UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA DE SÃO CARLOS

**Biotransformação de derivados de flavonoides empregando fungos
derivados de ambiente marinho**

Iara Lisboa de Matos

São Carlos
2018

Iara Lisboa de Matos

Biotransformação de derivados de flavonoides empregando fungos derivados de ambiente marinho

Tese apresentada ao Instituto de Química de São Carlos da Universidade de São Paulo como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Química Orgânica e Biológica

Orientador: Prof. Dr. André Luiz Meleiro Porto

São Carlos
2018

Dedico este trabalho aos meus pais, José e Raimunda.

AGRADECIMENTOS

A Deus pelo dom da vida, por seu meu guia e companheiro.

Ao meus pais, Raimunda e José, que com todo amor, esforço, dedicação e renúncias me mostraram o valor do conhecimento e me ensinaram valores morais que me permitiram chegar até aqui.

As minhas irmãs Rute, Miriam e Alda que sempre estiveram ao meu lado me dando apoio, incentivo e aos meus sobrinhos Pedro Vitor, Lucas, Bruna e Fernando que fazem os meus dias mais felizes.

Ao Leandro pela paciência e companheirismo, sempre me incentivando a alcançar meus objetivos.

Ao Prof. Dr. André L. M. Porto, por me conduzir rumo ao meu desenvolvimento profissional com orientação, paciência e dedicação.

Aos meus familiares que sempre torceram por mim, em especial a minha avó Josefa.

Aos amigos e colegas do Laboratório de Química Orgânica e Biocatálise Charlene, Rafaely, Willian, Érika, Aline, Lucas, David, Juliana Gala, Juliana Barreiro, Samuel, Tayane, Matheus, Jaqueline e aqueles já não fazem mais parte do grupo, mas que sempre farão parte da minha história Darlisson, Natália, Irlon, Sandra (*in memoriam*).

A Marília pelo suporte e amizade.

Aos professores, técnicos e funcionários do Instituto de Química de São Carlos que sempre me trataram com gentileza e que direta ou indiretamente contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho.

Ao Instituto de Química de São Carlos (IQSC/USP) por fornecer toda infra-estrutura e suporte necessários para a execução deste trabalho.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro por meio da bolsa de doutorado.

RESUMO

Os flavonoides são um grupo diversificado de compostos polifenólicos que podem ser encontrados na natureza e também sintetizados. A gama de atividades biológicas e o potencial para reduzir o risco de doenças crônicas tem motivado a comunidade científica a desenvolver métodos de síntese de compostos desta classe. Neste sentido, as reações de biotransformação são estratégias interessantes com grande potencial para modificar as estruturas de flavonoides naturais e sintéticos. Este estudo teve como objetivo a biotransformação de derivados de flavonoides por fungos derivados de ambiente marinho. Assim, os derivados de flavonoides 2'-hidroxichalconas (**1a-h**), 2'-hidroxi-diidrochalcona (**2a**), flavanona (**3a**) e flavan-4-ol (**4a**) foram usados como substratos em reações biocatalisadas por células totais de fungos de ambiente marinho. As condições reacionais foram otimizadas variando-se o pH e a composição nutricional do meio reacional. Dessa forma, foi realizada uma triagem com oito fungos (*Penicillium raistrickii* CBMAI 931, *Cladosporium* sp. CBMAI 1237, *Aspergillus sydowii* CBMAI 935, *Penicillium oxalicum* CBMAI 1996, *Penicillium citrinum* CBMAI 1186, *Mucor racemosus* CBMAI 847, *Westerdykella* sp. CBMAI 1679 e *Aspergillus sclerotiorum* CBMAI 849) utilizando a 2'-hidroxichalcona **1a** como substrato. A partir da triagem foram selecionados os fungos *P. raistrickii* CBMAI 931 e *A. sydowii* CBMAI 935 para serem aplicados com outros derivados de flavonoides. A reação empregando o fungo *P. raistrickii* CBMAI 931 resultou preferencialmente na hidrogenação da ligação $C\alpha=C\beta$ das 2'-hidroxichalconas substituídas (**1a-h**) com a formação das 2'-hidroxi-diidrochalconas (**2a-h**) com conversões que variaram de 25 a 83% em 14 dias de reação. Também foi realizada uma triagem com dez fungos (*Fusarium* sp. CBMAI 1830, *Acremonium* sp. CBMAI 1676, *Aspergillus* sp. CBMAI 1829, *A. sydowii* CBMAI 935, *P.oxalicum* CBMAI 1996, *P. citrinum* CBMAI 1186, *P. raistrickii* CBMAI 931, *Cladosporium* sp. CBMAI 1237, *M. racemosus* CBMAI 847 e *Westerdykella* sp. CBMAI 1679) para a biotransformação da flavanona **3a**. A biotransformação da flavanona **3a** resultou na formação de produtos de biorredução, hidroxilação e clivagem de anel. As reações empregando os fungos *Cladosporium* sp. CBMAI 1237, *Westerdykella* sp. CBMAI 1679 e *Acremonium* sp. CBMAI 1676 levou preferencialmente a biorredução do grupo cetônico da flavanona **3a** para formação do flavan-4-ol **4a** correspondente. Os fungos *Acremonium* sp. CBMAI 1676 e *Cladosporium* sp. CBMAI 1237 foram então utilizados para reduzir uma série de flavanonas **3b-g meta** e para substituídas, onde os flavan-4-óis foram isolados com bons rendimentos (67-87%), porém com baixa seletividade. O fungo *P. raistrickii* CBMAI 931 também apresentou potencial para obtenção de diidrochalconas a partir de flavanonas, assim como os fungos *A. sydowii* CBMAI 935 e *Fusarium* sp. CBMAI que além de produzirem diidrochalconas ainda promoveram a hidroxilação da mesma. Assim, os fungos de ambiente marinho *P. raistrickii* CBMAI 931 e *A. sydowii* CBMAI 935 foram eficientes na biotransformação de derivados de flavonoides com controle quimio- e regioseletivo. Os fungos de ambiente marinho utilizados mostraram-se como uma fonte de enzimas ene redutases, álcool desidrogenases e monoxigenases ao mediar eficientemente a biotransformação de derivados de flavonoides.

ABSTRACT

Flavonoids are a diverse group of polyphenolic compounds that can be found in nature and synthesized. The range of biological activities and the potential to reduce the risk of chronic diseases has motivated the scientific community to develop methods of synthesis of compounds of this class. In this sense, biotransformation reactions are interesting strategies with great potential to modify the structures of natural and synthetic flavonoids. This study aimed at the biotransformation of flavonoid derivatives by marine environment fungi. Thus, the flavonoid derivatives 2'-hydroxychalcones (**1a-h**), 2'-hydroxy dihydrochalcone (**2a**), flavanone (**3a**) and flavan-4-ol (**4a**) were used as substrates in biocatalysed reactions by total cells of fungi of marine environment. The reaction conditions were optimized by varying the pH and nutritional composition of the reaction medium. In this way, eight marine-derived fungi (*Penicillium raistrickii* CBMAI 931, *Cladosporium* sp. CBMAI 1237, *Aspergillus sydowii* CBMAI 935, *Penicillium oxalicum* CBMAI 1996, *Penicillium citrinum* CBMAI 1186, *Mucor racemosus* CBMAI 847, *Westerdykella* sp. 1679 and *Aspergillus sclerotiorum* CBMAI 849) were screened to perform the biotransformation of 2'-hydroxychalcone **1a**. From the screening, the fungi *P. raistrickii* CBMAI 931 and *A. sydowii* CBMAI 935 were selected for applied with other flavonoid derivatives. The reactions using the fungus *P. raistrickii* CBMAI 931 resulted preferentially in the hydrogenation of the C α -C β double bond of the substituted 2'-hydroxychalcones (**1a-h**) to led formation of 2'-hydroxy-dihydrochalcones (**2a-h**) with good conversions (25 to 83%) in 14 days of reaction. It was also carried out a screening with ten fungi derived from marine environment (*Fusarium* sp. CBMAI 1830, *Acremonium* sp. CBMAI 1676, *Aspergillus* sp. CBMAI 1829, *A. sydowii* CBMAI 935, *P. oxalicum* CBMAI 1996, *P. citrinum* CBMAI 1186, *P. raistrickii* CBMAI 931, *Cladosporium* sp. CBMAI 1237, *M. racemosus* CBMAI 847 and *Westerdykella* sp. CBMAI 1679) for the biotransformation of flavanone **3a**. The biotransformation reaction resulted in the biorreduction of flavanona **3a**, hydroxylation and ring cleavage of the products. Reactions by *Cladosporium* sp. CBMAI 1237, *Westerdykella* sp. CBMAI 1679 and *Acremonium* sp. CBMAI 1676 preferably led to the reduction of the pro-chiral ketone of flavanone to form the corresponding flavan-4-ol. The fungi *Acremonium* sp. CBMAI 1676 and *Cladosporium* sp. CBMAI 1237 were used to reduce a series of substituted flavanones, where flavan-4-ols were isolated in good yields (67-87%), but with low selectivity. The fungus *P. raistrickii* CBMAI 931 presented potential for produce dihydrochalcones from flavanones, as well as the fungi *A. sydowii* CBMAI 935 and *Fusarium* sp. CBMAI that in addition to producing dihydrochalcones still promoted the hydroxylation thereof. Thus, the marine environment fungi *P. raistrickii* CBMAI 931 and *A. sydowii* CBMAI 935 were efficient in biotransformation of flavonoid derivatives with chemo- and regioselective control. Marine-derived fungi have been shown to be a source of ene reductase enzymes, alcohol dehydrogenases and monooxygenases by efficiently mediating the biotransformation of flavonoid derivatives.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Redução assimétrica de alcenos ativados usando Ene-redutases dependentes de flavina mononucleotídeo.	28
Figura 2 – Rotas enzimáticas e quimio catalítica para a produção da Sitagliptina.	30
Figura 3 – Núcleo básico e estruturas químicas de compostos da classe dos flavonoides.....	33
Figura 4 - Exemplos de derivados de flavonoides naturais e sintético com atividades farmacológicas.....	33
Figura 5 - Estruturas químicas de flavonoides utilizados como princípios ativos em medicamentos.....	34
Figura 6 - Rota biossintética simplificada de formação da narigenina chalcona e de derivados de flavonoides.....	35
Figura 7 - Chalcona e alguns de seus derivados naturais.	36
Figura 8 - Exemplos de derivados de chalconas naturais e sintéticas com atividades farmacológicas.....	37
Figura 9 - Biorredução de chalconas por fungos e leveduras para obtenção de diidrochalconas.....	42
Figura 10 - Ilustração das etapas da síntese das 2'-hidroxichalconas 1a-h . (A) Reação entre a 2-hidroxiacetofenona e os derivados de benzaldeído a-h . (B) Finalização da reação com adição de HCl 10% e gelo. (C) Produto da reação após filtração em funil de Büchner.....	48
Figura 11 - Ilustração das etapas da síntese das flavanonas 3a-h . (A) Reação para formação da flavanona. (B) Filtração da mistura reacional em funil de Büchner. (C) Produto da reação após cromatografia em coluna.....	52
Figura 12 - Micélios de fungos de ambiente marinho empregados nas reações de biotransformação de derivados de flavonoides.	59
Figura 13 - Discos utilizados no cultivo dos fungos em meio de cultura líquido. (A) Placa com as colônias de fungos de onde foram retirados 10 discos contendo os micélios. (B) Discos contendo os micélios que foram inoculados em meio líquido.....	61
Figura 14 - Ilustração das etapas de filtração dos micélios/esporos dos fungos derivados de ambiente marinho. (A) crescimento dos fungos em estufa incubadora BOD (7 dias, 130 rpm, 32 °C). (B e C) Filtração dos micélios em funil de Büchner para obtenção da massa úmida dos fungos. (D) Frasco Erlenmeyer contendo o meio líquido e os micélios/esporos dos fungos após filtração e pesagem da massa úmida dos mesmos.....	61

Figura 15 - Etapas envolvidas no procedimento experimental para as reações de biotransformação dos derivados de flavonoides.....	63
Figura 16 - Etapas envolvidas no procedimento experimental para as reações de biotransformação.	64
Figura 17 – Reação de biotransformação de 1a-h por <i>P. raistrickii</i> CBMAI 931.	67
Figura 18 - Etapas envolvidas no procedimento experimental para os controles bióticos.....	77
Figura 19 - Etapas envolvidas no procedimento experimental para os controles abióticos....	77
Figura 20 - Possíveis sítios de reação no esqueleto estrutural da 2'-hidroxichalcona 1a	82
Figura 21 – Cromatogramas obtidos por CG/EM da triagem de fungos de ambiente marinho para a biotransformação da 2'-hidroxichalcona 1a em tampão fosfato ($\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$ 0,07 mol L ⁻¹ , pH 7, pH 8, 7 dias, 130 rpm, 32 °C).	84
Figura 22 - Cromatogramas obtidos por CLAE-UV empregando coluna quiral de 1a por <i>P. raistrickii</i> CBMAI 931 e por <i>A. sclerotiorum</i> CBMAI 849.	85
Figura 23 - Cromatogramas obtidos por CLAE-UV empregando coluna quiral de 1a por <i>Westerdykella</i> sp. CBMAI 1679 e por <i>Cladosporium</i> sp. CBMAI 1237 após 7 dias de incubação.	86
Figura 24 - Cromatogramas obtidos por CLAE-UV empregando coluna quiral: (A) reações com <i>P. citrinum</i> CBMAI 1186; (B) reações com <i>M. racemosus</i> CBMAI 847; (C) Flavanona 3a isoladas das reações com <i>P. citrinum</i> CBMAI 1186 e <i>M. racemosus</i> CBMAI 847 após 7 dias de incubação.....	88
Figura 25 - Cromatogramas obtidos por CG/EM das reações de 1a com os fungos <i>P. citrinum</i> CBMAI 1186 e <i>M. racemosus</i> CBMAI 847 em tampão fosfato pH 6 após 7 dias de incubação.	90
Figura 26 – Proposta de sequência de reação para a ciclização da 2'-hidroxichalcona 1a catalisada pela enzima chalcona isomerase.	91
Figura 27 - Cromatogramas obtidos por CG/EM das reações de biotransformação de 1a-h pelo fungo <i>P. raistrickii</i> CBMAI 931 após 14 dias de incubação.	96
Figura 28 - Reações de bio-hidrogenação com substituintes halogênicos na posição para do anel B das 2'-hidroxichalconas 1d , 1f e 1h	98
Figura 29 - Cromatogramas obtidos por CG/EM das reações de biotransformação de 1a-h dissolvidas em 600 µL de DMSO por <i>P. raistrickii</i> CBMAI 931 após 14 dias de incubação.	101
Figura 30 - Ligação hidrogênio intramolecular da 2'-hidroxichalcona 1a	102

