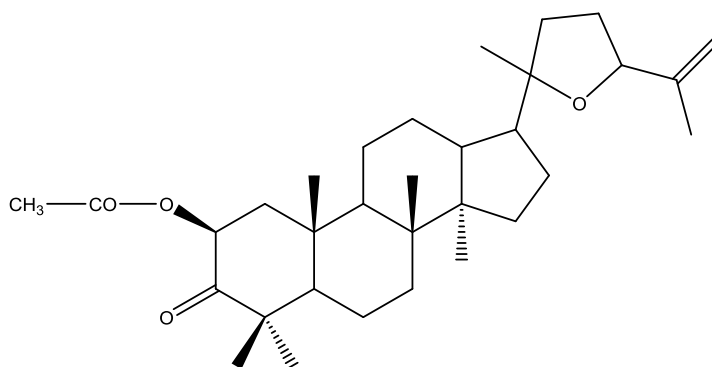


Figura 24 - Estrutura obtida (composto 3) da reação de cloreto de mesilo com cloreto de metilo.

No apêndice A e B encontra-se as tabelas e os espectros, respectivamente, relativos às massas e aos espectros dos produtos separados da repetição destas reações com vista a melhorar os pesos obtidos das colunas cromatográficas realizadas.

## 4.2 Biotransformação

Procedeu-se à incubação da 3-Dammaranona com os dois fungos, *Aspergillus niger* e *Rhizopus stolonifer*, através do procedimento já descrito.

Foi feita a incubação do produto, numa proporção de 25 mg/100 mL de meio de cultura, de modo a não inibir a atuação dos fungos.

Os fungos reagem de maneira a tornar o produto a biotransformar menos prejudicial, e assim, defenderem-se deste mesmo. Desta forma, são efetuadas alterações na molécula, que normalmente se traduzem na introdução de grupos oxigenados na mesma.

No final do período de incubação, era notória a goma de cor escura obtida, devido ao tempo utilizado para cada fungo.

### 4.2.1 Biotransformação com *Rhizopus stolonifer*

Através do diagrama 3 podemos observar o esquema geral dos resultados obtidos para este fungo após a Biotransformação e a respetiva extração dos produtos.

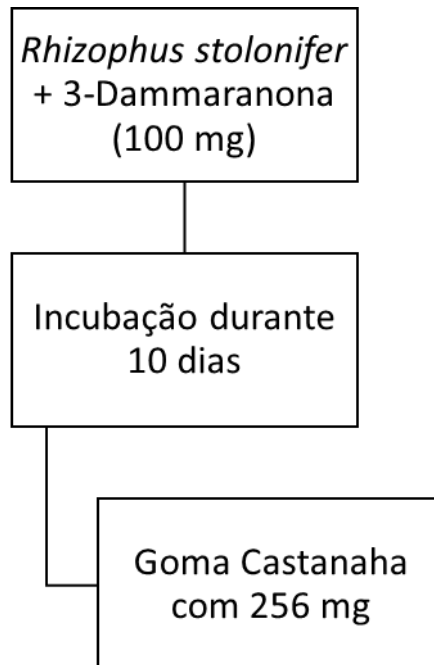
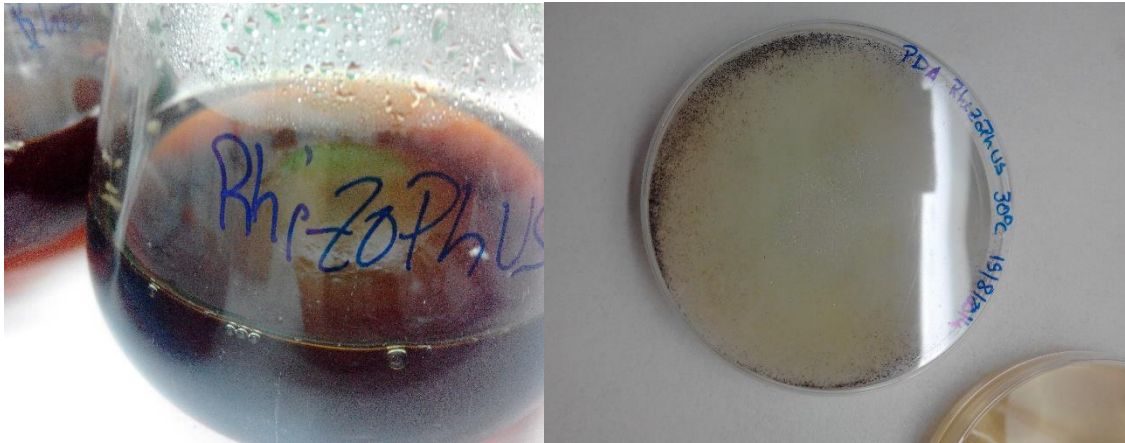


Diagrama 3 - Resultado da Biotransformação para o fungo *Rhizopus stolonifer*.

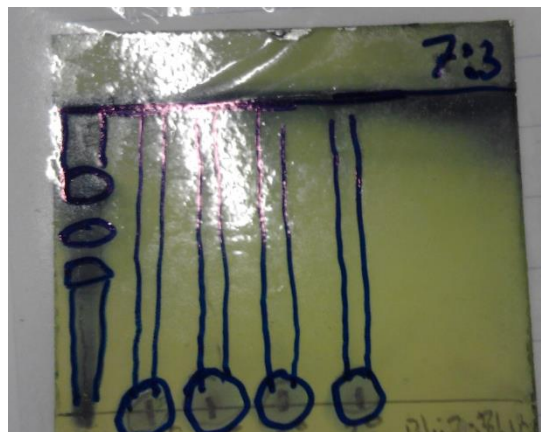
Todo o procedimento foi realizado de modo, a poder ativar o sistema enzimático do fungo, para que este adquira estabilidade antes de entrar em contacto com o meio líquido e não correr risco de perder o microrganismo. Na figura 25 encontra-se o inóculo do fungo no meio

sólido de PDA, que se deixou a maturar durante 72 horas e o respetivo inoculo no meio cultura liquido preparado para a Biotransformação.



**Figura 25** - Cultura de trabalho de *Rhizopus stolonifer* em PDA e Erlenmeyers com meio de cultura e o fungo.

Todo o processo de Biotransformação foi acompanhada por cromatografia em camada fina, de forma a verificar o grau de degradação do produto, como mostra a figura 26.

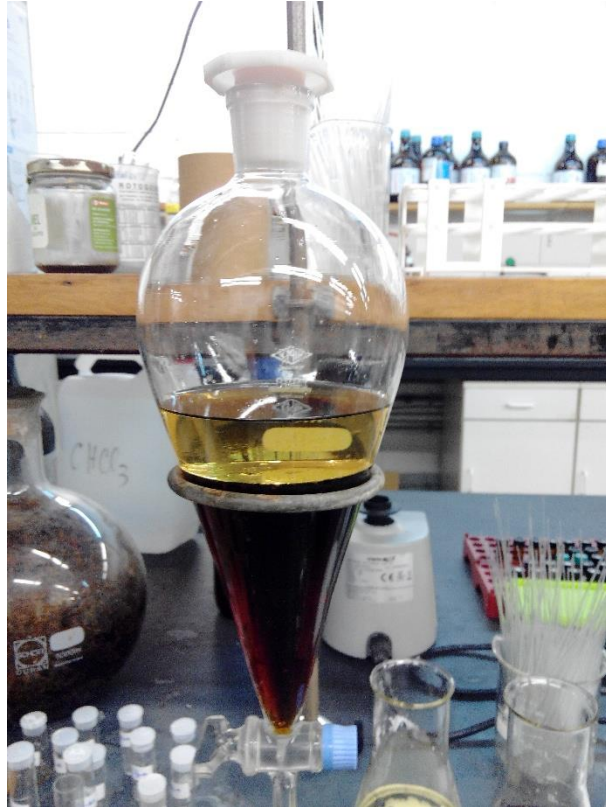


**Figura 26** - Cromatografia em camada fina da Biotransformação ao longo do tempo.

As amostras foram retiradas ao longo do tempo, ao primeiro, ao quarto, ao sexto e ao nono dia para realizar a cromatografia em camada fina.

Pela TLC, podemos ver que logo a partir do segundo dia, já não era visível o produto, o que sugere que este já tivesse sido metabolizado em produto da Biotransformação, ou que se encontrava no sistema enzimático do fungo.

Finalizado o tempo de fermentação, procedeu-se à extração dos produtos, através de uma extração líquido-líquido numa ampola de decantação como mostra a figura 27.



**Figura 27** - Extração líquido-líquido, como a separação evidente da fase aquosa a castanho e a fase orgânica incolor.

Depois de realizada a extração, evaporou-se o solvente e obteve-se uma goma castanha, como se pode observar na figura 28, com a massa de 256 mg.



**Figura 28** - Resultado da Biotransformação pelo fungo *Rhizopus stolonifer*

Após a extração, foi realizada a separação em coluna cromatográfica dos vários componentes. Na tabela seguinte apresenta-se a mistura de eluentes usada nesta coluna.

Tabela 12- Mistura de Eluentes usado na coluna cromatográfica.

<b>Eluente/Porção</b>	<b>Volume/ mL</b>
<b>Hexano</b>	200
<b>98:2 (Hexano/Acetato)</b>	200
<b>90:10 (Hexano/Acetato)</b>	300
<b>80:20 (Hexano/Acetato)</b>	200
<b>70:30 (Hexano/Acetato)</b>	200
<b>60:40 (Hexano/Acetato)</b>	200
<b>50:50 (Hexano/Acetato)</b>	200
<b>Acetato</b>	200
<b>Metanol</b>	200

Controlou-se por cromatografia de camada fina o grau de separação dos compostos obtidos. Após isso, evaporou-se a mistura de solvente utilizada e controlou-se o peso das frações com vista a efetuar a sua caracterização.

A tabela 13 indica os valores de peso das frações mais significativas.

