



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA NATUREZA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

Dissertação de Mestrado

**Efeito de cloreto de sódio e de Mn-porfirinas na produção de
biomassa de fungos filamentosos para reações de biocatálise**

Cristiano Tenório dos Santos

João Pessoa – PB – Brasil

Fevereiro/2016



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA NATUREZA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

Dissertação de Mestrado

Efeito de cloreto de sódio e de Mn-porfirinas na produção de biomassa de fungos filamentosos para reações de biocatálise

Cristiano Tenório dos Santos*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal da Paraíba como requisito para a obtenção do título de Mestre em Química Inorgânica.

Orientador: Prof. Dr. Júlio Santos Rebouças

Co-orientador: Dr. Cosme Rafael Martínez Salinas

* Bolsista CNPQ

João Pessoa – PB – Brasil

Fevereiro/2016

S237e Santos, Cristiano Tenório dos.
Efeito de cloreto de sódio e de Mn-Porfirinas na produção de biomassa de fungos filamentosos para reações de biocatálise / Cristiano Tenório dos Santos.- João Pessoa, 2016. 107f. : il.
Orientador: Júlio Santos Rebouças
Coorientador: Cosme Rafael Martínez Salinas
Dissertação (Mestrado) - UFPB/CCEN
1. Química inorgânica. 2. Fungos filamentosos.
3. Mn-porfirinas catiônicas. 4. Dinâmica de crescimento.
5. Estresse salino. 6. Biotransformação. 7. Biocatálise.

UFPB/BC

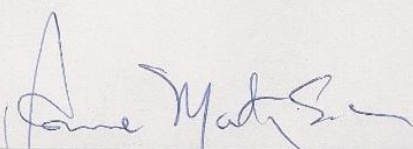
CDU: 546(043)

Efeito de Cloreto de Sódio e de Mn-porfirinas na produção de biomassa de fungos filamentosos para reações de biocatálise.

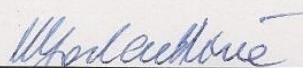
Dissertação de Mestrado apresentada pelo aluno Cristiano Tenório dos Santos e aprovada pela banca examinadora em 26 de fevereiro de 2016.



Prof. Dr. Júlio Santos Rebouças
Orientador/Presidente



Prof. Dr. Cosme Rafael Martinez Salinas
2º. Orientador



Profa. Dra. Krystyna Gorlach-Lira
Examinadora



Profa. Dra. Cláudia de Oliveira Cunha
Examinadora

A Deus

Aos meus pais José e Marili

À minha irmã Cryslâne

Aos meus amigos

Dedico

Agradecimentos

Agradeço a Deus, pela força que me deu em toda a minha vida e, em especial, para concretizar esse mestrado.

A meus pais, José Pinheiro e Marili Tenório, por todo incentivo, amor e apoio em toda a minha vida. Devo a eles tudo que tenho e sem eles nada disso teria sentido.

A minha irmã, Cryslâne Tenório, por incentivar e me apoiar.

Ao Professor Júlio Santos Rebouças, por todo o suporte e orientação desde o primeiro dia que comecei essa nova jornada em João Pessoa.

Ao Professor Cosme Rafael, pela orientação e colaboração durante o desenvolvimento do trabalho.

À professora Juliana Vale, pela colaboração e ajuda no desenvolvimento do trabalho.

Agradeço a Pedro Felipe, pela amizade e empenho prestados e sua ajuda na concretização dessa dissertação, ajuda que fortaleceu e enriqueceu esta dissertação.

A família que consegui em João Pessoa. Sem dúvida essa caminhada não seria a mesma sem essas pessoas, pois, mais que amigos, eles se fizeram família nessa jornada que chamamos de vida: Janete, Hidayane, Yolanda, Fagner, Adriano, Daniel, Rafael, Jôsy, Larissa.

Aos amigos de vida Felipe Lúcio, Eduardo Silva, Lucas Donato, Alex Sandro, agradeço por terem partilhado muitos momentos importantes em minha vida.

A meus amigos de grupo, José Ferreira, Clarissa Maia, Nathalia Falcão, Macgaiver, Gabriela, Barbara, Caio, Jacqueline Bueno, Vitor Hugo, Rômulo. Sem eles e o apoio que deram em todo o desenvolvimento do trabalho, compartilhando as angústias e os momentos felizes, esse trabalho não seria o mesmo.

Aos Amigos de laboratório do LCCQS e LASOB, que partilharam direta ou indiretamente da elaboração desse trabalho: Andreza, Carlos, Elaine, Fernanda, Géssica, Georgia, Gilvan, Handerson, Hariane, Handemberg, Iram, Yolanda, Ingrid, Israel, Jandeilson, Katharinne, Leadro, Poliane, Ubiratan.

Ao CNPq e PPGQ-UFPB pela bolsa concedida.

“Aos Outros, dou o direito
de ser como são. A mim, dou o
dever de ser cada dia melhor
(Chico Xavier)

SUMÁRIO

RESUMO	XI
ABSTRACT	XII
LISTA DE FIGURAS	XIII
LISTA DE TABELAS	XVII
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	XVIII
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 Problemática na produção de biomassa.....	1
1.2 Estresse salino e danos oxidativos.....	5
1.3 Mn-Porfirinas como moduladores redox de estresse oxidativo.....	6
1.4 Uso de micro-organismos em processos biocatalíticos	10
2 OBJETIVOS	16
2.1 Objetivo geral	16
2.2 Objetivos específicos.....	16
3 METODOLOGIA EXPERIMENTAL	17
3.1 Materiais, reagentes e solventes	17
3.2 Fungos filamentosos	17
3.3 Equipamentos e técnicas.....	18
3.3.1 Instrumentação geral.....	18
3.3.2 Espectroscopia eletrônica de absorção na região do UV/Vis	18
3.3.3 Leitor de placas ELISA	18
3.3.4 Cromatografia a gás (CG).....	18
3.3.5 Análises estatísticas	19
3.4 Síntese das Mn-Porfirinas.....	19
3.5 Meios de cultura e soluções salinas	21
3.5.1 Meio de cultura Sabouraud líquido	21
3.5.2 Meio de cultura Sabouraud sólido	21
3.5.3 Meio de cultura Sabouraud líquido concentrado	21
3.5.4 Solução salina fisiológica a 0,9%	21
3.5.5 Solução salina fisiológica a 0,9% com Tween 80 (dispersante de esporos).....	22
3.5.6 Meio de cultura YMA líquido	22
3.6 Preparo e padronização da suspensão de esporos.....	22
3.7 Obtenção de biomassa em meio submerso	23
3.7.1 Procedimento de obtenção de biomassa em meio submerso	23
3.7.2 Curvas de crescimento sob condições padrão	24

3.7.3 Efeito da velocidade de agitação orbital e da quantidade inicial de esporos na obtenção de biomassa	24
3.7.4 Efeito do estresse salino sobre a produção de biomassa em meio submerso.	24
3.7.5 Efeito de Mn-porfirina e de Mn^{2+} na produção de biomassa na presença e ausência de estresse salino	25
3.8 Obtenção de biomassa em microplaca.....	25
3.8.1- Procedimento para obtenção de biomassa em microplaca	25
3.8.2 Estudo do efeito estresse salino na produção de biomassa usando microplaca.....	26
3.8.3 Efeito de Mn-porfirina na produção de biomassa na presença e ausência de estresse salino em microplacas	27
3.9 Experimentos de biotransformação	28
3.9.1 Preparo da biomassa para reações de biotransformação	28
3.9.2 Reações de biotransformação	29
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	30
4.1 Curvas de crescimento dos fungos <i>R. stolonifer</i> , <i>R. microsporus</i> e <i>L. blakesleeana</i> em meio líquido Sabouraud.....	30
4.2 Efeito da velocidade de agitação orbital e da quantidade inicial de esporos na obtenção de biomassa do fungo <i>R. stolonifer</i>	32
4.3 Efeito da salinidade na produção de biomassa do fungo filamentoso <i>R. stolonifer</i>	33
4.3.1 Incubação em microplaca	34
4.3.2 Comparação entre a redução de biomassa do isolado <i>R. stolonifer</i> em meio submerso versus microplaca.	36
4.4 Efeito da MnTE-2-PyPCL ₅ e da MnTnHex-2-PyPCL ₅ na produção de biomassa do <i>R. stolonifer</i> na ausência e na presença de estresse salino: experimentos realizados em microplaca	37
4.4.1 Efeitos da MnTE-2-PyPCL ₅ na produção de biomassa em microplaca	37
4.4.2 Efeitos da MnTnHex-2-PyPCL ₅ na produção de biomassa em microplaca	39
4.5 Efeito da MnTE-2-PyPCL ₅ , MnTnHex-2-PyPCL ₅ e Mn^{2+} na produção de biomassa do <i>R. stolonifer</i> na ausência e na presença de estresse salino: experimentos em meio submerso .	40
4.6 Estudo dos fungos filamentosos <i>R. stolonifer</i> , <i>R. microsporus</i> e <i>L. blakesleeana</i> como biocatalisadores em reações de oxidação de álcool e de redução de cetona	43
4.6.1 Estudo da reação de oxidação do Cy-ol pelos fungos filamentosos <i>R. stolonifer</i> , <i>R. microsporus</i> e <i>L. blakesleeana</i>	45
4.6.2 Estudo da reação de redução da Cy-ona pelo fungo filamentoso <i>R. stolonifer</i> e reúso da biomassa para um segundo ciclo de biotransformação.....	49
4.6.3 Efeito do estresse salino como agente promotor da eficiência biocatalítica em reações de redução da Cy-ona pela biomassa do filamentoso <i>R. stolonifer</i>	51
4.6.4 Efeito da Mn-porfirina MnTE-2-PyPCL ₅ como aditivo à biomassa do fungo filamentoso <i>R. stolonifer</i> para redução de Cy-ona	53
5 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS.....	55

5.1 Conclusões e considerações finais.....	55
5.2 Perspectivas	57
6 REFERÊNCIAS.....	59
APÊNDICES	70

RESUMO

O presente trabalho se dedicou a estudos com os isolados dos fungos filamentosos *Rhizopus stolonifer* (SIS 35), *Rhizopus microsporus* var. *microsporus* (SIS 39) e *Lichtheimia blakesleeana* (SIS 40), provenientes da micoteca da "Rede Norte-Nordeste de Fungos Filamentoso de Solos da Caatinga e da Amazônia" (RENNORFUN). A dinâmica de crescimento de cada um desses 3 isolados foi determinada em meio de cultura líquido Sabouraud. A produção de biomassa do fungo *R. stolonifer* foi avaliada em relação às mudanças nas condições de cultivo, tais como: velocidade de agitação orbital e quantidade de inóculo inicial. Também foi avaliada a obtenção de biomassa sob vários níveis de salinidade de NaCl, utilizando dois protocolos experimentais: microplaca de 96 poços e meio submerso (erlenmeyers). Os efeitos do uso de Mn-porfirinas na produção de biomassa do isolado *R. stolonifer* foi investigado na presença e ausência do estressor salino, para isso usaram-se duas MnPs: uma MnP mais hidrofílica, *meso*-tetraquis(*N*-etilpiridínio-2-il)porfinatomanganês(III) (MnTE-2-PyPCL₅), e uma MnP mais lipofílica, *meso*-tetraquis(*N*-*n*-hexilpiridínio-2-il)porfinatomanganês(III) (MnTnHex-2-PyPCL₅). Nenhuma das MnPs estudadas foram eficientes em remediar o estresse associado à produção de biomassa na presença de NaCl nas concentrações de 250 mmol L⁻¹ e 500 mmol L⁻¹. As biomassas dos isolados *R. stolonifer*, *R. microsporus* e *L. blakesleeana* obtidas em meio YMA e Sabouraud foram avaliadas como biocatalisadores para a oxidação do álcool ciclohexanol (Cy-ol). A oxidação do substrato Cy-ol para ciclohexanona (Cy-on) foi observada apenas para os isolados *R. microsporus* e *L. blakesleeana*. O isolado *R. stolonifer* foi, no entanto, eficiente para a reação de redução do substrato Cy-on para Cy-ol. A reciclagem direta da biomassa (sem qualquer etapa de regeneração dos co-fatores) foi realizada sem alteração relevante na eficiência catalítica. Adicionalmente, observou-se que o isolado *R. stolonifer* crescido em meio Sabouraud na presença de 200 mmol L⁻¹ de NaCl resultou em uma biomassa ligeiramente mais eficiente quando comparada à biomassa obtida com uma baixa concentração de NaCl. Estudos iniciais indicaram que a biomassa do isolado *R. stolonifer* contendo MnTE-2-PyPCL₅ foi aparentemente mais eficiente como biocatalisador para redução de Cy-on que a biomassa sem MnP.

Palavras chave: Fungos filamentosos, Mn-porfirinas catiônicas, Dinâmica de crescimento, Estresse salino, Biotransformação, Biocatálise.

ABSTRACT

The present work dealt with studies on three filamentous fungi from the fungus collection of the “Rede Norte-Nordeste de Fungos Filamentoso de Solos da Caatinga e da Amazônia” (RENNORFUN): *Rhizopus stolonifer* (SIS 35), *Rhizopus microsporus* var. *microsporus* (SIS 39), and *Lichtheimia blakesleeana* (SIS 40). The growth dynamic of these 3 fungi were determined in Sabouraud medium. The biomass production of *R. stolonifer* was studied with respect to changes in growth conditions, such as orbital stirring rate and initial inoculum amount. The growth of SIS 35 was further evaluated under several levels of salinity, imposed by increasing amounts of NaCl, using two experimental protocols: one in 96-well microplates, and another under submerge conditions (erlenmeyers). The effects of Mn(III) porphyrins (MnPs) on SIS 35 biomass production in the presence and absence of saline stress was investigated with the hydrophilic MnP, Mn(III) *meso*-tetrakis(*N*-ethylpyridinium-2-yl)porphyrin (MnTE-2-PyPCL₅), and the lipophilic MnP, *meso*-tetrakis(*N*-n-hexylpyridinium-2-yl)porphyrin Mn(III) (MnTnHex-2-PyPCL₅). Neither MnTE-2-PyPCL₅ (up to 50 µmol/L) nor MnTnHex-2-PyPCL₅ (up to 5 µmol/L) was able to remediate the decrease in biomass production associated with 250-500 mmol/L NaCl saline stress. The *R. stolonifer*, *Rhizopus microsporus* and *L. blakesleeana* biomasses grown in either Sabouraud or YMA media were evaluated as biocatalysts for oxidation of alcohol (cyclohexanol, Cy-ol) and/or reduction of ketone (cyclohexanone, Cy-one). Whereas full conversion of Cy-ol to Cy-one was achieved with *Rhizopus microsporus* and *L. blakesleeana* as biocatalysts, no oxidation was observed with *R. stolonifer*. *R. stolonifer* was, however, particularly efficient for the reduction of Cy-one to Cy-ol. Direct recycling of the recovered biomass (without cofactor regeneration step) was carried out with little impact on catalytic efficiency. Additionally it was observed that *R. stolonifer* biomass grown under NaCl-based saline stress resulted in slightly more efficient biotransformation biocatalyst than that grown with no saline stress. Initial biotransformation data suggest that the use of MnTE-2-PyPCL₅-loaded *R. stolonifer* biomass may be of interest to yield more effective biocatalyst.

Keywords: Filamentous fungi, Mn porphyrin, growth dynamic, saline stress biotransformation, biocatalysis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1 – Estrutura esquemática do crescimento de uma levedura e de fungos filamentosos a partir do esporo até as hifas, em destaque estrutura de um filamentos visto em microscópio ótico.....	2
Figura 1.2 - Demonstração das fases de crescimento de micro-organismos.....	3
Figura 1.3 - Estrutura do centro porfirínico. Numeração recomendada pela IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry). As posições 5, 10, 15 e 20 são também conhecidas como posições meso, enquanto as posições 2, 3, 7, 8, 12, 13, 17, 18 são coletivamente denominadas posições β ou β -pirrólicas.....	6
Figura 1.4 - Mecanismos para dismutação do íon radical superóxido pela enzima SOD e por Mn-porfirinas.....	7
Figura 1.5 - Potenciais de redução e atividade SOD ($\log k_{cat}$) da MnTE-2-PyP ⁵⁺ e MnTnHex-2-PyP ⁵⁺ comparadas com o potencial da enzima SOD.....	8
Figura 1.6 - Efeito <i>in vivo</i> dos isômeros orto (MnTE-2-PyPCL ₅) e <i>meta</i> (MnTE-3-PyPCL ₅) de Mn(III) porfirinas. A menor atividade catalítica da MnTE-3-PyP ⁵⁺ é compensada <i>in vivo</i> pela maior lipofilicidade e consequente maior acúmulo celular em modelo de <i>E. coli</i> SOD-deficiente.	10
Figura 1.7 - Esquema geral de interação enzima/substrato, em 1 inicia-se a interação entre a enzima e o substrato. 2 representa a interação entre os sítios ativos da enzima com o substrato (formação do complexo enzima-substrato), 3 mostra a transformação do substrato no produto e por fim 4 representa a liberação do produto do sítio catalítico.....	12
Figura 1.8 - Oxidação do tipo Baeyer-Villiger que utiliza monooxigenase.....	13
Figura 1.9 - (a) Redução assimétrica de cetonas pró-quirais. (b) Quimiosseletividade na redução de α -metileno cetonas.....	13
Figura 1.10 - Reação de redução de uma cetona pró-quiral esquematizando o consumo de NADH e NADPH, onde ADH representa a enzima álcool desidrogenases.....	14
Figura 1.11 - Reduções enantiosseletivas de cetonas pró-quirais, com a ciclohexanona em seu esqueleto estrutural.....	15
Figura 1.12 - Conversão da lactona clerodane pelo fungo <i>Rhizopus stolonifer</i>	15
Figura 3.1 - Esquema geral para obtenção das Mn-porfirinas MnTE-2-PyPCL ₅ (R = Et) e MnTnHex-2-PyPCL ₅ (R = nHex).....	20

Figura 3.2- Espectros de UV-vis (em H ₂ O), os R _f foram obtidas usando CCD-SiO ₂ eluída com a mistura de KNO ₃ (aq. sat)- H ₂ O - MeCN (1:1:8 v/v/v) para MnTE-2-PyP ⁵⁺ (em azul, R _f 0,06) e MnTnHex-2-PyP ⁵⁺ (em roza, R _f 0,38).....	20
Figura 3.3 - Representação esquemática da microplaca usada nos experimentos em meio de cultura Sabouraud para avaliação do efeito do estresse salino na produção de biomassa. Os números no interior da microplaca indicam as concentrações de NaCl (mmol L ⁻¹) em cada poço.....	27
Figura 3.4 - Representação esquemática da microplaca usada nos experimentos em meio de cultura Sabouraud para avaliação dos efeitos das Mn-porfirinas MnTE-2-PyPCL ₅ e MnTnHex-2-PyPCL ₅ na presença e ausência de estresse salino. Os números no interior da microplaca indicam as concentrações de MnP (em µmol L ⁻¹) em cada poço.....	28
Figura 4.1 - (A) Curva de crescimento do <i>R. microsporus</i> . (B) Curva de crescimento do <i>L. blakesleeana</i> . (C) Curva de crescimento do <i>R. stolonifer</i> . Todas as curvas de dinâmica de crescimento foram realizadas em meio Sabouraud, com incubação a 28 °C e agitação orbital a 160 rpm.....	31
Figura 4.2 - Variação do pH com o tempo para os fungos: <i>R. stolonifer</i> (SIS 35), <i>R. microsporus</i> (SIS 39) e <i>L. blakesleeana</i> (SIS 40) em meio Sabouraud.....	32
Figura 4.3 - Obtenção de biomassa relacionada ao efeito da rotação orbital (160 ou 200 rpm) e da quantidade de unidades formadoras de colônia (2.000, 4.000 ou 9.000 UFC) no crescimento do fungo <i>R. stolonifer</i>	33
Figura 4.4 - Crescimento do fungo <i>R. stolonifer</i> em meio submerso, observa-se na imagem a relação biomassa versus salinidade. Amostras com 72 horas de crescimento em rotação orbital de 160 rpm e incubação a 28 °C.	34
Figura 4.5- Produção de biomassa do fungo <i>R. stolonifer</i> obtida em microplaca sob o efeito do aumento da concentração de NaCl no meio de cultura Sabouraud (Valores de biomassa Apêndice III).....	35
Figura 4.6 - Produção de biomassa do fungo <i>R. stolonifer</i> obtida em meio submerso sob o efeito do aumento da salinidade associada à concentração de NaCl, tempo de cultivo 72 horas (Valores de biomassa e pH Apêndice IV).	36
Figura 4.7 - Efeito da MnTE-2-PyP ⁵⁺ em microplaca no crescimento nas estirpes do fungo <i>R. stolonifer</i> (Valores de biomassa Apêndice V).	38
Figura 4.8 - Avaliação estatística (A) do efeito da MnTE-2-PyP ⁵⁺ em microplaca no crescimento do fungo e (B) da influência da salinidade no crescimento do fungo <i>R. stolonifer</i> (SIS 35).....	38
Figura 4.9 - Efeito da MnTnHex-2-PyP ⁵⁺ sobre a produção de biomassa do fungo <i>R. stolonifer</i> (SIS 35), com e sem efeito do estresse salino (Valores de biomassa Apêndice V).	39

Figura 4.10 - Demonstração estatística de (A) efeito da MnTnHex-2-PyP ⁵⁺ em microplaca no crescimento do fungo (B) influência da salinidade 0,5 M de cloreto de sódio (NaCl) no crescimento do fungo.....	40
Figura 4.11 - Efeito da MnTE-2-PyPCL ₅ sob a produção de biomassa do fungo <i>R. stolonifer</i> , com e sem o efeito da salinidade (Valores de biomassa e pH Apêndice VI)..	41
Figura 4.12 - Efeito da MnTnHex-2-PyPCL ₅ sob a produção de biomassa do fungo <i>R. stolonifer</i> , com e sem o efeito da salinidade (Valores de biomassa e pH Apêndice VIII)..	42
Figura 4.13 - Efeito do acetato de manganês sob a produção de biomassa do fungo <i>R. stolonifer</i> , com e sem o efeito da salinidade (Valores de biomassa e pH Apêndice X).....	42
Figura 4.14 - Reação de oxidação/redução de Ciclohexanol (Cy-ol) e Ciclohexanona (Cy-ona).....	43
Figura 4.15 - Curvas de crescimentos prévias para os fungos <i>R. stolonifer</i> , <i>R. microsporus</i> e <i>L. blakesleeana</i> obtidas em meio YMA.....	45
Figura 4.16 - Oxidação de Cy-ol a Cy-ona catalisada pelo fungo filamentosso <i>R. microsporus</i> , com biomassa obtida a partir de meio submerso Sabouraud.	46
Figura 4.17 - Oxidação de Cy-ol a Cy-ona catalisada pelo fungo filamentosso <i>L. blakesleeana</i> , com biomassa obtida a partir de meio submerso Sabouraud.....	46
Figura 4.18 - Oxidação de Cy-ol a Cy-ona catalisada pelo fungo filamentosso <i>R. microsporus</i> , com biomassa obtida a partir de meio submerso YMA.....	46
Figura 4.19 - Oxidação de Cy-ol a Cy-ona catalisada pelo fungo filamentosso <i>L. blakesleeana</i> , com biomassa obtida a partir de meio submerso YMA.....	47
Figura 4.20 - Biotransformação do Cy-ol pelo fungo filamentosso <i>R. stolonifer</i> , com biomassa obtida em meio submerso YMA e Sabouraud. Cy-ol permaneceu inalterado ao longo do tempo, indicando que oxidação não ocorreu.	499
Figura 4.21 - Redução de Cy-ona para Cy-ol por células íntegras do fungo filamentosso <i>R. stolonifer</i> , com biomassa obtida em meio submerso Sabouraud.....	50
Figura 4.22 - Comparação entre o primeiro ciclo de biotnasformação e o reuso das células íntegras do fungo filamentosso <i>R. stolonifer</i> em um segundo ciclo da Bioconversão.....	51
Figura 4.23 - Redução de Cy-ona para Cy-ol por células íntegras do fungo filamentosso <i>R. stolonifer</i> , com biomassa obtida em meio submerso Sabouraud com concentração de NaCl de 3 mmol L ⁻¹ (sem estresse salino) ou de 200 mmol L ⁻¹ (com salinidade).....	52
Figura 4.24 - Redução de Cy-ona para Cy-ol por células íntegras do fungo filamentosso <i>R. stolonifer</i> , com biomassa obtida em meio submerso Sabouraud com concentração de MnTE-2-PyPCL ₅ a 0 (controle) ou 0,5 µmol L ⁻¹	53

Figura 4.25 - Redução de Cy-ona para Cy-ol por células íntegras do fungo filamentoso *R. stolonifer*, com biomassa obtida em meio submerso Sabouraud com concentração de MnTE-2-PyPCl₅ a 0 (controle) ou 5,0 µmol L⁻¹. 54

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1 - Utilização de células íntegras *versus* enzimas isoladas em processos biotransformatórios. 11

Tabela 1.2 - Exemplos de biotransformações catalisadas por fungo filamentoso. 12

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CG	Cromatografia Gasosa
Cy-ol	Ciclohexanol
Cy-ona	Ciclohexanona
DMF	<i>N,N</i> -dimetilfomamida
ERO	Espécies reativas de oxigênio
ERN	Espécies reativas de nitrogênio
MnPs	Manganês porfirinas
MnTE-2-PyP ⁵⁺	Meso-Tetraquis(N-etilpiridínio-2-il)porfinatomanganês(III)
MnTnHex- 2-PyP ⁵⁺	Meso-Tetraquis(N-hexilpiridínio-2-il)porfinatomanganês(III)
NADH	Dinucleótido de nicotinamida e adenina
NADPH	Fosfato Dinucleótido de nicotinamida e adenina
SIS 35	<i>Rhizopus stolonifer</i>
SIS 39	<i>Rhizopus microsporus var. microsporus</i>
SIS 40	<i>Lichtheimia blakesleeana</i>
SOD	Superóxido Dismutase
SPSS	Statistical Package for Social Science for Windows
ATCC	American Type Culture Collection
RENNORFUN	Rede Norte-Nordeste de Fungos Filamentosos de solos da Caatinga e Amazônia
rpm	Rotação por minuto
UFC	Unidades formadoras de colônia
UNICAP	Universidade Católica de Pernambuco
UV/vis	Espectroscopia na região do visível
Tween 80	Polyoxyethylene (20) sorbitan monooleate
YMA	Levedura malte aga

1 Introdução

1.1 Problemática na produção de biomassa

Os fungos filamentosos e as leveduras têm se mostrado relevantes nas áreas ambientais e biotecnológicas (MADIGAN *et al.*, 2010). Ambientalmente, os fungos consagram sua importância por serem os principais responsáveis pela decomposição da matéria orgânica. Biotecnologicamente, por transformar os mais diversos grupos de moléculas (substratos), garantindo a inclusão desses organismos em diversas áreas da ciência básica e tecnológica, como os setores alimentícios (fermentação de bebidas alcoólicas, laticínios e no fermento biológico) e na indústria farmacêutica (na produção de antibióticos, enzimas e substâncias bioativas) (NEVOIGT, 2008; BORODINA, NIELSEN, 2014).

Para conseguir atingir os interesses científicos e industriais na produção de biomassa, muitos grupos buscam estabelecer protocolos que facilitem a produção de enzimas e/ou metabólitos necessários para os processos biotransformatórios, melhorando, consequentemente, os rendimentos desses sistemas (GIBSON *et al.*, 2008; NEVOIGT, 2008; CHEN Y. *et al.*, 2013; BORODINA, NIELSEN, 2014; YUN *et al.*, 2015). A exemplo disso, a indústria de processos fermentativos e de biotransformação, ao utilizar leveduras e fungos filamentosos, possuem protocolos que visam melhorar aspectos como o rendimento, a cinética e a energética do processo (GIBSON *et al.*, 2008; NEVOIGT, 2008; BORODINA; NIELSEN, 2014; YUN *et al.*, 2015).

Nesse contexto, estudos visando a melhoria da produção enzimática foram realizados com alguns fungos filamentosos, como fungo *Lichtheimia blakesleeana* (SIS 40) na busca das enzimas fitase e xilanase (ARORA, 2004; NEVES *et al.*, 2011). O fungo *Rhizopus microsporus var. microsporus*, por sua vez, vem sendo reportado por sua β -glucanase (CELESTINO, *et al.* 2006). Ambos os fungos destacam-se na produção de produtos para a indústria alimentícia.

Na maioria dos processos fermentativos à base de leveduras, o crescimento da biomassa e a conversão do substrato ao produto ocorrem simultaneamente em uma única etapa. Já os processos biotransformatórios de biocatálise que utilizam células íntegras de fungos filamentosos, são geralmente realizados em duas etapas (GIBSON *et al.*, 2008). No primeiro momento, há a produção da biomassa que, posteriormente, passa por um tratamento de lavagem

para retirada de excessos do meio de cultura. Em seguida, a biomassa é exposta ao substrato de interesse, sob novas condições experimentais, dando início ao processo de biotransformação (SHULZE *et al.*, 1999).

Os fungos filamentosos são micro-organismos multicelulares que possuem uma estrutura primária conhecida como esporos, estes são uma forma de proteção das intempéries ambientais, e germinam quando encontram as condições favoráveis. Após a germinação, há a formação de longos filamentos conhecidos como hifas. O conjunto de hifas é chamado de micélio ou manto micelial (Figura 1.1) (TORTORA *et al.*, 2012), enquanto que as leveduras são seres unicelulares formadas por pseudo-hifas com colônias de textura pastosa ou cremosa (Figura 1.1) (TORTORA *et al.*, 2012).

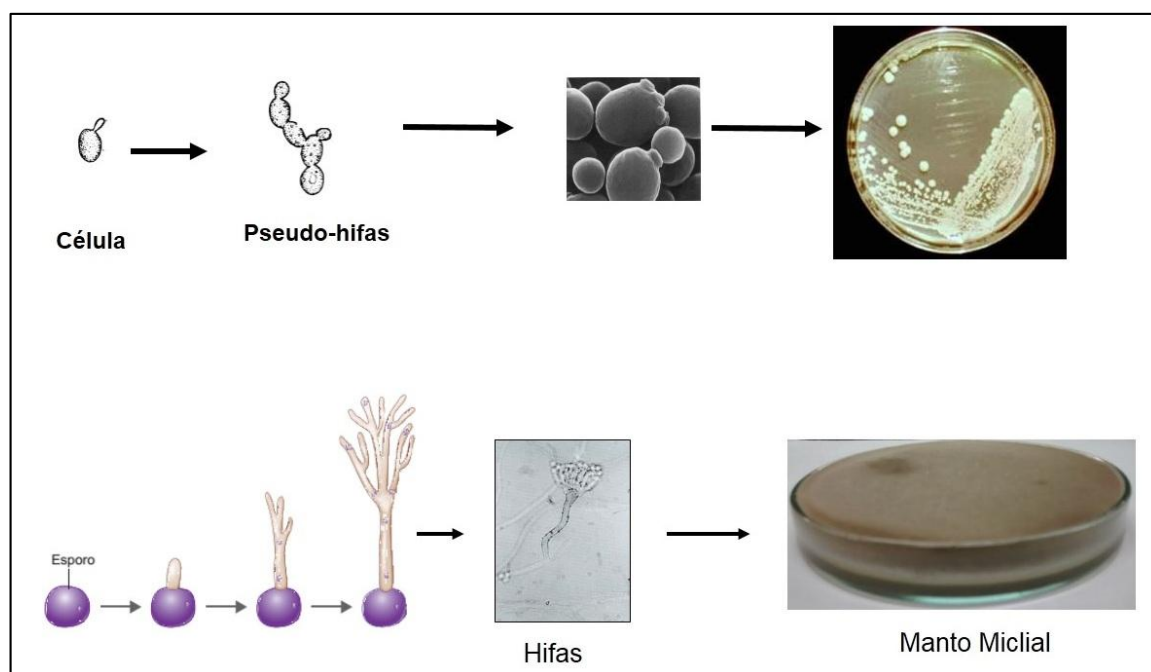


Figura 1.1 – Estrutura esquemática do crescimento de uma levedura e de fungos filamentosos a partir do esporo até as hifas. Em destaque, a estrutura de um fungo filamentoso visto em microscópio ótico.

Fonte: adaptado de TORTORA *et al.*, 2012.

Estudos relacionados aos protocolos de produção de biomassa e de biotransformação mostram que as condições de cultivo afetam o vigor dos micro-organismos, desde o inóculo no novo meio de cultura até o esgotamento/excesso do material que é consumido/produzido durante o crescimento (PÉREZ-TORRADO *et al.*, 2009). Isto resulta da exposição da biomassa a uma série de tensões e condições de estresses que podem prejudicar todo o processo de

produção, como o estresse oxidativo, estresse osmótico e estresse nutricional (GIBSON *et al.*, 2007, 2008).