Figura 31 - Proposta de sequência de reação para a redução quimiosseletiva de C=C da 2'-hidroxichalcona 1a mediada por ene redutases (ERs).....	103
Figura 32 - Desalogenação de 2'-hidroxichalconas 1e-h em reações de hidrogenação com Pd/C e H ₂	104
Figura 33 - Cromatogramas obtidos por CLAE-UV das reações de biotransformação de 3a por fungos derivados de ambiente marinho após 7 dias de incubação.	106
Figura 34 - Estruturas dos estereoisômeros da flavanona 3a e do flavan-4-ol 4a	107
Figura 35 - Cromatogramas obtidos por CLAE/UV utilizando coluna quiral da biotransformação de 3a por <i>P. raistrickii</i> CBMAI 931 após 7 dias de incubação.	108
Figura 36 - Produtos da biotransformação de 3a por <i>A. sydowii</i> CBMAI 935 ou <i>Fusarium</i> sp. CBMAI 1830.	109
Figura 37 - Cromatogramas obtidos por CLAE-UV com coluna quiral da biotransformação de 3a por <i>Westerdykella</i> sp. CBMAI 1679 após 7 dias de incubação.	111
Figura 38 - Cromatogramas obtidos por CLAE-UV com coluna quiral da biotransformação de 3a por <i>Acremonium</i> sp. CBMAI 1676 após 7 dias de incubação.	112
Figura 39 - Representação do ataque nucleofílico do íon hidreto pelas faces <i>Re</i> e <i>Si</i> da cetona pró-estereogênica da flavanona para formação dos flavan-4-óis 4a	113
Figura 40 - Cromatogramas da biotransformação de 3a por <i>Cladosporium</i> sp. CBMAI 1237 obtido por CLAE-UV com coluna quiral após 7 dias de incubação.	114
Figura 41 - Cromatogramas obtidos por CLAE-UV com coluna quiral da biotransformação de 3a por <i>M. racemosus</i> CBMAI 847 após 7 dias de incubação.....	115
Figura 42 – Sistema de reação de redução catalisada por desidrogenases e reciclagem de cofator.....	116
Figura 43 - Cromatogramas obtidos por CLAE-UV das reações de biotransformação de 3b-g pelo fungo <i>Cladosporium</i> sp. CBMAI 1237.	119
Figura 44 - Cromatogramas obtidos por CLAE-UV com coluna quiral de 4c isolado da reação de biotransformação promovida pelo fungo <i>Cladosporium</i> sp. CBMAI 1237 e <i>Acremonium</i> sp. CBMAI 1676 após 7 dias de incubação.	121
Figura 45 - Cromatogramas obtidos por CLAE-UV com coluna quiral de 4e isolados das reações de biotransformação promovidas pelos fungos <i>Cladosporium</i> sp. CBMAI 1237 e <i>Acremonium</i> sp. CBMAI 1676.	121
Figura 46 - Cromatogramas obtidos por CLAE-UV com coluna quiral do flavan-4-ol 4f isolados das reações de biotransformação promovidas pelos fungos <i>Cladosporium</i> sp. CBMAI 1237 e <i>Acremonium</i> sp. CBMAI 1676.	122

Figura 47 - Cromatogramas obtidos por CLAE-UV com coluna quiral de 4g isolados das reações de biotransformação promovidas pelos fungos <i>Cladosporium</i> sp. CBMAI 1237 e <i>Acremonium</i> sp. CBMAI 1676 após 7 dias de incubação.	123
Figura 48 - Cromatogramas obtidos por CG/EM das reações de 1a-4a com o fungo <i>A. sydowii</i> CBMAI 935. A) Biotransformação da 2'-hidroxichalcona 1a . B) Biotransformação de 2a . C) Biotransformação de 3a . D) Biotransformação de 4a	126
Figura 49 - Biotransformação da 2'-hidroxi-diidrochalcona 2a pelo fungo <i>A. sydowii</i> CBMAI 935 para a formação da 2',4-diidroxi-diidrochalcona 5a	127
Figura 50 - Reação de biotransformação da flavanona 3a pelo fungo <i>A. sydowii</i> CBMAI 935 para a formação de 2a e 5a em diferentes tempos reacionais.	127
Figura 51 - Sequência provável de reação para a abertura do anel C da flavanona 3a para formação da 2'-hidroxi-diidrochalcona 2a pelo fungo <i>A. sydowii</i> CBMAI 935.	128
Figura 52 - Reação de biotransformação da flavanona 3a pelo fungo <i>A. sydowii</i> CBMAI 935 após 72 h de incubação. A) Cromatograma obtido por CG/EM da reação de 72 h com surgimento do fenol. B) Espectro de massas (IE, 70 eV) do fenol.	130
Figura 53 - Cromatogramas obtidos por CLAE-UV com coluna quiral do monitoramento da biotransformação de 3a por <i>A. sydowii</i> CBMAI 935.	131
Figura 54 - Cromatograma obtido por CG/EM do monitoramento da reação de biotransformação do flavan-4-ol 4a pelo fungo <i>A. sydowii</i> CBMAI 935 de 24 - 168 h.	133
Figura 55 - Espectro de absorção na região do Infravermelho (KBr, cm ⁻¹) do composto 1b	135
Figura 56 - Espectro de massas (IE, 70 eV) do composto 1b	136
Figura 57 - Espectro de RMN de ¹ H (500 MHz, CDCl ₃) do composto 1b	137
Figura 58 - Espectro de RMN de ¹³ C (125 MHz, CDCl ₃) do composto 1b	138
Figura 59 - Espectro de absorção na região do Infravermelho (KBr, cm ⁻¹) para o composto 2b	139
Figura 60 - Espectro de massas (IE, 70 eV) do composto 2b	139
Figura 61 - Espectro de RMN de ¹ H (500 MHz, CDCl ₃) do composto 2b	140
Figura 62 - Espectro de RMN de ¹³ C (125 MHz, CDCl ₃) do composto 2b	141
Figura 63 - Espectro de absorção na região do Infravermelho (KBr, cm ⁻¹) para o composto 3b	142
Figura 64 - Espectro de Massas (IE, 70 eV) do composto 3b	142

Figura 65 - Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) do composto 3b .	143
Figura 66 - Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) do composto 3b .	144
Figura 67 - Espectro de absorção na região do Infravermelho (KBr , cm^{-1}) para o composto 4b .	145
Figura 68 - Espectro de massas (IE, 70 eV) do composto 4b .	145
Figura 69 - Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) do composto 4b .	146
Figura 70 - Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) do composto 4b .	147
Figura 71 - Espectro de absorção na região do Infravermelho (KBr , cm^{-1}) para o composto 6a .	148
Figura 72 - Espectro de massas (IE, 70 eV) do composto 6a .	148
Figura 73 - Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) do composto 6a .	149
Figura 74 - Espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) do composto 6a .	150
Figura 75 - Espectro de absorção na região do Infravermelho (KBr , cm^{-1}) da 2'-hidroxichalcona 1a .	160
Figura 76 - Espectro de absorção na região do Infravermelho (KBr , cm^{-1}) da 2'-hidroxichalcona 1b .	160
Figura 77 - Espectro de absorção na região do Infravermelho (KBr , cm^{-1}) da 2'-hidroxichalcona 1c .	161
Figura 78 - Espectro de absorção na região do Infravermelho (KBr , cm^{-1}) da 2'-hidroxichalcona 1d .	161
Figura 79 - Espectro de absorção na região do Infravermelho (KBr , cm^{-1}) da 2'-hidroxichalcona 1e .	161
Figura 80 - Espectro de absorção na região do Infravermelho (KBr , cm^{-1}) da 2'-hidroxichalcona 1f .	162
Figura 81 - Espectro de absorção na região do Infravermelho (KBr , cm^{-1}) da 2'-hidroxichalcona 1g .	162
Figura 82 - Espectro de absorção na região do Infravermelho (KBr , cm^{-1}) da 2'-hidroxichalcona 1h .	162
Figura 83 - Espectro de absorção na região do Infravermelho (puro, cm^{-1}) da 2'-hidroxi-diidrochalcona 2a .	163

Figura 84 - Espectro de absorção na região do Infravermelho (puro, cm^{-1}) da 2'-hidroxidiidrochalcona 2b .	163
Figura 85 - Espectro de absorção na região do Infravermelho (puro, cm^{-1}) da 2'-hidroxidiidrochalcona 1d .	164
Figura 86 - Espectro de absorção na região do Infravermelho (puro, cm^{-1}) da 2'-hidroxidiidrochalcona 1e .	164
Figura 87 - Espectro de absorção na região do Infravermelho (puro, cm^{-1}) da 2'-hidroxidiidrochalcona 1f .	164
Figura 88 - Espectro de absorção na região do Infravermelho (puro, cm^{-1}) da 2'-hidroxidiidrochalcona 1g .	165
Figura 89 - Espectro de absorção na região do Infravermelho (puro, cm^{-1}) da 2'-hidroxidiidrochalcona 1h .	165
Figura 90 - Espectro de absorção na região do Infravermelho (KBr, cm^{-1}) da flavanona 3a .	166
Figura 91 - Espectro de absorção na região do Infravermelho (KBr, cm^{-1}) da flavanona 3b .	166
Figura 92 - Espectro de absorção na região do Infravermelho (KBr, cm^{-1}) da flavanona 3c .	167
Figura 93 - Espectro de absorção na região do Infravermelho (KBr, cm^{-1}) da flavanona 3d .	167
Figura 94 - Espectro de absorção na região do Infravermelho (KBr, cm^{-1}) da flavanona 3e .	167
Figura 95 - Espectro de absorção na região do Infravermelho (KBr, cm^{-1}) da flavanona 3f .	168
Figura 96 - Espectro de absorção na região do Infravermelho (KBr, cm^{-1}) da flavanona 3g .	168
Figura 97 - Espectro de absorção na região do Infravermelho (KBr, cm^{-1}) do flavan-4-ol 4a .	169
Figura 98 - Espectro de absorção na região do Infravermelho (KBr, cm^{-1}) do flavan-4-ol 4b .	169
Figura 99 - Espectro de absorção na região do Infravermelho (KBr, cm^{-1}) do flavan-4-ol 4d .	170
Figura 100 - Espectro de absorção na região do Infravermelho (KBr, cm^{-1}) do flavan-4-ol 4e .	170

Figura 101 - Espectro de absorção na região do Infravermelho (KBr, cm^{-1}) do flavan-4-ol 4f	170
Figura 102 - Espectro de absorção na região do Infravermelho (KBr, cm^{-1}) do flavan-4-ol 4g	171
Figura 103 - Espectro de absorção na região do Infravermelho (KBr, cm^{-1}) da 2',4-diidroxidiidrochalcona 5a obtida na reação com o fungo <i>A. sydowii</i> CBMAI 935..	171
Figura 104 - Espectro de massas (IE, 70 eV) para a 2'-hidroxichalcona 1a	172
Figura 105 - Espectro de massas (IE, 70 eV) para a 2'-hidroxichalcona 1b	172
Figura 106 - Espectro de massas (IE, 70 eV) para a 2'-hidroxichalcona 1c	172
Figura 107 - Espectro de massas (IE, 70 eV) para a 2'-hidroxichalcona 1d	172
Figura 108 - Espectro de massas (IE, 70 eV) para a 2'-hidroxichalcona 1e	173
Figura 109 - Espectro de massas (IE, 70 eV) para a 2'-hidroxichalcona 1f	173
Figura 110 - Espectro de massas (IE, 70 eV) para a 2'-hidroxichalcona 1g	173
Figura 111 - Espectro de massas (IE, 70 eV) para a 2'-hidroxichalcona 1h	173
Figura 112 - Espectro de massas (IE, 70 eV) para a 2'-hidroxidiidrochalcona 2a	174
Figura 113 - Espectro de massas (IE, 70 eV) para a 2'-hidroxidiidrochalcona 2b	174
Figura 114 - Espectro de massas (IE, 70 eV) para a 2'-hidroxidiidrochalcona 2c	174
Figura 115 - Espectro de massas (IE, 70 eV) para a 2'-hidroxidiidrochalcona 2d	174
Figura 116 - Espectro de massas (IE, 70 eV) para a 2'-hidroxidiidrochalcona 2e	175
Figura 117 - Espectro de massas (IE, 70 eV) para a 2'-hidroxidiidrochalcona 2f	175
Figura 118 - Espectro de massas (IE, 70 eV) para a 2'-hidroxidiidrochalcona 2g	175
Figura 119 - Espectro de massas (IE, 70 eV) para a 2'-hidroxidiidrochalcona 2h	175
Figura 120 - Espectro de massas (IE, 70 eV) para a flavanona 3a	176
Figura 121 - Espectro de massas (IE, 70 eV) para a flavanona 3b	176
Figura 122 - Espectro de massas (IE, 70 eV) para a flavanona 3c	176
Figura 123 - Espectro de massas (IE, 70 eV) para a flavanona 3d	176
Figura 124 - Espectro de massas (IE, 70 eV) para a flavanona 3e	177

Figura 125 - Espectro de massas (IE, 70 eV) para a flavanona 3f .	177
Figura 126 - Espectro de massas (IE, 70 eV) para a flavanona 3g .	177
Figura 127 - Espectro de massas (IE, 70 eV) para o flavan-4-ol 4a .	178
Figura 128 - Espectro de massas (IE, 70 eV) para o flavan-4-ol 4b .	178
Figura 129 - Espectro de massas (IE, 70 eV) para o flavan-4-ol 4d .	178
Figura 130 - Espectro de massas (IE, 70 eV) para o flavan-4-ol 4e .	178
Figura 131 - Espectro de massas (IE, 70 eV) para o flavan-4-ol 4f .	179
Figura 132 - Espectro de massas (IE, 70 eV) para o flavan-4-ol 4g .	179
Figura 133 - Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) da 2'-hidroxichalcona 1a .	180
Figura 134 - Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) da 2'-hidroxichalcona 1a .	180
Figura 135 - Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) da 2'-hidroxichalcona 1b .	181
Figura 136 - Espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) da 2'-hidroxichalcona 1b .	181
Figura 137 - Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) da 2'-hidroxichalcona 1c .	182
Figura 138 - Espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) da 2'-hidroxichalcona 1c .	182
Figura 139 - Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) para a 2'-hidroxichalcona (1d).	183
Figura 140 - Espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) para a 2'-hidroxichalcona 1d .	183
Figura 141 - Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) 2'-hidroxichalcona 1e .	184
Figura 142 - Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) para a 2'-hidroxichalcona 1e .	184
Figura 143 - Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) para a 2'-hidroxichalcona 1f .	185
Figura 144 - Espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) para a 2'-hidroxichalcona 1f .	185
Figura 145 - Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) para a 2'-hidroxichalcona 1g .	186
Figura 146 - Espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) para a 2'-hidroxichalcona 1g .	186
Figura 147 - Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) para a 2'-hidroxichalcona 1h .	187
Figura 148 - Espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) para a 2'-hidroxichalcona 1h .	187
Figura 149 - Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) para a 2'-hidroxi-diidrochalcona 2a .	188