Tabela 13- Pesos das frações mais significativas da coluna cromatográfica.

<b>Fração</b>	<b>Massa de Produto (mg)</b>
<b>1-13</b>	18.6
<b>14-20</b>	51
<b>21-25</b>	34

Realizaram-se as análises espectroscópicas destas mesmas frações, e obtiveram-se os espectros apresentados a seguir.

Nas figuras 29 e 30, apresenta-se os espectros de prótão e carbono 13, correspondente à fração com o produto da reação (14-20).

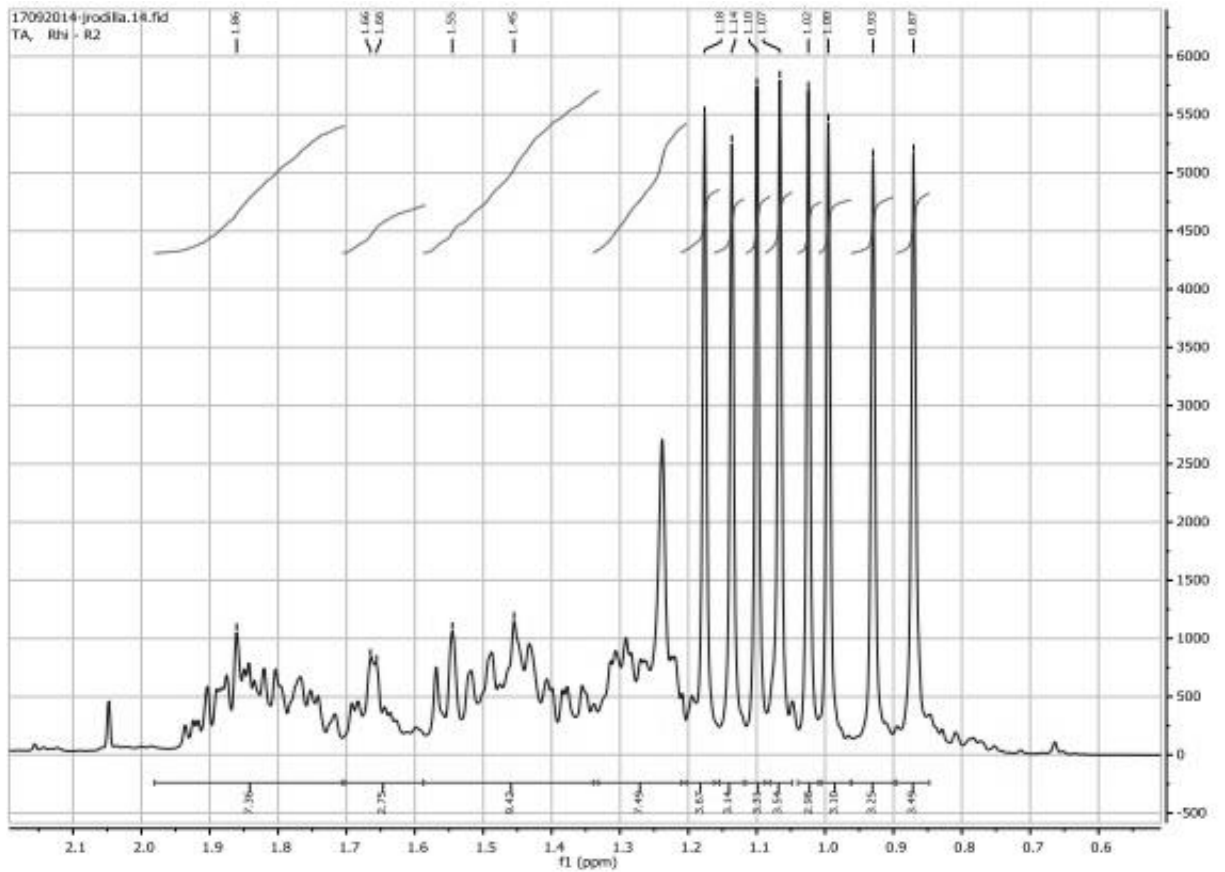


Figura 29 - Espectro de  $^1\text{H}$ -RMN para a Biotransformação com *Rhizopus stolonifer*

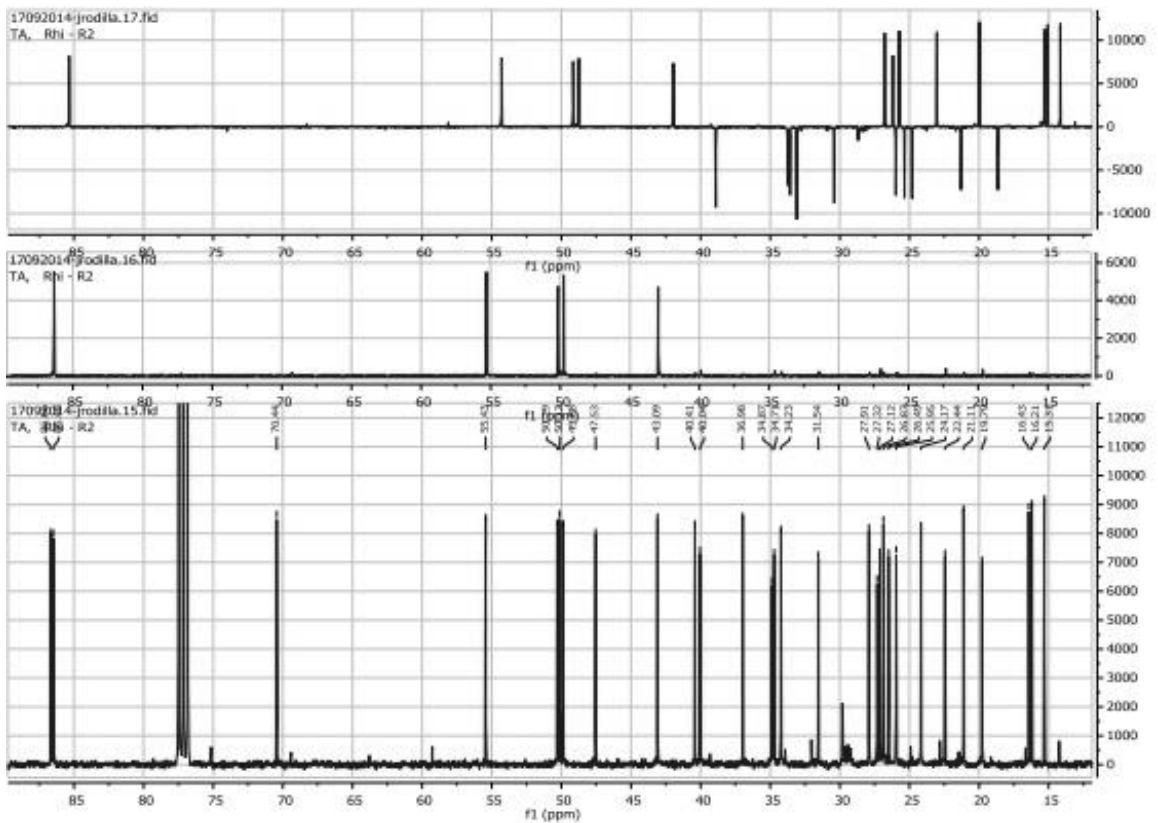


Figura 30 - Espectro de  $^{13}\text{C}$ -RMN para a Biotransformação com *Rhizopus stolonifer*

Através da análise dos espectros percebe-se que a fração que tinha peso mais significativo dizia respeito a meio de cultura presente na fase orgânica, e o restante a Produto inicial por transformar, o que indica que a Biotransformação não foi bem-sucedida, pelo menos para as condições de fermentação escolhidas.

#### 4.2.2 Biotransformação com *Aspergillus niger*

Através do diagrama 4 podemos observar o esquema geral dos resultados obtidos para este fungo após a Biotransformação e a respetiva extração dos produtos.

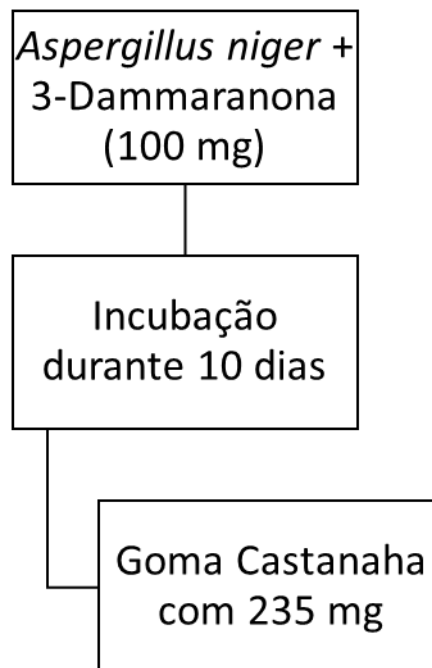
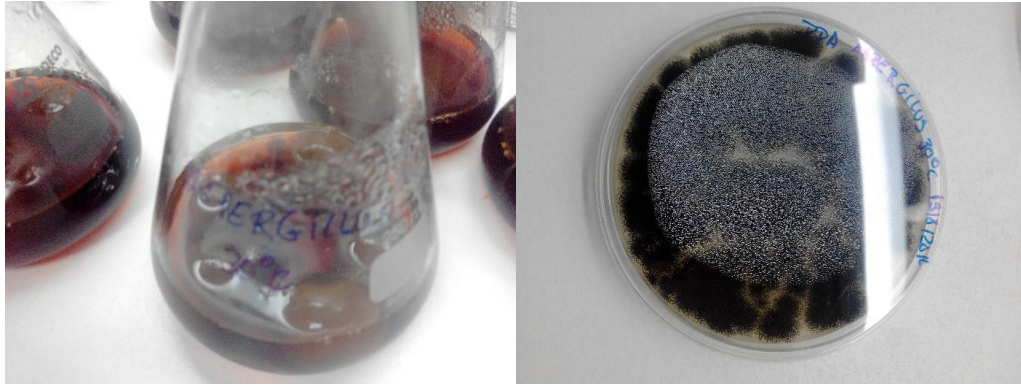


Diagrama 4 - Resultado da Biotransformação para o fungo *Aspergillus niger*.