A produção de biomassa passa por três estágios, que são as fases: lag, exponencial e estacionária (Figura 1.2). A primeira etapa consiste do inóculo do micro-organismo ao novo meio de cultura, o que submete o mesmo a tensões como consequência da adequação ao novo ambiente. Dentre essas tensões, destacam-se: pressão osmótica elevada e estresse oxidativo intenso (BORODINA, NIELSEN, 2014; CHEN *et al.*, 2013). Esse estágio é muito importante, pois os micro-organismos sintetizam nesta etapa muitas das moléculas essenciais ao seu desenvolvimento, principalmente aquelas que podem proteger as células contra agressões exógenas e endógenas (GIBSON *et al.*, 2007, 2008). Segue-se, então, a fase de rápido crescimento com uma maior linearidade, também conhecida como fase exponencial, na qual o fungo possui condições adequadas para o crescimento. Esse estágio corresponde à etapa em que há nutrientes prontamente disponíveis e assimiláveis para o crescimento do micro-organismo. Seguindo com a análise, em seguida, o meio começa a apresentar deficiência de nutrientes de rápida assimilação pelo micro-organismo, dando início, então à fase estacionária.

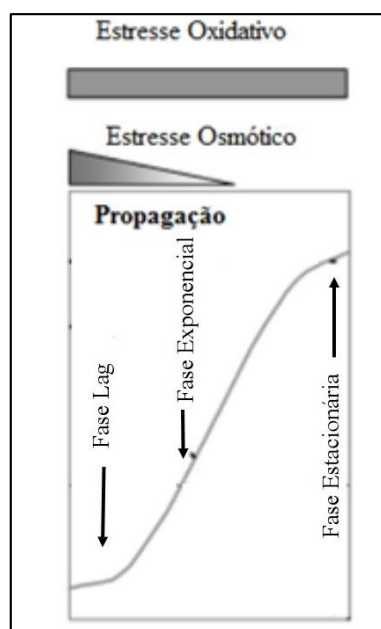


Figura 1.2 - Demonstração das fases de crescimento de micro-organismos.

Fonte: GIBSON *et al.*, 2007.

Estudos mostram que, em todas as fases descritas, o oxigênio, que é considerado um componente essencial para o metabolismo respiratório dos seres aeróbios, pode propiciar a geração de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (ERO e ERN) (GIBSON *et al.*, 2007, 2008). Tanto a aeração quanto a hipóxia advinda do consumo de oxigênio levam à geração de

espécies reativas, o que é considerado uma resposta normal do metabolismo de todos os organismos aeróbios existentes (HALLIWELL E GUTTERIDGE, 1999). Uma das possíveis consequências advinda do acúmulo dessas espécies reativas (ERO e ERN), ocorre devido à baixa disponibilidade, expressão ou inativação de enzimas e/ou compostos antioxidantes responsáveis pela eliminação dessas espécies, é o desequilíbrio caracterizado como estresse oxidativo (PEREIRA *et al.*, 2001).

Nos organismos vivos, desde os seres mais complexos como os seres humanos até seres unicelulares como leveduras, as principais estruturas subcelulares responsáveis pela produção das ERO e ERN são aquelas localizadas nas mitocôndrias, enquanto, nas plantas, as maiores fontes são os cloroplastos e peroxissomas (VASCONCELOS, *et al.*, 2007. BATINIĆ-HABERLE *et al.*, 2009b). Dentre as ERO e ERN, destacam-se o íon radical superóxido, o peróxido de hidrogênio e o ânion peroxinitrito (ONOO^- , um aduto entre superóxido e óxido nítrico).

A capacidade de tolerância que determinadas estirpes apresentam a condições que podem gerar o estresse oxidativo está relacionada aos seus mecanismos de defesa, como a expressão de sistemas antioxidantes endógenos (tais como as enzimas superóxido dismutase e catalase) e captação de antioxidantes exógenos a partir de componentes do meio de cultura/alimentos (LEI *et al.*, 2007; LI *et al.*, 2014). Estudos sobre a resposta a estímulos extracelulares durante a produção de biomassa têm buscado entender os mecanismos que dominam o crescimento das estirpes e como o melhoramento das condições do meio externo pode ser determinante para a qualidade das células (VALENTINE *et al.*, 1998; PEREIRA, 2001; NEVOIGT, 2008; PIZZARO *et al.*, 2008).

É comum nos processos industriais de fermentação, por exemplo, a biomassa, ou parte dela, ser submetida a diversos ciclos de reúso, o que geralmente requer a obtenção da biomassa seca. Assim, além da cinética de produção de biomassa e de metabólitos de interesse biotecnológicos a partir do cultivo de fungos, outras etapas pertencentes à obtenção de biomassa seca, tais como a decantação, centrifugação e desidratação de fungos, são importantes. Essas etapas também são afetadas pelos efeitos dos estresses induzidos, pelo processamento do sistema e danos, causados por radicais livres, têm sido também sugeridos ocorrer durante a desidratação (ESPINDOLA *et al.*, 2003). Esses processos estão correlacionados a danos à estrutura celular como a desnaturação protéica, o que gera prejuízos ao vigor da biomassa, (ESPINDOLA *et al.*, 2003; FRANÇA *et al.*, 2007; GIBSON *et al.*, 2007, 2008).

1.2 Estresse salino e danos oxidativos

Em organismos mais complexos, como as plantas, tem-se observado que o estresse salino induz à produção de espécies reativas ERO e ERN, o que prejudica o desenvolvimento, funções fisiológicas básicas e inibe o crescimento da planta por processos estressantes; isto resulta em grandes perdas na produção e consequentemente prejuízos para a agricultura (RIBEIRO *et al.*, 2007; SILVEIRA *et al.*, 2010; PUYANG *et al.*, 2015).

A origem do termo estresse salino se refere à existência de níveis tóxicos de sais presentes no solo ou no meio de cultura (RIBEIRO *et al.*, 2007). Geralmente, esses meios são indutores de estresse, pois agem de forma danosa na estrutura celular e podem impedir o crescimento, agindo, por exemplo, em enzimas ou causando desnaturação de proteínas (SILVEIRA *et al.*, 2010; VIANA *et al.*, 2004; PUYANG *et al.*, 2015)

O efeito provocado pelo acréscimo de sais ao meio de cultura e os danos que esses agentes estressores provocam na capacidade biotransformadora de micro-organismos ainda é pouco estudado. Nesse contexto, um estudo com leveduras mostrou que o aumento dos níveis salinos propiciou uma maior expressão da enzima invertase até uma concentração de 200 mmol L⁻¹, porém quando as estirpes desses organismos foram crescidas sob condições de estresse hiperosmótico acima dessa concentração, houve uma queda na produção dessa enzima (TÜRKEK E TURGUT, 2002).

Nesse sentido, uma hipótese relacionada ao estresse salino em micro-organismos é a de que, assim como em plantas, este estressor não redox, em conjunto com desequilíbrio osmótico advindo do excesso de espécies iônicas no meio, pode induzir um desequilíbrio no sistema responsável por controlar os níveis de espécies oxidativas (ERO e ERN) em micro-organismos como fungos, leveduras e bactérias, promovendo assim um aumento significativo dessas espécies, e, como consequência, ocasionando o estresse oxidativo (SILVEIRA *et al.*, 2010).

Essa ideia pode ser justificada, pois altos níveis de sais afetam diretamente sistemas celulares, como o de regulação eletrolítica e canais iônicos celulares (SILVEIRA *et al.*, 2010). Como uma possível consequência desse conjunto de alterações fisiológicas, encontra-se a quebra da homeostase entre as espécies oxidantes e antioxidantes, gerando então o estresse oxidativo.

1.3 Mn-Porfirinas como moduladores redox de estresse oxidativo

As porfirinas são compostos orgânicos que possuem um macrociclo tetrapirrólico, altamente conjugado derivado da porfina, como ilustrado na Figura 1.3. Essa estrutura base permite diversas alterações estruturais que incluem a coordenação de íons metálicos nos nitrogênios centrais. Quando dois hidrogênios estão ligados aos nitrogênios no centro da porfirina, como demonstrado na Figura 1.3, essas são conhecidas como porfirinas base-livre; quando há a substituição desses hidrogênios pela coordenação de um metal em seu centro, estas são conhecidas por metaloporfirinas. As metaloporfirinas estão intimamente ligadas à atividade de diversas biomoléculas essenciais à vida, como o grupo heme (uma Fe-porfirina) da hemoglobina, mioglobina, citocromo *c*, citocromos P450, óxido nítrico sintase, dentre outras (LIPPAD e BERG 1994).

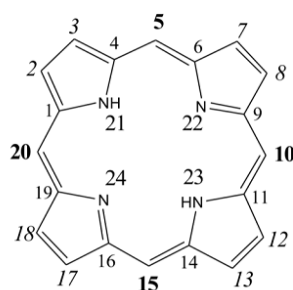


Figura 1.3 - Estrutura do centro porfirínico. Numeração recomendada pela IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry). As posições 5, 10, 15 e 20 são também conhecidas como posições meso, enquanto as posições 2, 3, 7, 8, 12, 13, 17, 18 são coletivamente denominadas posições β ou β -pirrólicas.

Fonte: WAGNER *et al.*, 1993.

Dentre as diversas opções de metais a serem coordenados ao anel porfirínico, destacam-se as Mn(III)-porfirinas, capazes de mimetizar eficientemente a enzima superóxido dismutase (SOD) (Figura 1.4). Algumas Mn-porfirinas catiônicas encontram-se hoje entre os melhores modelos biomiméticos das enzimas SOD e têm se destacado em estudos pré-clínicos em modelos animais como uma das classes mais importantes de reguladores redox catalíticos de estresse oxidativo (BATINIĆ-HABERLE *et al.*, 2009b). Essas moléculas possuem atividade comprovada em diversos modelos *in vivo*, tais como modelos unicelulares utilizando a bactéria *Escherichia coli* e a levedura *Saccharomyces cerevisiae*, e em animais complexos como mamíferos e primatas não-humanos (REBOUÇAS *et al.*, 2008b; BATINIĆ-HABERLE *et al.*, 2009a, 2011). Esses compostos têm se mostrado, por exemplo, capazes de minimizar os efeitos nocivos e danos causados por radiação (ação radioprotetora), de inibir os tumores (*via* ação

antiangiogênica), de aumentar a eficácia de radioterapia e hipertermia no tratamento de câncer (ação sinérgica) e de proteger órgãos e tecidos em transplantes e/ou processos de isquemia/reperfusão (POLLARD *et al.*, 2009; BATINIĆ-HABERLE *et al.*, 2010; OBERLEY-DEEGAN *et al.*, 2012; ALI *et al.*, 2013). Estudos clínicos em humanos (fase I e fase I/II) de algumas Mn-porfirinas catiônicas devem começar até o segundo semestre de 2016 nos Estados Unidos e Canadá (BATINIĆ-HABERLE, comunicação pessoal).

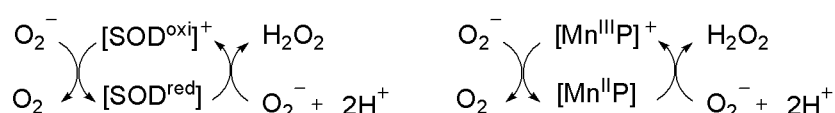


Figura 1.4 - Mecanismos para dismutação do íon radical superóxido pela enzima SOD e por Mn-porfirinas.

O planejamento de Mn-porfirinas (MnPs) como mímicos SOD com eficácia *in vitro* e *in vivo* para o controle do estresse oxidativo baseia-se em um equilíbrio entre fatores termodinâmicos e eletrostáticos. Quanto aos fatores termodinâmicos, procura-se ajustar o potencial de redução dos compostos para valores próximos aos da enzima SOD $\sim +300$ mV vs. NHE. Assim, complexos que possuam potencial de redução próximos a esse são consideradas bons candidatos a mímicos. As Mn-porfirinas catiônicas mostradas na Figura 1.5 apresentam potencial de redução Mn(III)/Mn(II) próximo ao da enzima SOD, que, por sua vez, está no ponto médio entre o potencial de oxidação e de redução do superóxido.

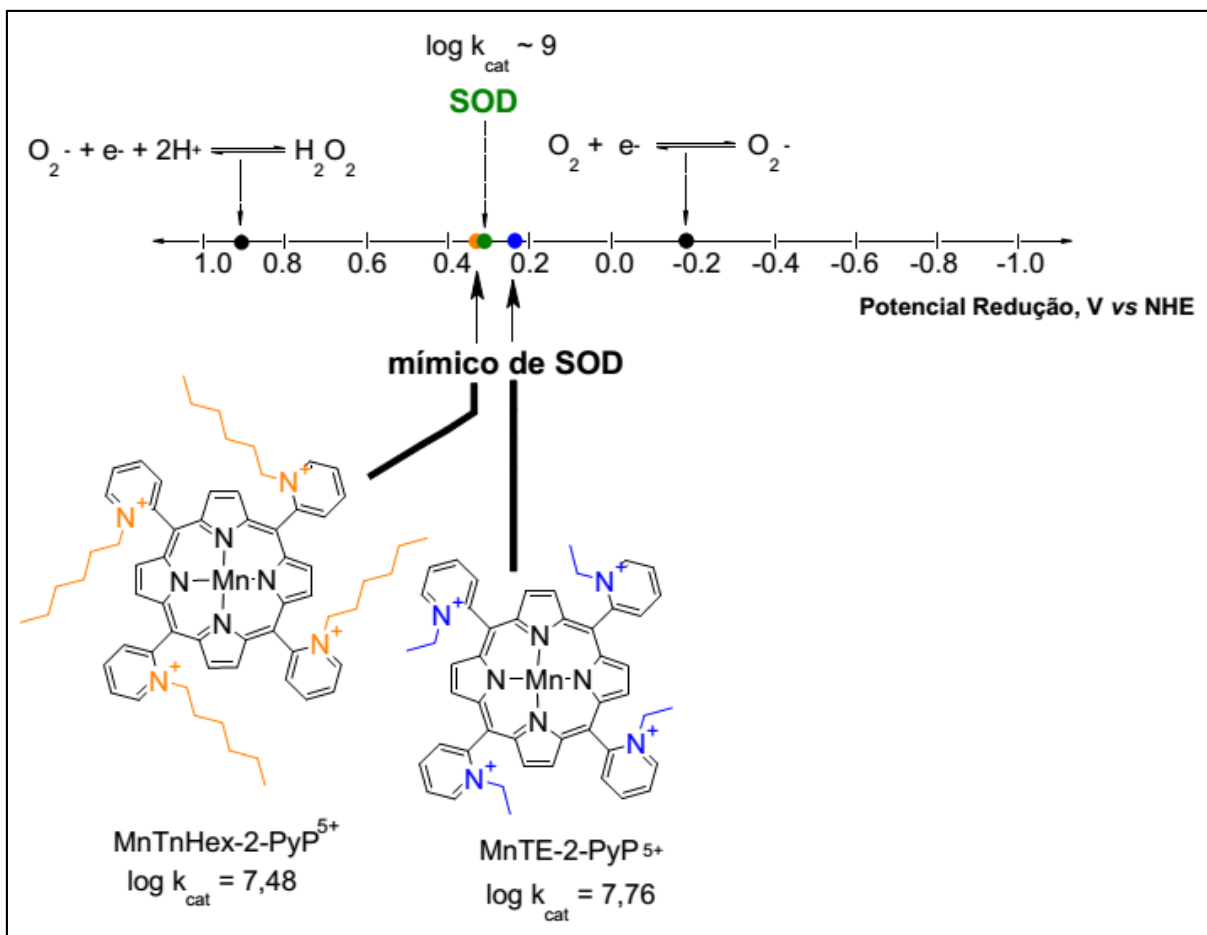


Figura 1.5 - Potenciais de redução e atividade SOD ($\log k_{\text{cat}}$) da MnTE-2-PyP⁵⁺ e MnTnHex-2-PyP⁵⁺ comparadas com o potencial da enzima SOD.

Fonte: Adaptado de: (PINTO, 2013; REBOUÇAS *et al.*, 2008a).

No que diz respeito aos fatores eletrostáticos e cinéticos, as cargas positivas das Mn-porfirinas catiônicas possibilitam uma facilitação eletrostática do ânion superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$) ao guiá-lo ao centro ativo, contribuindo para um considerável aumento (de 2 a 3 ordens de magnitude) nas atividades catalíticas das Mn-porfirinas (REBOUÇAS *et al.*, 2008a,b). O centro de carga positiva na molécula serve como “túnel”, facilitando a transferência eletrônica entre o metal e o íon superóxido.

Na procura do melhor entendimento da influência da carga do composto na atividade mímica SOD, curvas empíricas de relação estrutura-atividade revelaram os impactos dos fatores termodinâmicos e eletrostáticos na catálise de dismutação do superóxido. Esses estudos confirmaram que Mn-porfirinas catiônicas possuem de boa a ótima atividade SOD. Comparativamente, as Mn-porfirinas aniônicas mostram uma baixa atividade catalítica SOD, que está relacionado às cargas negativas que dificultam a aproximação do ânion radical

superóxido. Esse mecanismo de facilitação eletrostática foi confirmado por medidas de efeito cinético (REBOUÇAS *et al.*, 2008a,b; BATINIĆ-HABERLE *et al.*, 2009a,b).

Adicionalmente, observou-se que existe uma correlação direta entre a atividade SOD e a capacidade das Mn-porfirinas de reduzir o ânion peroxinitrito, que é uma ERN associada a muitos efeitos fisiologicamente prejudiciais para os sistemas biológicos (REBOUÇAS *et al.*, 2008; BATINIĆ-HABERLE *et al.*, 2009a,b). Esses estudos evidenciaram que as Mn-porfirinas catiônicas, tais como a MnTE-2-PyP⁵⁺ e MnTnHex-2-PyP⁵⁺ (Figura 1.5), são capazes de promover eficientemente a modulação não apenas de espécies reativas primárias, como o superóxido, mas também de espécies secundárias, como o peroxinitrito, tanto *in vitro* quanto *in vivo* (REBOUÇAS *et al.*, 2008c,d; BATINIĆ-HABERLE *et al.*, 2009a,b).

Além dos fatores termodinâmicos e eletrostáticos intrínsecos dos compostos, a capacidade antioxidante *in vivo* dos mímicos SOD, especificamente das Mn(III) N-alquilpiridinioporfirinas catiônicas, é diretamente afetada pela biodisponibilidade dos compostos. Essa característica, por sua vez, depende da lipofilicidade e de fatores estruturais como o tamanho das cadeias alquílicas laterais ligadas aos grupos piridilas. Enquanto o derivado contendo o grupo etila, MnTE-2-PyP⁵⁺ (Figura 1.5), é mais hidrofílico e localiza-se preferencialmente no citoplasma e no núcleo celular, o composto contendo o grupo n-hexila, MnTnHex-2-PyP⁵⁺ (Figura 1.5), é mais lipofílico e localiza-se nas mitocôndrias. Desse modo, apesar das atividades SOD desses compostos serem essencialmente semelhante, é possível modular a eficiência *in vivo* por meio do controle da cadeia lateral e, assim, da lipofilicidade e sublocalização celular (BATINIĆ-HABERLE *et al.*, 2010).

O impacto da biodisponibilidade na eficiência dos mímicos de SOD *in vivo* foi comprovada em linhagens da bactéria *Escherichia coli* e da levedura *Saccharomyces cerevisiae* modificadas geneticamente para serem SOD-deficientes. Uma característica desse modelo experimental é que os micro-organismos não conseguem se desenvolver no meio de cultura aeróbio, na ausência de um mímico de SOD, devido à toxicidade apresentada pelo superóxido decorrente do metabolismo do oxigênio. O crescimento desses micro-organismos em meio aeróbio na presença de Mn-porfirinas, como a MnTE-2-PyP⁵⁺ ou MnTE-3-PyP⁵⁺ (Figura. 1.6), mostrou-se tão bom quanto aquele dos sistemas controle em que a enzima nativa SOD é presente (Figura 1.6) (REBOUÇAS *et al.*, 2008a,b; BATINIĆ-HABERLE *et al.*, 2010). Apesar das Mn-porfirinas derivadas dos isômeros *orto* das Mn(III) N-alquilpiridinioporfirinas possuírem uma atividade catalítica 10 vezes maior que o correspondente isômero *meta*, os compostos *meta* possuem lipofilicidade cerca de 10 vezes maior, o que leva a um acúmulo *in*

vivo também 10 vezes maior, compensando a baixa atividade catalítica e levando a uma mesma eficiência *in vivo* que os isômeros *orto* (KOS, *et al.*, 2009a,b; BATINIĆ-HABERLE *et al.*, 2002, 2009b).

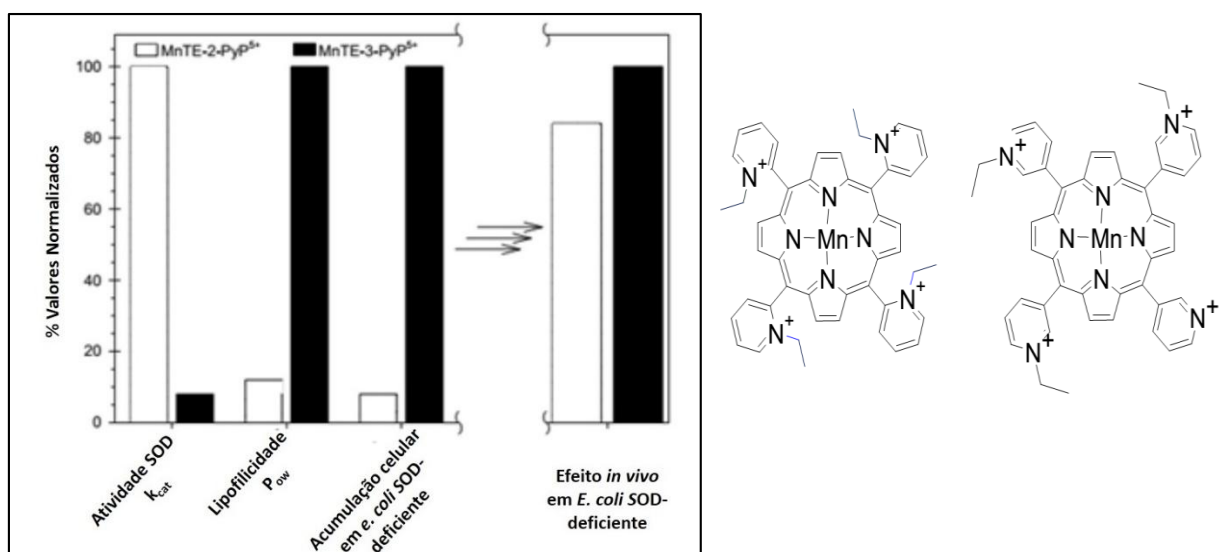


Figura 1.6 - Efeito *in vivo* dos isômeros *orto* (MnTE-2-PyP₅) e *meta* (MnTE-3-PyP₅) de Mn(III) porfirinas. A menor atividade catalítica da MnTE-3-PyP⁵⁺ é compensada *in vivo* pela maior lipofilicidade e consequente maior acúmulo celular em modelo de *E. coli* SOD-deficiente.

Fonte: Adaptado de KOS *et al.*, 2009a,b.

1.4 Uso de micro-organismos em processos biocatalíticos

A utilização de materiais biológicos de origem animal, vegetal ou microbiológico em reações são as bases dos processos biocatalíticos e/ou biotransformatório (DEMIRJIAN *et al.*, 1999). Isso é possível graças às enzimas existentes nesses sistemas, que são responsáveis por catalisar com eficiência as modificações de um substrato para um produto (ADRIO *et al.*, 2005).

Os processos biotransformatórios podem ocorrer com a utilização de enzimas isoladas e/ou com células íntegras (ARORA, 2004). A metodologia que utiliza enzimas isoladas são geralmente quimiosseletivas, regioseletivas e enantiosseletivas; porém, os processos como expressão, isolamento das enzimas e cuidados na manutenção, para preservar a eficiência catalítica, exigem técnicas dispendiosas e possuem alto custo agregado (DIAS *et al.*, 2012) (Tabela 1.1). Nesse sentido, a utilização de células íntegras destaca-se, pois se constitui como um sistema mais simples, de fácil manuseio e que possui um sistema multienzimático, elevando assim sua capacidade biossintetizante, já que estas podem promover a regeneração de cofatores

enzimáticos em condições reacionais brandas. Destaca-se, nesse sentido, o sistema que utiliza células íntegras possui alta sensibilidade às variações nas condições experimentais, o que pode alterar a viabilidade da celular, promovendo alterações na sua atividade biotransformadora (BURTON, 2003).

Tabela 1.1 - Utilização de células íntegras *versus* enzimas isoladas em processos biotransformatórios. **Fonte:** Adaptado de Dias *et al.*, 2012.

Biocatalisador	Vantagens	Desvantagens
<i>Células íntegras</i>	Baixo custo associado; Regeneração estrutural dos cofatores; Estabilidade operacional.	Instabilidade em solventes orgânicos; Reações concorrentes advindas de metabolismo celular; Permeabilidade dos substratos no interior das células.
<i>Enzimas isoladas</i>	Alta especificidade nas reações; Elevada eficiência catalítica; Facilidade no isolamento dos produtos.	Processos dispendiosos; Alto custo associado; Dependência dos cofatores (NADP ⁺ , NAD ⁺ , ATP) Pouca disponibilidade de enzimas produzidas pela indústria.

Como mencionado na Seção 1.1, os processos que utilizam células íntegras podem ocorrer de duas maneiras: uma delas consiste na metodologia usada pela indústria fermentativa à base de leveduras, nos quais a biotransformação ocorre em uma etapa única, com simultâneo crescimento da biomassa e conversão do substrato ao produto (GIBSON *et al.*, 2008; COSTA *et al.*, 1993). Os processos biotransformatórios que utilizam células íntegras de fungos filamentosos são geralmente realizados em duas etapas. Ambos os processos exploram a produção de enzimas (isoladas ou não) que sejam eficientes para a biotransformação em questão (FABER, 2004).

A seleção da fonte de células íntegras para a biotransformação é considerada como um dos passos fundamentais para o procedimento. Dentre as fontes existentes que utilizam células íntegras destacam-se os fungos filamentosos, que vêm ganhando destaque nos processos biotransformatórios graças à diversidade de reações em que eles são empregados (Tabela 1.2) (ABREU *et al.*, 2015).

Tabela 1.2 - Exemplos de biotransformações catalisadas por fungos filamentosos.

Fonte: Adaptado de Dias *et al.*, 2012; Patel, 2008; Abreu *et al.*, 2015.

Biotransformação	Classe enzimática	Fungos filamentosos empregados
Hidrólise de ésteres	Hidrolases (esterases e lípases)	<i>Penicillium</i> , <i>Fusarium</i> , <i>Aspergillus</i>
Oxidação de álcoois e tióis/ Redução de cetonas pró- quirais	Oxidoredutase (monooxigenase e desidrogenases)	<i>Geotrichum</i> , <i>Aspergillus</i> , <i>Cândida</i>
Desracemização	Isomerases	<i>Rhizopus</i> , <i>Aspergillus</i>

A eficiência de uma enzima em um processo biocatalítico pode ser determinada pela capacidade de sua combinação com o substrato. Como observado na Figura 1.7, essa combinação resulta no complexo enzima-substrato (etapas 2 e 3), que posteriormente promove a transformação do substrato no produto (etapas 3 e 4) (DIAS *et al.*, 2012; TORRELO *et al.*, 2015).

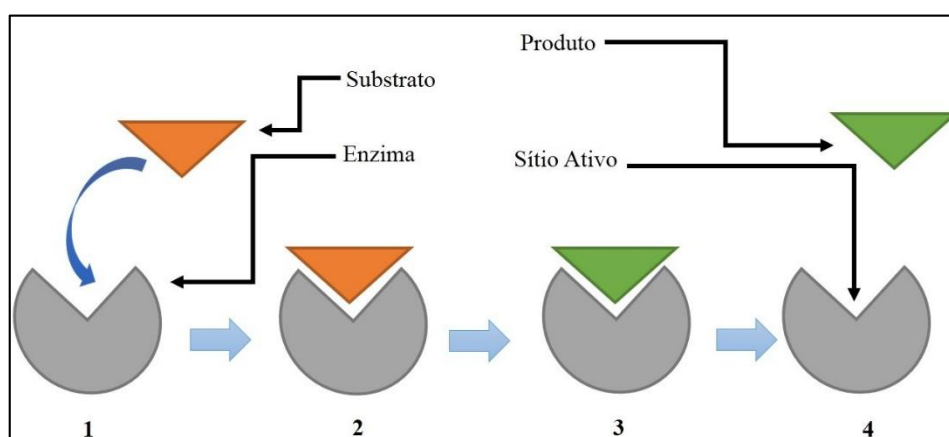


Figura 1.7 - Esquema geral de interação enzima/substrato: em 1 interação entre a enzima e o substrato; 2 interação entre os sítios ativos da enzima com o substrato (formação do complexo enzima-substrato); 3 transformação do substrato no produto; e, por fim, 4 liberação do produto do sítio catalítico.

Fonte: Adaptado de Dias *et al.*, 2012 e Torrelo *et al.*, 2015.

Muitas das reações de oxidação decorrentes desses micro-organismos dependem da atividade das enzimas monooxigenase, as quais se incluem os citocromos P450, que apresentam como grupo prostético uma Fe-porfirina (HIGUCHI *et al.*, 1996). A habilidade dos citocromos P450 em gerar espécies ativas de alta valência Fe-oxo com alto potencial oxidante faz com que estes exerçam papéis vitais aos organismos vivos e sejam essenciais em alguns processos biocatalíticos. Essas enzimas estão ligadas diretamente a uma série de reações realizadas por

fungos e bactérias, como as reações enantiosseletivas de epoxidação de alquenos terminais (PANKE, 1999), oxidação de α -pinenos (SCHEWE *et al.*, 2008), oxidação enantiosseletiva de sulfóxidos (HOLLAND e WEBER, 2000), oxidação de álcoois primários para obtenção de aldeídos (VILLA *et al.*, 2002) e oxidação enantiosseletiva de Baeyer-Villiger (Figura 1.8) (FANG, 1995; CARBALLEIRA *et al.*, 2004).

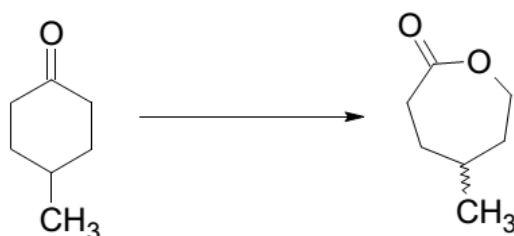


Figura 1.8 - Oxidação do tipo Baeyer-Villiger que utiliza monooxigenase

Fonte:(FANG, 1995; CARBALLEIRA *et al.*, 2004).

Já as reações de redução de substratos orgânicos promovidos biocataliticamente são comumente associadas às enzimas hidrogenases, ou realizadas indiretamente via acoplamento com as enzimas desidrogenases (NAKAMURA *et al.*, 2003). Dois destaques dessas reações são as reduções assimétricas de cetonas pró-quirais e reações enantiosseletivas de α -metileno cetonas, notando-se que em geral a cetona de interesse sofre redução enquanto um co-substrato, que normalmente é um álcool, sofre uma oxidação (Figura 1.9).

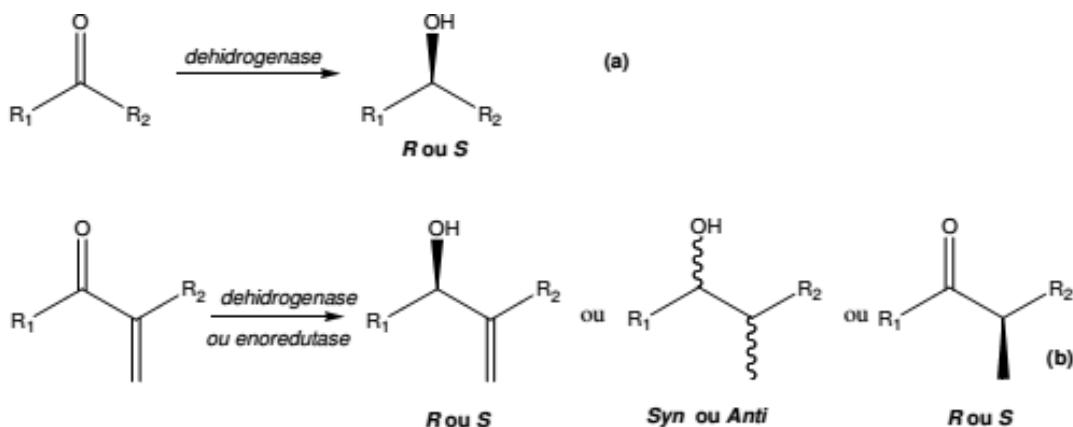


Figura 1.9 - (a) Redução assimétrica de cetonas pró-quirais. (b) Quimiosseletividade na redução de α -metileno cetonas.