Figura 150 – Espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) para a 2'-hidroxi-diidrochalcona 2a.	188
Figura 151 - Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) para a 2'-hidroxi-diidrochalcona 2b.	189
Figura 152 - Espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) para a 2'-hidroxi-diidrochalcona 2b.	189
Figura 153 - Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) para a 2'-hidroxi-diidrochalcona 2d.	190
Figura 154 - Espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) para a 2'-hidroxi-diidrochalcona 2d.	190
Figura 155 - Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) para a 2'-hidroxi-diidrochalcona 2e.	191
Figura 156 - Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) para a 2'-hidroxi-diidrochalcona 2e.	191
Figura 157 - Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) para a 2'-hidroxi-diidrochalcona 2f.	192
Figura 158 - Espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) para a 2'-hidroxi-diidrochalcona 2f.	192
Figura 159 - Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) para a 2'-hidroxi-diidrochalcona 2g.	193
Figura 160 - Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) para a 2'-hidroxi-diidrochalcona 2g.	193
Figura 161 - Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) para a 2'-hidroxi-diidrochalcona 2h.	194
Figura 162 - Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) para a 2'-hidroxi-diidrochalcona 2h.	194
Figura 163 - Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) da flavanona 3a.	195
Figura 164 - Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) da flavanona 3a.	195
Figura 165 - Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) da flavanona 3b.	196
Figura 166 - Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) da flavanona 3b.	196
Figura 167 - Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) para a flavanona 3c.	197
Figura 168 - Espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) para a flavanona 3c.	197

Figura 169 - Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) para a flavanona 3d .	198
Figura 170 - Espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) para a flavanona 3d .	198
Figura 171 - Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) da flavanona 3e .	199
Figura 172 - Espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) da flavanona 3e .	199
Figura 173 - Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) da flavanona 3f .	200
Figura 174 - Espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) da flavanona 3f .	200
Figura 175 - Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) da flavanona 3g .	201
Figura 176 - Espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) da flavanona 3g .	201
Figura 177 - Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) do flavan-4-ol 4a .	202
Figura 178 - Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) do flavan-4-ol 4b .	202
Figura 179 - Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) do flavan-4-ol 4b .	203
Figura 180 - Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) do flavan-4-ol 4b .	203
Figura 181 - Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) do flavan-4-ol 4d .	204
Figura 182 - Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) do flavan-4-ol 4d .	204
Figura 183 - Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) do flavan-4-ol 4e .	205
Figura 184 - Espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) do flavan-4-ol 4e .	205
Figura 185 - Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) do flavan-4-ol 4f .	206
Figura 186 - Espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) do flavan-4-ol 4f .	206
Figura 187 - Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) do flavan-4-ol 4g .	207
Figura 188 - Espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) do flavan-4-ol 4g .	207
Figura 189 - Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) da 2',4-diidroxi-diidrochalcona 5a .	208
Figura 190 - Espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) da 2',4-diidroxi-diidrochalcona 5a .	208
Figura 191 - Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) do flavan-4-ol ($\pm$)- 4a isolado da reação de biotransformação com o fungo <i>Cladosporium</i> sp. CBMAI 1237.	209
Figura 192 - Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) do flavan-4-ol ($\pm$)- 4a isolado da reação de biotransformação com o fungo <i>Cladosporium</i> sp. CBMAI 1237.	209

Figura 193 - Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) do flavan-4-ol ($\pm$)- 4b isolado da reação de biotransformação com o fungo <i>Cladosporium</i> sp. CBMAI 1237.	210
Figura 194 - Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) do flavan-4-ol ($\pm$)- 4b isolado da reação de biotransformação com o fungo <i>Cladosporium</i> sp. CBMAI 1237.	210
Figura 195 - Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) do flavan-4-ol ($\pm$)- 4c isolado da reação de biotransformação com o fungo <i>Cladosporium</i> sp. CBMAI 1237.	211
Figura 196 - Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) do flavan-4-ol ($\pm$)- 4c isolado da reação de biotransformação com o fungo <i>Cladosporium</i> sp. CBMAI 1237.	211
Figura 197 - Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) do flavan-4-ol ($\pm$)- 4d isolado da reação de biotransformação com o fungo <i>Cladosporium</i> sp. CBMAI 1237.	212
Figura 198 - Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) do flavan-4-ol ($\pm$)- 4d isolado da reação de biotransformação com o fungo <i>Cladosporium</i> sp. CBMAI 1237.	212
Figura 199 - Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) do flavan-4-ol ($\pm$)- 4e isolado da reação de biotransformação com o fungo <i>Cladosporium</i> sp. CBMAI 1237.	213
Figura 200 - Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) do flavan-4-ol ($\pm$)- 4e isolado da reação de biotransformação com o fungo <i>Cladosporium</i> sp. CBMAI 1237.	213
Figura 201 - Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) do flavan-4-ol ($\pm$)- 4f isolado da reação de biotransformação com o fungo <i>Cladosporium</i> sp. CBMAI 1237.	214
Figura 202 - Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) do flavan-4-ol ($\pm$)- 4f isolado da reação de biotransformação com o fungo <i>Cladosporium</i> sp. CBMAI 1237.	214

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Exemplos de fontes de classes de flavonoides em alimentos e seus principais compostos.	32
Tabela 2 - Métodos utilizados para as análises por CLAE-UV das flavanonas 3a-h e flavanóis 4a-h	78
Tabela 3 - Métodos utilizados para as análises por CLAE-UV empregando coluna quiral dos flavan-4-óis 4a-g obtidos nas reações de biorredução das flavanonas 3a-g	79
Tabela 4 - Biotransformação da 2'-hidroxichalcona 1a por fungos de ambiente marinho em tampão fosfato (Na ₂ HPO ₄ /KH ₂ PO ₄ 0,07 mol L ⁻¹ , pH 7, pH 8, 7 dias, 130 rpm, 32°C).	83
Tabela 5 - Controles abióticos em tampão fosfato (Na ₂ HPO ₄ /KH ₂ PO ₄ 0,07 mol L ⁻¹) após 7 dias de reação com a 2'-hidroxichalcona 1a	89
Tabela 6 - Biotransformação da 2'-hidroxichalcona 1a pelos fungos <i>P. citrinum</i> CBMAI 1186 e <i>M. racemosus</i> CBMAI 847 em tampão fosfato (Na ₂ HPO ₄ /KH ₂ PO ₄ 0,07 mol L ⁻¹ , pH 6, 7 dias, 130 rpm).	90
Tabela 7 - Condições reacionais para a biotransformação da 2'-hidroxichalcona 1a pelo fungo <i>P. raistrickii</i> CBMAI 931 após 7 dias de incubação.	94
Tabela 8 - Biotransformação de 1a pelo fungo <i>P. raistrickii</i> CBMAI 931 nas células totais e no caldo do cultivo após 14 dias de incubação.	95
Tabela 9 - Hidrogenação quimiosseletiva das 2'-hidroxichalconas 1a-h pelo fungo <i>P. raistrickii</i> CBMAI 931 após 14 dias de reação.	97
Tabela 10 - Hidrogenação quimiosseletiva das 2'-hidroxichalconas 1a-h dissolvidas em 600 µL de DMSO após 14 dias de incubação.	100
Tabela 11 - Reações de hidrogenação e hidroxilação da flavanona 3a promovidas por fungos derivados de ambiente marinho após 7 dias de incubação.	108
Tabela 12 - Reações de biorredução da flavanona 3a promovidas por fungos derivados de ambiente marinho após 7 dias de incubação.	110
Tabela 13 - Acompanhamento da biorredução da flavanona 3a promovida pelo fungo <i>Acremonium</i> sp. CBMAI 1676 de 1 a 14 dias.	117
Tabela 14 - Biorreduções das flavanonas 3b-e promovidas pelos fungos <i>Cladosporium</i> sp. CBMAI 1237 e <i>Acremonium</i> sp. CBMAI 1676 após 7 dias de incubação.	120
Tabela 15 - Monitoramento da biotransformação da flavanona 3a pelo fungo <i>A. sydowii</i> CBMAI 935.	131

Tabela 16 - Medidas de rotação óptica para as flavanonas 3a-g e flavan-4-óis 4a-g isolados das reações com fungos derivados de ambiente marinho.....	134
---	-----

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1 - Etapa enzimática da síntese do enantiômero <i>R</i> do intermediário do fármaco flurbiprofeno.....	28
Esquema 2 - Obtenção do intermediário chave para a síntese do Atazanavir utilizando células íntegras da bactéria <i>Rhodococcus erythropolis</i> SC 13845.	29
Esquema 3 - Síntese da Neohesperidina DC a partir da Neohesperidina.....	38
Esquema 4 - Diidrochalconas como intermediários e precursor na síntese de compostos orgânicos.....	38
Esquema 5 - Biotransformação de derivados de flavonoides com microrganismos.	39
Esquema 6 - Biotransformação de 2'-hidroxi-2,4-dimetoxichalcona pelo fungo terrestre <i>Aspergillus niger</i>	40
Esquema 7 - Biorredução de chalconas por <i>Aspergillus flavus</i>	40
Esquema 8 - Glicosilação regioseletiva do xanthohumol promovida por fungos.....	41
Esquema 9 - Conversão of 2'-hidroxichalconas por BSA.	43
Esquema 10 - Processo biocatalítico para formação do intermediário chave da síntese do fármaco Singulair®.	43
Esquema 11 - Síntese de derivados de 2'-hidroxichalconas por condensação aldólica de Claisen-Schmidt.....	48
Esquema 12 - Síntese de 2'-hidroxi-diidrochalconas a partir da redução de 2'-hidroxichalconas.....	52
Esquema 13 - Síntese das flavanonas a partir de 2'-hidroxichalconas em meio básico.....	53
Esquema 14 - Síntese de flavan-4-óis a partir da redução das (±)-flavanonas com NaBH ₄ . ..	56
Esquema 15 - Etapas realizadas na biotransformação de derivados de flavonoides por fungos derivados de ambiente marinho.	62
Esquema 16 - Reação de biotransformação das flavanonas 3a-g pelo fungo <i>Cladosporium</i> sp. CBMAI 1237.	71
Esquema 17 - Biotransformação da 2'-hidroxichalcona 1a empregando o fungo <i>A. sydowii</i> CBMAI 935.	87
Esquema 18 - Biotransformação da flavanona 3a para obtenção de diidrochalcona, flavanol e/ou diidroxidiidrochalcona por fungos de ambiente marinho.....	105

Esquema 19 - Biotransformação da flavanona 3a pelo fungo <i>A. sydowii</i> CBMAI 935 após 8, 24 e 48 h de incubação.	129
---	-----

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	25
1.1. A biocatálise e sua importância	25
1.2. Os flavonoides e seus derivados	32
1.1.1. Chalconas	34
1.2.1. Diidrochalconas	37
1.3. Biotransformação de derivados de flavonoides	38
2. OBJETIVOS	45
2.1. Geral	45
2.2. Metas específicas	45
3. MATERIAIS E MÉTODOS	47
3.1. Reagentes e solventes	47
3.2. Sínteses dos compostos	47
3.2.1. Sínteses das chalconas 1a-h	47
3.2.2. Sínteses das 2'-hidroxi-diidrochalconas 2a-h	51
3.2.3. Sínteses de derivados de (±)-flavanonas 3a-g	52
3.2.4. Síntese dos (±)-flavan-4-óis 4a-b e 3d-g	56
3.3. Cultivo dos microrganismos	59
3.3.1. Fungos de ambiente marinho utilizados como biocatalisadores	59
3.3.2. Cultivo dos fungos de ambiente marinho em meio de cultura sólido	60
3.3.3. Cultivo dos fungos de ambiente marinho em meio de cultura líquido	60
3.4. Reações de biotransformação dos derivados de flavonoides	61
3.4.1. Reações de biotransformação das chalconas 1a-h com os fungos de ambiente marinho	63
3.4.1.1. Triagem de fungos de ambiente marinho para a biotransformação da chalcona 1a	63
3.4.1.2. Método de extração das reações de biotransformação	63
3.4.1.3. Reação em maior escala para o isolamento dos produtos de biotransformação da triagem dos fungos	65
3.4.2. Reações de biotransformação das chalconas 1a-h com o fungo <i>P. raistrickii</i> CBMAI 931	65
3.4.2.1. Reações de biotransformação das 2'-hidroxichalconas 1a-h com os micélios do fungo <i>P. raistrickii</i> CBMAI 931	65

3.4.2.2. Reações de biotransformação da 2'-hidroxichalcona 1a com o caldo enzimático do fungo <i>P. raistrickii</i> CBMAI 931	66
3.4.2.3. Reações de biotransformação da 2'-hidroxichalcona 1a com o fungo <i>P. raistrickii</i> CBMAI 931 em tampão fosfato	66
3.4.2.4. Reações de biotransformação da 2'-hidroxichalcona 1a com o fungo <i>P. raistrickii</i> CBMAI 931 em tampão imidazol	66
3.4.2.5. Isolamento dos produtos de biotransformação 2a-h obtidos nas reações com o fungo <i>P. raistrickii</i> CBMAI 931	67
3.4.3. Reações de biotransformação de flavanonas 3a-h por fungos derivados de ambiente marinho	70
3.4.3.1. Triagem de fungos de ambiente marinho para a biotransformação da flavanona 3a	70
3.4.3.2. Reação de biotransformação de 3a pelo fungo derivado de ambiente marinho <i>Acremonium</i> sp. CBMAI 1676 de acordo com o tempo reacional	71
3.4.3.3. Reações de biotransformação das flavanonas 3b-g com o micélio dos fungos <i>Acremonium</i> sp. CBMAI 1676 e <i>Cladosporium</i> sp. CBMAI 1237	71
3.4.4. Reações de biotransformação de derivados de flavonoides 1a-4a pelo fungo derivado de ambiente marinho <i>A. sydowii</i> CBMAI 935	76
3.4.4.1. Reações de biotransformação de 1a-4a com o fungo <i>A. sydowii</i> CBMAI 935 em tampão fosfato	76
3.4.5. Experimentos controles	76
3.4.5.1. Controles bióticos para as reações de biotransformação com os fungos de ambiente marinho	76
3.4.5.2. Controles abióticos para avaliar a estabilidade dos derivados de flavonoides	77
3.5. Técnicas cromatográficas e métodos de caracterização estrutural	77
3.5.1. Análises por Cromatografia a Gás/Espectrometria de Massas	77
3.5.2. Análises por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência	78
3.5.3. Ponto de fusão	79
3.5.4. Espectrometria na região de absorção do Infravermelho (IV)	79
3.5.5. Ressonância Magnética Nuclear (RMN de ¹ H e ¹³ C)	80
3.5.6. Medidas de rotação óptica	80
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	82
4.1. Triagem de fungos derivados de ambiente marinho para a biotransformação da 2'-hidroxichalcona 1a	82
4.2. Hidrogenação quimiosseletiva de 2'-hidroxichalconas 1a-h pelo fungo derivado de ambiente marinho <i>P. raistrickii</i> CBMAI 931	93

4.3. Reações de biotransformação de flavanonas 3a-g por fungos derivados de ambiente marinho	105
4.4. Hidroxilação de derivados de flavonoides 1a-4a empregando o fungo <i>A. sydowii</i> CBMAI 935	125
4.5. Medidas da Rotação óptica dos compostos	134
4.6. Caracterização química dos derivados de flavonoides 1b-4b e 5a	135
4.6.1. Caracterização da (<i>E</i>)-1-(2-hidroxifenil)-3-(4-metoxifenil)prop-2-en-1-ona 1b^a	135
4.6.2. Caracterização da 1-(2-hidroxifenil)-3-(4-metoxifenil)propan-1-ona 2b	139
4.6.3. Caracterização da 2-(4-metoxifenil)croman-4-ona 3b	142
4.6.4. Caracterização da 2-(4-metoxifenil)croman-4-ol 4b	145
4.6.5. Caracterização da 1-(2-hidroxifenil)-3-(4-hidroxifenil)propan-1-ona 5a	148
5. CONCLUSÃO	151
REFERÊNCIAS	152
APÊNDICE	160

The background of the slide features a repeating pattern of chemical structures, specifically flavonoid compounds, rendered in a light yellow color against a darker yellow background. These structures include various forms of chalcones, flavanones, and flavanols, characterized by their multi-ring systems and functional groups like hydroxyl and carbonyl groups.