O procedimento utilizado para este fungo foi idêntico ao utilizado para o *Rhizopus stonolifer*. Na figura 31 demonstra o inóculo em meio sólido de PDA que se deixou maturar durante 72 horas, do qual este serviu para cultura de trabalho para a Biotransformação e o respetivo meio líquido utilizado para esse fim.



**Figura 31** - Cultura de trabalho de *Aspergillus niger* em PDA e Erlenmeyers com meio de cultura e o fungo.

Todo o processo de Biotransformação foi acompanhada por cromatografia em camada fina, de forma a verificar o grau de degradação do produto, como mostra a figura 32.



**Figura 32** - Cromatografia em camada fina da Biotransformação ao longo do tempo.

As amostras foram retiradas ao longo do tempo, ao primeiro, ao quarto, ao sexto e ao nono dia para realizar a cromatografia em camada fina.

Pela TLC, podemos ver que logo a partir do segundo dia, já não era visível o produto, o que sugere que este já tivesse sido metabolizado em produto da Biotransformação, ou que se encontrava no sistema enzimático do fungo.

Finalizado o tempo de fermentação, procedeu-se à extração dos produtos, através de uma extração líquido-líquido numa ampola de decantação

Depois de realizada a extração, evaporou-se o solvente e obteve-se uma goma castanha, como se pode observar na figura 33, com a massa de 235 mg.

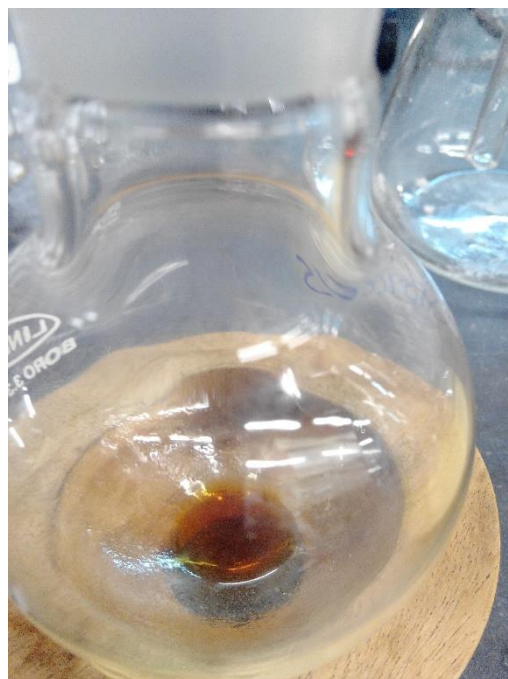


Figura 33 - Resultado da Biotransformação pelo fungo *Aspergillus niger*

Após a extração, foi realizada a separação em coluna cromatográfica dos vários componentes. Na tabela seguinte apresenta-se a mistura de eluentes usada nesta coluna.

Tabela 14- Mistura de eluentes usado na coluna cromatográfica

<b>Eluente/Porção</b>	<b>Volume/ mL</b>
<b>Hexano</b>	200
<b>98:2 (Hexano/Acetato)</b>	200
<b>90:10 (Hexano/Acetato)</b>	300
<b>80:20 (Hexano/Acetato)</b>	200
<b>70:30 (Hexano/Acetato)</b>	200
<b>60:40 (Hexano/Acetato)</b>	200
<b>50:50 (Hexano/Acetato)</b>	200
<b>Acetato</b>	200
<b>Metanol</b>	200

Controlou-se por cromatografia de camada fina o grau de separação dos compostos obtidos. Após isso, evaporou-se a mistura de solvente utilizada e controlou-se o peso das frações com vista a efetuar a sua caracterização.

A tabela 15 indica os valores de peso das frações mais significativas.

Tabela 15- Pesos das frações mais significativas da coluna cromatográfica.

Fração	Massa de Produto (mg)
1-10	8.8
21-30	42.1
31-35	1.2

Realizaram-se as análises espectroscópicas destas mesmas frações, e obtiveram-se os espectros apresentados a seguir.

Nas figuras 34 e 35, apresenta-se os espectros de próton e carbono 13, correspondente à fração com o produto da reação (21-30).

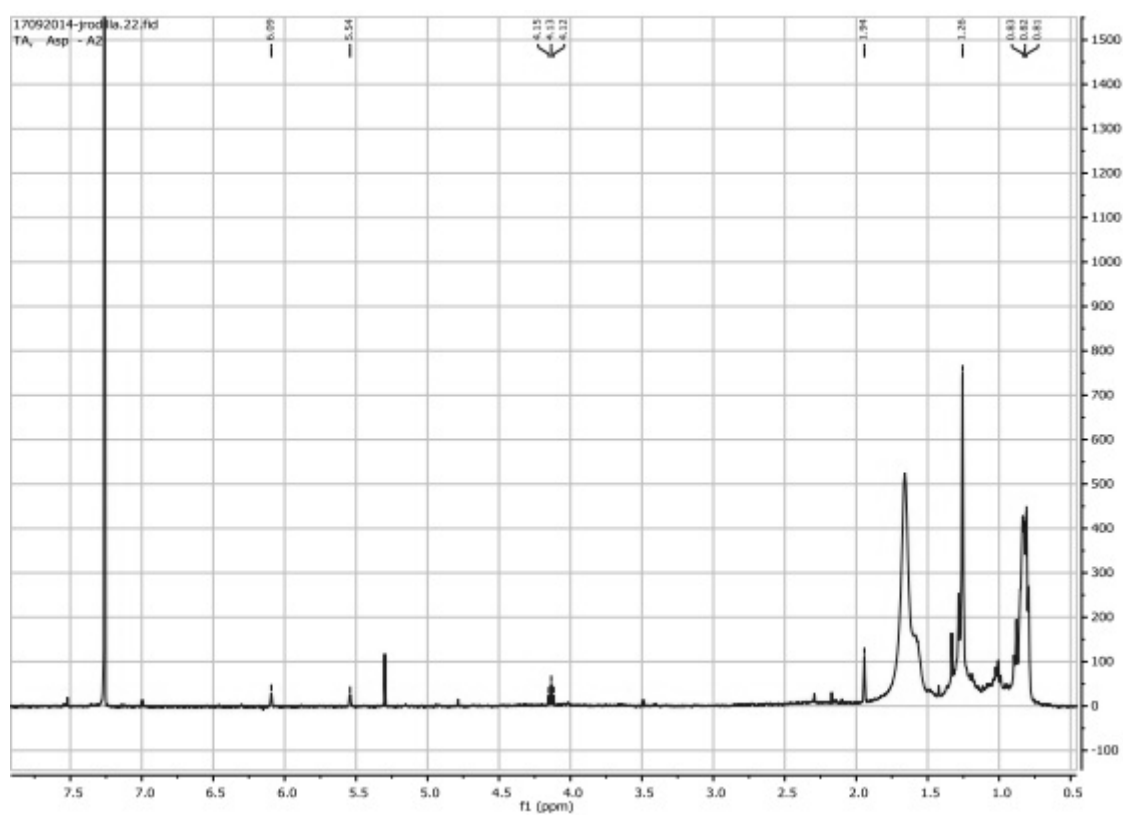


Figura 34 - Espectro de  $^1\text{H}$ -RMN para a Biotransformação com *Aspergillus niger*

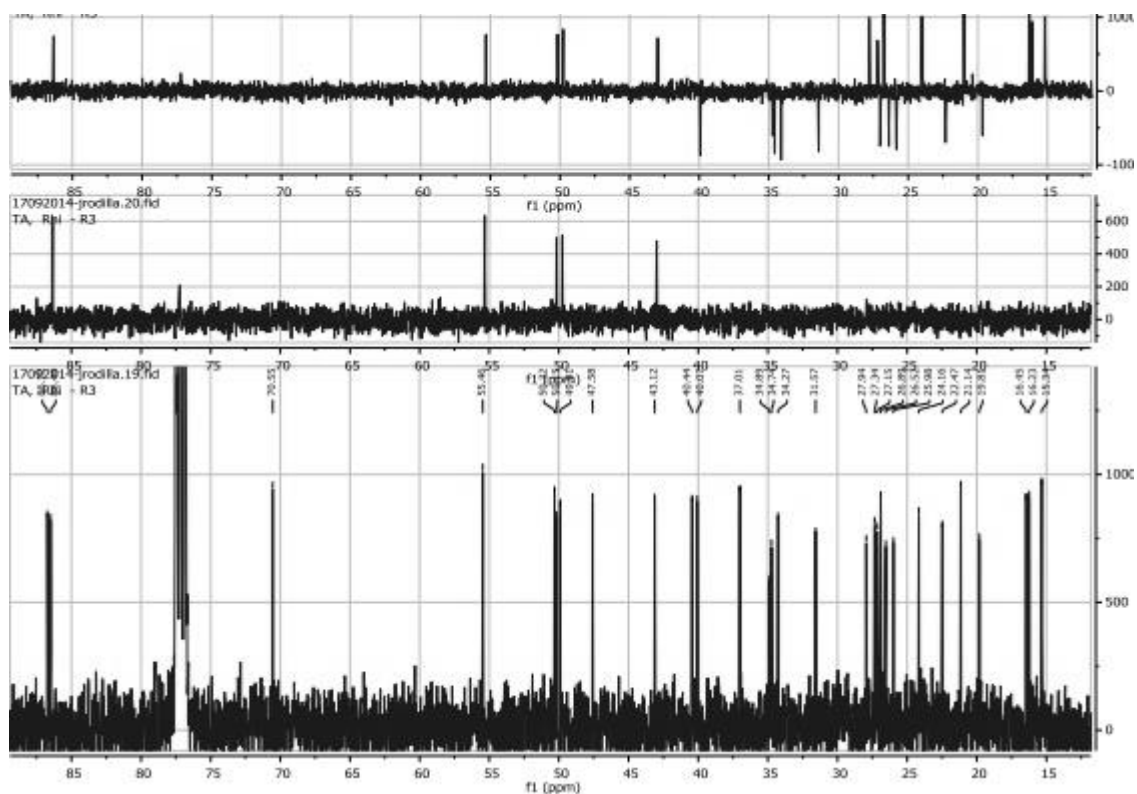


Figura 35 - Espectro de  $^{13}\text{C}$ -RMN para a Biotransformação com *Aspergillus niger*

Através da análise dos espectros percebe-se que a fração que tinha peso mais significativo dizia respeito a meio de cultura presente na fase orgânica, e o restante a Produto inicial por transformar, o que indica que a Biotransformação não foi bem-sucedida, pelo menos para as condições de fermentação escolhidas.