As reações de oxidação que são promovidas pelos citocromos P450, assim como algumas reações de redução, dependem do consumo de NADH (Dinucleótido de nicotinamida e adenina) e NADPH (Fosfato Dinucleótido de nicotinamida e adenina) (Figura 1.10) (TORRELO *et al.*, 2015). Nesse contexto, o uso de células íntegras é considerado um método

vantajoso frente aos sistemas enzimáticos isolados, pois as células viáveis possuem a capacidade de promover a regeneração do NADH e NADPH consumidos durante a ativação do dióxigênio (NAKAMURA *et al.*, 2003; SCHEWE *et al.*, 2008).

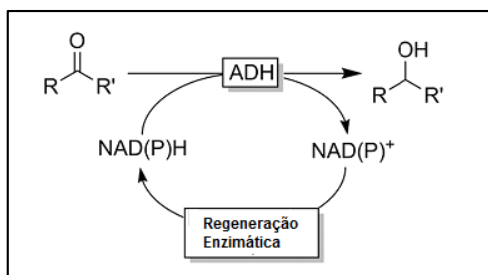


Figura 1.10 - Reação de redução de uma cetona pró-quiral esquematizando o consumo de NADH e NADPH, onde ADH representa a enzima álcool desidrogenases.

Fonte: Adaptado de: NAKAMURA *et al.*, 2003; TORRELO *et al.*, 2015.

No âmbito das reações de oxidação e redução, consideradas de fundamental importância para a química orgânica, substratos baratos e de fácil acesso como ciclohexanol e ciclohexanona podem servir como reações modelos para fornecer informações importantes quanto a futura capacidade biocatalítica de micro-organismos. Por exemplo, entre as duas possibilidades, qual reação é favorecida em sua capacidade biotransformatória. E a essa característica, agrega-se o fato de que muitos dos substratos usados nos processos biocatalíticos possuem estruturas químicas semelhantes a esses compostos (PIOVAN *et al.*, 2008; PINEDO-RIVILA *et al.*, 2009; TORRELO *et al.*, 2015). Dentre estes, por exemplo, destacam-se as reações de redução que utilizam cetonas pró-quirais (PINEDO-RIVILLA *et al.*, 2009; PIOVAN *et al.*, 2008; BIROLI *et al.*, 20015). Trabalhos com células integras de fungos filamentosos ou leveduras procuram verificar a atividade de enzimas monooxigenase para esse tipo de reação (PINEDO-RIVILLA *et al.*, 2009; PIOVAN *et al.*, 2008). Nesses estudos com substratos carbonílicos pró-quirais, os fungos filamentosos estudados apresentaram uma boa capacidade de conversão (Figura 1.11) com resultados relevantes na obtenção dos produtos, dando a estes destaque quando comparados a outros micro-organismos (TORRELO *et al.*, 2015).

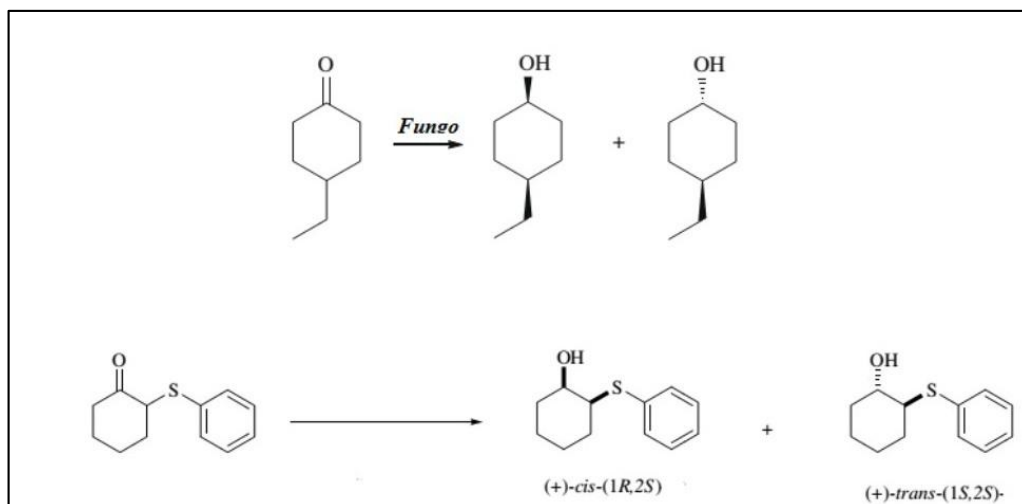


Figura 1.11- Reduções enantiosseletivas de cetonas pró-quirais, com a ciclohexanona em seu esqueleto estrutural.

Fonte: PINEDO-RIVILLA *et al.*, 2009; PIOVAN *et al.*, 2008.

Em ambientes onde há excesso de oxigênio molecular (O_2) a reação de oxidação geralmente é favorecida. Nesse contexto o fungo *Rhizopus stolonifer* NRRL-1392 foi reportado por Clodhary (2006, 2009 e 2013) como biocatalisador para modificações estruturais de terpenos (Figura 1.12) e os produtos dessa conversão mostram boa atividade anti-bacteriana. Esses resultado são, no entanto, questionáveis, uma vez que o mesmo grupo reporta estudos de fungos diferentes, mas com o mesmo código ATCC: *Fusarium oxysporum* NRRL-1392 (ATIF *et al.*, 2015) e *Cunninghamella elegans* NRRL-1392 (CLODHARY, 2007). Segundo o American Type Culture Collection (ATCC), o código NRRL-1392 é associado ao micro-organismo *Cunninghamella elegans*.

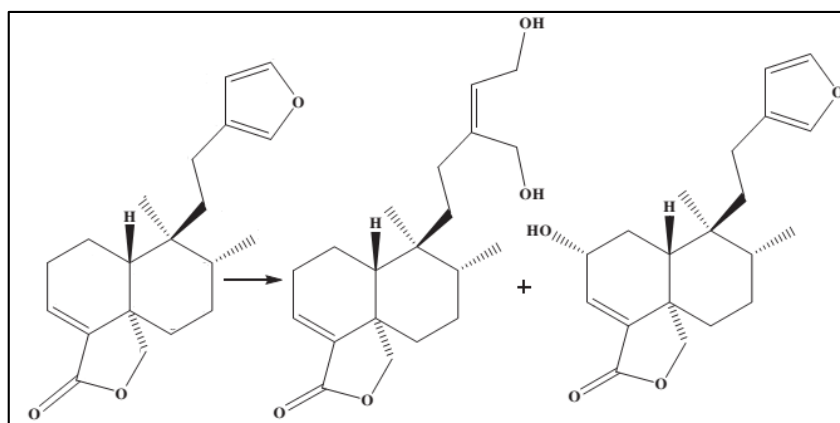


Figura 1.12 - Conversão da lactona clerodane pelo fungo *Rhizopus stolonifer*

Fonte: CLOUDHARY, *et al.*, 2013.

2 *Objetivos*

2.1 Objetivo geral

O presente trabalho objetiva estudar o impacto do cloreto de sódio e Mn-porfirinas, como indutores ou remediadores de situações de estresse em fungos filamentosos, provocam na obtenção de biomassa de fungos filamentosos e na qualidade da biomassa resultante para reações típicas de biotransformação, como oxidação de álcool e redução de cetona.

2.2 Objetivos específicos

- ✓ Estudar a dinâmica de crescimento dos fungos filamentosos.
- ✓ Estudar o efeito do estresse salino, induzido por cloreto de sódio como agente estressor, na produção de biomassa do fungo *R. stolonifer*.
- ✓ Avaliar o efeito de Mn-porfirinas catiônicas, na produção de biomassa do fungo *R. stolonifer* na ausência e na presença do agente estressor cloreto de sódio.
- ✓ Investigar a eficiência dos fungos filamentosos como biocatalisadores em reações de oxidação e de redução, com os substratos modelos: ciclohexanol e ciclohexanona.
- ✓ Avaliar a qualidade biotransformadora da biomassa do fungo *R. stolonifer* obtidas sob a influência da salinidade e da MnTE-2-PyP⁵⁺.
- ✓ Verificar a possibilidade de reúso das células íntegras do fungo *R. stolonifer* em um segundo ciclo biocatalítico.
- ✓ Agregar valor à biodiversidade regional.

3 Metodologia experimental

3.1 Materiais, reagentes e solventes

O solvente *N,N*-dimetilfomamida (DMF) foi adquirido da Tedia e bidestilado antes de ser utilizado. Os demais materiais, reagentes e solventes foram de grau de pureza analítica e usados sem tratamento prévio. Acetato de manganês(II) tetrahidratado, aliquat, hexafluorofosfato de amônio, ϵ -caprolactona e pirrol foram adquiridos da Sigma-Aldrich. 2-piridinacarboxaldeído foi adquirido da Alfa Aesar. Acetona, ácido acético, ácido clorídrico foram comprados da Química Moderna. Clorofórmio e álcool metílico foram adquiridos da Tedia. Bicarbonato de sódio foi da marca Nuclear. *p*-Toluenosulfonato de *n*-hexila foi adquirido da TCI-America. Ciclohexanona, peróxido de hidrogênio, hidróxido de sódio, cloreto de sódio, extrato de levedura, fosfato de sódio monobásico, fosfato de sódio dibásico, ágar e Tween 80 foram da Vetec. Ciclohexanol e glicose foram adquiridos da Dinâmica. Extrato de malte e Peptona foram da marca Himedia, enquanto o *n*-octanol foi adquirido da Janssen Chimica.

Nos experimentos em microplaca, utilizou-se microplaca de 96 poços de fundo em U, transparente, estéril, com poços de 6,9 mm de diâmetro por 10,7 mm de profundidade e capacidade volumétrica de 330 μ L por poço.

3.2 Fungos filamentosos

Os fungos filamentosos usados neste trabalho foram os isolados *Rhizopus stolonifer* (SIS 35), *Rhizopus microsporus var. microsporus* (SIS 39) e *Lichtheimia blakesleeana* (SIS 40). Estes micro-organismos foram cedidos pela micoteca da Universidade Católica de Pernambuco (UNICAP) no âmbito da Rede Norte-Nordeste de Fungos Filamentosos de Solos da Caatinga e da Amazônia (RENNORFUN).

3.3 Equipamentos e técnicas

3.3.1 Instrumentação geral

Os seguintes instrumentos de caráter geral foram utilizados: câmara de fluxo laminar vertical (PACHANE), autoclave vertical (PHOENIX), vortex (BIOMIXER), estufa com circulação e renovação de Ar (SOLAR), centrífuga (HITACHI), microcentrífuga refrigerada (HITACHI), incubadora com agitação orbital (TECNAL), pHmetro (PHTEK), balança analítica com sensibilidade de 0,1 mg (SHIMADZU) e balança analítica com sensibilidade de 0,01 mg (SARTORIUS).

3.3.2 Espectroscopia eletrônica de absorção na região do UV/Vis

Os espectros eletrônicos de absorção na região do UV/vis foram registrados em um espectrofotômetro SHIMADZU, modelo UV-1800, com resolução de 1 nm, utilizando cubetas de quartzo, vidro ou plástico com 10 mm de caminho ótico.

3.3.3 Leitor de placas ELISA

As leituras espectrofotométricas das microplacas foram efetuadas em um leitor de placas Elisa da marca THERMO, modelo Multiskan GO, utilizando modo de varredura de espectro ou comprimento de onda fixo (de acordo com o experimento).

3.3.4 Cromatografia a gás (CG)

As análises por cromatografia a gás foram efetuadas em um cromatógrafo Shimadzu, modelo CG-2010, acoplado a um detector por ionização de chama (FID) e empregando, como fase estacionária, uma coluna capilar RTX-5 com 30 m de comprimento, 0,25 mm de diâmetro e 0,25 µm de espessura do filme. Nitrogênio foi usado como gás de arraste e hidrogênio e ar sintético para manutenção da chama do detector FID.

3.3.5 Análises estatísticas

As análises estatísticas foram efetuadas utilizando o software Statistical Package for Social Science for Windows (SPSS). Usou-se para tratamento dos dados testes de análise estatística ANOVA.

3.4 Síntese das Mn-Porfirinas

As amostras de Mn-porfirinas foram obtidas através de procedimentos da literatura, utilizando três etapas de síntese (Figura 3.1). Na primeira etapa, a condensação de pirrol e 2-piridinacarboxialdeído pelo método de síntese adaptado daquele descrito por Adler e Longo (1967) resultou na porfirina base-livre H₂T-2-PyP (rendimentos de 3-5%). Na segunda etapa, efetuou-se a coordenação de manganês à H₂T-2-PyP, seguindo um procedimento idêntico àquele descrito por Pinto (2013), sendo isolada a MnT-2-PyPcl com rendimentos de 90%. Na terceira etapa, procedeu-se a alquilação da MnT-2-PyPcl com tosilato de etila ou de n-hexila, seguindo uma rota proposta por Pinto (2013), para obtenção da MnTE-2-PyPcl₅ e da MnTnHex-2-PyPcl₅, respectivamente, ambas com rendimentos superiores a 90%.

As amostras isoladas apresentaram características espectroscópicas e cromatográficas idênticas com aquelas descritas na literatura (figura 3.2). (REBOUÇAS *et al.*, 2008a,b; PINTO 2013 e BATINIĆ- HABERLE *et al.*, 2002)

A concentração das soluções aquosas das MnPs utilizadas no experimentos biológicos foi determinada espectrofotometricamente, a partir de dados de absorvidade molar da literatura, em água: MnTE-2-PyP⁵⁺, log $\epsilon_{454,0 \text{ nm}}$ = 5,14; MnTnHex-2-PyP⁵⁺, log $\epsilon_{454,5 \text{ nm}}$ = 5,21 (BATINIĆ-HABERLE *et al.*, 2011).

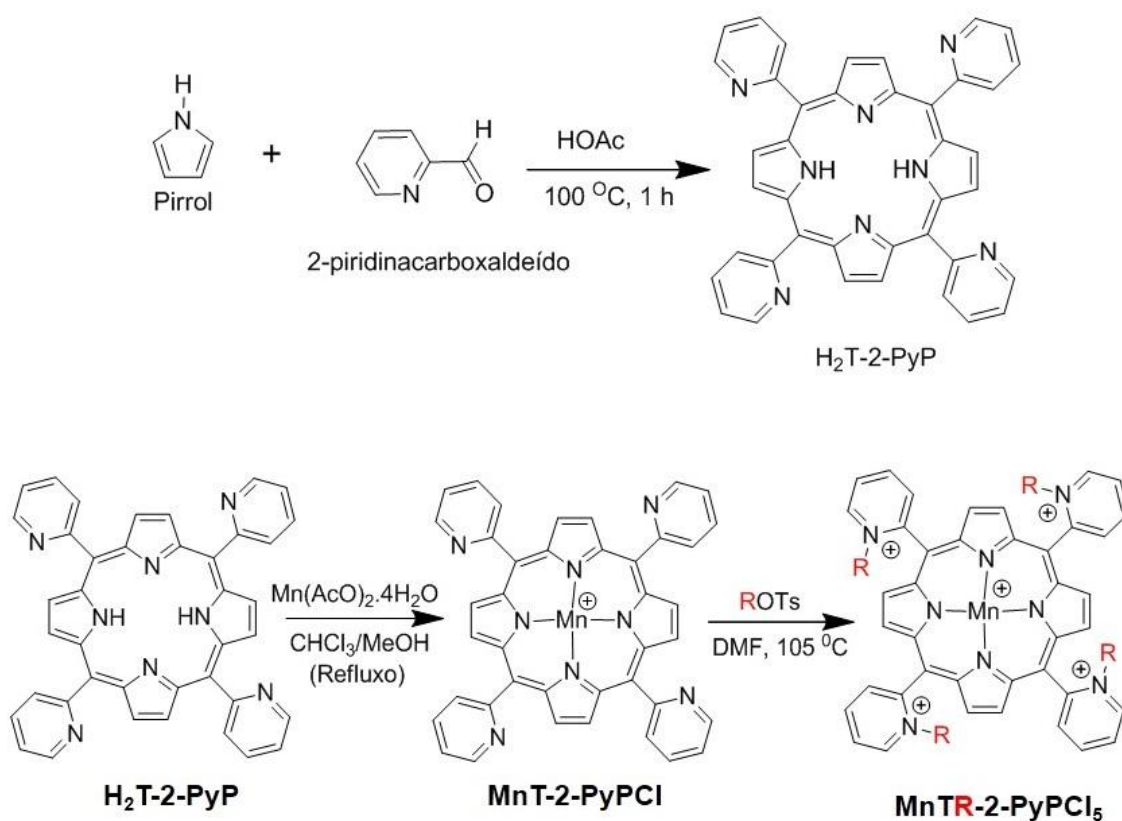


Figura 3.1- Esquema geral para obtenção das Mn-porfirinas MnTE-2-PyPCL₅ (R = Et) e MnTnHex-2-PyPCL₅ (R = nHex).

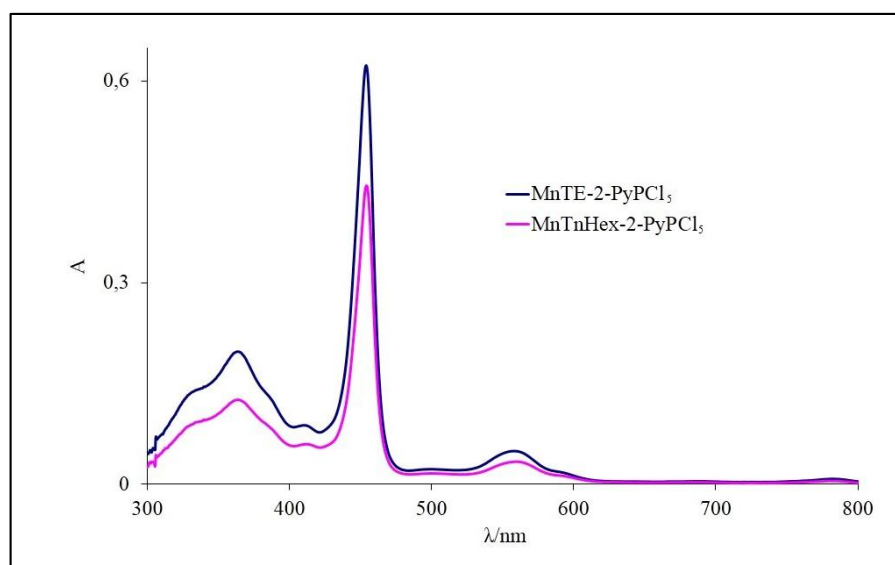


Figura 3.2 - Espectros de UV-vis (em H₂O), os R_f foram obtidas usando CCD-SiO₂ eluída com a mistura de KNO₃(aq. sat)- H₂O - MeCN (1:1:8 v/v/v) para MnTE-2-PyP⁵⁺ (em azul, R_f 0,06) e MnTnHex-2-PyP⁵⁺ (em rosa, R_f 0,38).

3.5 Meios de cultura e soluções salinas

3.5.1 Meio de cultura Sabouraud líquido

O meio foi preparado com dissolução de 40 g de glicose e 10 g de peptona em balão volumétrico de 1,00 L com água como diluente, sendo o pH do meio ajustado para $5,6 \pm 0,2$ com ácido clorídrico 10%. Alíquotas de 25 mL do meio foram transferidos a erlenmeyers de 125 mL, os quais foram tampados com algodão e gaze recobertos por papel alumínio e, em seguida, foram esterilizados em autoclave, por 15 minutos, a 121 °C.

3.5.2 Meio de cultura Sabouraud sólido

O meio foi preparado com dissolução de 40 g de glicose e 10 g de peptona em balão volumétrico de 1,00 L de água destilada, sendo o pH do meio ajustado para aproximadamente $5,6 \pm 0,2$ com ácido clorídrico 10%. A solução resultante foi vertida em um erlenmeyer ao qual se adicionou 15 g de ágar. O sistema foi vedado com algodão e gaze, recoberto por papel alumínio e, em seguida, esterilizado em autoclave, por 15 minutos, a 121 °C. A seguir, em uma câmara de fluxo laminar, 20 mL do meio ainda quente foram vertidos em placas de Petri estéreis, cujas bordas foram flambadas, previamente, em chama do bico de Bunsen. Após o meio chegar à temperatura ambiente com posterior solidificação, as placas foram recobertas com filme de PVC e armazenadas sob refrigeração aproximadamente 4 °C, para uso no dia seguinte.

3.5.3 Meio de cultura Sabouraud líquido concentrado

O meio foi preparado de modo idêntico àquele descrito na Seção 3.5.1, exceto que utilizaram-se 66,67 g de glicose e 16,67 g de peptona.

3.5.4 Solução salina fisiológica a 0,9%

A solução salina com concentração fisiológica usada em todos os experimentos foi preparada com a dissolução de 9,0 g de cloreto de sódio em balão volumétrico de 1,00 L. A solução foi esterilizada em autoclave, por 15 minutos, a 121 °C.

3.5.5 Solução salina fisiológica a 0,9% com Tween 80 (dispersante de esporos)

A solução salina com dispersante foi preparada com a dissolução de 1 mL de Tween 80 (dispersante de esporos) em 99 mL de solução salina fisiológica a 0,9 % descrita no item anterior. Após homogeneização, a solução resultante foi esterilizada em autoclave, por 15 minutos, a 121 °C.

3.5.6 Meio de cultura YMA líquido

O meio YMA foi preparado com dissolução de 3 g de extrato de malte, 3 g de extrato de levedura, 5 g de peptona e 10 g de glicose em balão volumétrico de 1,00 L. (Alíquotas de 25 mL do meio foram transferidos a erlenmeyers de 125 mL, os quais foram tampados com algodão e gaze recobertos por papel alumínio e, em seguida, foram esterilizados em autoclave, por 15 minutos, a 121 °C).

3.6 Preparo e padronização da suspensão de esporos

As culturas estoques dos fungos foram repicadas e inoculadas sob condições estéreis em placas de Petri contendo o meio sólido Sabouraud. As placas foram incubadas em estufa (BOD) a 28° C até a esporulação das estirpes (aproximadamente 15 dias). Posteriormente, em uma câmara de fluxo laminar, 20 discos de 3 mm do manto micelial foram cortados com canudo plástico estéril e transferidos para um tubo Falcon estéril, ao qual foram vertidos 20 mL de solução salina fisiológica a 0,9 % contendo Tween 80. A suspensão foi agitada por 10 minutos em Vortex, e os resíduos do manto micelial e meio sólido foram removidos por filtração usando micropeneira estéril. A suspensão de esporos (filtrado) foi recolhida em tubo estéril e armazenada a 4 °C para posterior uso. A quantificação dos esporos totais foi feita com auxílio de uma câmara de Neubauer, utilizando um procedimento descrito por Barker, 2002.

A determinação dos esporos viáveis na suspensão foi efetuada conforme o procedimento descrito a seguir. Com a suspensão estoque de esporos, prepararam-se diluições seriadas (1:10 a 1:10000) em duplicatas com solução salina fisiológica 0,9 % estéril. Antes da retirada de cada alíquota, a suspensão de esporos foi agitada por 2 minutos em Vortex. A seguir, em uma câmara de fluxo laminar, uma alíquota de 100 µL de cada diluição foi espalhada sobre meio sólido

Sabouraud com auxílio da alça de Drigalski, previamente flambada. Após o inóculo, as placas seguiram para incubação em estufa incubadora de crescimento microbiológico (BOD) a 28 °C. Passadas 17 horas após o procedimento de inóculo em meio sólido, procedeu-se com a primeira contagem dos esporos viáveis no meio, seguindo por monitoramento, 3 vezes ao dia, de 6 em 6 horas, totalizando um período de incubação de 35 horas. O número de colônias viáveis após 35 horas, foi estimado a partir de diluições em que a quantidade de colônias variaram entre 3-30, garantindo, assim, uma margem estatística e a pureza da suspensão. O número de unidades formadoras de colônia (UFC) por mL de solução estoque foi calculada considerando os fatores de diluição. A viabilidade da suspensão foi determinada como a razão entre o número de esporos viáveis (UFC) e o número de esporos totais.

A suspensão estoque foi finalmente diluída para resultar em uma suspensão padrão de esporos com viabilidade de 8.000 UFC/mL. Esta suspensão foi armazenada sob refrigeração para os posteriores inóculos do presente trabalho.

3.7 Obtenção de biomassa em meio submerso

3.7.1 Procedimento de obtenção de biomassa em meio submerso

Em erlenmeyers de 125 mL, foram adicionados 15 mL de meio Sabouraud ou YMA líquido concentrado e 10 mL de diluente, perfazendo 25 mL de meio de cultura total. Os erlenmeyers foram vedados com algodão e gaze, recobertos com papel alumínio e esterilizados em autoclave, por 15 minutos, a 121 °C. Após resfriamento, o meio estéril foi inoculado em câmara de fluxo laminar com uma alíquota da suspensão padrão de esporos (tipicamente 0,5 mL de suspensão estoque de esporos a 8.000 UFC/mL) de modo que se obtivesse o número de UFC desejado em cada erlenmeyer (aproximadamente 4.000 UFC/erlenmeyer ou 160 UFC/mL/erlenmeyer). Os erlenmeyers foram novamente vedados e, então, incubados a 28 °C sob agitação orbital (tipicamente 160 rpm) por um período de tempo apropriado para crescimento da biomassa. Após o tempo desejado, a biomassa resultante foi filtrada, centrifugada por 10 min em rotação de 4.000 rpm (para retirada do meio de cultura) e pesada. O pH do sobrenadante foi medido.

3.7.2 Curvas de crescimento sob condições padrão

O procedimento de obtenção de biomassa descrito na Seção 3.7.1 foi empregado para o estudo da dinâmica de crescimento dos fungos filamentosos, utilizando água destilada como diluente, 4.000 UFC/erlenmeyer (160 UFC/mL/erlenmeyer) e incubação sob agitação orbital a 160 rpm. Os horários de coleta da biomassa (tempos de incubação) foram fixados de acordo com curvas de crescimento para cada isolado. Utilizou-se um erlenmeyer para cada ponto de coleta ao longo da curva de crescimento. Alguns erlenmeyers contendo meios de cultura sem inóculo foram incubados paralelamente àqueles inoculados para utilização como controle. Os experimentos foram realizados em triplicata.

3.7.3 Efeito da velocidade de agitação orbital e da quantidade inicial de esporos na obtenção de biomassa

O procedimento descrito na Seção 3.7.1 foi adaptado para o estudo do efeito da quantidade inicial de esporos e da velocidade de agitação orbital sobre a produção de biomassa, usando água destilada como diluente. Assim, os meios de cultura foram inoculados com 2.000, 4.000 ou 9.000 UFC por erlenmeyer (80 ou 160 UFC/mL/erlenmeyer, respectivamente) e incubados utilizando duas velocidades de agitação orbital: 120 ou 160 rpm. Erlenmeyers contendo meio estéril sem inóculo foram utilizados como controle. Os experimentos foram realizados com seis replicatas.

3.7.4 Efeito do estresse salino sobre a produção de biomassa em meio submerso.

O procedimento descrito na Seção 3.7.1 foi adaptado usando, como diluente soluções aquosas de NaCl estéreis de concentração apropriada para alcançar a concentração final de 3; 100; 200; 300; 400; 500; 600; 700; 800; 900; 1000 mmol L⁻¹. Os testes de salinidade foram feitos com onze condições crescentes de NaCl. Controles para concentração mínima de salinidade foram realizados utilizando água destilada como diluente. As condições de inoculação (4.000 UFC/erlenmeyer) e de agitação orbital (160 rpm) foram empregadas. Controles sem o inóculo também foram realizados paralelamente.

3.7.5 Efeito de Mn-porfirina e de Mn^{2+} na produção de biomassa na presença e ausência de estresse salino

O procedimento descrito na Seção 3.7.1 foi adaptado usando, como diluente 10 mL de solução aquosa estéril de NaCl a $0,625 \text{ mol L}^{-1}$ (para alcançar a concentração final de $0,250 \text{ mol L}^{-1}$ no meio de cultura) ou 10 mL de água destilada estéril para os experimentos na ausência de estresse salino. O efeito da Mn-porfirina ($MnTE\text{-}2\text{-}PyP^{5+}$ ou $MnTnHex\text{-}2\text{-}PyP^{5+}$) ou de Mn^{2+} foi estudado com a adição de 100 μL de solução aquosa estéril de MnP ou Mn^{2+} em concentração adequada para obtenção das seguintes concentrações finais no meio de cultura: $0,5 \text{ nmol L}^{-1}$, 5 nmol L^{-1} , 50 nmol L^{-1} , $0,5 \text{ }\mu\text{mol L}^{-1}$, e $5 \text{ }\mu\text{mol L}^{-1}$. Para os controles com 0 $\mu\text{mol/L}$ de MnP ou Mn^{2+} , as soluções de MnP ou Mn^{2+} foram substituídas por água destilada estéril. Utilizou-se acetato de Mn(II) tetrahidratado como fonte de Mn^{2+} . A esterilização das soluções estoques de MnPs e de Mn^{2+} foi feita por filtração em membrana usando filtros de seringa de 0,22 μm de poro, em câmara de fluxo laminar. As condições de inoculação (4.000 UFC/erlenmeyer) e de agitação orbital (160 rpm) foram empregadas. Controles com meio de cultura sem inóculo também foram realizados paralelamente.

3.8 Obtenção de biomassa em microplaca

3.8.1- Procedimento para obtenção de biomassa em microplaca

Em um erlenmeyer de 50 mL, foram adicionados 10 mL de meio Sabouraud líquido concentrado, metodologia 3.5.1. O erlenmeyer foi vedado com algodão e gaze, recoberto com papel alumínio e o sistema foi esterilizado por autoclavagem, a $121 \text{ }^{\circ}\text{C}$, por 15 minutos. Em seguida, em uma câmara de fluxo laminar e com auxílio de uma micropipeta multicanal, foram adicionados em cada poço: 126 μL de meio Sabouraud concentrado estéril, 86 μL de diluente estéril (tipicamente água destilada ou solução salina de concentração apropriada para o experimento), 8 μL de solução aquosa de MnP estéril (por filtro milipore) em concentração apropriada (ou água destilada, para poços sem MnP). A inoculação da microplaca foi efetuada com adição de alíquota de 8 μL da suspensão padrão de esporos a 8.000 UFC/mL de modo a se obter 640 UFC/poço. A microplaca foi tampada com própria tampa e reforçada com fita microporosa estéril e, então, incubada a $28 \text{ }^{\circ}\text{C}$ sob agitação orbital de 160 rpm por um período

de 48 horas. Posteriormente, a microplaca foi levada ao leitor Elisa passando por um período de aproximadamente 12 horas, com agitação a cada hora seguida por uma leitura no espectrofotometro em comprimento de onda fixa de 450 nm e temperatura controlada de 28 °C. Após o tempo desejado, a biomassa resultante em cada poço foi coletada, centrifugada por 2 min em rotação de 6.000 rpm (para retirada do meio de cultura) e posteriormente a biomassa hidratada foi pesada.

3.8.2 Estudo do efeito estresse salino na produção de biomassa usando microplaca

O procedimento descrito na Seção 3.8.1 foi adaptado usando, como diluente soluções aquosas de NaCl estéreis de concentração apropriada para alcançar a concentração de 5; 67; 130; 250; 300; 400; 500; 700; 1000 mmol L⁻¹. Os testes de salinidade foram realizados com nove tratamentos crescentes de salinidade. Controles para concentração mínima de salinidade foram realizados utilizando água destilada como diluente. As condições de inoculação (640 UFC/poço e de agitação orbital a 160 rpm) foram empregadas inicialmente. Controles sem o inóculo também foram realizados na mesma microplaca. O Figura 3.3 ilustra o desenho característico da distribuição dos tratamentos na microplaca nesse experimento.