Introdução

1. INTRODUÇÃO

1.1. A biocatálise e sua importância

A demanda por estratégias de síntese de compostos orgânicos de maneira sustentável, levando em consideração a proteção do meio ambiente e os cuidados com a saúde pública têm chamado a atenção da comunidade científica. E, neste contexto, a biocatálise desempenha um papel importante no desenvolvimento de novas tecnologias e metodologias para a produção de compostos com valor agregado.

A biocatálise faz o uso de catalisadores biológicos (enzimas) para a síntese de compostos orgânicos de interesse. As enzimas são os catalisadores responsáveis pelas reações bioquímicas que ocorrem no metabolismo de células vivas, logo, qualquer organismo vivo pode ser uma fonte de enzimas. Assim, reações biocatalíticas podem ser realizadas empregando-se as enzimas na forma isolada ou purificada, bem como através de células íntegras e extratos enzimáticos de microrganismos (leveduras, bactérias e fungos), vegetais e animais (REETZ, 2013).

As células microbianas são excelentes fontes de enzimas e representam cerca de 90% do mercado total de biotransformação. Mais da metade das enzimas utilizadas industrialmente tem como fonte de origem fungos e bactérias, com o restante proveniente de animais e de plantas (ILLANES et al., 2012). Constantemente são desenvolvidas triagens de novos microrganismos a fim de se obter novas fontes enzimáticas com especificidade catalítica. Uma vez descobertos, esses biocatalisadores podem ser otimizados usando ferramentas robustas de engenharia enzimática (SUN et al., 2017).

Assim como todo catalisador, as enzimas atuam promovendo uma rota de síntese para determinado composto aonde a barreira da energia de ativação necessária para a formação do produto é menor, resultando em uma reação mais rápida que na rota original. Mas, o uso de enzimas como biocatalisadores apresenta alguns diferenciais, pois são obtidas de fontes renováveis, permitem que as reações sejam executadas em condições suaves, evitando o uso de reagentes tóxicos e diminuindo a geração de subprodutos e resíduos. Além disso é possível obter altos rendimentos com excelentes seletividades em moléculas multi funcionalizadas (MUÑOZ SOLANO et al., 2012; SUN et al., 2017). Estas, entre outras características, enquadram a biocatálise nos princípios da Química Verde e do desenvolvimento sustentável. Graças aos avanços em biotecnologia, a biocatálise não é apenas benéfica para o meio ambiente, mas também muito rentável (SHELDON; WOODLEY, 2018).

Assim como em qualquer processo, o emprego de enzimas também apresentam algumas desvantagens, tais como: a necessidade de cofatores e de um sistema de reciclagem dos mesmos; a maioria das enzimas apresentam maior atividade catalítica em meio aquoso, o que pode dificultar determinada transformação, já que compostos orgânicos são geralmente pouco solúveis em água; temperaturas e pH extremos podem causar a desativação de enzimas; e, as enzimas são propensas a sofrer inibição tanto pelos substratos quanto pelos produtos. Porém, muitas dessas desvantagens já podem ser contornadas com o uso de estratégias biotecnológicas como a imobilização, adição de co-solventes e a clonagem e expressão de enzimas (FABER, 2011; REETZ, 2013; SHELDON; WOODLEY, 2018).

As enzimas são compostas por cadeias peptídicas formadas pela combinação de L-aminoácidos naturais, obtendo-se uma estrutura tridimensional única para cada enzima. As reações catalisadas por enzimas ocorrem em uma região específica da enzima conhecida como sítio ativo ou sítio catalítico. O sítio ativo é composto por resíduos de aminoácidos que permitem o reconhecimento de determinado substrato através da interação dos mesmos por meio de forças intermoleculares (ligações hidrogênio, Van der Waals e eletrostáticas). A estrutura do sítio ativo, bem como, a sua função são determinadas por sua estrutura tridimensional, sendo assim, alterações na sequência de aminoácidos pode ter um enorme impacto na estrutura e função da proteína (FABER, 2011).

Por serem compostas por aminoácidos quirais, as enzimas também são quirais, e como consequência, qualquer tipo de quiralidade presente na molécula do substrato é "reconhecido" após a formação do complexo enzima-substrato, por isso as enzimas podem promover reações altamente seletivas dentro e fora de um organismo vivo. Essas características são muito interessantes para a síntese de fármacos, agroquímicos e fragrâncias, pois frequentemente precisam serem sintetizados na forma de um único enantiômero (COMASSETO, 2010; SKARYDOVÁ et al., 2010).

Dessa forma, as enzimas podem promover transformações abrangendo os três principais tipos de seletividades: a regiosseletividade, a quimiosseletividade e a estereosseletividade. Uma reação regiosseletiva é aquela onde a transformação ocorre em apenas um grupo funcional entre dois ou mais idênticos situados em posições diferentes da mesma molécula. Já uma reação quimiosseletiva ocorre quando a transformação de um único tipo de grupo funcional é favorecida em detrimento de outros presentes no substrato. E uma reação estereosseletiva é quando há formação de apenas um dos enantiômeros possíveis para o substrato (FABER, 2011).

Enzimas podem ser incorporadas em etapas específicas de síntese visando o controle regio-, quimio- e estereosseletivo, possibilitando o desenvolvimento de rotas eficientes para a obtenção de compostos opticamente puros (SIMON; MUTTI; KROUTIL, 2013). Em decorrência da relação entre a quiralidade e as atividades e propriedades de muitos compostos, o desenvolvimento de novos métodos e processos de obtenção de compostos enantiopuros são de interesse para as indústrias farmacêuticas, agrícolas e alimentícias e para a química fina. Assim, a robustez das enzimas em biotransformar diversos substratos xenobióticos as tornam uma alternativa viável para a produção de compostos bioativos, bem como de intermediários quirais de interesse industrial (MUÑOZ SOLANO et al., 2012).

As enzimas são catalisadores versáteis e podem ser utilizadas em reações de hidroxilação, glicosilação, hidrogenação, desidrogenação, hidrólise, *O*-metilação, *O*-acetilação, epoxidação dentre outras (GIRI et al., 2001; BANERJEE; SINGH; RAHMAN, 2012).

As pesquisas acadêmicas envolvendo a biocatálise e a biotransformação de compostos orgânicos são muito importantes para o desenvolvimento de novos processos industriais. Pois, além de contribuir para o desenvolvimento de uma química limpa, a biocatálise possibilita a formação de compostos orgânicos enantiomericamente puros e/ou enriquecidos. Compostos estes, muitas vezes difíceis de serem sintetizados por vias convencionais, tal como, a produção da 11 α -hidroxiprogesterona por meio de conversão regio- e estereoespecífica da progesterona por *Rhizopus stolonifer* sp. e *Rhizopus arrhizus* sp. (PETERSON et al. 1952; REETZ, 2013).

Além disso, etapas biocatalíticas têm sido cada vez mais incorporados em processos industriais, principalmente para obtenção de intermediários sintéticos de fármacos. Pietruszka e Schölzel (2012) desenvolveram um método de síntese para o (*R*)-Flurbiprofeno, um derivado de Pronfen, que além de ser um anti-inflamatório não esteroide foi considerado como potencial redutor de níveis de β -amilóides, os agentes causadores da formação de placas na doença de Alzheimer. Na reação de redução da ligação dupla C-C do 2-(3-flúor-4-hidroxifenil)acrilato de metila foi utilizada a enzima ene-reductase YqjM isolada da bactéria *Bacillus subtilis*, onde o intermediário (*R*)-2-(3-flúor-4-hidroxifenil)propanoato de metila foi obtido com elevado excesso enantiomérico (>99%) e rendimento moderado (68%) (PIETRUSZKA; SCHÖLZEL, 2012; SIMON; MUTTI; KROUTIL, 2013)(Esquema 1).

Esquema 1 - Etapa enzimática da síntese do enantiômero *R* do intermediário do fármaco flurbiprofeno.

Fonte: Adaptado de Pietruszka e Schölzel (2012) e Simon, Mutti e Kroutil (2013).

As Ene Redutases (ERs) são as enzimas responsáveis por catalisar reduções (assimétricas) de ligações duplas conjugadas com grupos retiradores de elétrons. Estas enzimas são dependentes da Flavina Mononucleotídeo (FMN) e fazem parte da família das OYEs (“Old Yellow Enzymes”) (FOREJTNIKOVÁ et al., 2005; SKROBISZEWSKI et al., 2013) (Figura 1). As enzimas ERs são altamente regiosseletivas e reduzem apenas ligações duplas C-C ativadas com grupos retiradores de elétrons, de modo que ligações duplas eletronicamente isoladas não podem ser reduzidas por essas enzimas (FABER, 2011). Dessa forma, as cetonas α,β -insaturadas são bons substratos para ene-redutases.

Figura 1 – Redução assimétrica de alcenos ativados usando ene-redutases dependentes de flavina mononucleotídeo.

Fonte: Adaptado de Faber (2011).

Processos biocatalíticos industriais não se limitam apenas à utilização de enzimas isoladas e/ou imobilizadas, o uso de células integras de microrganismos ainda fazem parte de um grande número de metodologias sintéticas. Estudos recentes têm sido desenvolvidos em escala preparativa utilizando células microbianas com o objetivo de obter intermediários chave para a síntese de fármacos. A farmacêutica Bristol-Myers Squibb, por exemplo, utiliza

um método biocatalítico para a produção do intermediário quiral do Atazanavir (Reyataz[®]), um inibidor de endopeptidase de HIV (BORNSCHEUER et al., 2012; MUÑOZ SOLANO et al., 2012). O intermediário carbamato de *tert*-butila (2*S*,3*R*)-4-cloro-3-hidroxi-1-fenilbutano-2-ila é obtido através da redução do carbamato de (1*S*)-(3-cloro-2-oxo-1-(fenilmetil)propila) pela bactéria *Rhodococcus erythropolis* SC 13845 (Esquema 2). Este método desenvolvido por Patel, Chu e Mueller (2003) promoveu a obtenção do intermediário do Atazanavir com bons rendimento (95%), diastereosseletividade (98%) e enantiosseletividade (>99%).

Esquema 2 - Obtenção do intermediário chave para a síntese do Atazanavir utilizando células íntegras da bactéria *Rhodococcus erythropolis* SC 13845.

Fonte: Adaptado de Patel, Chu e Mueller et. al (2003).

O uso de enzimas biotecnologicamente desenvolvidas afim de melhorar suas características e a promiscuidade de substrato tem crescido consideravelmente nos últimos anos (BORNSCHEUER et al., 2012; SHELDON; WOODLEY, 2018). A Codexis, por exemplo, desenvolveu um método enzimático para a síntese da Sitagliptina, medicamento usado para o tratamento de diabetes do tipo II, a partir da Prositagliptina utilizando uma transaminase *R* seletiva modificada. O rota enzimática superou o método químico utilizado anteriormente, pois além de dispensar o uso de catalisador metálico (ródio) e a diminuição dos resíduos oriundos da reação, o método enzimático aumentou o rendimento global e a produtividade em 53% em comparação com a rota quimiocatalítica (Figura 2) (SAVILE et al., 2010).

Recentemente, rotas alternativas também têm sido estudadas empregando microrganismos para a produção de intermediários chave da síntese da Sitagliptina, como a utilização de cepas da bactéria Gram-negativa *Pseudomonas pseudoalcaligenes* XW-40 ou do fungo filamentoso *Rhizopus microsporus* var. *rhizopodiformis* ZJPH1308. Em ambos os casos o intermediário (S)-álcool foi obtido com altos rendimentos (93-99%) e elevado excesso enantiomérico (>99%) após 24 h de reação (SUN et al., 2016; WEI; XIA; HE, 2016).

Figura 2 – Rotas enzimáticas e quimio catalítica para a produção da Sitagliptina.

Fonte: Adaptado de Sun et al. (2016), Wei Xia e He (2016), Savile et al. (2010)

Reações de biotransformação utilizando microrganismos apresentam muitas vantagens, tendo em vista suas características, como por exemplo o rápido crescimento microbiano, a facilidade de produção de enzimas em larga escala, o baixo custo, por ser biodegradável e favorável ao meio ambiente – pois, são de origem natural – dentre outras vantagens. Por décadas, os microrganismos de origem terrestre foram as principais fontes de enzimas, mas todos os avanços em biocatálise ressaltam a importância da busca por novas fontes enzimáticas.

Fontes enzimáticas ainda pouco exploradas, como os microrganismos derivados de ambiente marinho apresentam-se como uma alternativa promissora para o emprego em reações de biotransformação de diversos substratos naturais ou xenobióticos. Os oceanos compreendem mais de 70% da superfície do planeta e abrigam inúmeros organismos vivos que apresentam características únicas (ZHANG; KIM, 2010). Microrganismos derivados de ambiente marinho, como os fungos, podem ser obtidos a partir de diversas fontes marinhas,

tais como esponjas, algas, moluscos, peixes entre outras. E as enzimas provenientes desses microrganismos apresentam propriedades específicas, uma vez que são derivadas de organismos que sobrevivem em um habitat com baixas temperaturas, elevadas concentrações salinas, alta pressão e pouca luminosidade (TRINCONE, 2010; ALVARENGA et al., 2014). Essas características conferem a robustez biocatalítica de enzimas derivadas desses microrganismos para diferentes tipos de aplicações biotecnológicas.