## Capítulo 5

---

### 5 Considerações Finais

Ao longo dos anos, o uso de óleos essenciais tem tido um aumento exponencial e com isso aumenta o interesse em saber as suas potencialidades e as mais variadíssimas funções biológicas que estes podem desempenhar. No caso da *Cistus Libanotis* é alvo de estudo constante, tem sido encontradas as mais variadas características biológicas neste. No caso da 3-Dammaranona esta apresenta-se como um triterpeno tetracíclicos do esqueleto de dammarano, onde assumem uma importância extrema, pois está comprovado a sua relação antimicrobiana e mais importante, como função anti-inflamatório.

O objetivo deste trabalho foi dividido em duas partes. Por um lado, foi tentado sintetizar outros compostos de interesse científico tendo como produto de partida a 3-Dammaranona, sendo estes depois alvo de estudo químico. Da primeira reação utilizando Tetracetato de Chumbo com Benzeno Seco, a uma temperatura 45 °C, obteve-se um composto de estrutura  $C_{30}H_{52}O_5$ , o que confirma se tratar de um triterpeno no qual foi possível introduzir na sua estrutura o grupo acetato, com um rendimento de 21,4% o que revela que o peso obtido não foi tão elevado como o esperado. Com este composto obtido, foi efetuado um tratamento com cloreto de mesilo em cloreto de metileno e obteve-se um composto com a estrutura de  $C_{32}H_{47}O_4$ , do qual o espectro de massa ajudou a sua determinação e possibilitou saber que este apresentava uma massa molar de 495,34 g/mol, tratando-se de um triterpeno com o grupo acetato no átomo de Carbono na posição 2 e com o átomo de carbono da posição 23 sobre ligação dupla. Este composto foi obtido com um rendimento de 10,6%.

Por outro lado, foi testado o composto de partida de modo a saber a possibilidade de o transformar por via de microrganismos, neste caso pelo *Rhizophus stonolifer* e pelo *Aspergillus niger*, e assim tentar introduzir na molécula grupos funcionais que pudessem mudar as suas funções biológicas. O uso dos dois microrganismos prendeu-se pelo facto de no final, o número de variáveis seria menor e assim poder-se-ia comparar os resultados finais com mais consistência.

No início, pensou-se em começar com dois períodos de incubação entre 5 e 13 dias. Depois de analisar os resultados chegou-se à conclusão que o tempo usado, de 10 dias, foi curto, uma vez que o produto obtido não foi visível na análise espectroscópicas para os dois fungos, o que indica que não existe nenhum produto de Biotransformação ou então estes possuíam uma massa demasiado pequena que não foi possível de ser analisada, sendo que ainda foi recuperado produto de partida.

## 5.1 Perspetivas Futuras

É essencial que se continue o estudo intensivo sobre as plantas medicinais, devido à existência de cada vez mais ferramentas modernas que permitem compreender todos os seus efeitos sobre o corpo humano e as inúmeras aplicações na Indústria cosmética moderna. No caso da *Cistus Libanotis*, seria interessante testar novos reagentes de síntese com o produto inicial e obter novas rotas para os produtos obtidos.

É minha convicção que, no caso da Biotransformação, se deve testar novas condições de cultura, de modo a perceber qual a que melhor se adequa ao sistema enzimático dos fungos e também testar outro tipo microrganismos para a Biotransformação da 3-Dammaranona, a fim de perceber qual é que é mais eficaz para este processo.

## Capítulo 6

---

### 6 Referencias Bibliográficas

Bakkali F., Averbeck S., Averbeck D., Idaomar M. (2008). Biological effects of essential oils - A review. *Food and Chemical Toxicology* 46, 446-475.

Baker, S.; *Aspergillus niger* genomics: Past, present and into the future; *Medical Mycology* 44 (2006) S17 - S21.

Carvalho, C. C. C. R.; Fonseca, M. M. R.; Biotransformations of terpenes; *Biotechnology Advances* 24 (2006) 134 - 142.

Cowan, M. M. (1999) Plant products as antimicrobial agents, *Clinical microbiology reviews* 12, 564-82.

Cunha, A. Proenca; Ribeiro J. Alves; Roque O. Rodrigues; “Plantas Aromaticas em Portugal, Caracterizacao e Utilizacoes”; Fundacao Calouste Gulbenkian; Lisboa, 2007.

Cunha, A. Proenca; Silva A. Pereira; Roque O. Rodrigues; “Plantas e Produtos Vegetais em Fitoterapia”; Fundacao Calouste Gulbenkian; 2a edicao, Lisboa, 2006.

Ellul, P.; Boscaiu, M.; Vicente, O.; Moreno, V.; Rosseló, J. A.; Intra- and Interspecific variation in DNA content in *Cistus* (*Cistaceae*); *Annals of botany* 90: 345-351, 2002.

Faber, K.; *Biotransformations in Organic Chemistry*; 3th edition; Springer (1997).

Ferreira, W.; Sousa, J.C.; Lima, N.; *Microbiologia*; 2010, Lidel, 2ª Edição.

Garbutt, J. 1997. *Essentials of Food Microbiology*. 1st ed. London: Arnold

Gil, Ruiz P; “Products naturales”; Universidad Publica de Navarra, Pamplona, 2002.

Granados, A.; Melguizo E.; Parra, A.; Pérez, F.; Simeó Y.; Viseras, B.; Arias, J.; Chemical Semisynthesis and Biotransformation with *Rhizopus nigricans* of Several Sesquiterpenes: Obtention of New 1 $\alpha$ - and 2 $\alpha$ -Hydroxyselinane Derivatives; *Tetrahedron*, 56,2000,6517-6526.

Granados, A.; Rivas F.; Martínez, A.; Parra, A.; Biotransformations of Sesquiterpenoids by *Rhizopus* Species; *Current Organic Chemistry*, 2009, 13, 1182-1193.

Gomes, P. B.; Mata, V. G.; Rodrigues, A.E.; Characterization of the Portuguese-Grown *Cistus ladanifer* Essential oil; *J. Essent. Oil Res.*, 17, 160-165, 2005.

Koskinen, A.; *Asymmetric Synthesis of Natural Products*; Wiley, 1993, Volume 2.

Krings, U.; Berger, R.; Terpene Bioconversion - How does its future look?; *Natural Product Communications* 5 (2010) 1507 - 1522.

Loizzo, M. R.; Bonesi, M.; Lecce, G. D.; Boselli, E.; Tundis, R.; Pugliese, A.; Menichini, F.; Frega, N. G.; Phenolics, aroma profile, and *In Vitro* antioxidant activity of Italian desert passito wine from Saracena; *Journal of food science*, 78, Nr.5, 20013.

Lobo, Ana M; Lourenco, Ana M; "Biossíntese de produtos naturais"; IST Press, Lisboa, 2007.

Marquina, S.; Parra, J. L.; Gonzáles, M.; Zamilpa, A.; Escalante, J.; Trejo - Hernández, M. R.; Álvarez, L.; Hydroxylation of the diterpenes ent-kaur-16-en-19-oic and ent-beyer-15-en-19-oic acids by the fungus *Aspergillus niger*; *Phytochemistry* 70 (2009) 2017 - 2022.

Martin, G. D. A.; Biotransformation reactions by *Rhizopus* spp.; *Current Organic Chemistry* 14 (2010) 1 - 14.

Martin, G. D. A.; Reynolds, W. F.; Reese, P. B.; Investigation of the importance of the C-2 and C-13 oxygen functions in the transformation of stemodin analogues by *Rhizopus oryzae* ATCC 11145; *Phytochemistry* 65 (2004) 2211 - 2217.

Morrin, M.; Ward, O.; Biostransformation to 11- $\alpha$ -Hydroxyprogesterone by Different Morphological Forms of *Rhizopus arrhizus*; *Biotechnology Letters* Vo.11, No.5, 1989, 319-324

Muffler, K.; Leipold, D.; Scheller, M.; Hass, C.; Steingroewer, J.; Bley, T.; Neuhaus, H. E.; Mirata, M. A.; Schrader, J.; Ulber, R.; Biotransformation of triterpenes; *Process Biochemistry* 46 (2011) 1 - 15.

Pelczar, M. J.; Cham, E. C. S.; Krieg, N. R.; *Microbiology: concepts and application*; Mc-Graw Hill (1993).

Pereira, M. M.; Rodilla, J.; Silva L.; Alves. H.; *Cistus Libanotis* L. (*Cistaceae*) en el sur de Portugal. *Ecología, fitossociología y fitoquímica*; *Biblid* [0211-9714 (2007) 25, 2008.

Prescott; Harley; Klein's; Microbiology 7th edition; Mc-Graw Hill,2008.

Rasooli, I.; Owlia, P.; Chemoprevention by thyme oils of *Aspergillus parasiticus* growth and aflatoxin production; Phytochemistry, 66, 2851-2856, 2005.