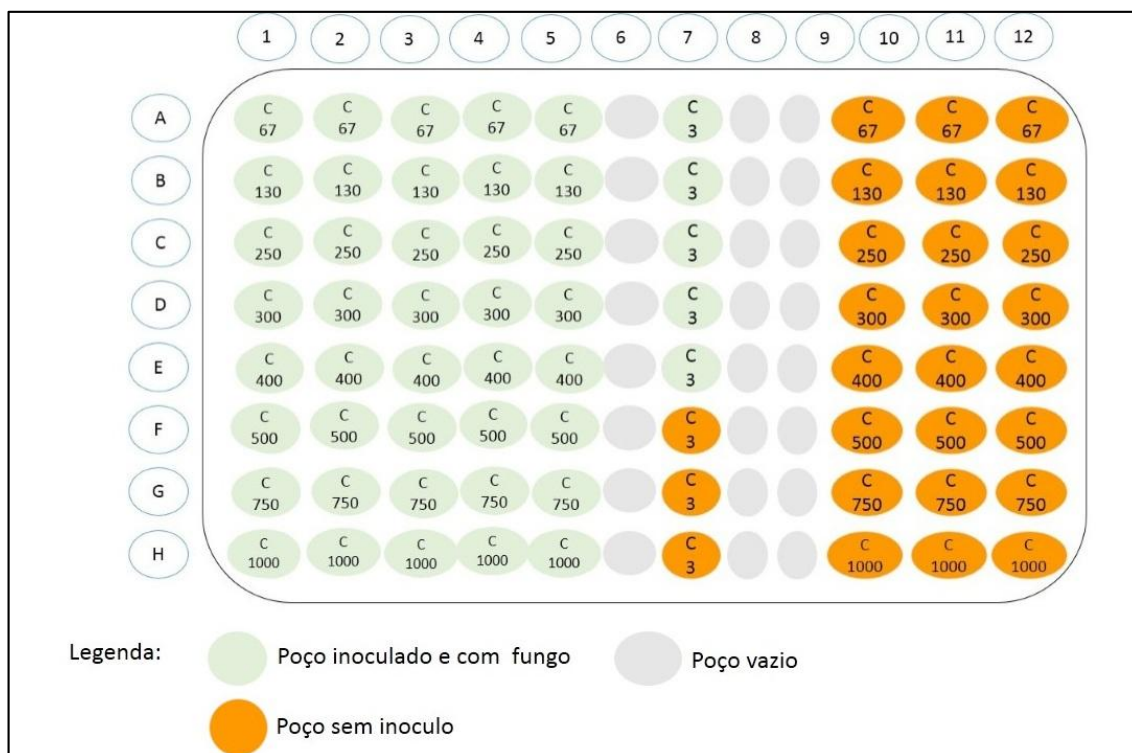


Figura 3.3 - Representação esquemática da microplaca usada nos experimentos em meio de cultura Sabouraud para avaliação do efeito do estresse salino na produção de biomassa. Os números no interior da microplaca indicam as concentrações de NaCl (mmol L^{-1}) em cada poço.

3.8.3 Efeito de Mn-porfirina na produção de biomassa na presença e ausência de estresse salino em microplacas

O procedimento descrito na Seção 3.8.1 foi adaptado usando, como diluente 84 μL de solução aquosa estéril de NaCl a $1,345 \text{ mol L}^{-1}$ (para alcançar a concentração final de 500 mmol L^{-1} no meio de cultura no poço) ou 84 μL de água destilada estéril para os experimentos na ausência de estresse salino. O efeito da Mn-porfirina (MnTE-2-PyP⁵⁺ ou MnTnHex-2-PyP⁵⁺) foi estudado com a adição de 8 μL de solução aquosa estéril de MnP com a concentração adequada para obtenção das seguintes concentrações finais no meio de cultura: 50 nmol L^{-1} , 0,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$, 5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$ para a porfirina MnTE-2-PyP⁵⁺ essa Mn-porfirina é a mais utilizada em estudos animais como modulador redox e a faixa de concentração típica dessa MnP em experimentos com modelos celulares é da ordem de 5 a 20 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (BATINIC-HABERLE *et al.*, 2011) e 10 nmol L^{-1} , 50 nmol L^{-1} , 0,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$, 5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ para a porfirina MnTnHex-2-PyP⁵⁺. Para os controles na ausência de MnP, as soluções de MnP foram substituídas por água destilada estéril. A esterilização das soluções estoques de MnPs foi realizada por filtração em membrana usando filtros de seringa de 0,22 μm de poro, em câmara

de fluxo laminar. As condições de inoculação (640 UFC/Poço) e de agitação orbital (160 rpm) foram empregadas. Controles com meio de cultura sem inóculo também foram realizados na mesma microplaca. O Figura 3.4 demonstra o desenho geral de distribuição de tratamentos na microplaca nesse experimento.

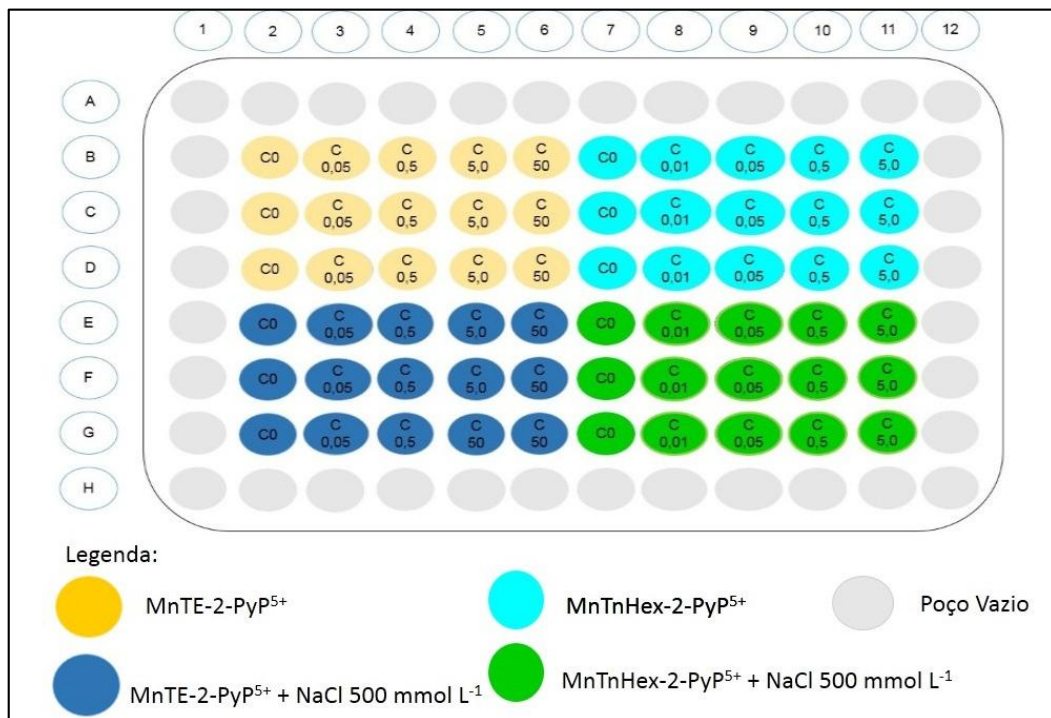


Figura 3.4 - Representação esquemática da microplaca usada nos experimentos em meio de cultura Sabouraud para avaliação dos efeitos das Mn-porfirinas MnTE-2-PyP₅ e MnTnHex-2-PyP₅ na presença e ausência de estresse salino. Os números no interior da microplaca indicam as concentrações de MnP (em $\mu\text{mol/L}$) em cada poço.

3.9 Experimentos de biotransformação

3.9.1 Preparo da biomassa para reações de biotransformação

O procedimento para obtenção de biomassa descrito na Seção 3.7.1 foi empregado para a obtenção da biomassa fúngica dos fungos filamentosos em dois meios YMA e Sabouraud, utilizando água destilada como diluente, 4.000 UFC/erlenmeyer (160 UFC/mL/erlenmeyer) e incubação sob agitação orbital a 160 rpm.

As biomassas crescidas sob condições de estresse salino foram obtidas usando um procedimento descrito na Seção 3.7.4. A concentração final de NaCl, após a adição do diluente, foi de 200 mol L⁻¹.

Para os estudos do efeito da MnTE-2-PyP⁵⁺, as biomassas foram crescidas sem salinidade seguindo a metodologia descrita na Seção 3.7.5. As concentrações da MnP usadas foram em 3 níveis: 0 (controle), 0,5 e 5,0 µmol L⁻¹.

Todas as biomassas foram coletas com 72 horas de incubação após inoculação. A biomassa resultante foi filtrada, centrifugada por 10 min em rotação de 4.000 rpm, lavada com tampão fosfato pH 6,5 para retirar excesso de meio e, novamente, centrifugada por 5 min. Em seguida a biomassa foi utilizada imediatamente para as reações de biotransformação.

3.9.2 Reações de biotransformação

Em erlenmeyers de 125 mL, 1 g da biomassa foi fracionada e adicionada ao meio de reação composto de 20 mL de tampão fosfato de sódio pH 6,5 e 10 µL do substrato (ciclohexanol ou ciclohexanona). Em seguida, o sistema foi incubado a 28 °C sob agitação orbital de 160 rpm. Para monitoramento do progresso da reação de conversão do substrato, foram realizadas coletas periódicas de alíquotas de 700 µL do sobrenadante da reação.

As alíquotas coletadas foram submetidas à extração líquido/líquido com 700 µL de clorofórmio contendo n-octanol (0,1 %, v/v) como padrão interno. A mistura bifásica foi agitada em Vortex por 1 minuto e centrifugada por 10 minutos para separação de fases. A fase orgânica foi coletada e analisada por cromatografia a gás. A quantificação da conversão do substrato e da formação dos produtos de reação ocorreu através de curva analítica, usando n-octanol como padrão interno. A identificação dos produtos foi realizada por co-eluição com amostras autênticas dos compostos.

4 Resultados e discussão

O presente trabalho concentrou-se nos estudos dos fungos filamentosos *Rhizopus stolonifer* (SIS 35), *Rhizopus microsporus* var. *microsporus* (SIS 39) e *Lichtheimia blakesleeana* (SIS 40), advindos da micoteca da Rede Norte-Nordeste de fungos filamentosos de solos da Caatinga e da Amazônia (RENNORFUN). O fungo *R. stolonifer*, em particular, foi utilizado como modelo experimental para avaliação do efeito da salinidade e do uso de Mn-porfirinas na produção de biomassa. Esses micro-organismos foram posteriormente explorados como potenciais biocatalisadores para reações de oxidação de um álcool (ciclohexanol) e de redução de uma cetona (ciclohexanona), sob condições de estresse.

4.1 Curvas de crescimento dos fungos *R. stolonifer*, *R. microsporus* e *L. blakesleeana* em meio líquido Sabouraud

Como os fungos utilizados no presente trabalho ainda são pouco explorados pela literatura, pouco se sabia sobre as dinâmicas de crescimento de cada micro-organismo e, conseqüentemente, sobre seu rendimento na produção de biomassa. Dentro desse contexto, as primeiras curvas de crescimento realizadas foram de cunho exploratório, para conhecimento da provável dinâmica de crescimento dos micro-organismos. Para cada isolado estudado, obteve-se em média 10 curvas exploratórias. Ao finalizar as etapas exploratórias e com definição dos tempos a serem estudados, obtiveram-se as curvas de crescimento propriamente ditas.

Em geral, os experimentos dessa etapa tiveram duração de cerca de 4 dias. Em tempos determinados, a biomassa foi coletada, centrifugada e posteriormente pesada, onde o pH dos meios foi aferido a cada coleta. As curvas de crescimento dos fungos *R. stolonifer*, *R. microsporus* e *L. blakesleeana*, obtidas em meio Sabouraud (Figura 4.1), apresentaram fase lag de um dia, exponencial de dois dias e estacionária a partir do terceiro dia no meio de cultura líquido Sabouraud. Este meio foi selecionado por ser comumente usado no Laboratório de Síntese Orgânica e Biocatálise da UFPB. Observou-se que o fungo *R. microsporus* possui uma taxa de crescimento na fase exponencial de 7,3 mg/h, enquanto para o *L. blakesleeana* esta é de 7,7 mg/h e para o *R. stolonifer*, de aproximadamente 3,9 mg/h. O fungo *R. stolonifer* possui a

dinâmica de crescimento mais lenta quando comparada com os demais fungos estudados e desse modo foi selecionado para os posteriores estudos do presente trabalho.

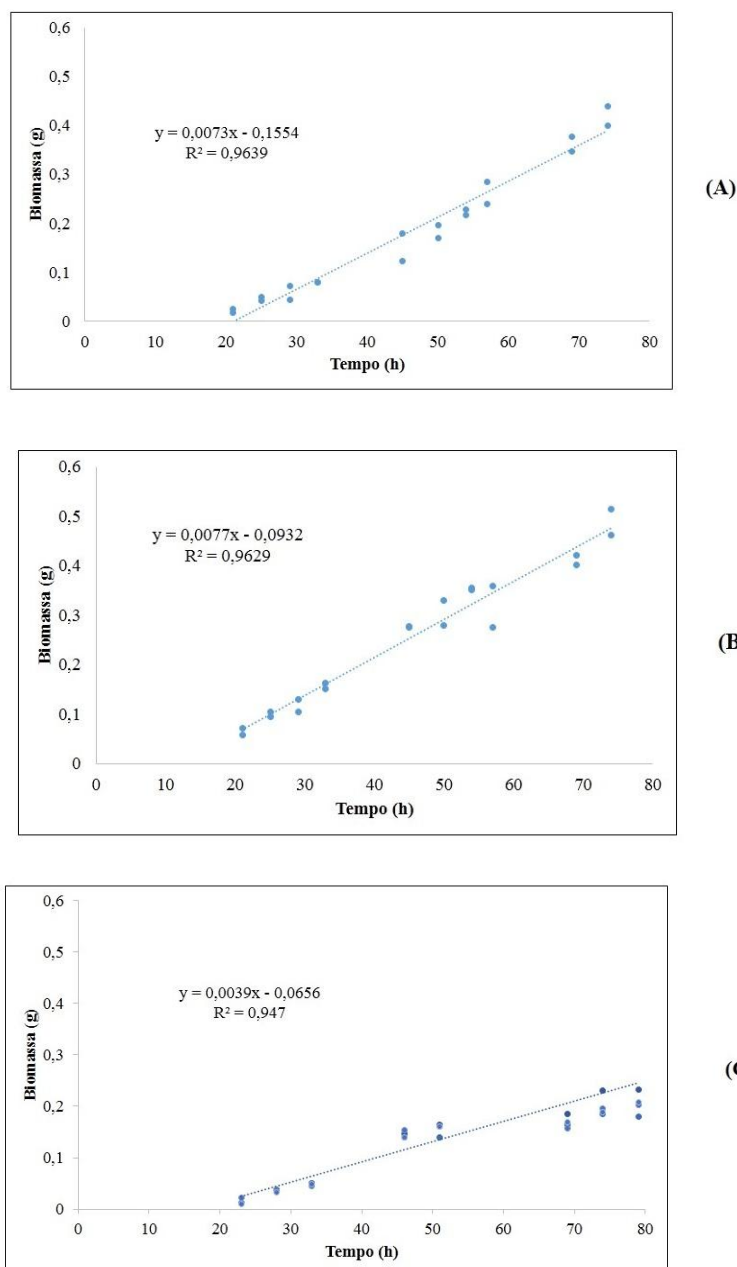


Figura 4.1 - (A) Curva de crescimento do *R. microsporus*. (B) Curva de crescimento do *L. blakesleeana*. (C) Curva de crescimento do *R. stolonifer*. Todas as curvas de dinâmica de crescimento foram realizadas em meio Sabouraud, com incubação a 28 °C e agitação orbital a 160 rpm (Valores de biomassa e pH Apêndice I).

Nesses experimentos observou-se a variação do pH durante o tempo de crescimento de cada micro-organismo. Assim como descrito na literatura (TORTORA *et al.*, 2012), a concentração de íons hidrônio (H^+) foi elevada com o crescimento dos fungos, provocando uma

diminuição do pH. Esse comportamento foi observado para todos os fungos estudados, havendo uma correlação direta entre aumento da biomassa e diminuição do pH do meio de cultura (Figura 4.2).

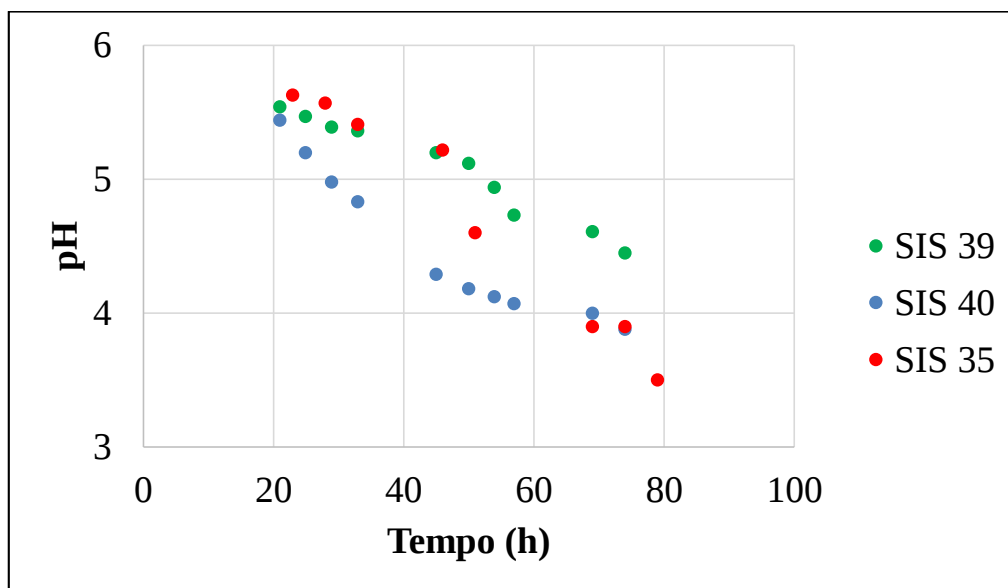


Figura 4.2 - Variação do pH com o tempo para os fungos: *R. stolonifer* (SIS 35), *R. microsporus* (SIS 39) e *L. blakesleeana* (SIS 40) em meio Sabouraud.

4.2 Efeito da velocidade de agitação orbital e da quantidade inicial de esporos na obtenção de biomassa do fungo *R. stolonifer*

Dentre as variáveis experimentais simples que podem afetar a produção de biomassa de fungos encontram-se a velocidade de agitação durante o processo de incubação e quantidade inicial de esporos inoculados no meio de cultura. A rotação no meio de cultura propicia uma maior aeração do meio, propiciando a oxigenação necessária para o crescimento pleno do micro-organismo. O efeito da variação conjunta desses dois parâmetros para a produção de biomassa do fungo *R. stolonifer* foi investigado. Assim, avaliou-se o efeito da rotação orbital na produção da biomassa utilizando dois níveis (160 e 200 rpm), enquanto o efeito da quantidade inicial de esporos foi avaliado em três níveis: com 2.000, 4.000 e 9.000 UFC/25 mL. Nesses estudos, utilizaram-se erlenmeyers de 125 mL com 25 mL de meio de cultura líquido Sabouraud, com coleta única após 72 horas do inóculo, ao fim da fase exponencial de crescimento do micro-organismo. Os resultados são apresentados na Figura 4.3.

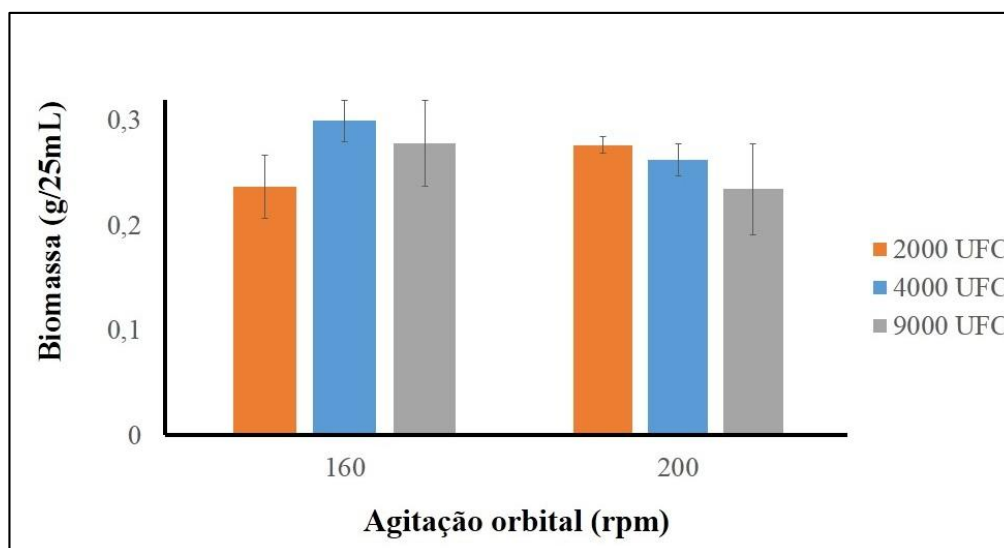


Figura 4.3 - Obtenção de biomassa relacionada ao efeito da rotação orbital (160 ou 200 rpm) e da quantidade de unidades formadoras de colônia (2.000, 4.000 ou 9.000 UFC) no crescimento do fungo *R. stolonifer*. (Valores de biomassa e pH Apêndice II)

Com base nas análises estatísticas para o efeito na velocidade de rotação orbital e da quantidade inicial de unidades formadoras de colônia (UFC) inoculadas para a produção de biomassa do isolado *R. stolonifer* (Figura 4.2), verificou-se que nas faixas estudadas nenhum desses parâmetros, alterou significativamente a produção de biomassa do isolado *R. stolonifer*, uma vez que os efeitos apresentaram $p > 0,05$. Decidiu-se manter as condições de agitação a 160 rpm e inoculação de 4.000 UFC/erlenmeyer nos experimentos posteriores.

4.3 Efeito da salinidade na produção de biomassa do fungo filamentoso *R. stolonifer*

Nos estudos para averiguar o efeito da salinidade no crescimento do fungo *R. stolonifer*, usou-se cloreto de sódio como agente estressante com duas metodologias experimentais distintas: a primeira consiste no uso de microplaca e a segunda em meio submerso (em erlenmeyers). Nas duas situações, utilizou-se meio líquido Sabouraud, uma vez que todos os poços (dos experimentos em microplacas) ou erlenmeyers (dos experimentos em meio submerso) são inoculados com suspensão de esporos em solução salina, a concentração mínima final de NaCl nesses sistemas é de 5 mmol L^{-1} e 3 mmol L^{-1} , respectivamente. Em ambos os sistemas, variou-se a concentração de NaCl no meio até 1000 mmol L^{-1} .

Como característica geral observada no crescimento em microplaca, notou-se que o fungo filamentoso cresce apenas na interface líquido/ar. Esse comportamento deve-se ao pouco espaço no poço para que ocorra o crescimento imerso ao meio. Como característica do meio submerso tradicional, o fungo cresce imerso no meio, formando pequenos “colônias” devido à rotação orbital. A Figura 4.4 ilustra o sistema de crescimento em meio submerso, onde se observa-se claramente que a quantidade de biomassa do *R. stolonifer* diminui com o aumento da salinidade do meio de cultura. A análise quantitativa dos experimentos em microplaca e em meio submerso serão apresentados a seguir.



Figura 4.4 - Crescimento do fungo *R. stolonifer* em meio submerso, observa-se na imagem a relação biomassa *versus* salinidade. Amostras com 72 horas de crescimento em rotação orbital de 160 rpm e incubação a 28 °C.

4.3.1 Incubação em microplaca

A utilização de microplaca possibilita uma análise rápida de uma série de experimentos, diminuindo custos com materiais e o tempo que seria gasto se o mesmo experimento fosse lançado em uma escala maior. Ela possui vasta utilização em análises biológicas, principalmente por possibilitar uma série de análise simultâneas e utilizar pouca quantidade de material.

Para este trabalho, a condução de experimentos em microplaca possibilitou a análise da dinâmica de crescimento do isolado *R. stolonifer*, com a realização de mais de 90 ensaios de uma única vez, o que por sua vez poupa tempo e espaço, visto que os experimentos ocorrem em um espaço compactado e esses possuem alta precisão.

A Figura 4.5 apresenta a biomassa do isolado *R. stolonifer* obtida nos experimentos com uso de microplaca sob várias concentrações de NaCl. O isolado *R. stolonifer* mostrou uma boa adequação ao meio nas salinidades iniciais quando comparado ao controle sem adição de NaCl, sendo observado que o tratamento de 130 mmol L⁻¹ foi obtido máximo de biomassa coletada. Com o aumento sucessivo da salinidade no meio de cultura, começou a haver uma diminuição na produção de biomassa fúngica, caracterizada pela queda no crescimento do fungo a partir da concentração de 250 mmol L⁻¹ de NaCl; esse declínio fica mais acentuado em concentrações de NaCl acima de 300 mmol L⁻¹. A salinidade associada à concentração 1000 mmol L⁻¹ de NaCl de alta toxicidade ao micro-organismo, de modo que o mesmo não conseguiu se adequar ao meio, e teve seu crescimento impossibilitando seu crescimento até as 72 horas.

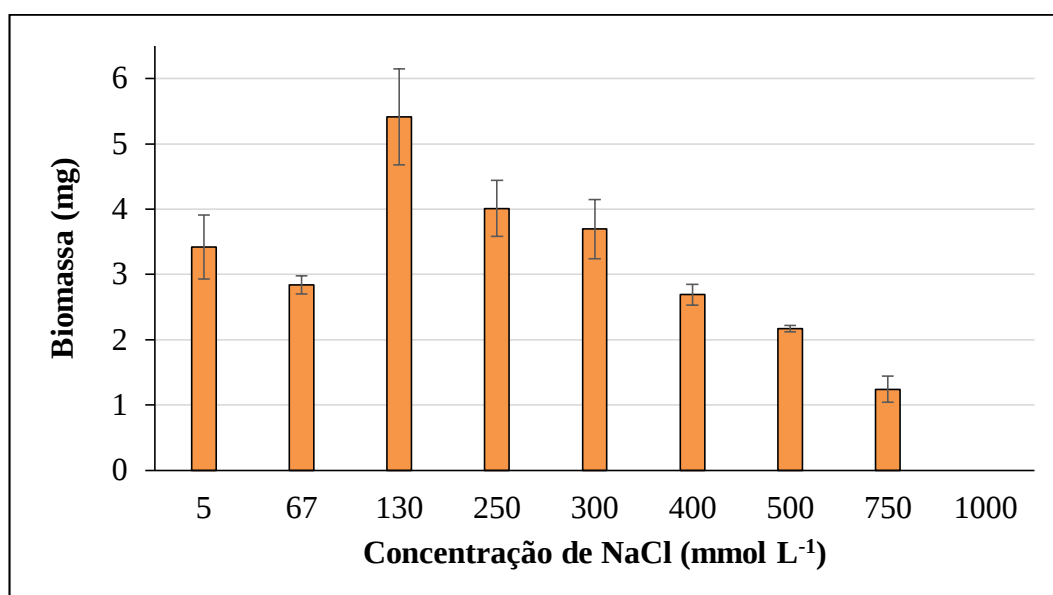


Figura 4.5 - Produção de biomassa do fungo *R. stolonifer* obtida em microplaca sob o efeito do aumento da concentração de NaCl no meio de cultura Sabouraud (Valores de biomassa Apêndice III).

Para os experimentos posteriores com uso de Mn-porfirinas nesta metodologia em microplacas, selecionou-se a salinidade associada à concentração de NaCl a 500 mmol L⁻¹. Nesta concentração de NaCl, a biomassa do micro-organismo *R. stolonifer* é aproximadamente ~ 40% daquela do tratamento com a maior produção de biomassa NaCl (a 130 mmol L⁻¹). Adicionalmente, esta concentração permite que a diferença entre a biomassa do fungo sob estresse salino e aquela do controle seja estatisticamente significativa.

4.3.2 Comparação entre a redução de biomassa do isolado *R. stolonifer* em meio submerso versus microplaca.

O efeito do aumento da salinidade associado ao aumento da concentração de NaCl sobre o crescimento do isolado *R. stolonifer* em meio submerso é apresentado na Figura 4.6. Observa-se que a indução da salinidade foi acompanhada por uma queda gradativa na produção de biomassa no meio submerso. Enquanto na microplaca concentrações baixas de NaCl (por exemplo, 130 mmol L⁻¹, Figura 4.5) foram capazes de melhorar a produção de biomassa em comparação com o tratamento controle. Já no meio submerso, qualquer das concentrações de NaCl testadas levou a uma diminuição na produção de biomassa do isolado *R. stolonifer*. Destaca-se que nessas condições de cultivo, uma vez que o fungo cresce submerso no meio, ele fica mais suscetível às possíveis variações osmóticas ocasionadas pelo agente estressante cloreto de sódio.

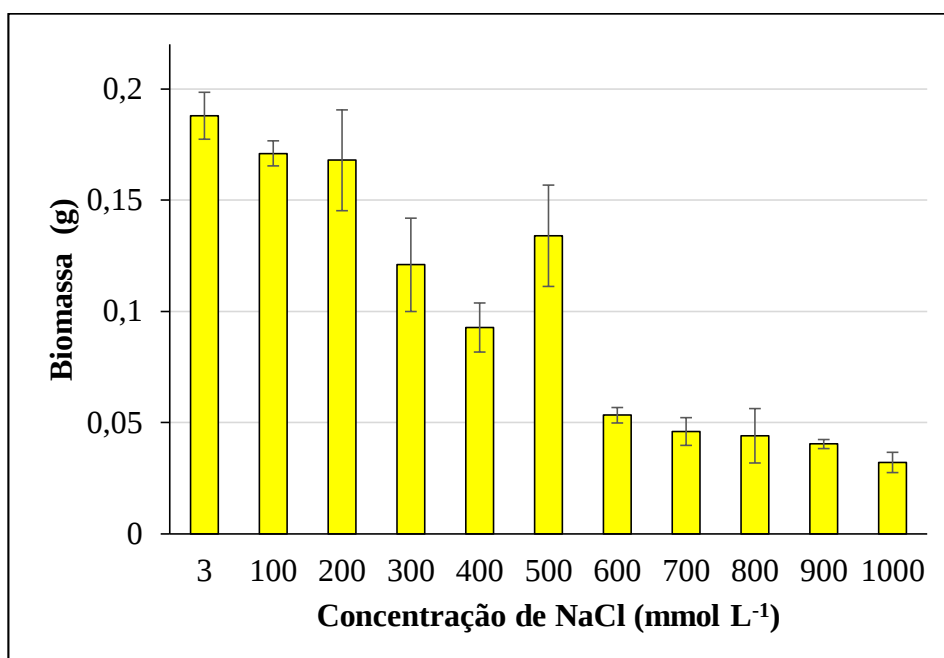


Figura 4.6- Produção de biomassa do fungo *R. stolonifer* obtida em meio submerso sob o efeito do aumento da salinidade associada à concentração de NaCl, tempo de cultivo de 72 horas. (Valores de biomassa e pH Apêndice IV)

Em ambos os modelos experimentais estudados, meio submerso e microplaca, a partir de uma determinada concentração de NaCl, o efeito da salinidade se tornou estatisticamente significativo, causando a diminuição na produção de biomassa do isolado *R. stolonifer*. Em ambos os sistemas, o NaCl mostrou-se um agente estressor eficiente para modular a produção de biomassa; a salinidade associada a algumas concentrações de NaCl (maiores que 700 mmol

L⁻¹, por exemplo) atingiu níveis tão tóxicos que tornou impossível a adequação do micro-organismo ao meio e seu pleno crescimento.

4.4 Efeito da MnTE-2-PyPcl₅ e da MnTnHex-2-PyPcl₅ na produção de biomassa do *R. stolonifer* na ausência e na presença de estresse salino: experimentos realizados em microplaca

Como base nos resultados obtidos durante a investigação da dinâmica de crescimento e do efeito da salinidade no crescimento do fungo *R. stolonifer*, a concentração de NaCl escolhida para a realização dos testes nos experimentos com Mn-porfirinas foi de 500 mmol L⁻¹, nível em que o NaCl demonstrou uma toxicidade moderada ao micro-organismo, considerando a produção de biomassa como indicador biológico (Figura 4.5). O nível mínimo de NaCl nos poços foi de 5 mmol L⁻¹ (devido à solução salina em que a suspensão de esporos é preparada para inoculação). Assim, dois níveis de concentração de NaCl foram investigados: 5 (controle) e 500 mmol L⁻¹.

Os níveis de concentração das Mn-porfirinas MnTE-2-PyPcl₅ e MnTnHex-2-PyPcl₅ foram escolhidos com base nos estudos em bactérias, leveduras e modelos celulares de mamíferos (BATINIC-HABERLE *et al.*, 2011), conforme descrito a seguir.

4.4.1 Efeitos da MnTE-2-PyPcl₅ na produção de biomassa em microplaca

Os resultados dos estudos com a MnTE-2-PyPcl₅ na ausência e na presença de estresse salino estão apresentados nas Figuras 4.7 e 4.8.