Ainda são poucas as enzimas derivadas de ambiente marinho comercializadas ou utilizadas na indústria, mas muitos estudos estão sendo voltados ao isolamento e utilização de enzimas para processos industriais. Enzimas do tipo lipases, álcool desidrogenases, proteases, amilases, lacases entre outras já foram isoladas de fungos derivados de ambiente marinho, apresentando elevada estabilidade em amplas faixas de temperatura (35-75 °C) e pH (3,0-11,0) (BONUGLI-SANTOS et al., 2015). Estas características são importantes para as reações que precisam serem realizadas em condições extremamente ácidas ou alcalinas, como algumas reações desejáveis para o processamento de alimentos, para a indústria de papel, de detergentes, de biocombustíveis e têxtil (SANA, 2013).

α -Amilases isoladas de microrganismos marinhos foram empregadas na produção de biocombustíveis, como é o caso da Fuelzyme® (Verenium Corporation) que foi isolada de um microrganismo de águas profundas, o *Thermococcus* sp. A Fuelzyme® é uma enzima termoestável (>100 °C) empregada na produção do etanol no processo de liquefação, liberando dextrinas e oligossacarídeos com maior solubilidade e com baixo peso molecular (HOMAEI; GHANBARZADEH; MONSEF, 2016).

Enzimas e microrganismos derivados de ambiente marinho também são utilizados para outras aplicações, tais como biodegradação de poluentes ambientais (pesticidas, efluentes têxteis, etc.), biotransformação de compostos naturais e xenobióticos, produção de “blocos de construção” de interesse para a indústria farmacêutica, entre outras.

Fungos derivados de ambientes marinhos têm sido empregados com sucesso frente a biotransformação e biodegradação de diversos substratos. O fungo *Penicillium citrinum* CBMAI 1186 foi utilizado na redução regioseletiva de chalconas, enonas e adutos de Knoevenagel (FERREIRA et al., 2014, 2015; JIMENEZ et al., 2016). *Aspergillus sydowii* CBMAI 935 e *Penicillium decaturense* CBMAI 1234 promoveram a biodegradação de metil paration (ALVARENGA et al., 2014). A biorredução estereosseletiva de α -azido cetonas e derivados de acetofenona também foram realizadas empregando fungos de ambiente marinho (RIBEIRO et al., 2015; ROCHA et al., 2015; MOUAD et al., 2016). Assim, estes estudos

demonstraram que os microrganismos marinhos podem ser excelentes fontes de enzimas capazes de catalisar diferentes reações em moléculas orgânicas.

1.2. Os flavonoides e seus derivados

Os flavonoides são um grupo diversificado de compostos comumente encontrados em frutas, legumes, grãos, cascas, raízes, caules, flores e ervas (MONDAL; GUPTA; MALLIK, 2011; CHENG; LI, 2012). Nas plantas, os flavonoides desempenham funções importantes, muitos deles são responsáveis pelas cores atrativas de flores, folhas e frutas, bem como, pelo sistema de defesa da planta (MONDAL; GUPTA; MALLIK, 2011). Eles são ainda componentes importantes na dieta humana (Tabela 1). Estudos sugerem que o consumo de uma dieta rica em flavonoides previne o desenvolvimento de muitas doenças associadas ao envelhecimento, câncer, diabetes, osteoporose, doenças cardiovasculares e neurodegenerativas (BEECHER, 2003; GRAF; MILBURY; BLUMBERG, 2005).

Tabela 1 – Exemplos de fontes de classes de flavonoides em alimentos e seus principais compostos.

Classe	Compostos	Alimentos
Flavanonas	Hesperidina, naringenina, neohesperidina	Frutas cítricas (Laranjas, limão, toranja), orégano
Flavonas	Apigenina, luteolina, diosmetina	Aipo, salsa, alcachofras, chicória, pimenta verde
Isoflavonoides	Daizeína, genisteína, gliciteína	Leite de soja, soja, tofu
Flavonóis	Kaempferol, quercetina, miricetina, rutina	Brócolis, alho, cebola, alcaparras, figos frescos
Flavanóis	Catequinas, procianidina, teaflavinas	Nozes, cacau, amora, maçãs, pêssegos, chás
Flavanonóis	Taxifolina	Limão

Fonte: Adaptado de Yao et al.(2004) e Raffa et al. (2017).

Quimicamente os flavonoides possuem um padrão estrutural contendo um esqueleto carbônico do tipo difenilpropano (C6-C3-C6) e são divididos em subclasses determinadas pela ligação do anel B ao anel C, bem como pelo estado de oxidação e pela presença de grupos funcionais presentes no anel C (WU et al., 2013). Dessa forma, os flavonoides são classificados como flavanonas (naringenina e hesperetina), flavanóis (catequina e *epi*-catequina), flavonas (apigenina e luteolina), isoflavonas (daidzeina e genisteína), flavanonóis (taxifolina) e flavonóis (kaempferol, miricetina e quercetina), dentre outros (Figura 3) (BEECHER, 2003; FAGGIO et al., 2016).

Figura 3 – Núcleo básico e estruturas químicas de compostos da classe dos flavonoides.

Estudos recentes exploraram diversas atividades biológicas e farmacológicas de flavonoides naturais e sintéticos, incluindo atividades antibacteriana, antifúngica, antiviral, antialérgica, anti-inflamatória, antiproliferativa, antioxidante e anticâncer (Figura 4). O potencial para reduzir os riscos de doenças crônicas tem motivado a comunidade científica a desenvolver métodos de síntese de compostos dessa classe (HAYTOWITZ; BHAGWAT; HOLDEN, 2013; WU et al., 2013; ROSA et al., 2017).

Figura 4 - Exemplos de derivados de flavonoides naturais e sintético com atividades farmacológicas.

No Brasil alguns flavonoides naturais já são utilizados por indústrias farmacêuticas como princípio ativo de medicamentos, como é o caso da quercetina, silimarina (Silimalon[®], Nikkho), diosmina e hesperidina (Diosmin[®], Aché) (ANVISA, 2017) (Figura 5). A silimarina, por exemplo, é utilizada no tratamento de doenças hepáticas. Já a associação da diosmina e hesperidina resulta em um medicamento antivariçoso de ação sistêmica, sendo assim utilizados no tratamento de doenças venosas crônicas. Além disso, existem medicamentos

fitoterápicos que possuem alto teor de flavonoides em sua composição, como aqueles a base de calêndula (*Calendula officinalis* L.) e maracujá (*Passiflora edulis* e *P. incarnata*).

Figura 5 - Estruturas químicas de flavonoides utilizados como princípios ativos em medicamentos.

1.1.1. Chalconas

As chalconas são consideradas “flavonoides menores”, pois atuam como precursoras biossintéticas de muitos produtos naturais originários da classe dos flavonoides, assim como flavanonas e flavonóis. As chalconas são derivadas da rota do Chiquimato e são produtos finais da condensação de uma unidade de partida de cinamoil-CoA adequada (por exemplo, 4-hidroxicinamoil-CoA) e três unidades de malonil-CoA. Essa reação de condensação é catalisada pela enzima chalcona sintase (CHS) através de uma reação do tipo Claisen. A flavanona é formada pela ação da enzima chalcona isomerase (CHI) através do ataque nucleofílico intramolecular do Michael do grupo hidroxila (2'-OH) da chalcona à ligação dupla α,β -insaturada da mesma (GROTEWOLD, 2006; DEWICK, 2009).

A Figura 6 apresenta a rota biossintética simplificada para a formação da naringenina chalcona e de compostos pertencentes as classes das flavanonas, flavonas, isoflavonas, flavanonois e flavonóis que podem ser biossinteticamente formados a partir da naringenina.

Figura 6 - Rota biossintética simplificada de formação da naringenina chalcona e de derivados de flavonoides.

Fonte: Adaptado de Dewick (2009) e Prasad et. al. (2016)

As chalconas são de ocorrência natural e podem ser facilmente encontradas em frutas e vegetais (ZENGER et al., 2015). Na natureza, as chalconas são encontradas geralmente com grupos hidroxilas em seus anéis aromáticos, mas uma variedade de substituintes podem ser sinteticamente incorporados em sua estrutura, que é composto por dois anéis aromáticos conectados por três átomos de carbono α,β -insaturados (Figura 7). As chalconas podem existir como isômeros *E* e *Z*, no entanto, a forma *E* é termodinamicamente mais estável.

Figura 7 - Chalcona e alguns de seus derivados naturais.

O esqueleto básico das chalconas apresenta características que atraem a atenção tanto do ponto de vista químico quanto biológico, pois as sínteses de compostos dessa classe são realizadas com procedimentos simples, que permitem a obtenção de compostos multi substituídos e com vários sítios passíveis de (bio)transformação. A literatura fornece uma série de procedimentos para a síntese de chalconas, entre elas a mais utilizada para a obtenção de chalconas substituídas é a condensação aldólica cruzada, também conhecida como condensação aldólica do tipo Claisen-Schmidt (RAJPUT; PATOLE, 2015).

O sistema α,β -insaturado das chalconas torna esses compostos fortes candidatos a intermediário de síntese, visto que a deslocalização da densidade de elétrons no sistema α,β -insaturado permite a participação em reações de adição através do ataque ao grupo carbonílico, bem como envolvendo o carbono β , levando à síntese de compostos heterocíclicos promissores. A ligação dupla α,β -insaturada das chalconas permite ainda a formação de ligações C-C através de adições de Michael, levando a formação de adutos de Michael altamente estereosseletivos (ZHUANG et al., 2017). Dessa forma, chalconas tem sido utilizadas em passos de síntese de compostos, tais como, pirróis, indóis, isoxazóis, imidazóis, pirazóis, indazóis, triazóis, tetrazóis, piridinas e pirimidinas (ALBUQUERQUE et al., 2015; RAJPUT; PATOLE, 2015).

Estas características, assim como a presença da ligação dupla α,β -insaturada, estão associadas a uma variedade de atividades biológicas, das quais destacam-se antidiabética,

anti-hipertensiva, antirretroviral, anti-inflamatória, anti-histamínica, antioxidante, antimalárica e anticâncer (Figura 8) (MAHAPATRA; BHARTI, 2016).

Figura 8 - Exemplos de derivados de chalconas naturais e sintéticas com atividades farmacológicas.

Chalconas hidroxiladas na posição 2 do anel A, também chamadas de 2'-hidroxichalconas têm sido reportadas na literatura como material de partida para a formação de flavanonas. De modo geral, a conversão de 2'-hidroxichalcona em flavanona pode ser realizada empregando-se catalisadores ácidos ou básicos, aminoácidos, uso da radiação micro-ondas e enzimas (RAGHAV; GARG; RAVISH, 2016).

1.2.1. Diidrochalconas

Assim como grande parte dos flavonoides, as diidrochalconas exibem uma variedade de atividades farmacológicas e alguns compostos são utilizados como adoçantes, por exemplo, a Neohesperdina DC, que é um adoçante hipocalórico não cariogênico e utilizado como um edulcorante numa vasta gama de alimentos, tais como, bebidas não alcólicas e doces (TOMÁS-BARBERÁN et al., 2000). A Neohesperidina DC é obtida a partir da hidrogenação em meio básico da Neohesperidina, uma flavanona glicosilada encontrada em algumas frutas cítricas como a laranja (*Citrus aurantium*) (Esquema 3).

Esquema 3 – Síntese da Neohesperidina DC a partir da Neohesperidina.

Fonte: Dewick (2009).

As diidrochalconas também são utilizadas para síntese orgânica, pois podem ser empregadas como intermediários-chave na síntese de núcleos de indenos, pirróis, flavenos, antocianinas e homoisoflavonoides (AHMED; VAN LIER, 2006; SIDDAIAH et al., 2006; ZHANG et al., 2013; ZHENG et al., 2015) (Esquema 4).

Esquema 4 - Diidrochalconas como intermediários e precursor na síntese de compostos orgânicos.

Fonte: Adaptado de Siddaiah et al. (2006), Zhang et al. (2013) e Zheng et al. (2015).

1.3. Biotransformação de derivados de flavonoides

A biotransformação é uma estratégia com grande potencial para modificar as estruturas de flavonoides naturais e sintéticos. Dentre as abordagens biocatalíticas já empregadas para a produção de flavonoides encontram-se a biotransformação microbiana, a engenharia enzimática, a engenharia metabólica e a utilização de células de plantas. O uso de microrganismos apresentou resultados promissores quando empregados na síntese assimétrica de flavonoides com potenciais atividades farmacológicas (CAO et al., 2015).

A adição de substituintes e a ciclização intramolecular são alguns exemplos de biotransformações estruturais de flavonoides promovidas por microrganismos. O microrganismo *Streptomyces avermitilis* MA-4680 catalisou a hidroxilação regioesselativa da genisteína através da adição de um grupo hidroxila no anel aromático B do substrato (ROH et al., 2009). A transformação de 6-hidroxi flavona utilizando o sistema enzimático de *Aspergillus niger* 13/5 resultou na desidrogenação seletiva de C-2 e C-3, levando a formação da 6-hidroxi flavona como um único produto (KOSTRZEWA-SUSŁOW et al., 2006). O xanthohumol, que é uma chalcona prenilada encontrada em uma variedade de lúpulos (*Humulus lupulus*) foi biotransformado para sua forma aurona pelo fungo *Aspergillus ochraceus* AM456 (TRONINA et al., 2014). Em todos os casos os complexos enzimáticos dos microrganismos catalisaram as reações de forma eficiente e seletiva (Esquema 5).

Esquema 5 - Biotransformação de derivados de flavonoides com microrganismos.

Fonte: Adaptado de Kostrzewa-Susłow et al. (2006), Roh et al. (2009) e Tronina et al. (2014).

Vários fungos do gênero *Aspergillus* foram utilizados em reação de biotransformação de chalconas. O fungo terrestre *Aspergillus niger* LSPN001 promoveu a ciclização (27%) e a hidroxilação (22%) de uma série de 2'-hidroxichalconas metoxiladas. Os rendimentos obtidos variaram entre 10-27% e não foram observados excessos enantioméricos para os produtos quirais. No estudo da cinética da reação, Alarcón et al. (2013) relataram que a formação dos

produtos de ciclização e desmetilação ocorreram nas primeiras 72 h de reação, e que os produtos da hidroxilação foram formados após este período. Assim, um maior tempo de incubação levou uma maior formação dos produtos hidroxilados (Esquema 6).