Rodilla, J.;Silva L.; Martinez, N.; Lorenzo, D.; Davyt, D.; Castillo, L.; Giménez, C.; Cabrera, R.; Coloma, A; Zrostlíková, J.; Dellacassa, E.; Advances in the identification and agrochemical importance of sesquiterpenoids from *Bulnesia sarmientoi* essential oil; Elsevier, Industrial Crops and Products 33, 2011, 497-503.

Silva, E.; Takahashi, J.; Boaventura, M.A.D; Oliveira, A.B.; The biotransformation of ent-kaur-16-en-19-oic acid by *Rhizopus stolonifer*; Pergamon, Phytochemistry, 52, 1999,, 397-400.

Souza, G.; Estudo da incubação da canforquinona e do fujenal com fungos como modelo para biotransformação de terpenos; Biblioteca digital Brasileira de Teses e Dissertações, 2008.

Tortora, G. J.; Funke, C. L.; Casf, C. L.; Microbiologia 6ª edição; Artmed (2000).

## Apêndice A

Tabelas com massas das variadas frações obtidas das colunas cromatográficas da síntese do composto 3-Dammaranona

Tabela 16 - Frações Obtidas da coluna cromatográfica da reação de Tetracetato de Chumbo e Benzeno, à temperatura de 40 °C - 50° C.

<b>Balão</b>	<b>Fração</b>	<b>Peso Balão inicial (gramas)</b>	<b>Peso Balão Final (gramas)</b>	<b>Produto (mg)</b>
<b>1</b>	1-2	47,7852	47,7866	1,4
<b>2</b>	3-14	48,9144	48,9184	4
<b>3</b>	15	55,3317	55,3326	0,9
<b>4</b>	16-40	54,6091	54,6211	12
<b>5</b>	41-46	49,3672	49,3915	24,3
<b>6</b>	47-52	54,3440	54,4418	97,8
<b>7</b>	53-56	46,7685	46,7931	24,6
<b>8</b>	58-63	51,0629	51,1192	56,3
<b>9</b>	64-69	51,3221	51,3289	6,8
<b>10</b>	70-73	49,7083	49,7115	3,2
<b>11</b>	74-78	64,962	64,966	4
<b>12</b>	79-83	46,6770	46,7659	88,9
<b>13</b>	84-87	45,2414	45,2946	53,2
<b>14</b>	88-102	47,0348	47,0589	24,1

**Tabela 17** - Frações Obtidas da coluna cromatográfica de uma segunda reação de Tetracetato de Chumbo e Benzeno, à temperatura de 40 °C - 50° C.

<b>Balão</b>	<b>Fração</b>	<b>Peso Balão inicial (gramas)</b>	<b>Peso Balão Final (gramas)</b>	<b>Produto (mg)</b>
1	1-41	49,7080	49,7283	19,3
2	42-49	47,0353	47,1204	85,1
3	50-55	64,963	65,207	244
4	56-64	48,9148	49,0337	119,9
5	65-68	47,7865	47,8415	56
6	69-82	49,3682	49,5241	155,9
7	83-99	46,6782	46,7151	36,9

**Tabela 18** - Frações Obtidas da coluna cromatográfica da primeira reação do Composto 2 com cloreto de mesilo em cloreto de metileno, à temperatura ambiente.

<b>Balão</b>	<b>Fração</b>	<b>Peso Balão inicial (gramas)</b>	<b>Peso Balão Final (gramas)</b>	<b>Produto (mg)</b>
1	1	55,2238	55,2276	3.8
2	2-24	49,3677	49,3760	8.3
3	25-30	48,2747	48,2840	9.3
4	31-35	47,3871	47,3912	4.1
5	36-43	64,963	64,984	21
6	44-50	67,376	67,406	30
7	51-54	49,7094	49,8671	157.7
8	55-60	54,3440	54,4285	84.5
9	61-66	64,612	64,644	32
10	67-73	45,2432	45,2524	9.2
11	74-78	52,6883	52,6420	-
12	79-101	43,1070	43,1355	28.5

**Tabela 19** - Frações Obtidas da coluna cromatográfica de uma terceira reação de Tetracetato de Chumbo e Benzeno, à temperatura de 40 °C - 50° C.

<b>Balão</b>	<b>Fração</b>	<b>Peso Balão inicial (gramas)</b>	<b>Peso Balão Final (gramas)</b>	<b>Produto (mg)</b>
<b>1</b>	1-35	47,7863	47,7947	8.4
<b>2</b>	36-40	51,0904	51,0904	27.4
<b>3</b>	41-45	67,606	67,606	230
<b>4</b>	46-47	43,1449	43,1449	38.8
<b>5</b>	48-55	61,940	62,052	112
<b>6</b>	56-57	49,3684	49,3726	4.2
<b>7</b>	58-70	47,3874	47,4336	46.2
<b>8</b>	71-76	44,6586	44,6908	32.2
<b>9</b>	77-101	54,3744	54,4310	56.6

**Tabela 20** - Frações Obtidas da coluna cromatográfica da segunda reação do Composto 2 com cloreto de mesilo em cloreto de metileno, à temperatura ambiente.

<b>Balão</b>	<b>Fração</b>	<b>Peso Balão inicial (gramas)</b>	<b>Peso Balão Final (gramas)</b>	<b>Produto (mg)</b>
<b>1</b>	1-50	54,8605	54,8645	4
<b>2</b>	51-60	47,7856	47,7862	0.6
<b>3</b>	61-90	54,3742	54,3749	0.6
<b>4</b>	91-130	54,9028	54,9075	4.7
<b>5</b>	131-140	45,2407	45,2428	2.1
<b>6</b>	141-150	53,6681	53,6711	3
<b>7</b>	151-160	57,8603	57,9110	50.7
<b>8</b>	161-170	41,1889	41,2333	44.1
<b>9</b>	171-304	45,6457	45,6542	8.5

## Apêndice B

### Espectros de $^{13}\text{C}$ -RMN e de $^1\text{H}$ -RMN dos produtos de interesse das colunas cromatográficas

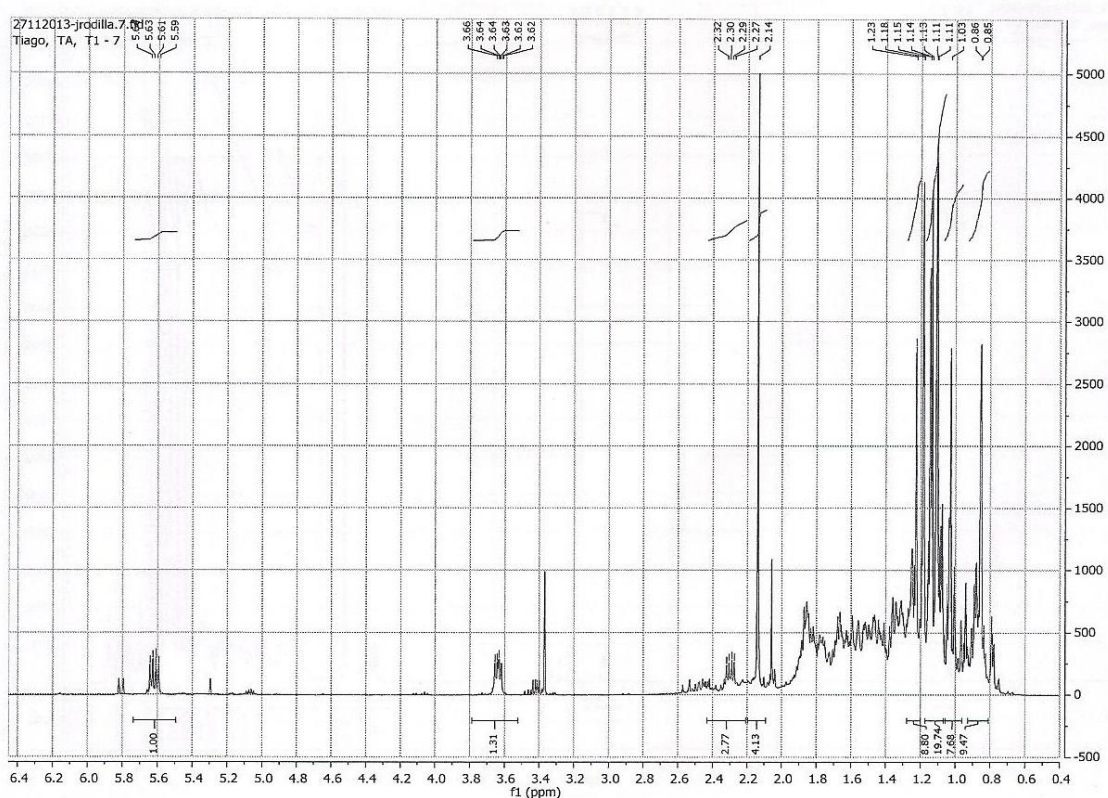


Ilustração 1 - Espectro de  $^1\text{H}$ -RMN da amostra T1-7 da coluna cromatográfica da primeira reação de Tetracetato de Chumbo e Benzeno, á temperatura de 40 °C - 50° C.