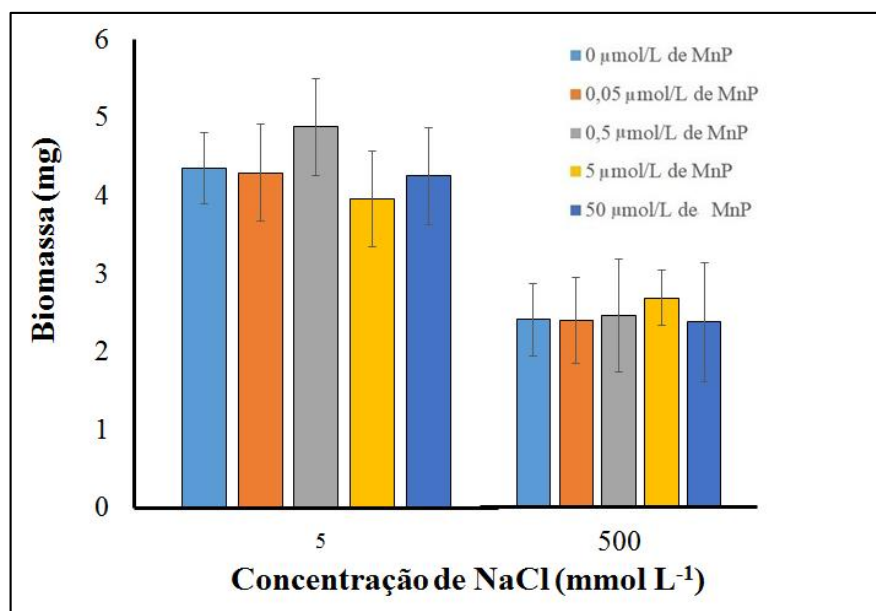


Figura 4.7 - Efeito da MnTE-2-PyP⁵⁺ em microplaca no crescimento nas estirpes do fungo *R. stolonifer* (Valores de biomassa Apêndice V)

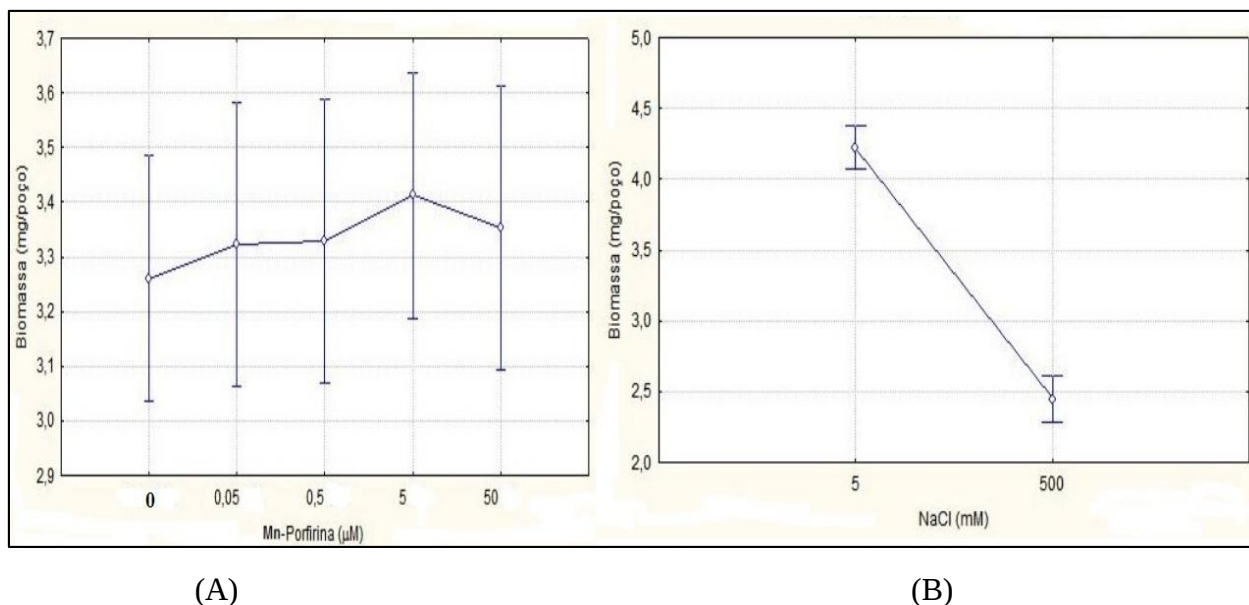


Figura 4.8 - Avaliação estatística (A) do efeito da MnTE-2-PyP⁵⁺ em microplaca no crescimento do fungo e (B) da influência da salinidade no crescimento do fungo *R. stolonifer*.

Nesse estudos, não se observou efeito de interação entre a MnP e o estresse salino. Enquanto o efeito da salinidade mostrou-se significativo ($p < 0,05$) em reduzir a biomassa do isolado *R. stolonifer* (Figura 4.8-B), conforme observado anteriormente, a MnTE-2-PyP_{Cl5} não afetou significativamente ($p = 0,99$) a produção de biomassa em qualquer dos níveis estudados (Fig. 4.7 e 4.8-A). Esse resultado demonstra que a MnTE-2-PyP_{Cl5} não foi tóxica para o *R.*

stolonifer em nenhum dos níveis testados, mas também não foi capaz de remediar o efeito do estresse salino associado à concentração de NaCl a 500 mmol L⁻¹.

4.4.2 Efeitos da MnTnHex-2-PyPCl₅ na produção de biomassa em microplaca

A MnTnHex-2PyPCl₅ é consideravelmente mais lipofílica, que a MnTE-2-PyPCl₅, apresentando também maior biodisponibilidade (KOS *et al.*, 2009a, 2009b; AITKEN *et al.*, 2013). Devido ao maior acúmulo da MnTnHex-2-PyCl₅ e seu caráter surfactante, as concentrações dessa MnP tipicamente utilizadas em estudos biológicos são pelo menos 10 vezes menores que aquelas da MnTE-2-PyPCl₅ (BATINIC-HABERLE *et al.*, 2011). Os resultados dos estudos com a MnTnHex-2-PyPCl₅ na ausência e na presença de estresse salino estão apresentados nas Figuras 4.9 e 4.10.

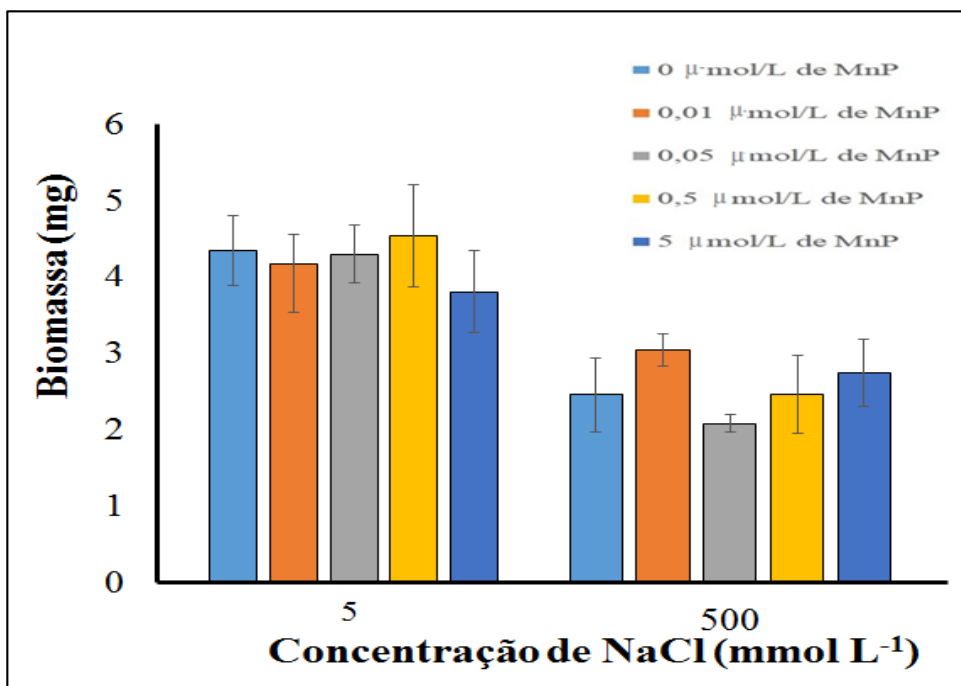


Figura 4.9 - Efeito da MnTnHex-2-PyP⁵⁺ sobre a produção de biomassa do fungo *R. stolonifer*, com e sem efeito do estresse salino em microplaca (Valores de biomassa Apêndice V).

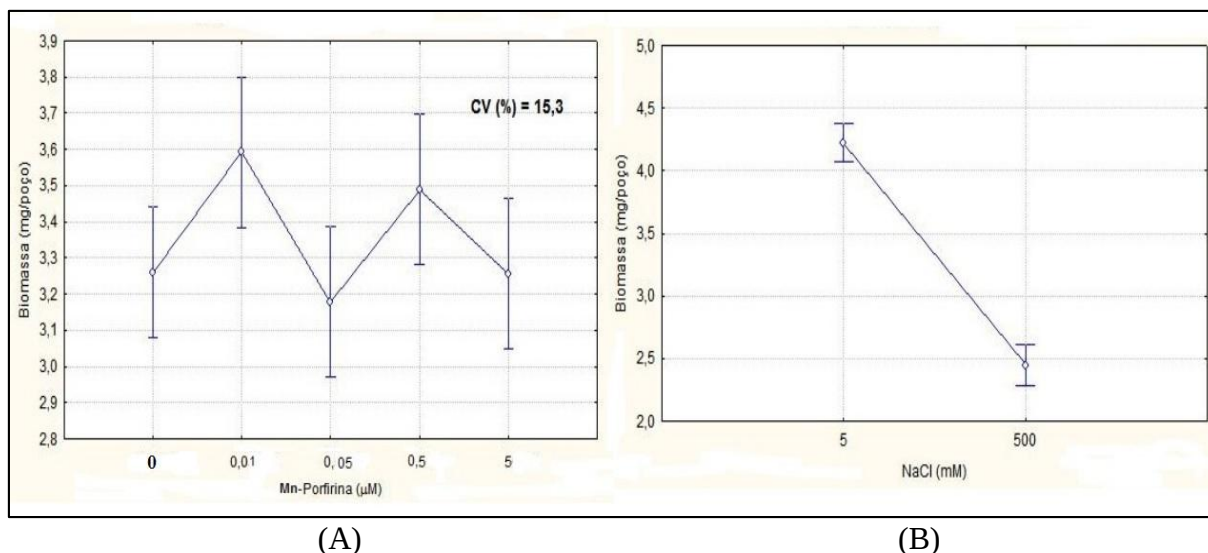


Figura 4.10 - Demonstração estatística de (A) efeito da MnTnHex-2-PyP⁵⁺ em microplaca no crescimento do fungo (B) influência da salinidade 500 mmol L⁻¹ de cloreto de sódio (NaCl) no crescimento do fungo.

De modo semelhante ao composto análogo MnTE-2-PyPCL₅, não foi possível observar efeito de interação entre a MnTnHex-2-PyPCL₅ e o estresse salino. Como observado anteriormente, enquanto o efeito do estresse associado à salinidade mostrou-se significativo em reduzir a biomassa do isolado *R. stolonifer* (Figura 4.10-B), a presença da MnTnHex-2-PyPCL₅ não afetou significativamente ($p = 0,58$) a produção de biomassa em qualquer dos níveis estudados (Figura 4.9 e 4.10-A). Esse resultado demonstra que a MnTnHex-2-PyPCL₅ não foi tóxica para o *R. stolonifer* em nenhum dos níveis testados, mas também não foi capaz de remediar o efeito do estresse salino associado à concentração de NaCl a 500 mmol L⁻¹.

4.5 Efeito da MnTE-2-PyPCL₅, MnTnHex-2-PyPCL₅ e Mn²⁺ na produção de biomassa do *R. stolonifer* na ausência e na presença de estresse salino: experimentos em meio submerso

Tendo como base os resultados obtidos com a investigação da dinâmica de crescimento e do efeito da salinidade no crescimento do fungo *R. stolonifer*, a concentração de NaCl escolhida para a realização dos testes nos experimentos em meio submerso com Mn-porfirinas foi de 250 mmol L⁻¹, nível em que o NaCl demonstrou uma toxicidade moderada ao micro-organismo, considerando a produção de biomassa como indicador biológico (Figura 4.5). O nível mínimo de NaCl nos erlenmeyer foi de 3 mmol L⁻¹ (devido à solução salina em que a

suspensão de esporos é preparada para inoculação). Assim, dois níveis de concentração de NaCl foram investigados: 3 e 250 mmol L⁻¹.

Nestes experimentos, além do efeito das Mn-porfirinas, decidiu-se verificar se o manganês livre poderia promover alguma atenuação no estresse salino; para isso, o sal de acetato de manganês Mn(OAc)₂ foi utilizado como controle. A escolha desse controle ocorreu porque o íon Mn²⁺ possui atividade SOD descrita na literatura, porém sua atividade é cerca de 2-3 ordens de magnitude menor que as MnPs (BATINIĆ-HABERLE *et al.*, 2011). O efeito das MnPs e do Mn²⁺ livre foi estudado em seis níveis: 0; 0,0005; 0,005; 0,05; 0,5 e 5 µmol L⁻¹.

Os resultados dos estudos em meio submerso com as Mn-porfirinas MnTE-2-PyPCL₅ e MnTnHex-2-PyPCL₅ e com o Mn(OAc)₂, na ausência e na presença de estresse salino, estão apresentados nas Figuras 4.11, 4.12 e 4.13, respectivamente. De modo análogo ao reportado para os experimentos em microplacas, enquanto o efeito do estresse vindo da salinidade no meio submerso mostrou-se significativo em reduzir a biomassa do isolado *R. stolonifer*, nem as MnPs nem o Mn²⁺ livre afetou significativamente a produção de biomassa em qualquer dos níveis estudados. Esse resultado demonstra que nenhum dos compostos foi tóxico para o *R. stolonifer* em qualquer dos níveis testados, mas também não foram capazes de remediar o efeito do estresse salino associado à concentração de NaCl a 250 mmol L⁻¹.

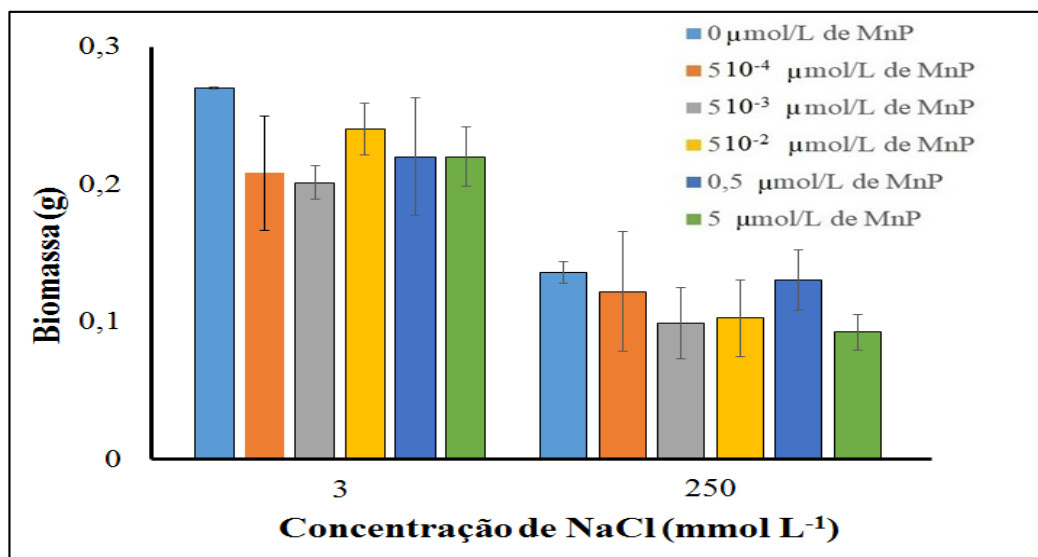


Figura 4.11 - Efeito da MnTE-2-PyPCL₅ sob a produção de biomassa do fungo *R. stolonifer*, com e sem o efeito da salinidade (Valores de biomassa e pH Apêndice VI).

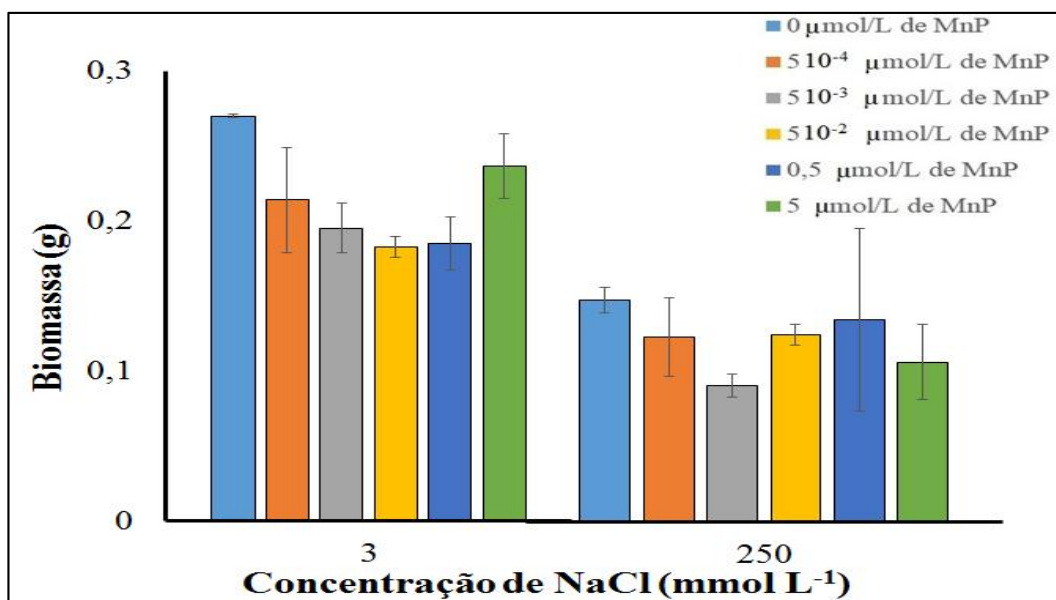


Figura 4.12 - Efeito da MnTnHex-2-PyPCL₅ sob a produção de biomassa do fungo *R. stolonifer*, com e sem o efeito da salinidade (Valores de biomassa e pH Apêndice VIII).

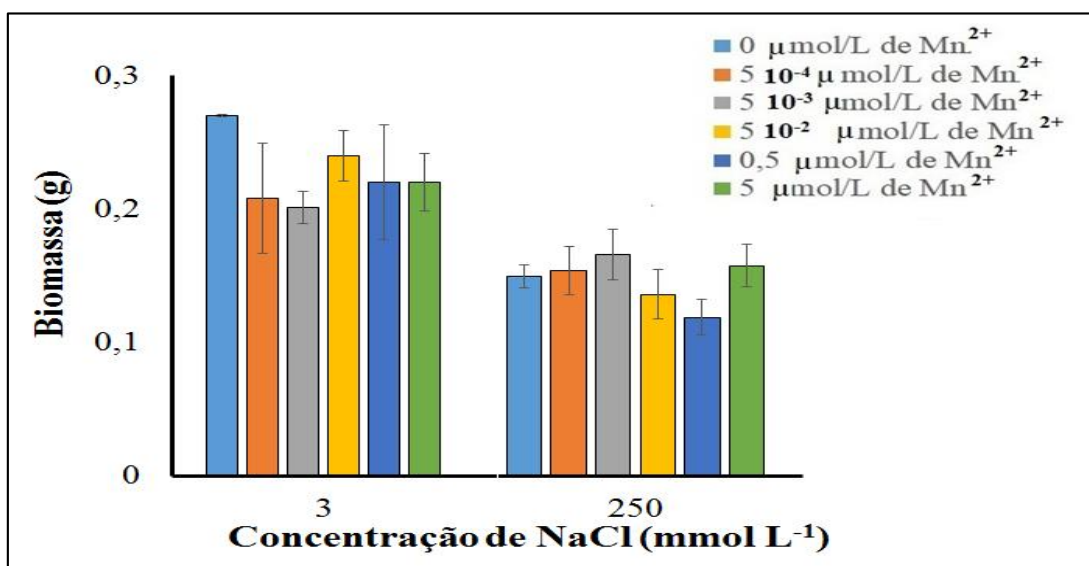


Figura 4.13 - Efeito do acetato de manganês sob a produção de biomassa do fungo *R. stolonifer*, com e sem o efeito da salinidade (Valores de biomassa e pH Apêndice X)

Até o presente momento os resultados do presente trabalho indicam que a produção de biomassa do fungo *R. stolonifer* não é influenciada nem positiva nem negativamente pela presença das Mn-porfirinas MnTE-2-PyPCL₅ e MnTnHex-2-PyPCL₅ nos níveis estudados, tanto para os sistemas em microplaca quanto aqueles em meio submerso, seja em condições de estresse salino ou não. Isto pode indicar que a salinidade usada nos estudos pode ter sido tão alta que as Mn-porfirinas não conseguem remediar a agressão imposta pelo agente estressor

NaCl, que os níveis adequados de MnPs não foram utilizados ou, finalmente, que a redução na biomassa ocasionada pelo estresse salino pode não está necessariamente ligada a um processo de estresse oxidativo reversível nas condições em estudo.

4.6 Estudo dos fungos filamentosos *R. stolonifer*, *R. microsporus* e *L. blakesleeana* como biocatalisadores em reações de oxidação de álcool e de redução de cetona

As reações de oxidação de álcoois e redução de cetonas, a exemplo daquelas apresentadas na Figura 4.14, são consideradas relevantes para a química orgânica. O presente trabalho busca rotas alternativas para essas reações, explorando para isso a biomassa de micro-organismos selecionados da micoteca da RENNORFUN como biocatalisadores da conversão desses substratos. Em particular, os estudos que serão apresentados verificaram a eficiência biocatalítica dos isolados *R. stolonifer*, *R. microsporus* e *L. blakesleeana*, em reações de oxidação de álcoois e redução de cetonas usando substratos típicos, como ciclohexanol (Cy-ol) e ciclohexanona (Cy-ona), respectivamente.

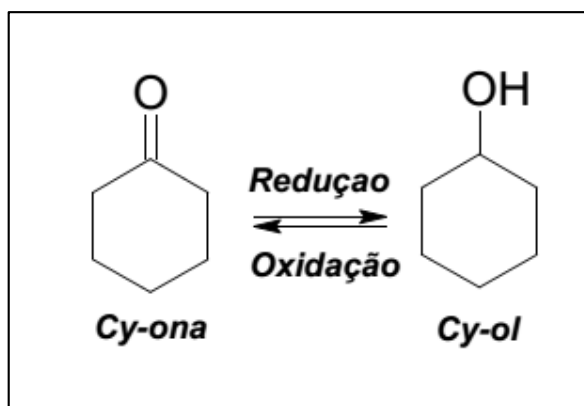


Figura 4.14 - Reação de oxidação/redução de Ciclohexanol (Cy-ol) e Ciclohexanona (Cy-ona).

A obtenção da biomassa constitui o primeiro passo para a realização desses experimentos, uma vez que as características da biomassa (taxa de crescimento, expressão enzimática, etc.) dependem do meio de cultura, foram empregados, inicialmente, dois meios para a obtenção da biomassa destinada aos estudos de biotransformação deste trabalho. A saber, testaram-se os meios Sabouraud e YMA.

A composição do meio de cultura Sabouraud e YMA difere pelo fato do último possuir, além de peptona e glicose que são componentes comuns a ambos meios, extrato de malte e extrato de levedura que são componentes ausentes no meio Sabouraud. O meio YMA é, por

isso, considerado um meio mais rico em nutrientes. Para compensar a falta de diversidade nutricional, a quantidade de glicose do meio Sabouraud é cerca de dez vezes maior que aquela do meio YMA.

O impacto dessa diferença composicional entre os meios de cultura sobre as propriedades biocatalíticas da biomassa fúngica, foi claramente verificada em trabalhos no Laboratório de Síntese Orgânica e Biocatálise – UFPB, com o fungo filamentoso *Geotrichum candidum* (PEIXOTO *et al.*, 2013). Nesses estudos com *G. candidum* uma melhor eficiência biotransformatória foi observada com biomassa obtida no meio YMA quando comparada àquela obtida meio Sabouraud. A reação de oxidação Baeyer-Villiger da Cy-ona para ϵ -caprolactona mostrou-se limitada por glicose e a biomassa resultante de incubação em meio YMA, mais pobre em glicose, mostrou-se significativamente mais eficiente que aquela obtida em meio Sabouraud.

Embora os estudos de dinâmica de crescimento para os fungos *R. stolonifer*, *R. microsporus* e *L. blakesleeana* tenha sido realizada em meio Sabouraud (Seção 4.1, Figuras 4.1), a investigação detalhada não foi efetuada em meio YMA. Um conjunto preliminar de curvas de crescimento para esses fungos em YMA (Figuras 4.15) indica, no entanto, que a tendência de crescimento relativa desses fungos neste meio é semelhante àquela encontrada anteriormente no meio Sabouraud. A partir desses conjuntos de curvas nos meios Sabouraud e YMA (Figuras 4.1 e 4.15, respectivamente), estabeleceu-se, como padrão para obtenção de biomassa em ambos os meios, o tempo de 72 h para coleta da biomassa afim de ser empregada nas reações de biotransformação. Para qualquer dos fungos, esse tempo de incubação corresponde a uma biomassa no fim da fase de crescimento exponencial. Após a coleta da biomassa, esta foi lavada com tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ (pH 6,5), centrifugada e fracionada para uso imediato nas reações de biotransformação.

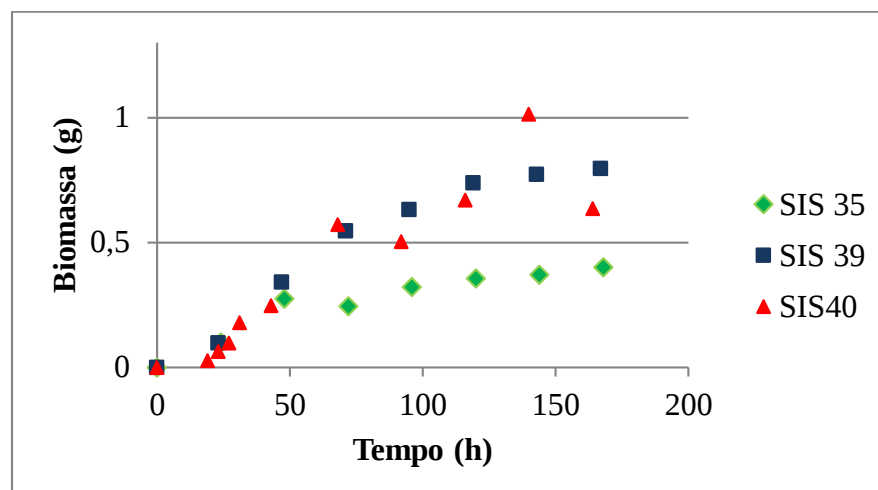


Figura 4.15 - Curvas de crescimentos prévias para os fungos *R. stolonifer* (SIS 35), *R. microsporus* (SIS 39) e *L. blakesleeana* (SIS 40) obtidas em meio YMA.

4.6.1 Estudo da reação de oxidação do Cy-ol pelos fungos filamentosos *R. stolonifer*, *R. microsporus* e *L. blakesleeana*

A eficiência biocatalítica dos fungos filamentosos *R. stolonifer*, *R. microsporus* e *L. blakesleeana* para reações de oxidação do substrato ciclohexanol foi estudada com biomassas obtidas em meio submerso Sabouraud e YMA.

Para as reações com os isolados *R. microsporus* e *L. blakesleeana*, observou-se que o início da oxidação do Cy-ol à Cy-ona, tanto com biomassa obtida em meio Sabouraud quanto em meio YMA, ocorreu a partir de 24 horas, atingindo rendimento de Cy-ona entre 70 e 97% em aproximadamente 6 dias (Figuras. 4.16 a 4.19).

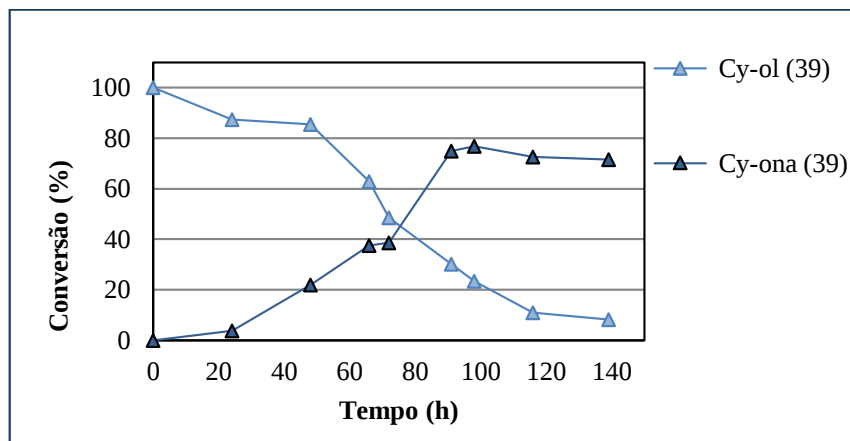


Figura 4.16 - Oxidação de Cy-ol a Cy-ona catalisada pelo fungo filamentoso *R. microsporus*, com biomassa obtida a partir de meio submerso Sabouraud.

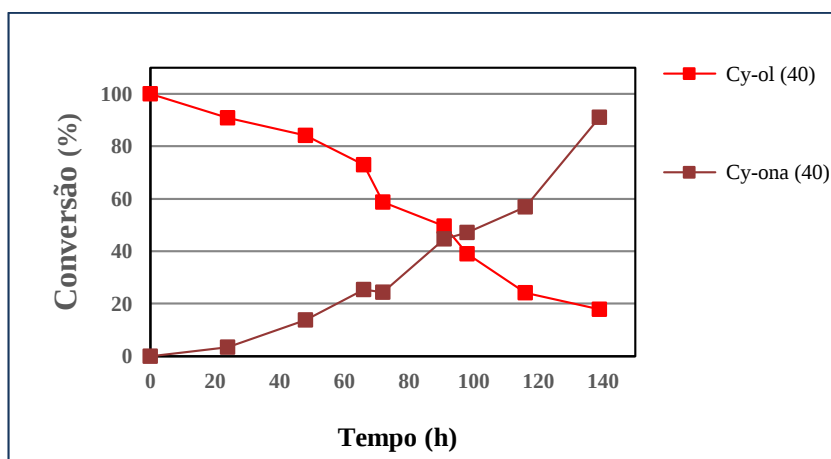


Figura 4.17 - Oxidação de Cy-ol a Cy-ona catalisada pelo fungo filamentoso *L. blakesleeana*, com biomassa obtida a partir de meio submerso Sabouraud.

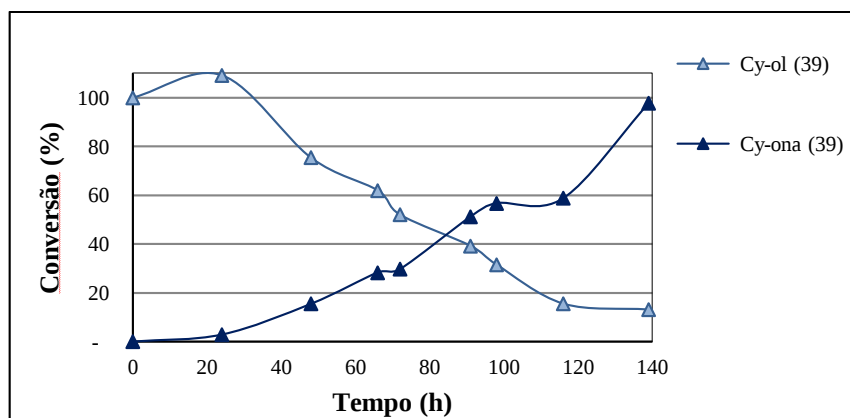


Figura 4.18 - Oxidação de Cy-ol a Cy-ona catalisada pelo fungo filamentoso *R. microsporus*, com biomassa obtida a partir de meio submerso YMA.