Esquema 6 - Biotransformação de 2'-hidróxi-2,4-dimetoxichalcona pelo fungo terrestre *Aspergillus niger*.

Fonte: Alarcón et al. (2013).

O fungo terrestre *Aspergillus alliaceus* UI 315 também promoveu a ciclização de 2'-hidróxi-2,3-metoxichalcona com rendimentos entre 6-16% e sem enantiosetelividade para os produtos quirais (SANCHEZ-GONZALEZ; ROSAZZA, 2004). Já o fungo endofítico *Aspergillus flavus*, isolado da planta *Paspalum maritimum* também foi empregado na biotransformação de chalconas, porém foi observado apenas a redução da ligação dupla C α -C β nas correspondentes diidrochalconas (Esquema 7)(CORRÊA et al., 2011).

Esquema 7 - Biorredução de chalconas por *Aspergillus flavus*.

Fonte: Corrêa et al. (2011).

A glicosilação do flavonoide natural xanthohumol foi estudada por Tronina et al. (2013) que utilizaram os fungos terrestres *Absidia coerulea* AM93, *Rhizopus nigricans* UPF701, *Mortierella mutabilis* AM404 e *Beauveria bassiana* AM446 para promover a glicosilação regioseletiva da posição C-4' do xanthohumol formando o xanthohumol 4'-O- β -D-glucopiranosídeo e o xanthohumol 4'-O- β -D-(4'''-O-metil)-glucopiranosídeo. Além da

glicosilação, o fungo *M. mutabilis* AM404 também catalisou a ciclização do xanthohumol resultando na isoxanthohumol 7-*O*- β -glucopiranosídeo (Esquema 8).

Esquema 8 - Glicosilação regioseletiva do xanthohumol promovida por fungos.

Fonte: Adaptado de Tronina et al. (2013).

Janeczko, Gładkowski e Kostrzewa-Susłow (2013) realizaram a biotransformação da chalcona e 2'-hidroxichalcona utilizando leveduras e fungos filamentosos. Neste trabalho os autores observaram que as cinco culturas de leveduras foram mais eficientes na redução da ligação dupla C-C α,β -insaturada para a chalcona (80-99%, 1 h) do que para a 2'-hidroxichalcona (63-98%, 72 h) (Figura 9). As reações empregando fungos apresentaram menores conversões tanto para a chalcona (6-97%, 1 h) quanto para a 2'-hidroxichalcona (2-76%, 72 h). Quando mantidas em incubação por 3-9 dias as culturas de *Rhodotorula rubra* KCh 4, *Fusarium culmorum* KCh 10, *Rhodotorula glutinis* KCh242 e *Didymosphaeria igniaria* KCh 6670 apresentaram um decréscimo na concentração da diidrochalcona formada seguida pela redução enantiosseletiva da ligação C=O para produzir o *R*- ou *S*-álcool.

Figura 9 - Biorredução de chalconas por fungos e leveduras para obtenção de diidrochalconas.

Fonte: Adaptado de Janeczko, Gładkowski e Kostrzewa-Susłow, (2013).

Células totais de bactérias também têm sido empregadas na obtenção de diidrochalconas, tais como, *Rhodococcus* sp. DSM 364 e *Gordonia* sp. DSM 44456 que promoveram a biotransformação de flavanona e chalconas em bons rendimentos (13-94%) (STOMPOR et al., 2013). Silva, Stambuk e Nascimento (2010) sintetizaram uma série de chalconas contendo grupos metoxila e nitro, os quais foram usados como substratos em reações de biotransformação mediadas por três linhagens comerciais da levedura *Saccharomyces cerevisiae*. As reações foram realizadas em sistema bifásico utilizando tampão fosfato de potássio/ácido cítrico e hexano (1:1 v/v). As leveduras promoveram a biorredução quimiosseletiva das chalconas, mas a influência dos grupos substituintes nos anéis A e B das chalconas foram, em geral, pouco significantes e não foi observada nenhuma correlação entre grupos doadores ou receptores de elétrons.

Proteínas também são utilizadas em reações biocatalíticas, como é o caso da Albumina de Soro Bovino (BSA) que foi utilizada como biocatalisador em reações de ciclização das chalconas sintéticas 2'-hidroxi-4-metoxichalcona e 2-amino-4-metoxichalcona para formar a 4-metoxiflavanona (55%) e a 4-metoxiazaflavanona (50%), respectivamente (RAGHAV; GARG; RAVISH, 2016) (Esquema 9). Com base nos experimentos realizados Raghav et al. (2016) observaram a participação do aminoácido cisteína na reação de ciclização e propuseram um mecanismo para a provável ação do grupo –SR da cisteína de BSA na reação biocatalítica. Entretanto, não foram realizados estudos para definir a enantiosseletividade das flavanonas formadas.

Esquema 9 - Conversão of 2'-hidroxichalconas por BSA.

Fonte: Raghav et al. (2016).

Com o avanço da biotecnologia enzimática Liang et al. (2010) desenvolveram um processo biocatalítico para a obtenção em grande escala (200 kg) de um intermediário chave na síntese do antiasmático Montelukaste de sódio, princípio ativo do fármaco Singulair® (Esquema 10). Na etapa biocatalítica, uma enzima ceto reductase KRED (CDX-026) biotecnologicamente desenvolvida pela Codexis foi empregada para conversão enantiosseletiva de um derivado de diidrochalcona ao álcool correspondente, com excelente rendimento (> 95%), elevado excesso enantiomérico (ee > 99,9%) e boa pureza química (> 98,5%), resultando em um processo robusto e econômico.

Esquema 10 - Processo biocatalítico para formação do intermediário chave da síntese do fármaco Singulair®.

Fonte: Adaptado de Liang et al. (2010).

Nesse contexto, com o biocatalisador adequado e com vantagem de uma reação realizada a um pH próximo do neutro e a temperatura ambiente, a biocatálise pode ser utilizada para sintetizar derivados de flavonoides por uma via biológica de baixo custo e de fácil execução atendo aos princípios da Química Verde, além de possibilitar a formação de moléculas enantiomericamente puras e/ou enriquecidas e com potencial farmacológico.

The background of the slide features a repeating pattern of chemical structures, specifically flavonoid-like molecules, rendered in a light yellow color against a slightly darker yellow background. These structures include various rings, hydroxyl groups, and carbonyl groups, creating a scientific and organic aesthetic.

Objetivos

2. OBJETIVOS

2.1. Geral

Realizar reações de biotransformação de derivados de flavonoides (chalconas, diidrochalcona, flavanona e flavan-4-ol) empregando fungos de ambiente marinho.

2.2. Metas específicas

- Sintetizar 2'-hidroxichalconas substituídas por reações de condensação aldólica cruzada Claisen-Schmidt;
- Sintetizar derivados de flavonoides (diidrochalconas, flavanonas e flavan-4-óis) racêmicos por métodos químicos para serem utilizados como padrões nas análises cromatográficas;
- Realizar reações de biotransformação de derivados de flavonoides utilizando fungos de ambiente marinho;

The background of the page features a repeating pattern of chemical structures, specifically flavonoid compounds, rendered in a light yellow color against a white background. These structures are scattered across the upper and middle portions of the page, creating a scientific and thematic backdrop for the title.

Materiais e Métodos

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Reagentes e solventes

Os reagentes 2-hidroxiacetofenona (99%), benzaldeído (99%), 3-bromobenzaldeído (97%), 4-bromobenzaldeído (99%), 3-clorobenzaldeído (97%), 4-clorobenzaldeído (97%), 3-fluorobenzaldeído (97%), 4-fluorobenzaldeído (98%) foram obtidos comercialmente da Sigma-Aldrich. O 4-metoxibenzaldeído (98%) foi adquirido da Vetec. O hidróxido de sódio (97%) e o ácido clorídrico (37%) foram adquiridos da Quemis (Brasil). Os solventes acetato de etila (PA) e hexano (PA) foram adquiridos da Synth. Os solventes grau cromatográfico (hexano, metanol e 2-propanol) foram obtidos da Panreac. Todos os reagentes foram usados sem prévia purificação. A sílica gel para cromatografia *flash* de 6 nm de diâmetro de poro (0,035-0,070 nm) utilizada nas purificações dos compostos por cromatografia em coluna foi obtida da Acros Organic. Os sais utilizados na preparação da água do mar artificial foram adquiridos comercialmente da Synth. O Agar e o extrato de malte foram adquiridos da Kasvi.

3.2. Sínteses dos compostos

3.2.1. Sínteses das chalconas **1a-h**

As chalconas **1a-h** foram sintetizadas de acordo com o procedimento a seguir: Em um balão de fundo redondo de 125 mL foram adicionados 50 mL de etanol, 2-hidroxiacetofenona (0,01 mol) e derivados do benzaldeído **a-h** (0,01 mol) (FERREIRA et al., 2014). A mistura reacional foi mantida à temperatura ambiente em agitação magnética por 10 minutos. Em seguida foram adicionados 5 mL de NaOH (5 M) gota a gota e a mistura reacional permaneceu em agitação por 12 – 24 h. As reações foram acompanhadas por Cromatografia em Camada Delgada (CCD) (Macherey-Nagel, 20x20cm, sílica gel 60, G/UV 254 nm). Após esse período a mistura reacional foi transferida para um frasco béquier (500 mL) e em seguida foram adicionados lentamente 5 mL de HCl (10 %). O precipitado formado foi filtrado e lavado 4 vezes com água destilada gelada (Figura 10). Após serem purificados por cromatografia em coluna utilizando hexano e acetato de etila (9,5:0,5) os rendimentos foram determinados. As caracterizações dos produtos **1a-h** obtidos foram realizadas por técnicas espectroscópicas de Ressonância Magnética Nuclear de ^1H e ^{13}C , Infravermelho (IV) e Espectrometria de Massas (EM) (Esquema 11).

Figura 10 - Ilustração das etapas da síntese das 2'-hidroxichalconas **1a-h**. (A) Reação entre a 2-hidroxiacetofenona e os derivados de benzaldeído **a-h**. (B) Finalização da reação com adição de HCl 10% e gelo. (C) Produto da reação após filtração em funil de Büchner.

Fonte: Autoria própria.

Esquema 11 - Síntese de derivados de 2'-hidroxichalconas por condensação aldólica de Claisen-Schmidt.

(E)-1-(2-hidroxifenil)-3-fenilprop-2-en-1-ona (**1a**)

$\text{C}_{15}\text{H}_{12}\text{O}_2$, 224,26 g mol⁻¹; rendimento de 90%; sólido amarelo; pf = 78-80 °C; IV (KBr) ν (cm⁻¹) = 3055, 3026, 1639, 1582, 1574, 1485, 1437, 1369, 1341, 1308, 1296, 1267, 1206, 1153, 976, 864, 756, 741; RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm) = 12,81 (s, 1H), 7,95 – 7,89 (m, 2H), 7,70 – 7,62 (m, 3H), 7,50 (ddd, J = 8,5, 7,2, 1,6 Hz, 1H), 7,46 – 7,41 (m, 3H), 7,03 (dd, J = 8,4, 1,1 Hz, 1H), 6,95 (ddd, J = 8,3, 7,2, 1,2 Hz, 1H); RMN de ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ (ppm) = 193,7, 163,6, 145,5, 136,4, 134,6, 130,9, 129,7, 129,0, 128,7, 120,1, 120,0, 118,9, 118,6; EM (70 eV, I.E.) m/z = 224 (M⁺) (100), 223, 207, 178, 165, 147, 131, 120, 103, 93, 77, 65, 51. Os dados estão de acordo com a literatura (ZHANG; WANG, 2014).

(E)-1-(2-hidroxifenil)-3-(4-metoxifenil)prop-2-en-1-ona (**1b**)

$C_{16}H_{14}O_3$, 254,28 g mol⁻¹; rendimento de 40%; sólido amarelo; pf = 92-94 °C; IV (KBr) $\mu_{\max}$ (cm⁻¹) = 3034, 3005, 2750, 1639, 1599, 1580, 1508, 1493, 1443, 1341, 1321, 1269, 1229, 1209, 1161, 829, 814, 762, 752; RMN de ¹H (500 MHz, CDCl₃) δ (ppm) = 12,94 (s, 1H), 7,90 (d, J = 15,4 Hz, 1H), 7,91 (dd, J = 8,0 e 1,6 Hz, 1H), 7,64 – 7,60 (m, 2H), 7,53 (d, J = 15,4 Hz, 1H), 7,48 (ddd, J = 8,5, 7,2, 1,5 Hz, 1H), 7,02 (dd, J = 8,4, 1,0 Hz, 1H), 6,97 – 6,91 (m, 3H), 3,86 (s, 3H); RMN de ¹³C (125 MHz, CDCl₃) δ (ppm) = 193,7, 163,6, 162,0, 145,3, 136,1, 130,5, 129,5, 127,3, 120,1, 118,7, 118,6, 117,6, 114,5, 55,5; EM (IE, 70 eV) m/z = 254 (M⁺•), 237, 223, 207, 161, 134 (100), 121, 108, 93, 77, 65. Os dados estão de acordo com a literatura (YONG et al., 2013).

(E)-3-(3-fluorofenil)-1-(2-hidroxifenil)prop-2-en-1-ona (**1c**)

$C_{15}H_{11}FO_2$, 242,25 g mol⁻¹; rendimento de 81%; sólido amarelo; pf = 103-105 °C; IV (KBr) ν (cm⁻¹) = 3046, 2924, 1645, 1585, 1487, 1449, 1439, 1368, 1346, 1288, 1288, 1223, 1202, 1155, 1148, 968, 737, 664; RMN de ¹H (500 MHz, CDCl₃) δ (ppm) = 12,71 (s, 1H), 7,91 (dd, J = 8,1, 1,6 Hz, 1H), 7,86 (d, J = 15,5 Hz, 1H), 7,64 (d, J = 15,5 Hz, 1H), 7,51 (ddd, J = 8,6, 7,2, 1,6 Hz, 1H), 7,44 – 7,34 (m, 3H), 7,16 – 7,11 (m, 1H), 7,05 – 7,02 (m, 1H), 6,96 (ddd, J = 8,2, 7,2, 1,2 Hz, 1H); RMN de ¹³C (125 MHz, CDCl₃) δ (ppm) = 193,4, 163,6, 163,1 (d, J = 247,2 Hz), 143,9 (d, J = 2,8 Hz), 136,8 (d, J = 7,7 Hz), 136,6, 130,6 (d, J = 8,2 Hz), 129,7, 124,8 (d, J = 2,9 Hz), 121,4, 119,9, 118,9, 118,7, 117,7 (d, J = 21,4 Hz), 114,63 (d, J = 21,9 Hz); EM (IE, 70 eV) m/z = 242 (M⁺•), 225, 196, 183, 147 (100), 121, 101, 93, 75, 65. Os dados estão de acordo com a literatura (BIST et al., 2017).