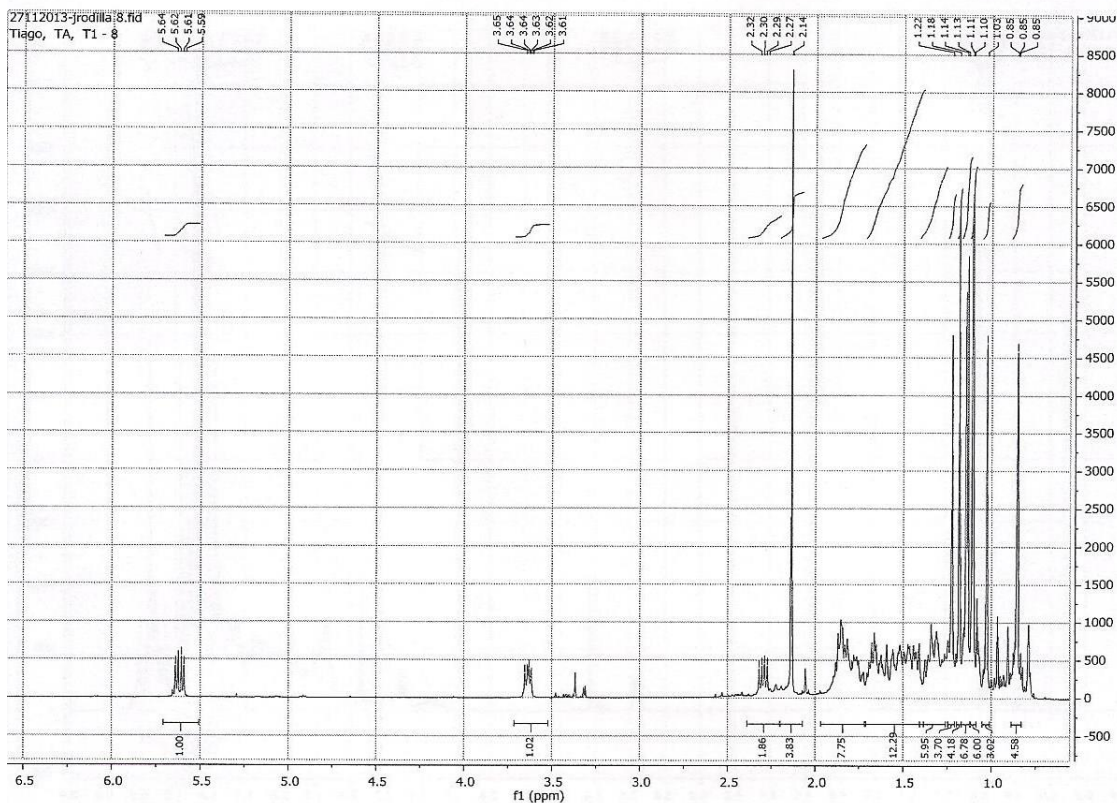


Ilustração 2 - Espectro de  $^1\text{H}$ -RMN da amostra T1-8 da coluna cromatográfica da primeira reação de Tetracetato de Chumbo e Benzeno, à temperatura de 40 °C - 50° C.

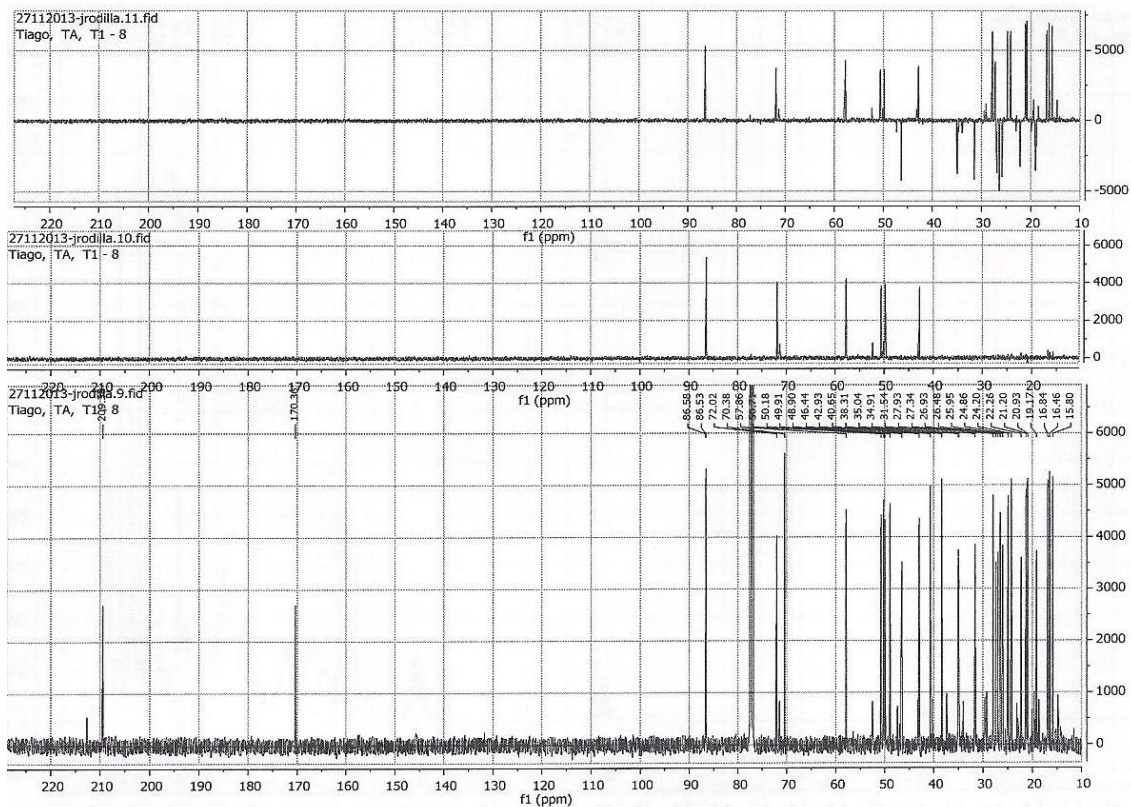


Ilustração 3 - Espectro de  $^{13}\text{C}$ -RMN da amostra T1-8 da coluna cromatográfica da primeira reação de Tetracetato de Chumbo e Benzeno, à temperatura de 40 °C - 50° C.

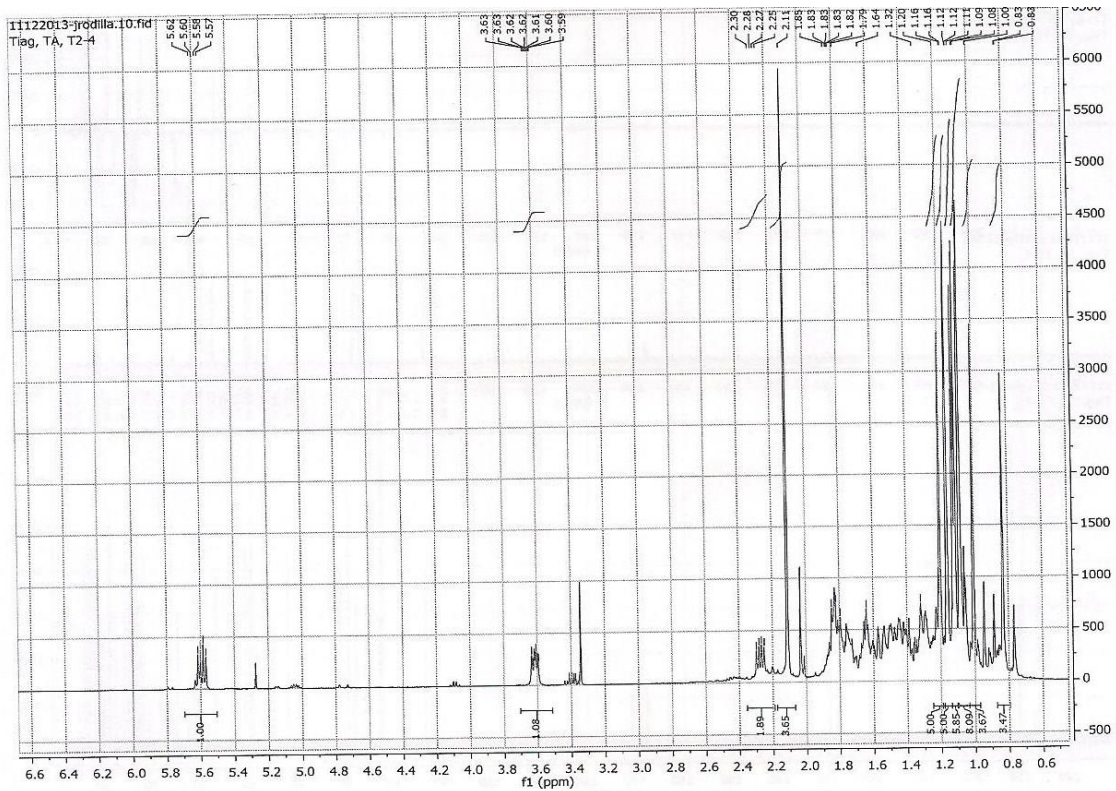


Ilustração 4 - Espectro de  $^1\text{H}$ -RMN da amostra T2-4 da coluna cromatográfica de uma segunda reação de Tetracetato de Chumbo e Benzeno, á temperatura de  $40^\circ\text{C}$  -  $50^\circ\text{C}$ .