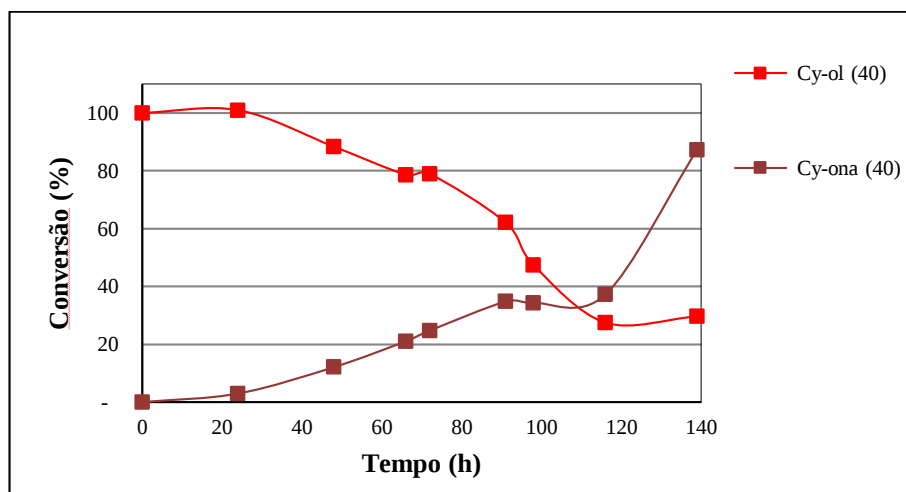


Figura 4.19 - Oxidação de Cy-ol a Cy-ona catalisada pelo fungo filamentoso *L. blakesleeana*, com biomassa obtida a partir de meio submerso YMA.

Os resultados para a oxidação catalisada pelas biomassas obtidas em meio submerso Sabouraud são apresentados nas Figuras 4.16 e 4.17 e revelam que a cepa do *L. blakesleeana* apresentou uma eficiência ligeiramente melhor que o fungo *R. microsporus* para a desidrogenação do Cy-ol à Cy-ona; os rendimentos de Cy-ona no sistema com *L. blakesleeana* atingiram ~90 %, enquanto aqueles com a cepa *R. microsporus* foram de ~70 %. Já os resultados obtidos com as biomassas de *R. microsporus* e *L. blakesleeana* crescidas em meio de cultura YMA (Figuras 4.18 e 4.19) mostraram eficiências catalíticas semelhantes, levando a rendimentos de Cy-ona de ~90 %.

Apesar da desidrogenação do Cy-ol à Cy-ona ser efetiva com as biomassas dos fungos *R. microsporus* e *L. blakesleeana* (Figuras 4.16 a 4.19), a subsequente oxidação Baeyer-Villiger da Cy-ona à ϵ -caprolactona não foi observada. Esse resultado encontra-se em direto contraste com o comportamento observado para o fungo *Geotrichum candidum*, que é capaz de promover a biotransformação completa do Cy-ol à ϵ -caprolactona, com a Cy-ona como produto intermediário (FANG, 1995; PEIXOTO *et al.*, 2013; CARBALLEIRA *et al.*, 2004). Outra diferença entre a eficiência catalítica do micro-organismo *G. candidum* comparada com as cepas dos fungos *R. microsporus* e *L. blakesleeana* é que a oxidação do Cy-ol é consideravelmente mais rápida com *G. candidum* como biocatalisador, sendo concluída em menos de 24 horas. Destaca-se, no entanto, que esta eficiência da biomassa do *G. candidum* é extremamente sensível à natureza do meio em que a mesma foi obtida, uma vez que oxidação rápida e completa é observada com biomassa obtida em meio YMA, mas não com biomassa obtida em meio Sabouraud (PEIXOTO *et al.*, 2013); para os fungos *R. microsporus* e *L.*

blakesleeana, a biotransformação, apesar de lenta, é seletiva para Cy-ona e observada com biomassa obtida em qualquer dos meios de cultura.

Como observado nos resultados para a oxidação do substrato Cy-ol, em algumas reações o consumo do substrato nem sempre é acompanhado pela formação do produto e vice-versa, como representa as figuras 4.16 a 4.19. Nela, percebe-se que uma grande quantidade de produto é formado em um curto período, enquanto o substrato é consumido gradativamente.

Esse comportamento pode indicar que, no processo de conversão, estão sendo formadas outras espécies que não são identificadas nas análises por cromatografia (DIAS *et al.*, 2012). Exemplos dessas espécies seriam o intermediário reacional e/ou um sub-produto, que podem ser provenientes de reações concorrentes do metabolismo celular (ARANTES, 2008; DIAS *et al.*, 2012; TORRELO *et al.*, 2015), ou finalmente, esse fato pode estar relacionado ao aprisionamento do substrato no interior da célula do micro-organismo, causando o comportamento observado nas figuras 4.17 e 4.18.

Diferentemente dos fungos *R. microsporus* e *L. blakesleeana*, as células íntegras do fungo filamentoso *R. microsporus* não se mostraram apropriadas para catalisar a oxidação do Cy-ol com biomassa obtida em qualquer dos meios estudados, Sabouraud ou YMA (Figuras 4.20). Esse comportamento contrasta, por exemplo, com o *R. microsporus*, que representa um micro-organismo do gênero *Rhizopus* e que promoveu eficientemente a primeira oxidação do Cy-ol, e como outros micro-organismos relatados na literatura que promovem essa reação (CARBALLEIRA *et al.*, 2004; TORRELO *et al.*, 2015). A reação foi monitorada por 140 horas, mas a concentração de Cy-ol não se alterou, mostrando que o fungo *R. Stolonifer* não promove a oxidação do substrato Cy-ol, pelo menos nas condições de cultivo e biotransformação empregadas nesse trabalho.

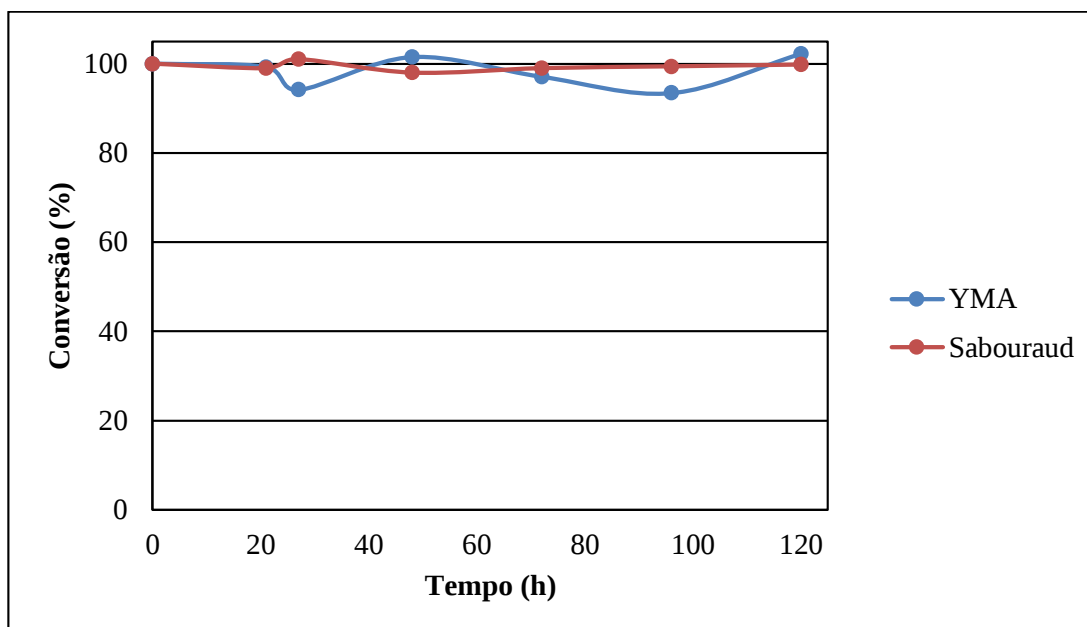


Figura 4.20 - Biotransformação do Cy-ol pelo fungo filamentoso *R. stolonifer*, com biomassa obtida em meio submerso YMA e Sabouraud. Cy-ol permaneceu inalterado ao longo do tempo, indicando que oxidação não ocorreu.

4.6.2 Estudo da reação de redução da Cy-ona pelo fungo filamentoso *R. stolonifer* e reúso da biomassa para um segundo ciclo de biotransformação

Como o fungo *R. stolonifer* não promoveu a oxidação do substrato Cy-ol, decidiu-se verificar, então, sua eficiência para reações de redução, usando como substrato padrão a ciclohexanona. Nesses estudos, utilizou-se apenas a biomassa do *R. stolonifer* obtida em meio Sabouraud. A investigação da biomassa obtida em meio YMA não foi efetuada devido a limitações de tempo.

A Figura 4.21 apresenta os resultados obtidos na biotransformação da Cy-ona pelo fungo *R. stolonifer*. Observou-se uma completa conversão do substrato em aproximadamente 44 h, sendo o produto o álcool Cy-ol. O início da conversão da Cy-ona para Cy-ol pelo fungo *R. stolonifer* no meio Sabouraud foi observada a partir de 5 horas de reação, levando a rendimentos de ~99 % em ~50 h. Esse resultado mostra que este micro-organismo é biocataliticamente tão eficiente quanto outros fungos que são descritos devido a sua capacidade transformatória em reações de redução de cetonas (NAKAMURA *et al.*, 2003; PIOVAN *et al.*, 2008; PINEDO-RIVILLA *et al.*, 2009; TORRELO *et al.*, 2015). Com o monitoramento da reação por 96 horas verificou-se que a concentração de Cy-ol se mantém estável (Figuras 4.22),

sem se degradar ou ser biotransformado nesse período. Comparativamente à capacidade de conversão de outros micro-organismos, a exemplo do *T. rígida*, *Candida magnoliae*, *Aspergillus niger* IFO 4415, que possuem cerca de ~90 % de conversão de uma cetona pró-quiral (PIOVAN *et al.*, 2008; NAKAMURA *et al.*, 2003), espera-se que o fungo filamentoso *R. stolonifer* possa ser utilizado com eficiência similar em reações com substratos semelhantes.

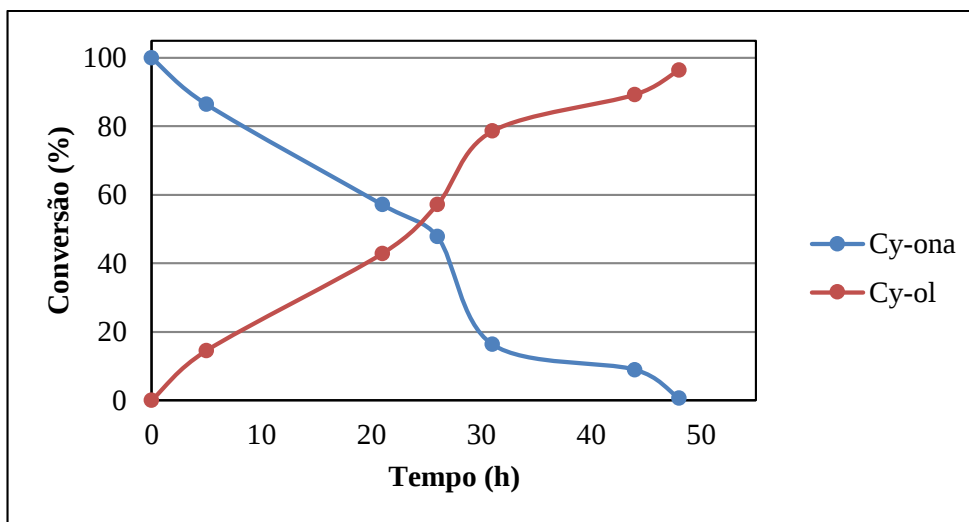


Figura 4.21 - Redução de Cy-ona para Cy-ol por células íntegras do fungo filamentoso *R. stolonifer*, com biomassa obtida em meio submerso Sabouraud.

Nesse contexto, verificou-se a possibilidade de se reutilizar a biomassa do fungo filamentoso *R. stolonifer* em um segundo ciclo para bioconversão de substrato Cy-ona em Cy-ol. Para esse experimento, a biomassa usada no primeiro ciclo de conversão foi retirada do meio de biotransformação, centrifugada por 3 minutos, lavada (4 vezes) com tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ (pH 6,5), incubada em tampão fosfato por 1 hora sobe agitação orbital e, em seguida, submetida a uma nova reação de biotransformação com solvente e substrato frescos.

A Figuras 4.22 apresenta uma análise comparativa dos resultados obtidos no primeiro e no segundo ciclo de biotransformação do substrato Cy-ona ao produto Cy-ol pelo fungo filamentoso *R. stolonifer*. Pode-se observar que, apesar da biomassa continuar com capacidade biotransformatória, houve uma pequena queda na eficiência biocatalítica no segundo ciclo. Um detalhe importante é que a biomassa usada no segundo ciclo não foi submetida a qualquer mecanismo de regeneração dos cofatores, tal como solução glicosada ou meios típicos de cultura (por exemplo, Sabouraud ou YMA). Procedimentos de regeneração dos cofatores poderiam ser benéficos neste caso, e não foram efetuados por limitação de tempo. Os co-fatores como NADH e NADPH são descritos na literatura devido ao seu importante papel em reações

que usam enzimas mooxigenases e álcool desidrogenase para os processos de oxidação e redução e a regeneração desses compostos é necessária para que a reação ocorra (BERNHARDT 2006; TORRELO *et al.*, 2015). De qualquer forma, a queda de eficiência é pequena, indicando que a investigação adicional da redução de cetonas pelo *R. stolonifer* é promissora.

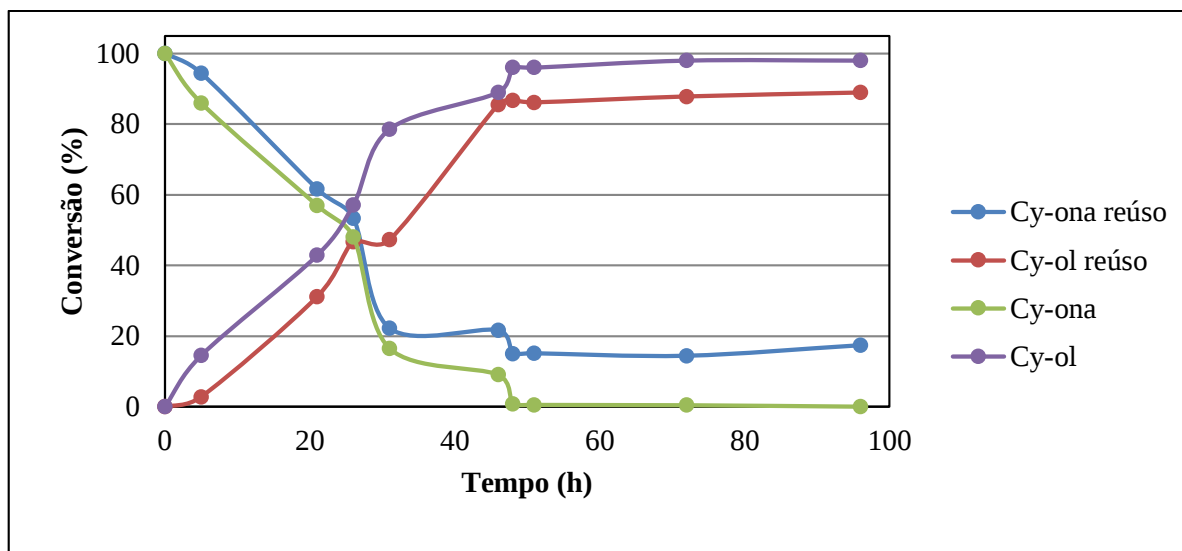


Figura 4.22 - Comparação entre o primeiro ciclo de biotransformação e o reuso das células íntegras do fungo filamentoso *R. stolonifer* em um segundo ciclo da bioconversão.

4.6.3 Efeito do estresse salino como agente promotor da eficiência biocatalítica em reações de redução da Cy-ona pela biomassa do filamentoso *R. stolonifer*

A indução de estresse salino durante o crescimento de leveduras e fungos filamentosos gera alterações metabólicas e fisiológicas que prejudicam a dinâmica de crescimento do micro-organismo e, portanto, a produção de biomassa. Nesse estudo, pretende-se avaliar se o estresse salino, ao afetar a expressão enzimática do micro-organismo, pode afetar também o posterior processo biotransformatório. Escolheu-se estudar, como modelo, a redução de Cy-ona pelo fungo filamentoso *R. stolonifer*, com biomassa obtida em meio Sabouraud na ausência e na presença de estresse salino. Na condição denominada sem estresse salino, a biomassa do fungo *R. stolonifer* foi obtida com exposição à concentração mínima de NaCl de 3 mmol L⁻¹ (devido à solução salina em que a suspensão de esporos de inoculação é preparada). Na condição máxima de salinidade, selecionou-se a concentração de 200 mmol L⁻¹ de NaCl para obtenção de biomassa. Esta condições de preparo de biomassa para o fungo *R. stolonifer* em meio submerso Sabouraud foi descrita na Seção 4.3.2 (Figura 4.6).

Observou-se que aparentemente a biomassa do isolado *R. stolonifer* obtida a partir de um meio de cultura contendo 200 mmol L⁻¹ de NaCl foi consistentemente mais efetiva em promover a redução de Cy-ona a Cy-ol (Figura 4.23). Após 10 horas de reação, o rendimento de Cy-ol nas reações com a biomassa obtida com maior concentração de cloreto de sódio, se mostrou ~10% maior que aquele observado com biomassa obtida sem estresse. Isto reduziu em 12 horas o tempo necessário para conversão completa do substrato ao se usar biomassa com estresse salino, nota-se também que o ponto médio onde as concentrações são de aproximadamente 50 % foi diminuída em aproximadamente 10 horas, quando comparada com a biomassa obtida sem altas concentrações de sal. Esse comportamento indica que, apesar de o estresse salino afetar a dinâmica de crescimento do fungo, resultando em uma diminuição da biomassa, este procedimento simples (isto, é, o uso de um estressor não-redox barato e ambientalmente benigno) facilitou a conversão do substrato durante a biotransformação, assim como observado em trabalhos com a levedura *Saccharomyces cerevisiae*, em que o efeito hiperosmótico facilitou a produção de enzimas (TÜRKEL e TURGUT 2002).

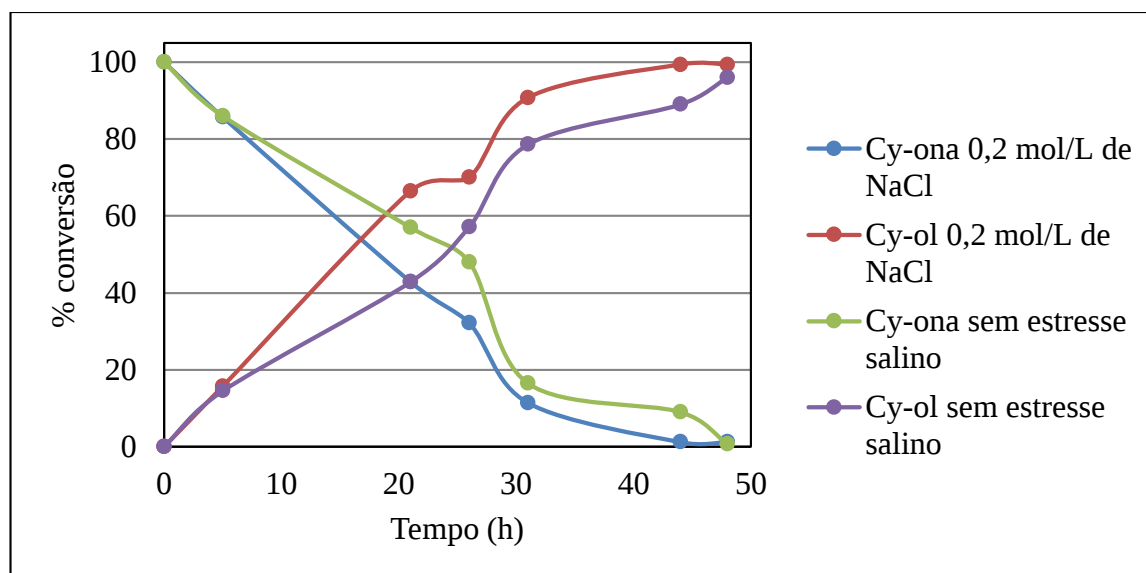


Figura 4.23 - Redução de Cy-ona para Cy-ol por células íntegras do fungo filamentoso *R. stolonifer*, com biomassa obtida em meio submerso Sabouraud com concentração de NaCl de 3 mmol L⁻¹ ou de 200 mmol L⁻¹ (com salinidade).

Embora as causas desse efeito salino sobre a biotransformação (sem aparente precedente na literatura) precisem ser melhor investigadas, outra especulação para esse efeito é uma provável hipótese que ao crescer o fungo filamentoso sob condição de estresse salino (200 mmol L⁻¹), a biomassa resultante poderia estar sendo preconditionada para melhor adaptação ao meio salino da biotransformação, que consiste de solução tampão fosfato a 100 mmol L⁻¹.

4.6.4 Efeito da Mn-porfirina MnTE-2-PyPcl₅ como aditivo à biomassa do fungo filamentoso *R. stolonifer* para redução de Cy-ona

Nesse estudo procurou-se verificar se a Mn-porfirina catiônica tipicamente utilizada em estudos biológicos como modulador redox, MnTE-2-PyPcl₅, poderia exercer alguma influência sobre a biomassa do fungo *R. stolonifer* e resultar em uma melhor capacidade biotransformadora na redução do substrato ciclohexanona. Partiu-se da hipótese de que sob estresse oxidativo, o aparato redutor do micro-organismo poderia ser prejudicado e uma atenuação desse estresse originário, por exemplo, das próprias condições de reação, poderia melhorar os rendimentos de biotransformação. Assim, avaliou-se o efeito da MnTE-2-PyPcl₅ nos processos de conversão de redução do substrato Cy-ona, utilizando biomassa obtida com em meio submerso Sabouraud com três níveis de MnP: 0 (controle), 0,5 e 5 $\mu\text{mol L}^{-1}$.

Observou-se que a biomassa do fungo *R. stolonifer* obtida em meio Sabouraud contendo 0,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de MnP apresentou comportamento biotransformatório para redução de Cy-ona semelhante àquele da biomassa controle sem Mn-porfirina (Figura 4.24).

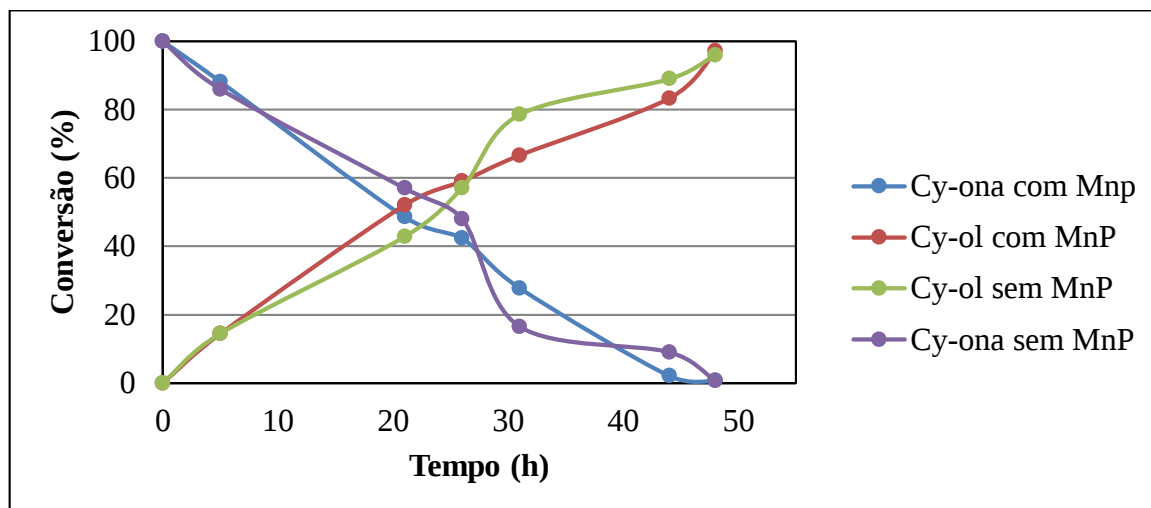


Figura 4.24 - Redução de Cy-ona para Cy-ol por células íntegras do fungo filamentoso *R. stolonifer*, com biomassa obtida em meio submerso Sabouraud com concentração de MnTE-2-PyPcl₅ a 0 (controle) ou 0,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$.

Já para a biomassa do fungo *R. stolonifer* obtida sob efeito de 5,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de MnTE-2-PyPcl₅ no meio Sabouraud, verificou-se uma melhora muito sutil na capacidade biotransformadora do sistema para redução de Cy-ona, quando comparada com os resultados de biomassa de *R. stolonifer* sem MnP (Figura 4.25). Esta ligeira indicação de melhora com o

uso de MnP, no entanto, precisa ser confirmada com mais experimentos e análise estatística adequada. Para verificação de efeito mais pronunciado, é possível que a concentração de MnP precise ser aumentada para valores semelhantes àqueles usados na literatura para a levedura *Saccharomyces cerevisiae* e a bactéria *E. coli* (TOVMASYAN *et al.*, 2014; REBOUÇAS *et al.*, 2008a; KOS *et al.*, 2009b). Destaca-se que a produção de biomassa do *R. stolonifer* foi pouco afetada pela MnTE-2-PyPCl₅ até, pelo menos, 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (Figura 4.11).

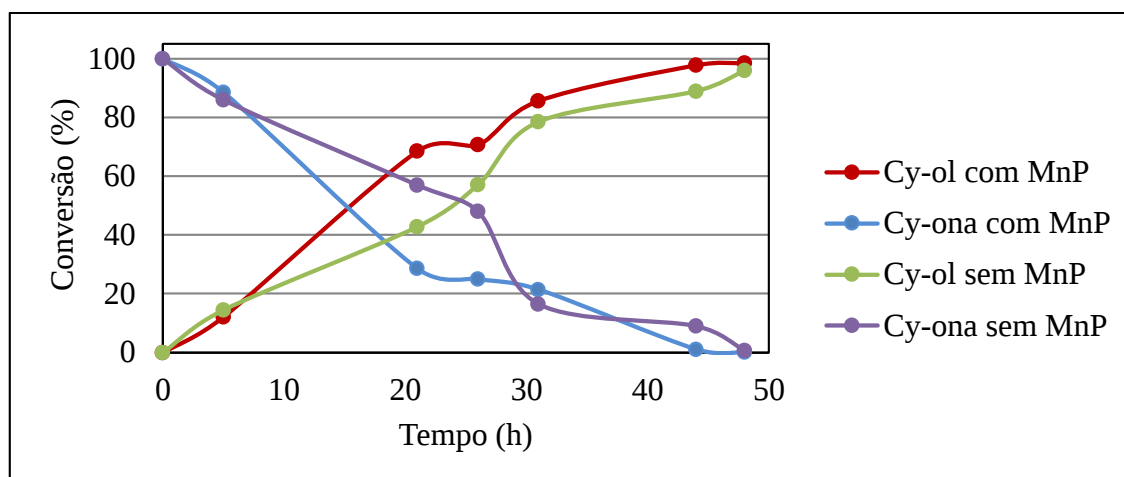


Figura 4.25 - Redução de Cy-ona para Cy-ol por células íntegras do fungo filamentoso *R. stolonifer*, com biomassa obtida em meio submerso Sabouraud com concentração de MnTE-2-PyPCl₅ a 0 (controle) ou 5,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$.

5 Conclusões e perspectivas

5.1 Conclusões e considerações finais

Nesta dissertação foram apresentados estudos da dinâmica de crescimento para três isolados de fungos oriundos da micoteca da RENNORFUN, *R. stolonifer*, *R. microsporus* e *L. blakesleeana* em meio Sabouraud. Adicionalmente, estudaram-se os efeitos do uso de NaCl e das Mn-porfirinas MnTE-2-PyPCL₅ e MnTnHex-2-PyPCL₅ sobre a produção de biomassa do fungo filamentoso *R. stolonifer* usando dois métodos experimentais: meio submerso e microplaca. As biomassas dos fungos *R. stolonifer*, *R. microsporus* e *L. blakesleeana* foram avaliadas com biocatalisadores para oxidação de ciclohexanol e redução de ciclohexanona.

As principais conclusões dos experimentos associados à produção de biomassa desses fungos são resumidas a seguir:

- Estabeleceu-se as curvas de crescimento para os fungos filamentosos cultivados no meio de cultura Sabouraud. As curvas dos fungos *R. microsporus* e *L. blakesleeana* foram muito semelhantes. O fungo *R. stolonifer* apresentou a menor taxa de crescimento ~50% menor que os demais isolados.
- Os experimentos de indução de estresse salino foram realizados com o fungo *R. stolonifer* utilizando tanto metodologia em microplaca quanto em meio submerso. As duas metodologias apresentaram uma boa correspondência quando o estresse salino foi relativamente alto. Em concentrações mais baixas de NaCl, o fungo *R. stolonifer* mostrou-se bem mais sensível ao agente estressor no meio submerso que nas microplacas.
- A produção de biomassa do fungo *R. stolonifer* permaneceu essencialmente inalterada pela presença das Mn-porfirinas MnTE-2-PyPCL₅ e MnTnHex-2-PyPCL₅ em concentrações até 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$ ou 5 $\mu\text{mol L}^{-1}$, respectivamente, sob condições de estresse salino ou não.

A utilização das células íntegras dos fungos filamentosos *R. stolonifer*, *R. microsporus* e *L. blakesleeana* em reações típicas de oxidação de álcool e de redução de cetona foi efetuada com biomassa obtidas em meios Sabouraud ou YMA. Avaliaram-se também os efeitos que biomassas obtidas sob estresse salino ou contendo a Mn-porfirina MnTE-2-PyPCL₅ poderiam

ocasionar na eficiência biotransformadora. As principais conclusões desses experimentos foram:

- O fungo *R. Microsporus* e *L. Blakesleeana* tiveram atividade biocatalítica semelhante para a reação de oxidação de Cy-ol à Cy-ona; as reações foram monitoradas por 6 dias, e observou-se o início da conversão após 24 horas; os rendimentos de Cy-ona variaram de 85-95 % para as biomassas obtidas em ambos meios YMA e Sabouraud.
- O fungo filamentoso *R. stolonifer* não foi capaz de promover a oxidação do Cy-ol nas condições estudadas, mesmo após 100 h (4 dias).
- Na reação de redução de Cy-ona utilizando a biomassa do fungo *R. stolonifer* crescida em meio Sabouraud, a conversão do substrato para Cy-ol foi essencialmente concluída em ~44 h. Mesmo sem a regeneração dos co-fatores, o reúso da biomassa foi efetuado com sucesso, com pequena diminuição na eficiência biotransformadora, indicando que se trata de um sistema promissor para biocatálise.
- Apesar da indução de estresse salino durante o crescimento do fungo filamentoso *R. stolonifer* estar associada a uma menor produção de biomassa, verificou-se que biomassa obtida com NaCl a 200 mmol L⁻¹, resultou em biomassa ligeiramente mais eficiente para biotransformação, com conversão completa da Cy-ona a Cy-ol em 32 horas, quando comparada com reações catalisadas por biomassa obtida sem estresse salino. Especula-se que a indução de estresse durante a produção da biomassa pode atuar como um mecanismo de condicionamento para o meio de biotransformação, constituído de tampão fosfato a 100 mmol L⁻¹.
- A utilização de MnTE-2-PyPCL₅ a 5 µmol L⁻¹ durante o crescimento do fungo *R. stolonifer*, resultou em biomassa que aparenta ser discretamente mais ativa que aquela sem MnP. Esta observação não possui, porém, validação estatística e precisa, portanto, ser confirmada. Sugere-se que investigações posteriores incluam concentrações de MnP maiores, uma vez que a produção de biomassa do fungo *R. stolonifer* é pouco afetada por MnP até, pelo menos, 50 µmol L⁻¹.

5.2 Perspectivas

Como perspectiva de continuação do trabalho, verifica-se a necessidade de estudos mais detalhados para caracterizar a associação do estresse salino e do estresse oxidativo na biomassa, utilizando outros marcadores celulares, como os marcadores bioquímicos, em substituição ao indicador físico de produção de biomassa. É provável que a concentração de sal mínima para que se observe um efeito físico significativo na produção de biomassa seja já elevada o bastante para que os danos celulares sejam essencialmente irreversíveis na presença do agente estressor. Assim, a remediação do estresse oxidativo poderia ser comprometida, por melhor que fosse a potência e a biodisponibilidade do modulador redox.

Dentre esses marcadores moleculares típicos associados ao estresse oxidativo, estão por exemplo, a baixa expressão ou inativação de antioxidantes catalíticos endógenos, tais como as enzimas SOD e catalase. Assim, a quantificação da atividade dessas enzimas nos extratos celulares dos micro-organismos estudados poderia ser útil para buscar dependência do grau de estresse oxidativo com o efeito da salinidade.

Os estudos podem ser estendidos para outros fungos filamentosos e leveduras, assim como o uso de Mn-porfirinas aniônicas.