(E)-3-(4-fluorofenil)-1-(2-hidroxifenil)prop-2-en-1-ona (**1d**)

$C_{15}H_{11}FO_2$, 242,25 g mol⁻¹; rendimento de 62%; sólido amarelo; pf = 101-103 °C; IV (KBr) ν (cm⁻¹) = 3034, 3005, 2750, 1639, 1599, 1580, 1508, 1493, 1443, 1341, 1341, 1321, 1269, 1229, 1209, 1161, 829, 814, 762, 752; RMN de ¹H (500 MHz, CDCl₃) δ (ppm) = 12,78 (s, 1H), 7,93 –

7,90 (m, 1H), 7,89 (d, $J = 15,7$ Hz, 1H), 7,69 – 7,64 (m, 2H), 7,58 (d, $J = 15,5$ Hz, 1H), 7,50 (ddd, $J = 8,6, 7,3, 1,6$ Hz, 1H), 7,16 – 7,10 (m, 2H), 7,03 (dd, $J = 8,4, 0,9$ Hz, 1H), 6,95 (ddd, $J = 8,2, 7,2, 1,2$ Hz, 1H); RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) δ (ppm) = 193,5, 163,6, 164,3 (d, $J = 252,4$ Hz), 144,1 (d, $J = 0,7$ Hz), 136,5, 130,9 (d, $J = 3,3$ Hz), 130,6 (d, $J = 8,8$ Hz), 129,6, 120,0, 119,9 (d, $J = 2,4$ Hz), 118,9, 118,7, 116,3 (d, $J = 22,0$ Hz); EM (IE, 70 eV) $m/z = 241$ ($\text{M}^{+\bullet}$) (100), 225, 196, 147, 120, 101, 92, 75, 65. Os dados estão de acordo com a literatura (BIST et al., 2017)

(E)-3-(3-bromofenil)-1-(2-hidroxifenil)prop-2-en-1-ona (**1e**)

$\text{C}_{15}\text{H}_{11}\text{BrO}_2$, 303,15 g mol $^{-1}$; rendimento de 80%; sólido amarelo; pf = 92-94 °C; IV (KBr) ν (cm $^{-1}$) = 2932, 1641, 1576, 1570, 1485, 1472, 1439, 1266, 1341, 1217, 1283, 1206, 1157, 1022, 970, 758; RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ (ppm) = 12,70 (s, 1H), 7,92 (dd, $J = 8,1, 1,6$ Hz, 1H), 7,85 – 7,79 (m, 2H), 7,64 (d, $J = 15,5$ Hz, 1H), 7,59 – 7,48 (m, 3H), 7,31 (t, $J = 7,9$ Hz, 1H), 7,04 (dd, $J = 8,4, 0,9$ Hz, 1H), 6,96 (ddd, $J = 8,2, 7,2, 1,2$ Hz, 1H); RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) δ (ppm) = 193,4, 163,6, 143,6, 136,7, 136,7, 133,6, 130,9, 130,5, 129,7, 127,5, 123,2, 121,5, 119,9, 119,0, 118,7; EM (IE, 70 eV) $m/z = 303$ ($\text{M}^{+\bullet}$), 285, 223, 147 (100), 120, 102, 65. (ZHANG; WANG, 2014)

(E)-3-(4-bromofenil)-1-(2-hidroxifenil)prop-2-en-1-ona (**1f**)

$\text{C}_{15}\text{H}_{11}\text{BrO}_2$, 303,15 g mol $^{-1}$; rendimento de 91%; sólido amarelo; pf = 136-139 °C; IV (KBr) ν (cm $^{-1}$) = 3061, 2747, 1645, 1562, 1487, 1439, 1402, 1371, 1229, 1202, 1265, 1207, 1070, 1009, 816, 754, 746; RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) δ (ppm) = 12,73 (s, 1H), 7,91 (dd, $J = 8,1, 1,6$ Hz, 1H), 7,85 (d, $J = 15,5$ Hz, 1H), 7,67-7,62 (m, 1H), 7,59-7,55 (m, 2H), 7,55 – 7,49 (m, 3H), 7,04 (dd, $J = 8,4, 1,2$ Hz, 1H), 6,97 – 6,93 (m, 1H). RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) δ (ppm) = 193,5, 163,6, 144,0, 136,6, 133,5, 132,3, 130,0, 129,6, 125,3, 120,7, 119,9, 118,9, 118,7; EM (IE, 70 eV) $m/z = 303$ ($\text{M}^{+\bullet}$), 285, 223, 147 (100), 120, 102, 93, 65. (STOYANOV et al., 2002)

(E)-3-(3-clorofenil)-1-(2-hidroxifenil)prop-2-en-1-ona (**1g**)

$C_{15}H_{11}ClO_2$, 258,70 g mol⁻¹; rendimento de 86%; sólido amarelo; pf = 94-97 °C; IV (KBr) ν (cm⁻¹) = 3049, 3015, 2824, 1647, 1584, 1566, 1491, 1443, 1369, 1339, 1319, 1265, 1207, 1163, 1022, 982, 806, 756, 665; RMN de ¹H (500 MHz, CDCl₃) δ (ppm) = 12,70 (s, 1H), 7,91 (dd, J = 8,1, 1,6 Hz, 1H), 7,83 (d, J = 15,5 Hz, 1H), 7,67 – 7,64 (m, 1H), 7,64 (d, J = 12,3 Hz, 1H), 7,54 – 7,49 (m, 2H), 7,41 (dt, J = 8,0, 1,6 Hz, 1H), 7,39 – 7,35 (m, 1H), 7,04 (dd, J = 8,4, 0,9 Hz, 1H), 6,96 (ddd, J = 8,2, 7,2, 1,1 Hz, 1H); RMN de ¹³C (125 MHz, CDCl₃) δ (ppm) = 193,4, 163,6, 143,7, 136,6, 136,4, 135,1, 130,7, 130,3, 129,7, 128,0, 127,0, 121,4, 119,9, 119,0, 118,7; EM (IE, 70 eV) m/z = 257 (M⁺•), 241, 223, 205, 165, 147 (100), 120, 102, 93, 75, 65. (ZHANG; WANG, 2014)

(E)-3-(4-clorofenil)-1-(2-hidroxifenil)prop-2-en-1-ona (**1h**)

$C_{15}H_{11}ClO_2$, 258,70 g mol⁻¹; rendimento de 87%; sólido amarelo; pf = 140-143 °C; IV (KBr) ν (cm⁻¹) = 3059, 2922, 2745, 1639, 1580, 1564, 1485, 1441, 1368, 1341, 1204, 1261, 1206, 1159, 1022, 829, 785, 760; RMN de ¹H (500 MHz, CDCl₃) δ (ppm) = 12,75 (s, 1H), 7,90 (dd, J = 8,1 e 1,6 Hz, 1H), 7,86 (d, J = 15,5 Hz, 1H), 7,62 (d, J = 15,5 Hz, 1H), 7,61-7,57 (m, 2H), 7,51 (ddd, J = 8,6, 7,2 e 1,6 Hz, 1H), 7,46-7,37 (m, 2H), 7,03 (dd, J = 8,4 e 0,9 Hz, 1H), 6,95 (ddd, J = 8,2, 7,2 e 1,2 Hz, 1H). RMN de ¹³C (125 MHz, CDCl₃) δ (ppm) = 193,5, 163,6, 143,9, 136,9, 136,5, 133,1, 129,8, 129,6, 129,3, 120,6, 119,9, 118,9, 118,7. EM (IE, 70 eV) m/z = 257 (M⁺•), 241, 223, 205, 165, 147 (100), 138, 120, 102, 92, 75, 65. (ZHANG; WANG, 2014).

3.2.2. Sínteses das 2'-hidroxi-diidrochalconas 2a-h

Em um balão de 25 mL foram adicionados 150 mg das 2'-hidroxichalconas **1a-h**, 5% de Pd/C e 5 mL de metanol (Esquema 12). A mistura reacional foi mantida em agitação magnética por 1-5 h em atmosfera de gás hidrogênio. A reação foi acompanhada por CCD até o total consumo dos reagentes. Em seguida a mistura reacional foi filtrada em uma coluna contendo Celite®, o filtrado foi evaporado em pressão reduzida. Os produtos **2a**, **2b** e **2d**

foram obtidos após purificação por cromatografia em coluna e caracterizados por IV, EM e RMN (^1H e ^{13}C). Os dados referentes a caracterização das 2'-hidroxi-diidrochalconas **2a**, **2b** e **2d** estão descritos na Seção 3.4.2.5.

Esquema 12 - Síntese de 2'-hidroxi-diidrochalconas a partir da redução de 2'-hidroxichalconas.

3.2.3. Sínteses de derivados de ($\pm$)-flavanonas **3a-g**

Em um balão de 25 mL foram adicionados as 2'-hidroxichalconas **1a-h** (0,45 mmol), KOH (8 M, 1 mL), L-prolina (0,01 g) e água destilada (5,0 mL). A suspensão foi mantida em agitação magnética à temperatura ambiente por 1-24 h. O precipitado formado foi recolhido por filtração, lavado com água destilada e secou à temperatura ambiente (Figura 11) (TANAKA; SUGINO, 2001; JIANG et al., 2011). Quando necessário foi realizada a purificação por cromatografia em coluna utilizando hexano e acetato de etila (9,5:0,5). Os produtos **3a-g** foram caracterizados por IV, EM, RMN (^1H e ^{13}C) e seus rendimentos determinados (Esquema 13).

Figura 11 - Ilustração das etapas da síntese das flavanonas **3a-h**. (A) Reação para formação da flavanona. (B) Filtração da mistura reacional em funil de Büchner. (C) Produto da reação após cromatografia em coluna.

Esquema 13 - Síntese das flavanonas a partir de 2'-hidroxichalconas em meio básico. **2-fenilcroman-4-ona (3a)**

$\text{C}_{15}\text{H}_{12}\text{O}_2$, 224,22 g mol⁻¹; rendimento de 89%; sólido branco; pf = 70-71 °C; IV (KBr) ν (cm⁻¹) = 3063, 3038, 2895, 1690, 1605, 1578, 1462, 1373, 1321, 1304, 1229, 1150, 1115, 1067, 986, 908, 766; RMN de ¹H (500 MHz, CDCl₃) δ (ppm) = 7,94 (dd, J = 8,1, 1,7 Hz, 1H), 7,54 – 7,36 (m, 6H), 7,09 – 7,02 (m, 2H), 5,49 (dd, J = 13,4, 2,8 Hz, 1H), 3,09 (dd, J = 16,9, 13,4 Hz, 1H), 2,90 (dd, J = 16,9, 2,9 Hz, 1H); RMN de ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ (ppm) = 192,0, 161,6, 138,7, 136,2, 128,9, 128,8, 127,1, 126,2, 121,6, 120,9, 118,1, 79,6, 44,7; EM (IE, 70 eV) m/z = 224 (M⁺) (100), 207, 147, 120, 104, 92, 77, 64, 51. Os dados estão de acordo com Kostrzewa-Susłow et al. (2008). As análises de RMN de ¹³C e ¹H foram realizadas em equipamentos de diferentes frequências.

2-(4-metoxifenil)croman-4-ona (3b)

$\text{C}_{16}\text{H}_{14}\text{O}_3$, 254,28 g mol⁻¹; rendimento de 70%; sólido branco; pf = 81-82 °C; IV (KBr) ν (cm⁻¹) = 2961, 2932, 2907, 2835, 1694, 1603, 1518, 1427, 1304, 1261, 1146, 1113, 1065, 980, 716; RMN de ¹H (500 MHz, CDCl₃) δ (ppm) = 7,93 (ddd, J = 7,8, 1,8, 0,5 Hz, 1H), 7,50 (ddd, J = 8,3, 7,2, 1,8 Hz, 1H), 7,44 – 7,39 (m, 2H), 7,08 – 7,01 (m, 2H), 6,98 – 6,94 (m, 2H), 5,43 (dd, J = 13,4, 2,8 Hz, 1H), 3,83 (s, 3H), 3,11 (dd, J = 16,8, 13,4 Hz, 1H), 2,86 (dd, J = 16,8, 2,8 Hz, 1H); RMN de ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ (ppm) = 192,2, 161,6, 160,0, 136,2, 130,8, 127,7, 127,0, 121,5, 120,9, 118,1, 114,2, 79,4, 55,4, 44,5; EM (IE, 70 eV) m/z = 254 (M⁺), 134 (100), 121, 108, 91, 77, 65. Os dados estão de acordo com a literatura (ZHANG; WANG, 2014). As análises de RMN de ¹³C e ¹H foram realizadas em equipamentos de diferentes frequências.

2-(3-fluorofenil)croman-4-ona (**3c**)

$C_{15}H_{11}FO_2$, 242,25 g mol⁻¹; rendimento 66%; Sólido amarelo claro; IV ν (cm⁻¹) = 3063, 3030, 2918, 2897, 2694, 1603, 1574, 1470, 1460, 1437, 1364, 1417, 1300, 1231, 1221, 1113, 1067, 910, 787, 768, 696; RMN de ¹H (500 MHz, CDCl₃) δ (ppm) = 7,93 (dd, J = 8,1, 1,8 Hz, 1H), 7,53 (ddd, J = 8,4, 7,2, 1,8 Hz, 1H), 7,44 – 7,36 (m, 1H), 7,24 (dd, J = 10,1, 8,7 Hz, 2H), 7,11 – 7,04 (m, 3H), 5,49 (dd, J = 13,1, 3,0 Hz, 1H), 3,04 (dd, J = 16,8, 13,1 Hz, 1H), 2,91 (dd, J = 16,8, 3,1 Hz, 1H); RMN de ¹³C (125 MHz, CDCl₃) δ (ppm) = 191,4, 163,0 (d, J = 246,9 Hz), 161,2, 141,3 (d, J = 7,2 Hz), 136,3, 130,4 (d, J = 8,2 Hz), 127,1, 121,9, 121,6 (d, J = 3,0 Hz), 120,9, 118,1, 115,6 (d, J = 21,1 Hz), 113,2 (d, J = 22,5 Hz), 78,7 (d, J = 1,9 Hz), 44,7; EM (IE, 70 eV) m/z = 242 (M⁺), 225, 147, 120 (100), 92, 75, 64. Os dados estão de acordo com a literatura (ZHANG; WANG, 2014).