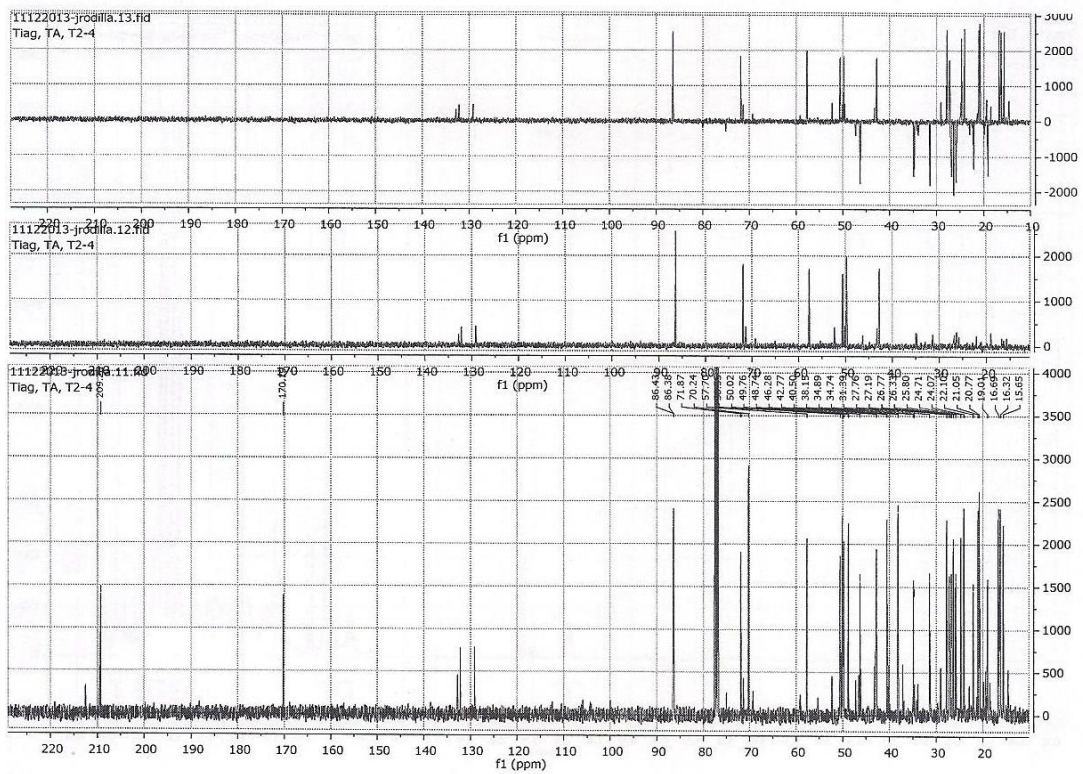
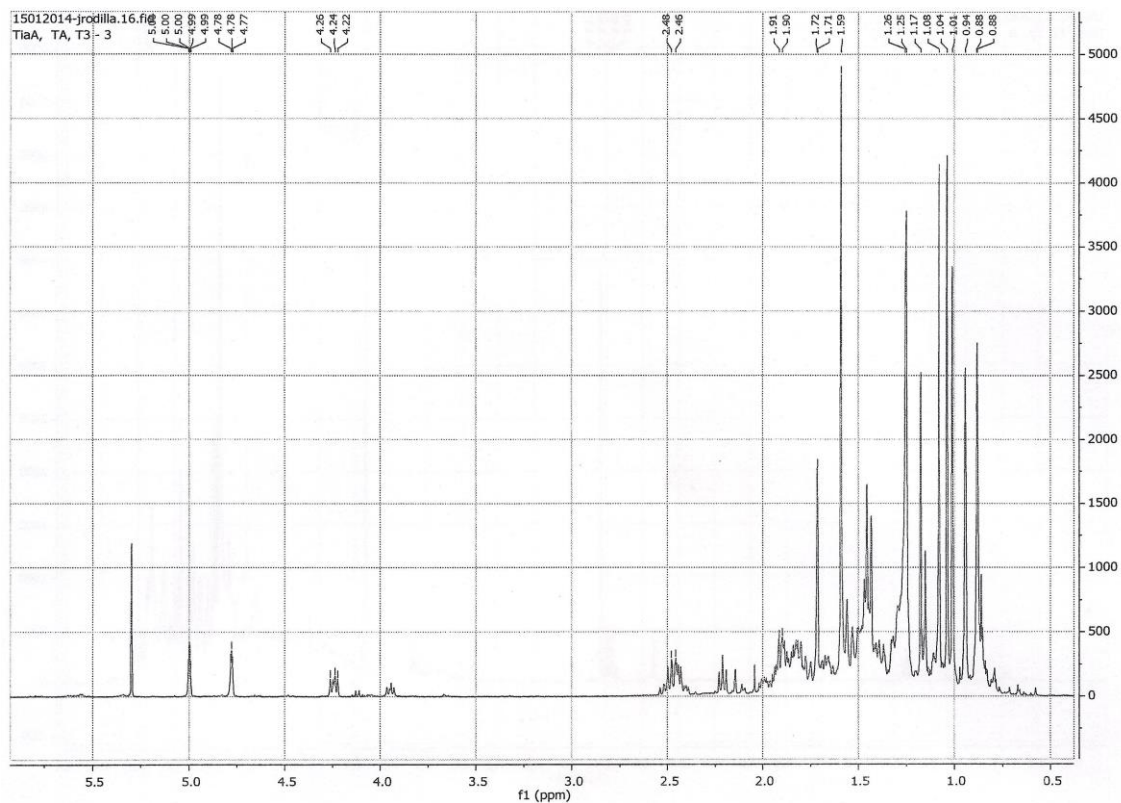
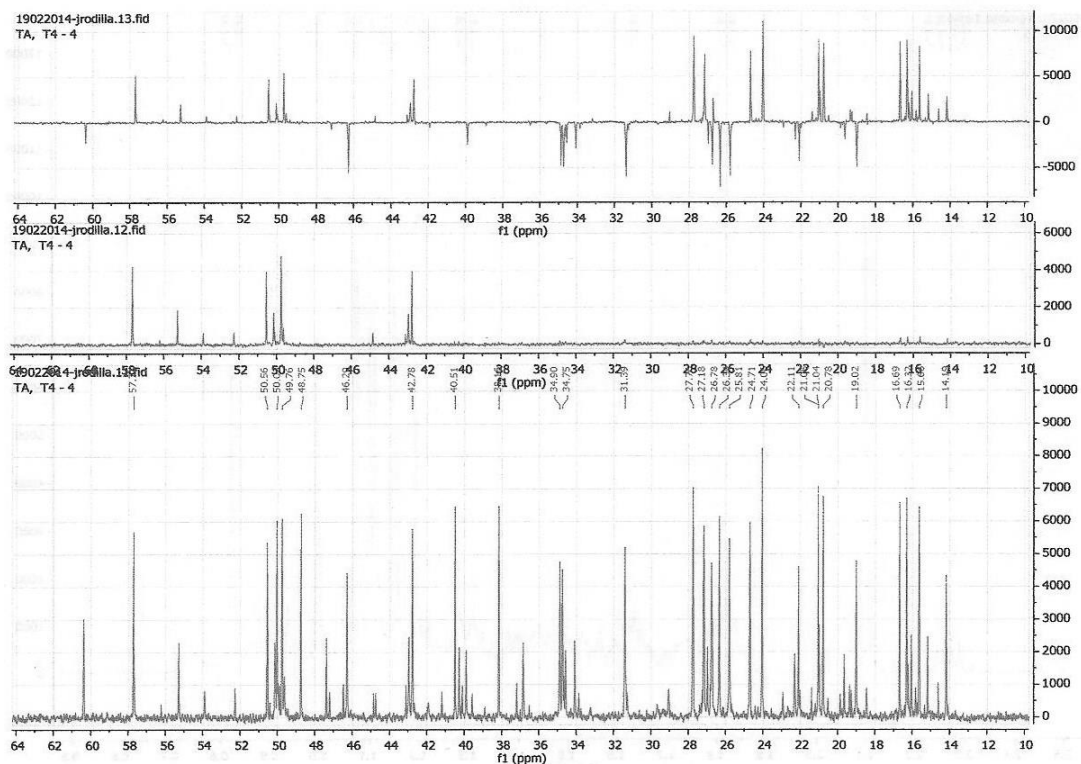


Ilustração 5 - Espectro de  $^{13}\text{C}$ -RMN da amostra T2-4 da coluna cromatográfica de uma segunda reação de Tetracetato de Chumbo e Benzeno, á temperatura de  $40^\circ\text{C}$  -  $50^\circ\text{C}$ .



**Ilustração 6** - Espectro de  $^1\text{H}$ -RMN da amostra T3-3 da coluna cromatográfica da primeira reação do Composto 2 com cloreto de mesilo em cloreto de metileno, à temperatura ambiente.



**Ilustração 7** - Espectro de  $^{13}\text{C}$ -RMN da amostra T4-4 da coluna cromatográfica de uma terceira reação de Tetracetato de Chumbo e Benzeno, à temperatura de 40 °C - 50° C.

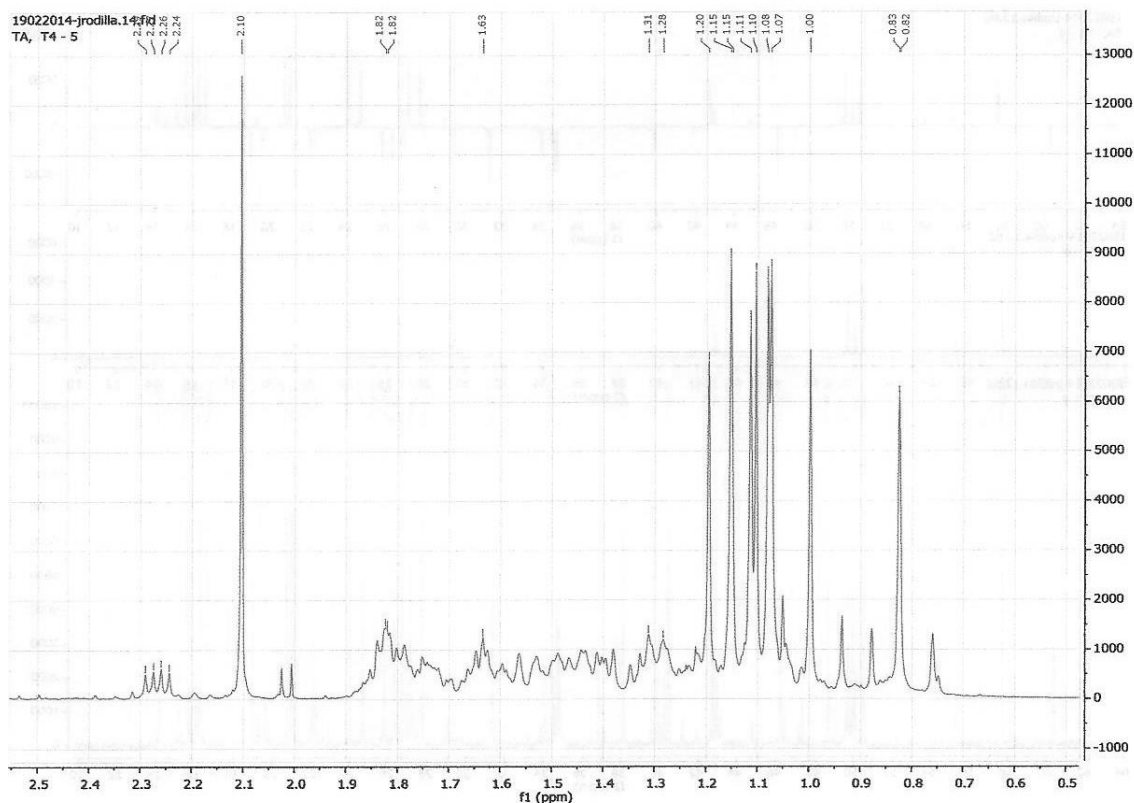


Ilustração 8 - Espectro de  $^1\text{H}$ -RMN da amostra T4-5 da coluna cromatográfica de uma terceira reação de Tetracetato de Chumbo e Benzeno, á temperatura de 40 °C - 50 °C.