No âmbito das reações de biocatálise pode-se propor:

- Realizar a bioprospecção de fungos filamentosos cedidos pela micoteca da RENNORFUN para reações de biocatálise, incluindo estudos de dinâmica de crescimento para os fungos mais promissores.
- Investigar processos de biotransformações de oxidação e redução de substratos típicos. Por exemplo, a redução da ciclohexanona, oxidação de ciclohexanol e a oxidação de Baeyer-Villiger de ciclohexanona à ϵ -caprolactona. Posteriormente, outros substratos poderão ser também usados.
- Identificar o impacto promovido pelo uso de cloreto de sódio na qualidade da biomassa para a realização de reações de oxidação/redução acima citadas.
- Não limitar as Mn-porfirinas a apenas aquelas incorporadas na biomassa, mas analisar o efeito causado pelo uso das Mn-porfirinas como aditivo nas reações de biotransformação em si.
- Verificar se o efeito das MnPs na eficiência da biomassa para biocatálise poderia ser observado com concentrações maiores das MnPs.

- Ampliar o escopo das reações para incluir substratos pró-quirais e avaliar o potencial biotransformador de fungos filamentosos, tais como o *R. stolonifer*, para reduções enantiosseletivas, no intuito de se obter compostos enantiomericamente puros.

6 Referências

ABREU, J. A. S.; ROVIDA, A. F. S.; PAMPHILE, J. A. **Fungos de interesse: Aplicações biotecnológicas.** *Revista UNINGÁ Review*, v. 21, p. 55-59, 2015.

ADLER, A. D.; LONGO, F. R.; SHERGALIS, W., **Mechanistic Investigations of Porphyrin Synthesis , i Preliminary studies of ms-Tetraphenylporphyrins.** *Journal of the Chemical Society*, v. 18, p 3145-3149, 1964.

ADRIO, J. L.; DEMAINE, A. L. **Microbial cells and enzymes: A century of progress. Methods in Biotechnology, Microbial Enzymes and Biotransformations.** *Ed: Barredo, J.L. (Ed.), Totowa, nL. Humana Press Inc. Cap. 1, v.17, 2005.*

ALI, D. K.; ORIOWO, M.; TOVMASYAN, A.; BATINIĆ-HARBELE, I. **Late Administration of Mn Porphyrin-based SOD mimic Enhances Diabetic Complications.** *Redox Biology*, p. 457- 166, 2013.

AITKEN, J. B.; SHEARER, E. Y. L.; GILES, N. M.; LAI, B.; VOGT, S.; REBOUCAS, J. S.; BATINIC-HABERLE, I.; LAY, P. A.; GILES, G. I. **Intracellular Targeting and Pharmacological Activity of the Superoxide Dismutase Mimics MnTE-2-PyP and MnTnHex-2-PyP Regulated by Their Porphyrin Ring Substituents.** *Inorganic Chemistry*, v. 52, p. 4121-4123, 2013.

ARORA, D. K. **Handbook of Fungal Biotechnology.** Nova Iorque: CRC Press, v. 20, 2004.

ATIF, M.; SYED, A. A. S.; SULTAN, S.; CHOUDHARY, M. I. **Solid phase microbial fermentation of anabolic steroid Dihydrotestosterone with Ascomycete fungus *Fusarium Oxysporum*.** *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, v. 7, p. 106-107, 2015.

BARKER, K. **Na bancada: manual de iniciação científica em laboratórios de pesquisas biomédicas**. Trad. JACKEL, C. M. M. – Porto Alegre: Artmed, 2002.

BATINIĆ-HABERLE, I.; SPASOJEVIĆ I.; STEVENS, R. D.; HAMBRIGHT, P.; FRIDOVICH, I. **Manganese (III) meso-tetrakis(ortho-N-alkylpyridyl)porphyrins synthesis, characterization, and catalysis of O₂⁻ dismutation**. Dalton Full Paper, v. p. 2689-2696, 2002.

BATINIĆ-HABERLE, I.; REBOUÇAS, J. S.; SPASOJEVIĆ I. **Superoxide Dismutase Mimics: Chemistry, Pharmacology and Therapeutic Potential**. *Antioxidants e Redox Signaling*, v. 13, p. 877-918, 2010.

BATINIĆ-HABERLE, I.; CUZZOCREA, S.; FERRER-SUETA, G.; REBOUÇAS, J. S., FERRER-SUETA, G.; MAZZON, E.; PAOLA, R. D.; RADI, R.; SPASOJEVIĆ, I.; BENOVI, L.; SALVEMINI, D. **Pure MnTBAP selectively scavenges peroxynitrite over superoxide: Comparison of pure and commercial MnTBAP samples to MnTE-2-PyP in two models of oxidative stress injury, an SOD-specific *Escherichia coli* model and carrageenan-induced pleurisy**. *Free Radical Biology e Medicine*, v. 46, p. 192–201, 2009a.

BATINIĆ-HABERLE, I.; NDENGELE, M.; CUZZOCREA, S.; REBOUÇAS, J. S.; SPASOJEVIĆ, I.; SALVEMINI, D. **Lipophilicity is a critical parameter that dominates the efficacy of metalloporphyrins in blocking the development of morphine antinociceptive tolerance through peroxynitrite-mediated pathways**. *Free Radical Biology e Medicine*, v. 46, p. 212–219, 2009b.

BERNHARDT, R. **Cytochromes P450 as versatile biocatalysts**. *Journal of Biotechnology*, v. 124, p. 128-145, 2006.

BIROLI, W. G.; FERREIRA, I. M.; ALVARENGA, N.; SANTOS, D. A.; MATOS, I. L.; COMASSETO, J. V.; PORTO, I. L. **Biocatalysis and biotransformation in Brazil: Na overview**. *Biotechnology Advances*, v. 33, p. 481-510, 2015.

BORGES, K.B.; BORGES, W.S.; DURAN-PATRÓN, R.; PUPPO, M.T.; BONATO, P.S. E COLLADO, I.G. **Stereoselective biotransformations using fungi as biocatalysts**. *Tetrahedron: Asymmetry*, v. 20, p.385-397, 2009.

BORODINA, I.; NIELSEN, J. **Advances in metabolic engineering of yeast *Saccharomyces cerevisiae* for production of chemicals.** *Journal of Biotechnology*, v. 9, p. 609–620, 2014.

BUDZIKIEWICZ, H.; DJERASSI, C. E WILLIAMS, D.H. **Strutural elucidation of natural products by mass spectrometry. Volume II: steroids, terpenoids, sugar and miscellaneous classes.** Holden-Day, 1964.

BURTON, S.G. **Oxidizing enzymes as biocatalysts.** *Trends in Biotechnology*, v. 21, p. 543-549, 2003.

CARBELLEIRA, J. D.; ÁLVAEZ, E.; SINISTERRA, J. V. **Biotransformation of cyclohexanone using immobilized *Geotrichum candidum* NCYC49 factors affecting the selectivity of the process.** *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 28, p. 25-32, 2004.

CELESTINO, K. R. S.; CUNHA, R. B.; FELIX, C. R. **Characterization of a β -glucanase produced by *Rhizopus microsporus* var. *microsporus*, and its potential for application in the brewing industry.** *BMC Biochemistry*, v. 7, p. 23, 2006.

CHEN, Y.; DAVIET, L.; SCHALK, M.; SIEWERS, V.; NIELSEN, J. **Establishing a platform cell factory through engineering of yeast acetyl-CoA metabolism.** *Metabolic Engineering*, v.15, p 48–54, 2013.

CHI, Z.; ARNEBORG, N. **Relationship between lipid composition, frequency of ethanolinduced respiratory deficient mutants, and ethanol tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*.** *Journal of Applied Microbiology*, v. 86, p. 1047-1052, 1999.

CHOUDHARY, M.I.; RANJIT, R.; RAHMAN, A.; DEVKOTA, K.P.; MUSHARRAF, S.G. E SHRESTHA, T.M. **Hydroxylation of the sesterterpene leucosceptrine by fungus *Rhizopus stolonifer*.** *Phytochemistry*, v.67, p.439-443, 2006.

CHOUDHARY, M.I.; KHAN, N. T.; MUSHARRAF, S. G.; ANJUM, S.; RAHMAN, A. **Biotransformation of adrenosterone by filamentous fungus, *Cunninghamella elegans*.** *Steroids*, v. 72, p. 923-929, 2007.

CLOUDHARY, M. I.; MOHAMMAND, M. Y.; MUSHARRAF, S. G.; ONAJOBI, I.; MOHAMMAND, A.; ANIS, I.; SHAH, M. R.; RAHMAN, A. **Biotransformation of clerodane diterpenoids by *Rhizopus stolonifer* and antibacterial activity of resulting metabolites.** *Phytochemistry*, v.90, p. 56-61, 2013.

COSTA, V.; REIS, E.; QUINTANILHA, A.; MORADASFERREIRA, P. **Acquisition of Ethanol Tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*: The Key Role of the Mitochondrial Superoxide Dismutase.** *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v. 300, p. 608-614, 1993.

DEMAIN, A.L. E ADRIO, J.L. **Contributions of microorganisms to industrial biology.** *Molecular Biotechnology*, v. 38, p. 41 -55, 2008.

DEMIRJIAN, D.S.; SHAM, P. C.; MORIS-VAS, F. **Biocatalysis-** From Disc. to Appli., v.12, p. 200, 1999.

DIAS, F. R. T.; FERREIRA, V. F.; CUNHA, A. C. **Uma visão geral dos diferentes tipos de catálise em síntese orgânica.** *Revista virtual de química*, v. 4, p 840-871, 2012.

DIAS, M.A.; LACERDA, I.C.A.; PIMENTEL, P.F.; CASTRO, H.F. E ROSA, C.A. **Removal of heavy metal by an *Aspergillus terreus* strain immobilized in a polyurethane matrix.** *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 34, p. 46-50, 2002

ESPINDOLA, A.S.; GOMES, D.S.; PANEK, A.D.; ELEUTHERIO, E.C. **The role of glutathione in yeast dehydration tolerance.** *Cryobiology*, v. 47 p. 236–241, 2003.

FABER, K. **Biotransformations in Organic Chemistry.** 5th ed.; *Shpringer-Verleg: New York*, 2004.

FANG, J.M. **Enzymes in organic synthesis: oxireductions.** *Journal of the Chemical Society*, p. 967-977, 1995.

FRANÇA, M.B.; PANEK, A.D.; ELEUTHERIO, E.C. **Oxidative stress and its effects during dehydration.** *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular Integrative Physiology*, v. 146, p. 621-631, 2007.

GALUN, M.; GALUN, E.; SIEGEL, B.Z.; KELLER, P.; LEHR, H. E SIEGEL, S.M. **Removal of metal ions from aqueous solutions by *Penicillium* biomass: Kinetic and uptake parameters.** *Water, Air and Soil pollution*, v. 33, p. 359-371, 1987.

GIBSON, B.R.; LAWRENCE, S. L.; LECLAIRE, J. P.R.; POWELL, C. D.; SMART, K. A. **Yeast responses to stresses associated with industrial brewery handling.** *FEMS Microbiology Reviews*, v. 31, p. 535–569, 2007.

GIBSON, B. R.; LAWRENCE, S. L.; BOULTON, C. A.; BOX, W. G.; GRAHAM, N. S.; LINFORTH, R. S. T.; SMART, K. A. **The oxidative stress response of a lager brewing yeast strain during industrial propagation and fermentation.** *FEMS Yeast Res.* v. 8, p. 574-585, 2008.

GROSS, Z.; INI, S.; KAPON, M.; COHEN, S. **First utilization of a homochiral ruthenium porphyrin as enantioselective epoxidation catalyst.** *Tetrahedron Letters*, v. 37, p. 7325-7328, 1996.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free Radicals in Biology and Medicine.** Oxford University Press, Oxford, 1999.

HANSON, J. R. **The microbiological transformation of diterpenoids.** *Natural Products Reports*, v.8, p.139-151, 1992.

HIGUCHI, T.; HIROBE, M. **Four recent studies in cytochrome P450 modelings: A stable iron porphyrin coordinated by a thiolate ligand; a robust ruthenium porphyrin-pyridine N-oxide derivatives system; polypeptide-bound iron porphyrin; application to drug metabolism studies.** *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical*, v. 113, p. 403-422, 1996.

HOLLAND, H.L.; WEBER, W.K. **Enzymatic hydroxylation reactions.** *Current Opinion in Biotechnology*, v. 11, p. 547-553, 2000.

KORZEKWA, K.; TRAGER, W.; GOUTERMAN, M.; SPANGLER, D.; LOEW, G. **Cytochrome P450 mediated aromatic oxidation: a theoretical study.** *Journal of the American Chemistry Society*, v. 107, p. 4273-4279, 1985.

KOS, I., BENOVA, L., SPASOJEVIĆ, I., REBOUÇAS, J. S., BATINIĆ-HABERLE, I. **High lipophilicity of meta Mn(III) N-alkylpyridylporphyrin-based superoxide dismutase (SOD) mimics compensates for their lower antioxidant potency and makes them equally effective as ortho analogues in protecting SOD-deficient *E. coli*.** *Journal of Medicinal Chemistry*, v. 52, p.7868–7872, 2009a.

KOS, I., REBOUÇAS, J. S., DEFREITAS-SILVA, G., SALVEMINI, D., VUJASKOVIĆ, Z., DEWHIRST, M. W., SPASOJEVIĆ, I., BATINIĆ-HABERLE, I. **Lipophilicity of potent porphyrin-based antioxidants: Comparison of ortho and meta isomers of Mn(III) N-alkylpyridylporphyrins.** *Free Radical Biology e Medicine*, v.47, p. 72-78, 2009b.

LEI, J.; ZHAO, X.; GE, X.; BAI, F. **Ethanol tolerance and the variation of plasma membrane composition of yeast floc populations with different size distribution.** *Journal Biotechnology*, v. 131, p. 270- 275, 2007.

LI, A. M.; MARTINS, J.; TOVMASYAN, A.; VALENTINE, J. S.; BATINIĆ-HARBELE, I.; SPASOJEVIC, I.; GRALLA, E. B. **Differential Localization and Potency of Manganese Porphyrin Superoxide Dismutase-mimicking Compounds in *Saccharomyces Cerevisiae*.** *Redox Biology*, v.3, p. 1–6, 2014

LIPPARD, S.K.; BERG, J.M. **Principles of bioinorganic chemistry.** Mill Valley: University Scienc Books, 1994.

MADIGAN, M.T.; MARTINKO, J.M.; DUNLAP, P.V.; CLARK, D.P. **Microbiologia de Brock.** 12. ed., Porto Alegre: Artmed, 2010.

MARTINS, L. R. **Avaliação do potencial biotecnológico de fungos brasileiros em reações de biotransformações e biorremediação.** Tese de doutorado, UFMG, 2009.

NAKAMURA, K.; YAMANAKA, MATSUDA, T.; HARADA, T. **Recent developments in asymmetric reduction of ketones with biocatalys.** *Tetrahedron: Asymmetry*, v. 14, p. 2659–2681, 2003.

NEVES, M. L. C.; SILVA, M. F.; SOUZA-MOTTA, C. M.; SPIER, M. R.; SOCCOL, C. R.; PORTO, T. S.; MOREIRA, K. A.; PORTO, A. L. F. ***Lichtheimia blakesleeana* as a New Potencial Producer of Phytase and Xylanase.** *Molecules*, v. 16 p. 4807-4817, 2011.

NEVOIGT, E. **Progress in metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae*.** *Microbiology and Molecular Biology*, v.73, p. 379–412, 2008.

OBERLEY-DEEGAN, R.; STEFFAN, J. J.; ROVE. K.O.; PATE, K. M.; WEAVER, M. W.; SPASOJEVIC, I.; FREDERICK, B.; RABEN, D.; MEACHAM, R. B.; CRAPO, J. D.; KOUL, H. K. **The Antioxidant, MnTE-2-PyP, Prevents Side-Effects incurred by Prostate Cancer Irradiation.** *PLoS One*; v. 7, 2012.

PANKE, S. **Engineering of a stable whole-cell biocatalyst capable of (S)-styrene oxide formation for continuous two-liquid phase applications.** *Applied Microbiology Biotechnology*, v. 65, p. 5619-5923, 1999.

PATEL, R.N. **Synthesis of chiral pharmaceutical intermediates by biocatalysis.** *Coordination Chemistry Reviews*, v. 252, p. 659-701, 2008.

PEREIRA, M. D.; ELEUTHEIRIO, E. C.; PANEK, A. D. **Acquisition of tolerance against oxidative damage in *saccharomyces cerevisiae*.** *BMC Microbiology*, Disponível em: <http://www.biomedcentral.com/1471-2180/1/11>. Acessado em: 26/07/2015.

PÉREZ-TORRADO, R.; GÓMEZ-PASTOR, R.; LARSSON, C.; MATAALLANA, E. **Fermentativa capacity of dry active wine yeast requires a specific oxidative stress**

response during industrial biomass growth. *Applied Microbiology Biotechnology*, v.81, p. 951-960, 2009.

PEIXOTO, I. N.; MELO, K. L.M.; VALE, J. A; REBOUÇAS, J. S. **Oxidação Baeyer-Villiger da ciclohexanona a ϵ -caprolactona utilizando *Geotrichum candidum*** 36ª Reunião Anual da SBQ, 2013, CAT-001.

PINEDO-RIVILLA, C.; CAFÊU, M. C.; CASATEJADA, J. A.; ARAUJO, Â. R.; COLLADO, I. G. **Asymmetric microbial reduction of ketones: absolute configuration of *trnas*-4-ethyl-1-(1S-Hydroxyethyl)cyclohexanol.** *Tetrahedron: Asymmetry*, v. 20, p. 2666-2672, 2009.

PINTO, V. H. A. **Mn(III)-porfirinas como catalisadores biomiméticos : estabilidade térmica e imobilização em vermiculita e sílica gel funcionalizada para hidroxilação de alcanos.** Tese de doutorado, UFPB, 2013.

PIOVAN, L.; KAGOHARA, E.; RICCI, L. C.; KEPPLER, A. F.; CAPELARI, M.; ANDRADE, L. H.; COMASSETO, J. V.; PORTO, A.L.M. **Chemoselective screening for the reduction of a chiral functionalized ($\pm$) - 2- (phenylthio)cyclohexanone by whole cells of Brazilian micro-organisms.** *Tetrahedron: Asymmetry*, v. 19, p. 2385-2389, 2008.

PIZARRO, F. J.; JEWETT, M. C.; NIELSEN, J.; AGOSIN, E. **Growth temperature exerts differential physiological and transcriptional responses in laboratory and wine strains of *Saccharomyces cerevisiae*.** *Applied and Environmental Microbiology*, v. 74, p. 6358-6368, 2008.

POLLARD, J. M.; REBOUÇAS, J. S.; DURAZO, A.; KOS, I.; FIKE, F.; PANNI, M.; GRALLA, E. B.; VALENTINE, J. S.; BATINIĆ-HARBELE, I.; GATTI, R. A. **Radioprotective Effects of Manganese-containing Superoxide Dismutase Mimics on Ataxia- telangiectasia Cells.** *Free Radical Biology and Medicine*, v. 47, p. 250–260, 2009.

POTTS, M. **Desiccation Tolerance of Prokaryotes.** *Microbiology*, v. 58, p. 755-805, 1994.

PUYANG, X.; AN, M.; HAN, L.; ZHANG, X. **Protective effect of spermidine on salt stress induced oxidative damage in two Kentucky bluegrass (*Poa pratensis* L.) Cultivars.** *Ecotoxicology and Environmental safety*, v. 117, p. 96-106, 2015.

REBOUÇAS, J. S.; SPASOJEVIC. I.; BATINIĆ-HABERLE, I. **Pure manganese(III) 5,10,15,20-tetrakis(4-benzoic acid)porphyrin (MnTBAP) is not a superoxide dismutase mimic in aqueous systems: a case of structure–activity relationship as a watchdog mechanism in experimental therapeutics and biology.** *Journal Biological Inorganic Chemistry*, v. 13, p.289–302, 2008a.

REBOUÇAS, J. S.; SPASOJEVIC. I.; BATINIĆ-HABERLE, I. **Quality of potent Mn porphyrin-based SOD mimics and peroxynitrite scavengers for pre-clinical mechanistic/therapeutic purposes.** *Journal of Pharmaceutical Biomedical Analysis*, v. 48, p.1046–1049, 2008b.

REBOUÇAS, J. S.; SPASOJEVIĆ, I.; TJAHJONO, D.H.; RICHAUD, A.; MENDEZ, F.; BENOVIĆ, L.; BATINIĆ-HARBELE, I. **Redox modulation of oxidative stress by Mn porphyrin-based therapeutics: The effect of charge distribution.** *Dalton Transactions*, p. 1233-1242, 2008c

REBOUÇAS, J.S.; SPASOJEVIĆ, I.; BATINIĆ-HARBELE, I. **Quality of potent Mn porphyrin-based SOD mimics and peroxynitrite scavengers for pre-clinical mechanistic/therapeutic purposes.** *Journal of Pharmaceutical Biomedical Analysis*, v. 48, p. 1046-1049, 2008d.

REBOUÇAS J.S.; DE CARVALHO, M. E.; M. D., IDEMORI; Y. M. **Perhalogenated 2-pyridylporphyrin complexes: synthesis, self-coordinating aggregation properties, and catalytic studies.** *Journal Porphyrins Phthalocyanines*, v. 6, p. 50-57, 2002.

REBOUÇAS, J. S.; KOS, I.; VUJASKOVIC, Z.; BATINIĆ-HABERLE, I. **Determination of residual manganese in Mn porphyrin-based superoxide dismutase (SOD) and peroxynitrite reductase mimics.** *Journal of Pharmaceutical Biomedical Analysis* v. 50, p. 1088-1091, 2009.

RIBEIRO, J. S.; LIMA, A. B.; CUNHA, P. C.; WILLADINO, L.; CÂMARA, T. R. **O estresse abiótico em regiões semiáridas: respostas metabólicas das plantas.** IN: MOURA, A. N.; ARAÚJO, E. L.; ALBUQUERQUE, U. P. (Orgs.) **Biodiversidade, potencial econômico e processos eco- fisiológicos em ecossistemas nordestinos**, Recife: Comunigraf., p. 361, 2007.

SCHEWE, H.; KAUP, B-A.; SCHRADER, J. **Improvement of P450_{BM-3} whole-cell biocatalysis by integrating heterologous cofactor regeneration combining glucose facilitator and dehydrogenase in *E. coli*.** *Appl Microbiol Biotechnol* v. 78, p. 55-65, 2008.

SCHULZE, B.; WUBOOLTS, M.G. **Biocatalyses for industrial production of the chemical.** *Current Opinion Biothechnology*, v. 10, p. 609-615, 1999.

SILVEIRA, J. A. G.; SILVA, S. L. F.; SILVA, E. N.; VIÉGAS, R. A. **Mecanismos biomoleculares envolvidos com a resistência ao estresse salino em plantas.** *Manejo da salinidade na agricultura* 1999: Estudos básicos e aplicados. p. 168-185, 2010.

SINGH, J.; KUMAR, D.; RAMAKRISHNAN, N.; SINGHAL, V.; JERVIS, J.; GARST, J.F.; SLAUGHTER S.M.; DESANTIS, A.M.; POTTS, M.; HELM, R.F. **Transcriptional Response of *Saccharomyces cerevisiae* to Desiccation and Rehydration.** *Applied Environmental Microbiology*, v. 71, p. 8752-8763, 2005.

STRAUSS, U.T.; FELFER, U.; FABER, K. **Biocatalytic transformation os racemates into chiral building blocks in 100% chemical yield and 100% enantiomeric excess.** *Tetrahedron: Asymmetry*, v. 10, p. 107, 1999.

TORRELO, G.; HANEFELD, U.; HOLLMAN, F. **Biocatalysis.** *Catal Lett*, v. 145, p. 309-345, 2015.

TORTORA, G. J.; FUNKR, B.R.; CASE, C.L.; **Microbiologia.** 10 ed. Porto Alegre Artmed, 2012.

TÜRKEL, S.; TURGUT, T. **Analysis of the Effects of Hyperosmotic Stress on the Derepression of Invertase Activities and the Growth of Different Baker's Yeast Strains.** *Turk. Journal Biology*, v. 26, p. 155-161, 2002.

VASCONCELOS, S. M. N.; GOULART, M. O. F.; MOURA, J. B. F.; MANFREDINI, V.; BENFATO, M. S.; KUBOTA, L. T. **Espécies Reativas de Oxigênio e de Nitrogênio, Antioxidantes e Marcadores de Dano Oxidativo em Sangue Humano: Principais Métodos Analíticos para sua Determinação.** *Química Nova*, v. 30, p. 1323-1338, 2007.

VALENTINE, J. S.; WERTZ D. L.; LYONS T.J.; LIOU L.; GOTO J. J.; GRALLA E. B.; **The dark side of dioxygen biochemistry.** *Curr. Opin. Chemistry Biology*, v. 2, p. 253-262, 1998.

VIANA, S. B. A.; FERNANDES, P. D.; GHEYI, H. R.; SOARES, F. A. L.; CARNEIRO, P. T. **Índices morfofisiológicos e Índices morfofisiológicos e de produção de alface sob estresse salino de produção de alface sob estresse salino,** *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola Ambiental*, Campina Grande, v.8, p.23-30, 2002.

VILLA, R.; ROMANO, A.; GANDOLFI, R.; GAGO, J. V. S.; MOLINARI, F. **Chemoselective oxidation of primary alcohols to aldehydes with *Gluconobacter oxydans*.** *Tetrahedron Letters*, v. 43, p. 6059-6061, 2002.

WAGNER, U.G.; PATTRIDGE, K.A.; LUDWIG, M.L.; STALLINGS, W.C.; WERBER, M.M.; OEFNER, C.; FROLOW, F.; SUSSMAN, J.L. **Comparison of the crystal structure of genetically engineered human manganese superoxide dismutase and manganese superoxide dismutase from *Thermus thermophilus*: Differences in dimer-dimer interactions.** *Protein Science*, v. 2, p. 814-825, 1993.

YUN, J. E.; KWAK, S.; KIN, S.R.; PARK, Y-C.; JIN, Y-S.; KIN, K. H. **Production of (S)-3-hydroxybutyrate by metabolically engineered *Saccharomyces cerevisiae*.** *Journal Biotechnology*, v. 209, p. 23–30, 2015.

Apêndices

Apêndice I

Dados de Biomassa dos isolados *R. microsporus*, *R. stolonifer* e *L. blaskeleeana* obtidos em meio Sabouraud

Tabela 1 - Biomassa de *R. microsporus* em tempos específicos de cultivo em meio Sabouraud

Tempo(h)	pH Controle	pH Meio	Biomassa(g)
21	5,52	5,54	0,018
21	5,52	5,54	0,025
25	5,50	5,47	0,050
25	5,50	5,47	0,042
29	5,53	5,39	0,044
29	5,53	5,39	0,072
33	5,55	5,36	0,079
33	5,55	5,36	0,079
45	5,43	5,20	0,122
45	5,43	5,20	0,179
50	5,44	5,12	0,170
50	5,44	5,12	0,196
54	5,56	4,94	0,228
54	5,56	4,94	0,217
57	5,51	4,73	0,285
57	5,51	4,73	0,239
69	5,49	4,61	0,346
69	5,49	4,61	0,377
74	5,47	4,45	0,439
74	5,47	4,45	0,399

Tabela 2 - Biomassa de *L. blakesleeana* em tempos específicos de cultivo em meio *Sabouraud*

Tempo(h)	pH Controle	pH Meio	Biomassa(g)
21	5,52	5,36	0,071
21	5,52	5,44	0,058
25	5,50	5,30	0,094
25	5,50	5,16	0,105
29	5,53	5,08	0,105
29	5,53	4,95	0,129
33	5,55	4,87	0,150
33	5,55	4,81	0,162
45	5,43	4,30	0,277
45	5,43	4,28	0,275
50	5,44	4,20	0,278
50	5,44	4,16	0,329
54	5,56	4,08	0,354
54	5,56	4,13	0,350
57	5,51	4,05	0,358
57	5,51	4,10	0,274
69	5,49	4,08	0,401
69	5,49	4,10	0,420
74	5,47	3,89	0,461
74	5,47	3,82	0,513

Tabela 3 - Biomassa de *R. stolonifer* em tempos específicos de cultivo em meio *Sabouraud*.

Tempo(h)	pH Controle	pH Meio	Biomassa(g)
23	5,52	5,64	0,012
23	5,52	5,62	0,011
28	5,50	5,57	0,036
28	5,50	5,41	0,037
33	5,53	5,22	0,051
33	5,53	5,19	0,053
46	5,55	4,42	0,142
46	5,55	4,58	0,140
51	5,43	3,45	0,159
51	5,43	3,58	0,162
69	5,44	3,11	0,182
69	5,44	3,10	0,164
74	5,56	3,09	0,195
74	5,56	3,13	0,189
79	5,51	3,01	0,203
79	5,51	3,20	0,208

Apêndice II

Tabela 4- Efeitos da rotação e número de unidades formadoras de colônia no crescimento do fungo *R. stolonifer*.

Rotação por minuto	UFC/ Unidade formadora de colônia	Biomassa	Média	Desvio P.
160	4000	0,307	0,2995	0,0195
160	4000	0,264		
160	4000	0,297		
160	4000	0,279		
160	4000	0,300		
160	4000	0,350		
200	4000	0,274	0,262	0,01533
200	4000	0,275		
200	4000	0,258		
200	4000	0,252		
200	4000	0,283		
200	4000	0,230		
160	2000	0,235	0,237	0,00883
160	2000	0,217		
160	2000	0,240		
160	2000	0,250		
160	2000	0,270		
160	2000	0,300		
200	2000	0,231	0,276	0,0505
200	2000	0,331		
200	2000	0,291		
200	2000	0,359		
200	2000	0,250		
200	2000	0,197		
160	9000	0,286	0,278	0,04152
160	9000	0,231		
160	9000	0,256		
160	9000	0,245		
160	9000	0,375		
200	9000	0,264	0,232	0,04336
200	9000	0,180		
200	9000	0,310		
200	9000	0,230		
200	9000	0,180		

Apêndice III
 Dados de biomassa fungo *R. stolonifer* em microplaca salinidade

Tabela 5 - Biomassa do *R. stolonifer* em microplaca, com 72 horas de crescimento, sob incubação de 28 °C e 160 rpm.

Concentração NaCl (mmol/L)	Biomassa (mg)				Desvio padrão
	Massa 1	Massa 2	Massa 3	Média	
5	2,87	3,56	3,83	3,42	0,495
67	3,05	2,86	2,77	2,89	0,142
130	5,99	5,66	4,59	5,41	0,731
250	3,61	3,96	4,46	4,01	0,427
300	3,19	3,80	4,09	3,69	0,459
400	2,59	2,88	2,60	2,69	0,164
500	2,11	2,21	2,19	2,17	0,052
750	1,13	1,11	1,48	1,24	0,208
1000	0	0	0	0	-----

Apêndice IV

Dados de biomassa fungo *R. stolonifer* em meio submerso com salinidade

Tabela 6 - Biomassa do *R. stolonifer* em meio submerso, com 72 horas de crescimento, sob incubação de 28 °C e 160 rpm.

Concentração NaCl (mmol/L)	Biomassa (g)				Desvio padrão
	Massa 1	Massa 2	Massa 3	Média	
3	0,187	0,199	0,178	0,188	0,0105
100	0,166	0,177	0,170	0,171	0,0055
200	0,192	0,147	0,165	0,168	0,0226
300	0,142	0,121	0,100	0,121	0,0210
400	0,100	0,080	0,098	0,092	0,0110
500	0,108	0,144	0,150	0,134	0,0227
600	0,050	0,053	0,057	0,053	0,0035
700	0,053	0,041	0,044	0,046	0,0062
800	0,052	0,030	0,050	0,044	0,0121
900	0,038	0,042	0,041	0,040	0,0020
1000	0,033	0,027	0,036	0,032	0,0045

pH Controle	pH Meio		
5,26	3,30	3,33	3,35
5,10	3,46	3,27	3,38
5,12	3,66	3,85	3,78
5,08	4,01	4,06	4,10
5,04	4,04	4,41	4,23
5,01	4,33	4,28	4,48
5,02	4,90	5,50	5,10
5,00	5,00	4,9	5,22
4,98	5,18	5,11	5,22
5,03	5,03	5,14	5,13
4,97	5,28	5,22	5,27

Apêndice V

Tabela 7- Dados de biomassa do Fungo *R. stolonifer* em microplaca MnTE-2-PyP⁵⁺ salinidade de 5 e 500 mmol L⁻¹ de NaCl

Concentração MnTE-2-PyP ₅ (μmol L ⁻¹)	SALINIDADE (mmol L ⁻¹) de NaCl	Biomassa (mg)			
		Massa 1	Massa 2	Massa 3	Média
50	5	3,90	3,98	5,01	4,29
5	5	5,15	5,50	4,00	3,96
0,5	5	3,98	4,35	3,55	4,88
0,005	5	4,25	3,90	4,61	4,29
0	5	4,90	4,91	4,55	4,32
50	500	1,92	2,31	3,00	2,41
5	500	2,56	3,16	1,71	2,47
0,5	500	2,80	2,30	3,00	2,70
0,005	500	2,80	2,88	1,50	2,39
0	500	2,80	2,66	2,69	2,73

Tabela 8- Dados de biomassa fungo *R. stolonifer* em microplaca MnTnHex-2-PyP⁵⁺ salinidade de 5 e 500 mmol L⁻¹ de NaCl.

Concentração MnTnHex-2-PyP ₅ (μmol L ⁻¹)	SALINIDADE (mmol L ⁻¹) de NaCl	Biomassa (mg)			
		Massa 1	Massa 2	Massa 3	Média
5	5	4,02	3,02	4,04	3,81
0,5	5	4,17	5,32	4,14	4,54
0,005	5	4,67	3,90	4,35	4,30
0,001	5	3,55	4,15	4,85	4,18
0	5	4,90	4,99	4,55	4,81
5	500	3,00	2,20	2,90	2,70
0,5	500	3,00	2,28	2,03	2,43
0,005	500	1,95	2,02	2,18	2,05
0,001	500	3,00	3,20	2,80	3,00
0	500	2,80	2,66	2,69	2,71

Apêndice VI

Tabela 9- Dados de biomassa e pH do fungo do *R. stolonifer* em meio submerso MnTE-2-PyPCl₅, concentração salina de 3 e 250 mmol L⁻¹ de NaCl.

Concentração MnTE-2-PyPCl ₅ (μmol L ⁻¹)	SALINIDADE (mmol L ⁻¹) de NaCl	Biomassa (g)			
		Massa 1	Massa 2	Massa 3	Média
5	3	0,242	0,191	0,227	0,220
0,5	3	0,204	0,181	0,281	0,222
0,05	3	0,218	0,245	0,264	0,242
0,005	3	0,198	0,199	0,224	0,206
0,0005	3	0,263	0,199	0,163	0,208
0	3	0,300	0,280	0,360	0,313
5	250	0,098	0,099	0,128	0,108
0,5	250	0,122	0,135	0,177	0,144
0,05	250	0,067	0,133	0,131	0,110
0,005	250	0,070	0,113	0,137	0,106
0,0005	250	0,080	0,193	0,120	0,131
0	250	0,155	0,150	0,135	0,146

Concentração MnTE-2-PyPCl ₅ (μmol L ⁻¹)	SALINIDADE (mmol L ⁻¹) de NaCl	pH		
		pH	pH	pH
5	3	4,61	4,35	4,78
0,5	3	4,38	4,66	4,58
0,05	3	4,87	4,53	4,86
0,005	3	4,65	4,76	4,92
0,0005	3	4,45	4,67	4,98
0	3	4,68	4,77	4,63
5	250	4,98	5,03	4,96
0,5	250	4,88	4,97	4,87
0,05	250	5,01	4,98	5,10
0,005	250	4,96	4,75	5,09
0,0005	250	4,85	5,30	4,70
0	250	5,04	4,92	4,95

Apêndice VII

Dados estatísticos

MnTE-2-PyP⁵⁺ meio submerso concentração salina de 3 e 250 mmol L⁻¹ de NaCl

Tabela 10- Teste ANOVA do efeito da salinidade na produção de biomassa:

Com nível de significância adotado foi $p < 0,05$.

Significância $p < 0,05$

Significância da Salinidade

ANOVA

Biomassa

	Soma dos quadrados	Df	Mean Square	F	Sig.
Entre os grupos	0,097	1	0,097	74,802	0,000
Dentro do grupo	0,044	34	0,001		
Total	0,141	35			

Tabela 11- Teste ANOVA do efeito da MnTE-2-PyP⁵⁺ na produção de biomassa:

O nível de significância adotado foi $p < 0,05$.

Significância $p > 0,05$

Significância da Mn-Pofirina

ANOVA

Biomassa

	Soma dos Quadrados	Df	Mean Square	F	Sig.
Entre os grupos	0,010	5	0,002	0,471	0,795
Dentro do grupo	0,131	30	0,004		
Total	0,141	35			

Tabela 12- Verificação da influência entre fatores de biomassa (comparação entre médias)
Controles sem salinidades e com MnTE-2-PyP⁵⁺, todos mostraram $p < 0,05$

Legenda:

Biomassa 1- Sem sal e sem porfirina

Biomassa 2- Sem sal e com porfirina 0,5 nmol L⁻¹

Biomassa 3- Sem sal e com porfirina 5,0 mol L⁻¹

Biomassa 4- Sem sal e com porfirina 0,05 µmol L⁻¹

Biomassa 5- Sem sal e com porfirina 0,5 µmol L⁻¹

Biomassa 5- Sem sal e com porfirina 5,0 µmol L⁻¹

Paired Samples Test

		Paired Differences					T	Df	Sig. (2-tailed)
		Significado	Std. Derivação	Std. Erro	95% de confiança no interval de Diferença				
					Lower	Upper			
Pair 1	Biomassa1 - Biomassa2	0,06366667	0,0789263	0,04556802	-0,1323967	0,25973000	1,397	2	0,297
Pair 2	Biomassa1 - Biomassa3	0,06533333	0,0472581	0,02728451	-0,0520624	0,18272910	2,395	2	0,139
Pair 3	Biomassa1 - Biomassa4	0,02966667	0,0551936	0,03186604	-0,1074418	0,16677517	0,931	2	0,450
Pair 4	Biomassa1 - Biomassa5	0,05000000	0,0822860	0,04750789	-0,1544099	0,25440997	1,052	2	0,403
Pair 5	Biomassa1 - Biomassa6	0,05200000	0,0575065	0,03320141	-0,0908541	0,19485412	1,566	2	0,258
Pair 6	Biomassa2 - Biomassa3	0,00166667	0,0370045	0,02136456	-0,0902576	0,09359095	0,078	2	0,945
Pair 7	Biomassa2 - Biomassa4	-0,03400000	0,0425323	0,02455606	-0,1396561	0,07165619	-1,385	2	0,300
Pair 8	Biomassa2 - Biomassa5	-0,01366667	0,0075055	0,00433333	-0,0323115	0,00497816	-3,154	2	0,088
Pair 9	Biomassa2 - Biomassa6	-0,01166667	0,0457857	0,02643441	-0,1254047	0,10207140	-0,441	2	0,702
Pair 10	Biomassa3 - Biomassa4	-0,03566667	0,0140119	0,00808977	-0,0704741	-0,00085918	-4,409	2	0,048
Pair 11	Biomassa3 - Biomassa5	-0,01533333	0,0378725	0,02186575	-0,1094140	0,07874740	-0,701	2	0,556
Pair 12	Biomassa3 - Biomassa6	-0,01333333	0,0184481	0,01065103	-0,0591610	0,03249435	-1,252	2	0,337
Pair 13	Biomassa4 - Biomassa5	0,02033333	0,0408697	0,02359614	-0,0811926	0,12185933	0,862	2	0,480
Pair 14	Biomassa4 - Biomassa6	0,02233333	0,0045092	0,00260342	0,0111317	0,03353493	8,578	2	0,013
Pair 15	Biomassa5 - Biomassa6	0,00200000	0,0435545	0,02514624	-0,1061955	0,11019553	0,080	2	0,944

Tabela 13- Verificação da influência entre fatores de biomassa:

Controles sem salinidades e com MnTE-2-PyP⁵⁺, todos os controles com a porfirina e com sal mostraram $p < 0,05$ todas as comparações entre o controle Biomassa 1 com as demais biomassas obtiveram $p < 0,05$.

Legenda:

Biomassa 1- Sem sal e sem porfirina

Biomassa 2- com sal e sem porfirina

Biomassa 3- Com sal e com porfirina 0,5 nmol L⁻¹Biomassa 4- Sem sal e com porfirina 5,0 nmol L⁻¹Biomassa 5- Sem sal e com porfirina 0,05 µmol L⁻¹Biomassa 6- Sem sal e com porfirina 0,5 µmol L⁻¹Biomassa 7- Sem sal e com porfirina 5,0 µmol L⁻¹

Paired Samples Test

		Paired Differences					T	Df	Sig.
		Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean	95% de confiança no intervalo				
					de diferença				
					Lower	Upper			
Pair 1	Biomassa1 - Biomassa2	0,1253333	0,0340636	0,0196666	0,0407145	0,2099521	6,373	2	0,024
Pair 2	Biomassa1 - Biomassa3	0,1410000	0,0295127	0,0170391	0,0676863	0,2143136	8,275	2	0,014
Pair 3	Biomassa1 - Biomassa4	0,1653333	0,0655159	0,0378256	0,0025828	0,3280838	4,371	2	0,049
Pair 4	Biomassa1 - Biomassa5	0,1616666	0,0541971	0,0312907	0,0270334	0,2962999	5,167	2	0,035
Pair 5	Biomassa1 - Biomassa6	0,1273333	0,0438900	0,0253399	0,0183044	0,2363621	5,025	2	0,037
Pair 6	Biomassa2 - Biomassa3	0,0156666	0,0540030	0,0311787	-0,1184844	0,1498177	0,502	2	0,665
Pair 7	Biomassa2 - Biomassa4	0,0400000	0,0392300	0,0226495	-0,0574529	0,1374529	1,766	2	0,219
Pair 8	Biomassa2 - Biomassa5	0,0363333	0,0274651	0,0158570	-0,0318938	0,1045605	2,291	2	0,149
Pair 9	Biomassa2 - Biomassa6	0,0020000	0,0391535	0,0226053	-0,0952627	0,0992627	0,088	2	0,938
Pair 10	Biomassa3 - Biomassa4	0,0243333	0,0912432	0,0526793	-0,2023275	0,2509941	0,462	2	0,690
Pair 11	Biomassa3 - Biomassa5	0,0206666	0,0621637	0,0358902	-0,1337566	0,1750900	0,576	2	0,623
Pair 12	Biomassa3 - Biomassa6	-0,0136666	0,0733303	0,0423372	-0,1958292	0,1684959	-0,323	2	0,777
Pair 13	Biomassa4 - Biomassa5	-0,0036666	0,0551392	0,0318346	-0,1406400	0,1333067	-0,115	2	0,919
Pair 14	Biomassa4 - Biomassa6	-0,0380000	0,0351567	0,0202977	-0,1253343	0,0493343	-1,872	2	0,202
Pair 15	Biomassa5 - Biomassa6	-0,0343333	0,0659570	0,0380803	-0,1981797	0,1295130	-0,902	2	0,462
Pair 16	Biomassa1 - Biomassa7	0,1636666	0,0493389	0,0284858	0,0411018	0,2862314	5,746	2	0,029
Pair 17	Biomassa2 - Biomassa7	0,0383333	0,0176162	0,0101707	-0,0054279	0,0820946	3,769	2	0,064
Pair 18	Biomassa3 - Biomassa7	0,0226666	0,0715145	0,0412889	-0,1549853	0,2003187	0,549	2	0,638
Pair 19	Biomassa4 - Biomassa7	-0,0016666	0,0229419	0,0132455	-0,0586576	0,0553243	-0,126	2	0,911
Pair 20	Biomassa5 - Biomassa7	0,0020000	0,0335111	0,0193477	-0,0812464	0,0852464	0,103	2	0,927
Pair 21	Biomassa6 - Biomassa7	0,0363333	0,0370720	0,0214035	-0,0557586	0,1284252	1,698	2	0,232

Anexo VIII

Tabela 14- Dados de biomassa e pH do fungo do *R. stolonifer* em meio Submerso MnTnHex-2-PyPCl₅, concentração salina 3 e 250 mmol L⁻¹.

Concentração MnTnHex-2-PyPCl ₅ (μmol L ⁻¹)	SALINIDADE (mmol L ⁻¹) De NaCl	Biomassa (g)			
		Massa 1	Massa 2	Massa 3	Média
5	3	0,258	0,215	0,258	0,236
0,5	3	0,177	0,169	0,210	0,185
0,05	3	0,175	0,192	0,181	0,182
0,005	3	0,190	0,178	0,218	0,195
0,0005	3	0,240	0,238	0,164	0,214
0	3	0,300	0,280	0,236	0,272
5	250	0,128	0,116	0,071	0,105
0,5	250	0,270	0,133	0,207	0,203
0,05	250	0,130	0,153	0,087	0,123
0,005	250	0,080	0,089	0,099	0,089
0,0005	250	0,158	0,103	0,103	0,121
0	250	0,150	0,155	0,135	0,146

Concentração MnTnHex-2-PyPCl ₅ (μM)	SALINIDADE (mmol L ⁻¹) De NaCl			
		pH	pH	pH
5	3	4,71	4,81	4,31
0,5	3	4,66	4,66	4,32
0,05	3	4,30	4,55	4,45
0,005	3	4,21	4,39	4,26
0,0005	3	4,38	4,31	4,49
0	3	4,29	4,18	4,71
5	250	5,05	4,99	4,89
0,5	250	4,98	5,30	4,85
0,05	250	4,97	4,67	4,84
0,005	250	5,01	4,86	5,02
0,0005	250	4,98	4,92	5,31
0	250	4,89	5,10	4,93

Apêndice IX

Dados estatísticos

MnTnHex-2-PyP⁵⁺ meio submerso

Tabela 15- Teste ANOVA do efeito da salinidade na produção de biomassa:

O nível de significância adotado foi $p < 0,05$.

Significância $p < 0,05$

Significância da Salinidade

ANOVA

Biomassa

	Soma dos quadrados	Df	Mean Square	F	Sig.
Entre o grupo	0,024	1	0,024	10,061	0,004
Dentro do grupo	0,066	28	0,002		
Total	0,090	29			

Tabela 16- Teste ANOVA do efeito da MnP na produção de biomassa:

O nível de significância adotado foi $p < 0,05$.

Significância $p > 0,05$

Significância Mn-pofirina

ANOVA

Biomassa

	Soma dos quadrados	Df	Mean Square	F	Sig.
Entre o grupo	0,026	5	0,005	1,932	0,126
Dentro do grupo	0,064	24	0,003		
Total	0,090	29			

Tabela 17- Verificação da influência entre fatores de biomassa:Controles sem salinidades e com MnTnHex-2-PyP⁵⁺, todos mostraram $p < 0,05$

Legenda:

Biomassa 1- Sem sal e sem porfirina

Biomassa 2- Sem sal e com porfirina 0,5 nmol L⁻¹Biomassa 3- Sem sal e com porfirina 5,0 nmol L⁻¹Biomassa 4- Sem sal e com porfirina 0,05 µmol L⁻¹Biomassa 5- Sem sal e com porfirina 0,5 µmol L⁻¹Biomassa 5- Sem sal e com porfirina 5,0 µmol L⁻¹

Paired Samples Test

		Paired Differences					T	df	Sig. (2-tailed)
		Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean	95% Confidence Interval of the Difference				
					Lower	Upper			
Pair 1	Biomassa1 - Biomassa2	0,0186667	0,0633193	0,0365574	-0,1386271	0,1759605	0,511	2	0,660
Pair 2	Biomassa1 - Biomassa3	0,0313333	0,0425245	0,0245515	-0,0743033	0,1369700	1,276	2	0,330
Pair 3	Biomassa1 - Biomassa4	0,0286667	0,0647327	0,0373734	-0,1321384	0,1894718	0,767	2	0,523
Pair 4	Biomassa1 - Biomassa5	-0,0136667	0,0696586	0,0402174	-0,1867084	0,1593751	-0,340	2	0,766
Pair 5	Biomassa1 - Biomassa6	0,0513333	0,0345301	0,0199360	-0,0344443	0,1371110	2,575	2	0,123
Pair 6	Biomassa2 - Biomassa3	0,0126667	0,0255799	0,0147685	-0,0508774	0,0762107	0,858	2	0,481
Pair 7	Biomassa2 - Biomassa4	0,0100000	0,0101488	0,0058594	-0,0152112	0,0352112	1,707	2	0,230
Pair 8	Biomassa2 - Biomassa5	-0,0323333	0,0075055	0,0043333	-0,0509786	-0,0136880	-7,462	2	0,017
Pair 9	Biomassa2 - Biomassa6	0,0326667	0,0820020	0,0473439	-0,1710376	0,2363711	0,690	2	0,562
Pair 10	Biomassa3 - Biomassa4	-0,0026667	0,0232450	0,0134205	-0,0604106	0,0550772	-0,199	2	0,861
Pair 11	Biomassa3 - Biomassa5	-0,0450000	0,0298161	0,0172143	-0,1190673	0,0290673	-2,614	2	0,120
Pair 12	Biomassa3 - Biomassa6	0,0200000	0,0565597	0,0326547	-0,1205020	0,1605020	0,612	2	0,603
Pair 13	Biomassa4 - Biomassa5	-0,0423333	0,0081445	0,0047022	-0,0625654	-0,0221012	-9,003	2	0,012
Pair 14	Biomassa4 - Biomassa6	0,0226666	0,0791475	0,0456958	-0,1739467	0,2192800	0,496	2	0,669
Pair 15	Biomassa5 - Biomassa6	0,0650000	0,0862786	0,0498129	-0,1493279	0,2793279	1,305	2	0,322

Tabela 18- Verificação da influência entre fatores de biomassa:

Controles sem salinidades e com MnTnHex-2-PyP⁵⁺, todos os controles com a porfirina e com sal mostraram $p < 0,05$ todas as comparações entre o controle Biomassa 1 com as demais biomassas obtiveram $p < 0,05$.

Legenda:

Biomassa 1- Sem sal e sem porfirina

Biomassa 2- com sal e sem porfirina

Biomassa 3- Com sal e com porfirina 0,5 nmol L⁻¹

Biomassa 4- Sem sal e com porfirina 5,0 nmol L⁻¹

Biomassa 5- Sem sal e com porfirina 0,05 µmol L⁻¹

Biomassa 6- Sem sal e com porfirina 0,5 µmol L⁻¹

Biomassa 7- Sem sal e com porfirina 5,0 µmol L⁻¹

Paired Samples Test

		Paired Differences					t	df	Sig. (2-tailed)
		Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean	95% Confidence Interval of the Difference				
					Lower	Upper			
Pair 1	Biomassa1 - Biomassa2	0,0673333	0,0474798	0,0274124	-0,0506130	0,18527975	2,456	2	0,133
Pair 2	Biomassa1 - Biomassa3	0,0830000	0,0375100	0,0216564	-0,0101800	0,17618000	3,833	2	0,062
Pair 3	Biomassa1 - Biomassa4	0,1073333	0,0725281	0,0418741	-0,0728365	0,28750326	2,563	2	0,124
Pair 4	Biomassa1 - Biomassa5	0,1036666	0,0700095	0,0404200	-0,0702466	0,27757996	2,565	2	0,124
Pair 5	Biomassa1 - Biomassa6	0,0693333	0,0438444	0,0253135	-0,0395822	0,17824892	2,739	2	0,111
Pair 6	Biomassa2 - Biomassa3	0,0156666	0,0540030	0,0311787	-0,1184844	0,14981777	0,502	2	0,665
Pair 7	Biomassa2 - Biomassa4	0,0400000	0,0392300	0,0226495	-0,0574529	0,13745295	1,766	2	0,219
Pair 8	Biomassa2 - Biomassa5	0,0363333	0,0274651	0,0158570	-0,0318938	0,10456050	2,291	2	0,149
Pair 9	Biomassa2 - Biomassa6	0,0020000	0,0391535	0,0226053	-0,0952627	0,09926279	0,088	2	0,938
Pair 10	Biomassa3 - Biomassa4	0,0243333	0,0912432	0,0526793	-0,2023275	0,25099417	0,462	2	0,690
Pair 11	Biomassa3 - Biomassa5	0,0206666	0,0621637	0,0358902	-0,1337566	0,17509001	0,576	2	0,623
Pair 12	Biomassa3 - Biomassa6	-0,0136667	0,0733303	0,0423372	-0,1958292	0,16849590	-0,323	2	0,777
Pair 13	Biomassa4 - Biomassa5	-0,0036666	0,0551392	0,0318346	-0,1406400	0,13330674	-0,115	2	0,919
Pair 14	Biomassa4 - Biomassa6	-0,0380000	0,0351567	0,0202977	-0,1253343	0,04933431	-1,872	2	0,202
Pair 15	Biomassa5 - Biomassa6	-0,0343333	0,0659570	0,0380803	-0,1981797	0,12951308	-0,902	2	0,462
Pair 16	Biomassa1 - Biomassa7	0,1056666	0,0603351	0,0348345	-0,0442142	0,25554755	3,033	2	0,094
Pair 17	Biomassa2 - Biomassa7	0,0383333	0,0176162	0,0101707	-0,0054279	0,08209460	3,769	2	0,064
Pair 18	Biomassa3 - Biomassa7	0,0226666	0,0715145	0,041288	-0,1549853	0,20031870	0,549	2	0,638
Pair 19	Biomassa4 - Biomassa7	-0,0016666	0,0229419	0,0132455	-0,0586576	0,05532431	-0,126	2	0,911
Pair 20	Biomassa5 - Biomassa7	0,0020000	0,0335111	0,0193477	-0,0812464	0,08524642	0,103	2	0,927
Pair 21	Biomassa6 - Biomassa7	0,0363333	0,0370720	0,0214035	-0,0557586	0,12842529	1,698	2	0,232

Apêndice X

Tabela 19- Dados de biomassa e pH do fungo do *R. stolonifer* em meio Submerso $\text{Mn}(\text{OAc})_2$

Concentração $\text{Mn}(\text{OAc})_2$ ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	SALINIDADE	Biomassa (g)			
		Massa 1	Massa 2	Massa 3	Média
5	0	0,253	0,253	0,219	0,241
0,5	0	0,302	0,209	0,239	0,250
0,05	0	0,204	0,233	0,291	0,242
0,005	0	0,237	0,212	0,196	0,215
0,0005	0	0,227	0,229	0,229	0,228
0	0	0,272	0,300	0,236	0,269
5	0,25	0,148	0,146	0,176	0,154
0,5	0,25	0,107	0,135	0,107	0,116
0,05	0,25	0,147	0,145	0,107	0,133
0,005	0,25	0,178	0,137	0,173	0,162
0,0005	0,25	0,131	0,148	0,173	0,150
0	0,25	0,155	0,135	0,150	0,146

Concentração $\text{Mn}(\text{OAc})_2$ ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	SALINIDADE	pH		
		pH	pH	pH
5	0	3,76	3,35	3,55
0,5	0	3,34	3,57	3,60
0,05	0	3,45	3,35	3,20
0,005	0	3,43	3,27	3,57
0,0005	0	3,30	3,83	3,41
0	0	3,21	3,28	2,17
5	0,25	4,02	3,88	3,97
0,5	0,25	3,98	4,01	4,08
0,05	0,25	4,30	3,99	3,87
0,005	0,25	3,97	3,97	4,13
0,0005	0,25	4,09	4,01	3,93
0	0,25	4,23	3,98	3,77

Apêndice XI

Dados estatísticos

Mn(OAc)₂ meio submerso

Tabela 20- Teste ANOVA do efeito da salinidade na produção de biomassa:

O nível de significância adotado foi $p < 0,05$.

Significância $p < 0,05$

Significância da salinidade

ANOVA

Biomassa

	Soma dos quadrados	Df	Mean Square	F	Sig.
Entre os grupos	0,046	1	0,046	33,276	0,000
Dentro dos grupos	0,039	28	0,001		
Total	0,084	29			

Tabela 21- Análise do efeito da salinidade na produção de biomassa:

O nível de significância adotado foi $p < 0,05$.

Significância $p > 0,05$

Significância do Mn²⁺

ANOVA

Biomassa

	Soma dos quadrados	Df	Mean Square	F	Sig.
Entre os grupos	0,016	5	0,003	1,119	0,377
Dentro dos grupos	0,068	24	0,003		
Total	0,084	29			

Tabela 22- Verificação da influência entre fatores de biomassa:
Controles sem salinidades e com $\text{Mn}(\text{OAc})_2$, todos mostraram $p < 0,05$

Legenda:

Biomassa 1- Sem sal e sem porfirina

Biomassa 2- Sem sal e com porfirina 0,5 nmol/L

Biomassa 3- Sem sal e com porfirina 5,0 nmol/L

Biomassa 4- Sem sal e com porfirina 0,05 $\mu\text{mol/L}$

Biomassa 5- Sem sal e com porfirina 0,5 $\mu\text{mol/L}$

Biomassa 5- Sem sal e com porfirina 5,0 $\mu\text{mol/L}$

Paired Samples Test

		Paired Differences					T	df	Sig.
		Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean	95% Confidence Interval of the Difference				
					Lower	Upper			
Pair 1	Biomassa1 - Biomassa2	0,0436666	0,0336055	0,0194021	-0,0398141	0,1271474	2,251	2	0,153
Pair 2	Biomassa1 - Biomassa3	0,0570000	0,0149331	0,0086216	0,0199039	0,0940960	6,611	2	0,022
Pair 3	Biomassa1 - Biomassa4	0,0293333	0,0770346	0,0444759	-0,1620312	0,2206979	0,660	2	0,577
Pair 4	Biomassa1 - Biomassa5	0,0220000	0,0424381	0,0245017	-0,0834223	0,1274223	0,898	2	0,464
Pair 5	Biomassa1 - Biomassa6	0,0303333	0,0415852	0,0240092	-0,0729701	0,1336368	1,263	2	0,334
Pair 6	Biomassa2 - Biomassa3	0,0133333	0,0217332	0,0125476	-0,0406550	0,0673216	1,063	2	0,399
Pair 7	Biomassa2 - Biomassa4	-0,0143333	0,0434319	0,0250754	-0,1222242	0,0935575	-0,572	2	0,625
Pair 8	Biomassa2 - Biomassa5	-0,0216666	0,0485626	0,0280376	-0,1423030	0,0989697	-0,773	2	0,520
Pair 9	Biomassa2 - Biomassa6	-0,0133333	0,0202319	0,0116809	-0,0635923	0,0369257	-1,141	2	0,372
Pair 10	Biomassa3 - Biomassa4	-0,0276666	0,0642598	0,0371004	-0,1872970	0,1319637	-0,746	2	0,534
Pair 11	Biomassa3 - Biomassa5	-0,0350000	0,0346987	0,0200333	-0,1211963	0,0511963	-1,747	2	0,223
Pair 12	Biomassa3 - Biomassa6	-0,0266666	0,0266520	0,0153875	-0,0928741	0,0395407	-1,733	2	0,225
Pair 13	Biomassa4 - Biomassa5	-0,0073333	0,0797579	0,0460482	-0,2054631	0,1907964	-0,159	2	0,888
Pair 14	Biomassa4 - Biomassa6	0,0010000	0,0449332	0,0259422	-0,1106204	0,1126204	0,039	2	0,973
Pair 15	Biomassa5 - Biomassa6	0,0083333	0,0352751	0,0203660	-0,0792949	0,0959615	0,409	2	0,722

Tabela 23- Verificação da influência entre fatores de biomassa:

Controles sem salinidades e com $\text{Mn}(\text{OAc})_2$, todos os controles com a $\text{Mn}(\text{OAc})_2$ e com sal mostraram $p < 0,05$ todas as comparações entre o controle Biomassa 1 com as demais biomassas obtiveram $p < 0,05$.

Legenda:

Biomassa 1- Sem sal e sem porfirina

Biomassa 2- com sal e sem porfirina

Biomassa 3- Com sal e com porfirina 0,5 nmol/L

Biomassa 4- Sem sal e com porfirina 5,0 nmol/L

Biomassa 5- Sem sal e com porfirina 0,05 $\mu\text{mol/L}$ Biomassa 6- Sem sal e com porfirina 0,5 $\mu\text{mol/L}$ Biomassa 7- Sem sal e com porfirina 5,0 $\mu\text{mol/L}$

Paired Samples Test

		Paired Differences					T	df	Sig. (2-tailed)
		Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean	95% Confidence Interval of the Difference				
					Lower	Upper			
Pair 1	Biomassa1 - Biomassa2	0,121333	0,0537990	0,031060	-0,01231081	0,2549774	3,906	2	0,060
Pair 2	Biomassa1 - Biomassa3	0,109333	0,0525388	0,030333	-0,02118047	0,2398471	3,604	2	0,069
Pair 3	Biomassa1 - Biomassa4	0,139000	0,0442266	0,025534	0,02913481	0,2488651	5,444	2	0,032
Pair 4	Biomassa1 - Biomassa5	0,155666	0,0234378	0,013531	0,09744379	0,2138895	11,504	2	0,007
Pair 5	Biomassa1 - Biomassa6	0,117333	0,0500133	0,028875	-0,00690667	0,2415733	4,063	2	0,056
Pair 6	Biomassa2 - Biomassa3	-0,012000	0,0112694	0,006506	-0,03999481	0,0159948	-1,844	2	0,206
Pair 7	Biomassa2 - Biomassa4	0,017666	0,0284312	0,016414	-0,05296036	0,0882936	1,076	2	0,394
Pair 8	Biomassa2 - Biomassa5	0,034333	0,0354729	0,020480	-0,05378647	0,1224531	1,676	2	0,236
Pair 9	Biomassa2 - Biomassa6	-0,004000	0,0125299	0,007234	-0,03512616	0,0271261	-0,553	2	0,636
Pair 10	Biomassa3 - Biomassa4	0,029666	0,0370180	0,02137	-0,06229118	0,1216245	1,388	2	0,300
Pair 11	Biomassa3 - Biomassa5	0,046333	0,0384751	0,022213	-0,04924411	0,1419107	2,086	2	0,172
Pair 12	Biomassa3 - Biomassa6	0,008000	0,0226053	0,013051	-0,04815470	0,0641547	0,613	2	0,602
Pair 13	Biomassa4 - Biomassa5	0,016666	0,0208166	0,012018	-0,03504478	0,0683781	1,387	2	0,300
Pair 14	Biomassa4 - Biomassa6	-0,021666	0,0162890	0,009404	-0,06213092	0,0187975	-2,304	2	0,148
Pair 15	Biomassa5 - Biomassa6	-0,038333	0,0283784	0,016384	-0,10882918	0,0321625	-2,340	2	0,144

Apêndice XII

Tabela 24- Dados de biomassa e pH do fungo do *R. stolonifer* em meio submerso MnTE-2-PyPCl₅ com salinidade de 3 e 150 mmol L⁻¹ de NaCl.

Concentração MnTE-2-PyPCl ₅ (μM)	SALINIDADE (mmol L ⁻¹) de NaCl	Biomassa (g)			
		Massa 1	Massa 2	Massa 3	Média
5	3	0,270	0,200	0,245	0,238
0,5	3	0,250	0,252	0,238	0,246
0	3	0,235	0,246	0,250	0,243
5	150	0,166	0,183	0,160	0,169
0,5	150	0,143	0,156	0,162	0,153
0	150	0,170	0,180	0,150	0,166

Concentração MnTE-2-PyPCl ₅ (μM)	SALINIDADE (mmol L ⁻¹) de NaCl			
		pH	pH	pH
5	3	3,96	3,79	3,19
0,5	3	3,75	4,18	3,32
0	3	3,77	3,88	4,14
5	150	3,62	3,50	3,14
0,5	150	4,25	4,22	3,76
0	150	3,83	3,96	4,30

Apêndice XIII

Tabela 25- Dados de biomassa e pH do fungo do *R. stolonifer* em meio submerso MnTnHex-2-PyPCl₅ com salinidade de 3 e 150 mmol L⁻¹ de NaCl.

Concentração MnTnHex-2-PyPCl ₅ (μmol L ⁻¹)	SALINIDADE (mmol L ⁻¹) de NaCl	Biomassa (g)			
		Massa 1	Massa 2	Massa 3	Média
5	3	0,220	0,235	0,198	0,217
0,5	3	0,250	0,252	0,200	0,234
0	3	0,235	0,246	0,250	0,243
5	150	0,113	0,168	0,171	0,452
0,5	150	0,129	0,143	0,155	0,142
0	150	0,170	0,180	0,150	0,166

Concentração MnTnHex-2-PyPCl ₅ (μmol L ⁻¹)	SALINIDADE (mmol L ⁻¹) de NaCl			
		pH	pH	pH
5	3	3,75	4,20	3,32
0,5	3	3,78	3,76	3,55
0	3	3,77	3,88	4,14
5	150	4,15	4,22	3,76
0,5	150	4,27	4,11	4,45
0	150	3,83	3,96	4,30