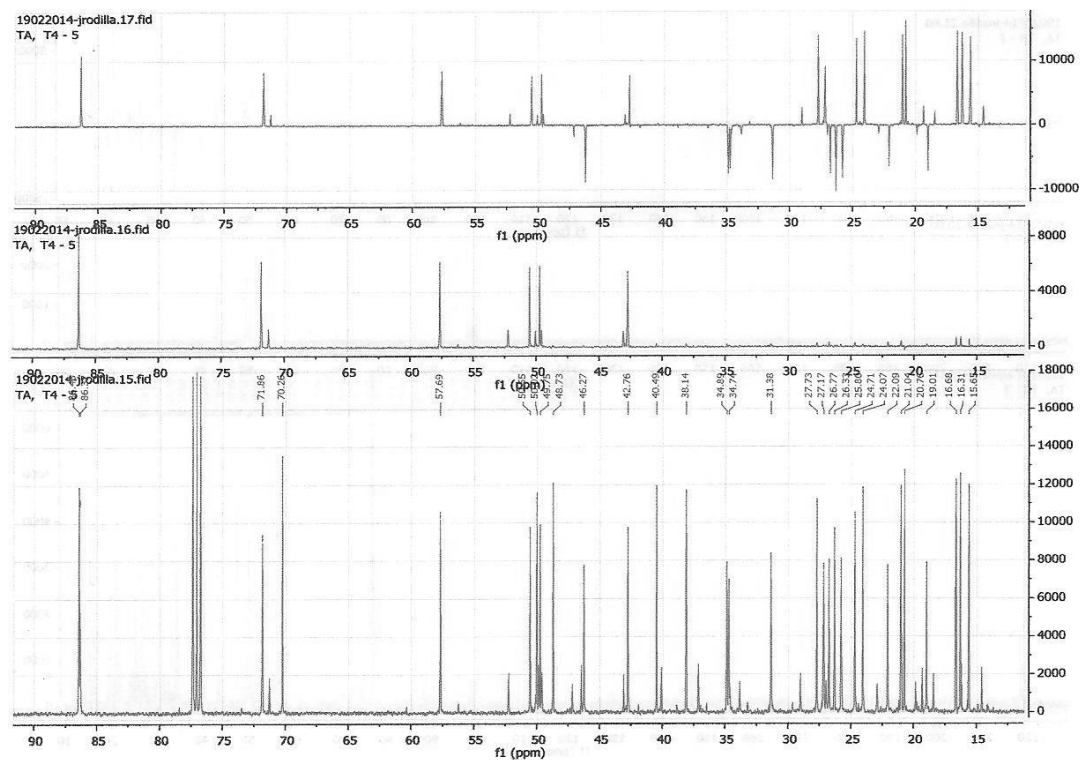


Ilustração 9 - Espectro de  $^{13}\text{C}$ -RMN da amostra T4-5 da coluna cromatográfica de uma terceira reação de Tetracetato de Chumbo e Benzeno, á temperatura de 40 °C - 50 °C.

Amostra Ta, T5 – 5: RMN de H,

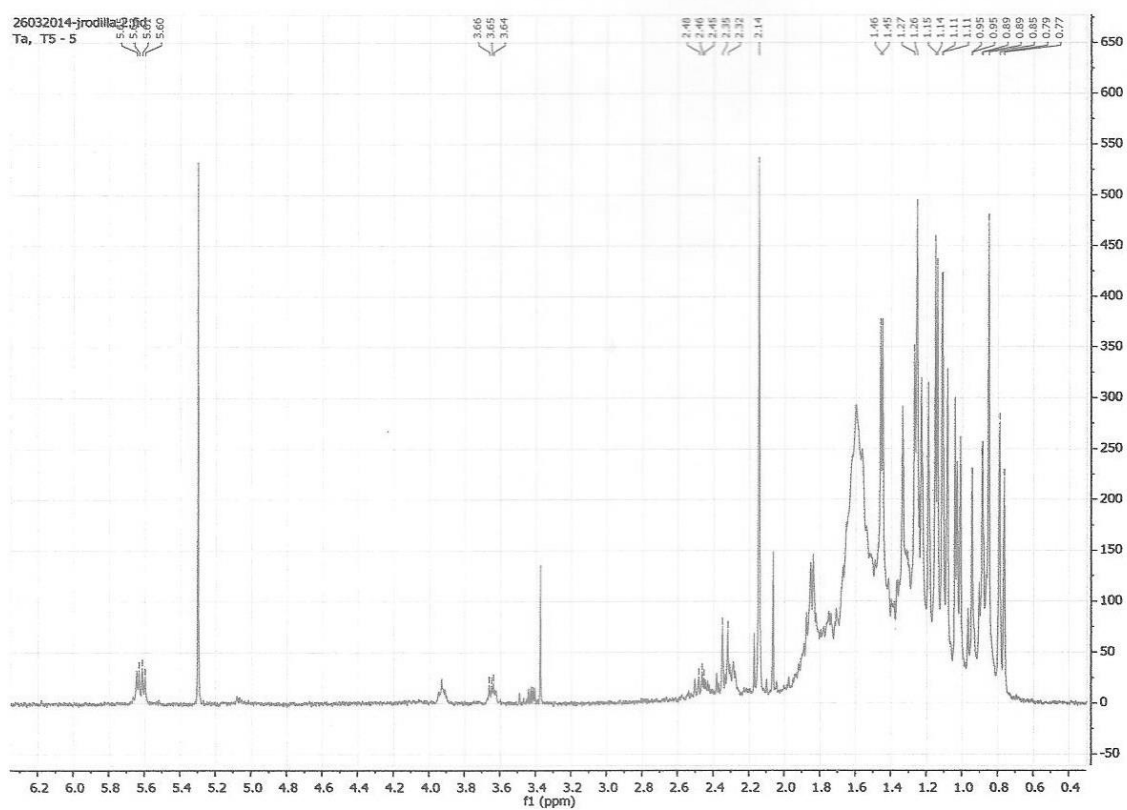


Ilustração 10 - Espectro de  $^1\text{H}$ -RMN da amostra T5-5 da coluna cromatográfica da segunda reação do Composto 2 com cloreto de mesilo em cloreto de metileno, à temperatura ambiente.

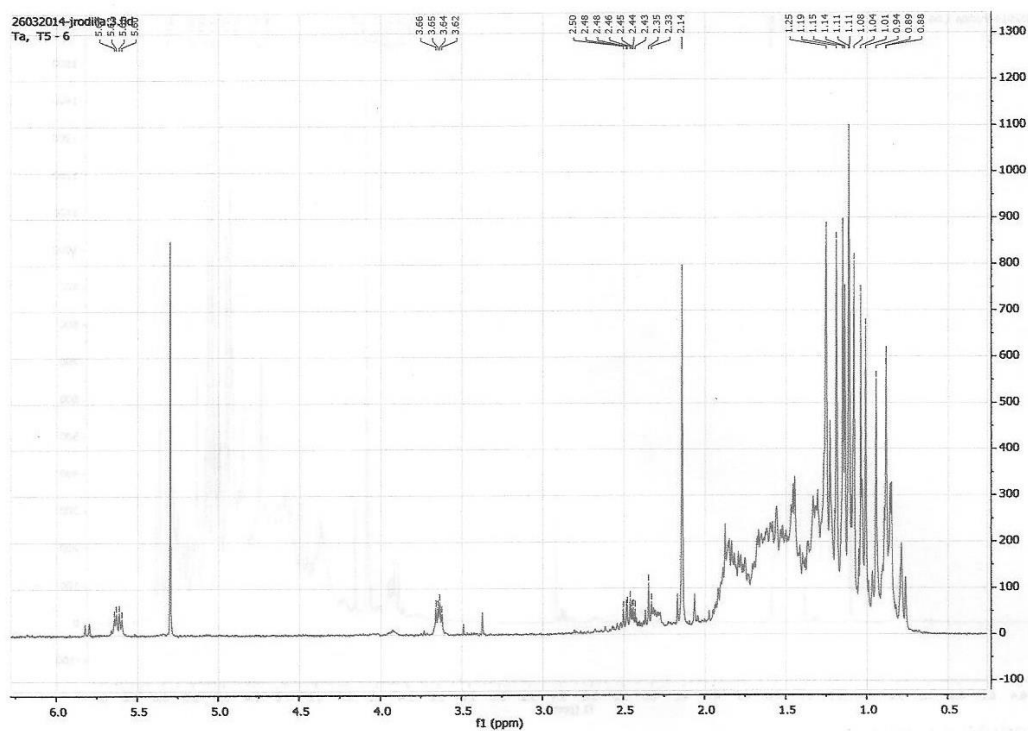


Ilustração 10 - Espectro de  $^1\text{H}$ -RMN da amostra T5-6 da coluna cromatográfica da segunda reação do Composto 2 com cloreto de mesilo em cloreto de metileno, à temperatura ambiente.