2-(4-fluorofenil)croman-4-ona (**3d**)

$C_{15}H_{11}FO_2$, 242,25 g mol⁻¹; rendimento 83%; sólido branco; pf = 72-74 °C; IV (KBr) ν (cm⁻¹) = 3078, 3048, 2899, 1694, 1603, 1512, 1472, 1462, 1317, 1304, 1225, 1150, 1115, 1069, 908, 768; RMN de ¹H (500 MHz, CDCl₃) δ (ppm) = 7,94 (dd, J = 7,8, 1,7 Hz, 1H), 7,52 (ddd, J = 8,4, 7,2, 1,8 Hz, 1H), 7,49 – 7,44 (m, 2H), 7,16 – 7,10 (m, 2H), 7,09 – 7,03 (m, 2H), 5,47 (dd, J = 13,3, 2,8 Hz, 1H), 3,06 (dd, J = 16,8, 13,3 Hz, 1H), 2,88 (dd, J = 16,8, 2,9 Hz, 1H); RMN de ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ (ppm) = 191,7, 162,8 (d, J = 247,6 Hz), 161,4, 136,3, 134,6 (d, J = 3,2 Hz), 128,0 (d, J = 8,4 Hz), 127,1, 121,8, 120,9, 118,1, 115,8 (d, J = 21,7 Hz), 78,9, 44,7; EM (IE, 70 eV) m/z = 242 (M⁺), 225, 147, 120 (100), 92, 75, 64. Os dados estão de acordo com a literatura (TANG; FURUYA; RITTER, 2010). As análises de RMN de ¹³C e ¹H foram realizadas em equipamentos de diferentes frequências.

2-(3-bromofenil)croman-4-ona (**3e**)

$C_{15}H_{11}BrO_2$, 303,15 g mol⁻¹; rendimento 71%; sólido branco; pf = 93-95 °C; IV (KBr) ν (cm⁻¹) = 3061, 3032, 2924, 2901, 1697, 1603, 1574, 1470, 1460, 1460, 1441, 1368, 1317, 1300, 1233, 1223, 1113, 1067, 868, 789, 768, 696; RMN de ¹H (500 MHz, CDCl₃) δ (ppm) = 7,95 – 7,92 (m, 1H), 7,68 (t, J = 1,8 Hz, 1H), 7,55 – 7,50 (m, 2H), 7,41 – 7,38 (m, 1H), 7,31 (t, J = 7,8 Hz, 1H), 7,10 – 7,05 (m, 2H), 5,46 (dd, J = 13,3, 3,0 Hz, 1H), 3,04 (dd, J = 16,8, 13,3 Hz, 1H), 2,89 (dd, J = 16,8, 3,0 Hz, 1H); RMN de ¹³C (125 MHz, CDCl₃) δ (ppm) = 191,4, 161,2, 141,0, 136,3, 131,8, 130,4, 129,2, 127,1, 124,6, 122,9, 121,9, 120,9, 118,1, 78,7, 44,7; EM (IE, 70 eV) m/z = 302 (M⁺•), 285, 223, 182, 147, 120 (100), 103, 92, 77, 64, 51. Os dados estão de acordo com a literatura (ZHANG; WANG, 2014).

2-(4-bromofenil)croman-4-ona (**3f**)

$C_{15}H_{11}BrO_2$, 303,15 g mol⁻¹; rendimento 52%; sólido branco; pf = 111-113 °C; IV (KBr) ν (cm⁻¹) = 3065, 2957, 2897, 2886, 1971, 1946, 1917, 1688, 1597, 1489, 1468, 1460, 1410, 1300, 1221, 1150, 1111, 1067, 1013, 905, 845, 822, 773, 498; RMN de ¹H (500 MHz, CDCl₃) δ (ppm) = 7,95 – 7,91 (m, 1H), 7,59 – 7,55 (m, 2H), 7,52 (ddd, J = 8,3, 7,2, 1,8 Hz, 1H), 7,39 – 7,35 (m, 2H), 7,10 – 7,03 (m, 2H), 5,46 (dd, J = 13,2, 3,0 Hz, 1H), 3,04 (dd, J = 16,8, 13,2 Hz, 1H), 2,88 (dd, J = 16,8, 3,0 Hz, 1H); RMN de ¹³C (125 MHz, CDCl₃) δ (ppm) = 191,5, 161,3, 137,8, 136,3, 132,0, 127,8, 127,1, 122,7, 121,8, 120,9, 118,1, 78,9, 44,6; EM (IE, 70 eV) m/z = 303 (M⁺•), 287, 223, 207, 182, 147, 120 (100), 103, 92, 77, 65, 51. Os dados estão de acordo com a literatura (AHMED et al., 2013).

2-(3-clorofenil)croman-4-ona (**3g**)

$C_{15}H_{11}ClO_2$, 258,70 g mol⁻¹; rendimento 65%; sólido branco; pf = 79-80 °C; IV (KBr) ν (cm⁻¹) = 3063, 3032, 2924, 2899, 1695, 1603, 1470, 1460, 1300, 1231, 1223, 1113, 1067, 789, 768, 696; RMN de ¹H (500 MHz, CDCl₃) δ (ppm) = 7,95 – 7,92 (m, 1H), 7,55 – 7,50 (m, 2H), 7,38 – 7,32 (m, 3H), 7,10 – 7,05 (m, 2H), 5,46 (dd, J = 13,3, 3,0 Hz, 1H), 3,04 (dd, J

= 16,8, 13,3 Hz, 1H), 2,90 (dd, $J = 16,8, 3,0$ Hz, 1H); RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) δ (ppm) = 191,4, 161,2, 140,8, 136,3, 134,8, 130,1, 128,9, 127,1, 126,3, 124,1, 121,9, 120,9, 118,1, 78,8, 44,6; EM (IE, 70 eV) $m/z = 258$ ($\text{M}^{+\bullet}$), 241, 223, 147, 120 (100), 103, 92, 77, 64. Os dados estão de acordo com a literatura (ZHANG; WANG, 2014).

3.2.4. Síntese dos ($\pm$)-flavan-4-óis **4a-b** e **3d-g**

Em um balão de 25 mL adicionou-se 1 mmol da flavanona de interesse **3a-h** e 10 mL de etanol. A mistura foi colocada em banho de gelo em agitação magnética por 5 min. Em seguida foi adicionado NaBH_4 com excesso de 0,5 mmol em relação à ($\pm$)-flavanona (Esquema 14). A reação foi acompanhada por CCD até a completa conversão dos reagentes. Após a reação ser completada o metanol foi removido em rotaevaporador e foi obtido um sólido branco. Em seguida foram adicionados 10 mL de água destilada e foi realizada a extração com acetato de etila (3 x 10 mL) em funil de separação. À fase orgânica adicionou-se sulfato de sódio anidro e o solvente foi filtrado e evaporado a vácuo e submetido à purificação por cromatografia em coluna. Os ($\pm$)-flavan-4-óis **4a-b** e **4d-g** foram caracterizados por IV, EM e RMN (^1H e ^{13}C) e seus rendimentos determinados.

Esquema 14 - Síntese de flavan-4-óis a partir da redução das ($\pm$)-flavanonas com NaBH_4 .

cis-($\pm$)-2-fenilcroman-4-ol (**4a**)

Produto *cis*: $\text{C}_{15}\text{H}_{14}\text{O}_2$, 226,27 g mol $^{-1}$; rendimento de 89%; sólido branco; pf = 133-136 °C; IV (KBr) ν (cm $^{-1}$) = 32998, 3192, 3034, 2959, 2916, 2889, 1607, 1580, 1485, 1454, 1346, 1227, 1070, 1061, 1038, 1022, 1011, 905, 754, 702. RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) δ (ppm) = 7,52 – 7,49 (m, 1H), 7,46 – 7,37 (m, 4H), 7,36 – 7,32 (m, 1H), 7,20 (dddd, $J = 8,1, 7,3, 1,7, 0,7$ Hz, 1H), 6,98 (td, $J = 7,5, 1,2$ Hz, 1H), 6,89 (dd, $J = 8,2, 1,1$ Hz, 1H), 5,16 (dd, $J = 11,6, 1,9$ Hz, 1H), 5,08 (dd, $J = 10,4, 6,3$ Hz, 1H), 2,50 (ddd, $J = 13,1, 6,2, 2,0$ Hz, 1H), 2,13 (ddd,

$J = 13,1, 11,6, 10,5$ Hz, 1H), 1,90 (s, 1H). RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) δ (ppm) = 154,5, 140,5, 129,2, 128,7, 128,2, 127,0, 126,1, 125,7, 121,0, 116,7, 76,8, 65,8 40,1. EM (IE, 70 eV) $m/z = 226$ ($\text{M}^{+\bullet}$), 207, 189, 178, 165, 152, 131, 121, 104 (100), 91, 77, 65, 51. Os dados estão de acordo com a literatura (ZHAO; BEIRING; GLORIUS, 2013). As análises de RMN de ^{13}C e ^1H foram realizadas em equipamentos de diferentes frequências.

cis-(±)-2-(4-metoxifenil)croman-4-ol (4b)

Produto *cis*: $\text{C}_{16}\text{H}_{16}\text{O}_3$, 256,30 g mol $^{-1}$; rendimento 94%; sólido branco; pf = 141-142 °C; IV (KBr) ν (cm $^{-1}$) = 3372, 3048, 2959, 2930, 2837, 1917, 1609, 1580, 1518, 1483, 1300, 1179, 1113, 1601, 1001, 947, 905, 868, 847, 831, 615, 555; RMN de ^1H (400

MHz, cdcl_3) δ (ppm) = 7,51 (d, $J = 7,6$ Hz, 1H), 7,41 – 7,33 (m, 2H), 7,23 – 7,15 (m, 1H), 7,01 – 6,90 (m, 3H), 6,87 (dd, $J = 8,2, 1,0$ Hz, 1H), 5,16 – 5,05 (m, 2H), 3,82 (s, 3H), 2,49 (ddd, $J = 13,1, 6,3, 1,9$ Hz, 1H), 2,15 (ddd, $J = 13,1, 11,7, 10,5$ Hz, 1H), 1,81 (d, $J = 8,3$ Hz, 1H); RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) δ (ppm) = 159,6, 154,6, 132,6, 129,1, 127,5, 126,9, 125,7, 120,9, 116,7, 114,1, 76,6, 65,9, 55,3, 39,9; EM (IE, 70 eV) $m/z = 256$ ($\text{M}^{+\bullet}$), 238, 207, 134 (100), 121, 91, 77, 65. Os dados estão de acordo com a literatura (ZHAO; BEIRING; GLORIUS, 2013).

cis-(±)-2-(4-fluorofenil)croman-4-ol (4d)

Produto *cis*: $\text{C}_{15}\text{H}_{13}\text{FO}_2$, 244,27 g mol $^{-1}$; rendimento de 80%; sólido branco; pf = 125-127 °C; IV (KBr) ν (cm $^{-1}$) = 3059, 2924, 2849, 1682, 1639, 1607, 1580, 1568, 1474, 1462, 1447, 1300, 1283, 1206, 1155, 1115, 986, 770, 754, 691; RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ (ppm) =

7,54 – 7,50 (m, 1H), 7,45 – 7,39 (m, 2H), 7,24 – 7,18 (m, 1H), 7,12 – 7,05 (m, 2H), 6,99 (td, $J = 7,5, 1,1$ Hz, 1H), 6,88 (dd, $J = 8,2, 1,1$ Hz, 1H), 5,15 (dd, $J = 11,8, 1,8$ Hz, 1H), 5,13 – 5,06 (m, 1H), 2,50 (ddd, $J = 13,1, 6,3, 1,9$ Hz, 1H), 2,17 – 2,02 (m, 1H), 1,84 (d, $J = 8,1$ Hz, 1H); RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) δ (ppm) = 163,8, 161,3, 154,3, 136,3, 136,3, 129,2, 127,9, 127,8, 126,9, 125,7, 121,1, 116,7, 115,7, 115,4, 76,2, 65,8, 40,1; EM (IE, 70 eV) $m/z = 244$ ($\text{M}^{+\bullet}$), 225, 122 (100), 96, 77, 65. Os dados estão de acordo com a literatura (ZHAO; BEIRING; GLORIUS, 2013).

cis-(±)-2-(3-bromofenil)chroman-4-ol (**4e**)

Produto *cis*: C₁₅H₁₃BrO₂, 304,01 g mol⁻¹; rendimento 83%; sólido branco; pf = 77-80 °C; IV (KBr) ν (cm⁻¹) = 3283, 3078, 3015, 2961, 2926, 2878, 1688, 1609, 1580, 1481, 1456, 1433, 1302, 1271, 1227, 1069, 1038, 1015, 841, 787, 756, 694, 683. RMN de ¹H (500 MHz, CDCl₃) δ (ppm) = 7,62 (t, *J* = 1,6 Hz, 1H), 7,51 (d, *J* = 7,7 Hz, 1H), 7,47 (ddd, *J* = 7,9, 1,7 e 1,0 Hz, 1H), 7,36 (d, *J* = 7,7 Hz, 1H), 7,27 (d, *J* = 15,5 Hz, 1H), 7,21 (td, *J* = 7,9 e 1,1 Hz, 1H), 7,02 – 6,97 (m, 1H), 6,90 (dd, *J* = 8,2 e 0,9 Hz, 1H), 5,13 (dd, *J* = 11,7 e 1,7 Hz, 1H), 5,09 (dd, *J* = 10,4 e 6,3 Hz, 1H), 2,50 (ddd, *J* = 13,1, 6,2 e 1,9 Hz, 1H), 2,07 (ddd, *J* = 13,0, 11,7 e 10,7 Hz, 1H), 1,87 (s, 1H). RMN de ¹³C (125 MHz, CDCl₃) δ (ppm) = 154,1, 142,8, 131,2, 130,2, 129,3, 129,2, 126,9, 125,6, 124,6, 122,7, 121,2, 116,7, 76,0, 65,6, 40,1. EM (IE, 70 eV) *m/z* = 304 (M⁺), 287, 207, 152, 131, 122 (100), 103, 93, 77, 65, 51.

cis-(±)-2-(4-bromofenil)chroman-4-ol (**4f**)

Produto *Cis*: C₁₅H₁₃BrO₂, 304,01 g mol⁻¹; rendimento 84%; sólido branco; pf = 158-159 °C; IV (KBr) ν (cm⁻¹) = 3333, 3279, 2951, 2911, 1580, 1485, 1458, 1416, 1267, 1225, 1215, 1072, 1065, 1038, 1009, 903, 816, 764, 754; RMN de ¹H (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm) = 7,63 – 7,59 (m, 2H), 7,49 – 7,46 (m, 1H), 7,45 – 7,42 (m, 2H), 7,14 (dddd, *J* = 8,0, 7,2, 1,7, 0,7 Hz, 1H), 6,93 (td, *J* = 7,5, 1,2 Hz, 1H), 6,79 (dd, *J* = 8,2, 1,1 Hz, 1H), 5,54 (d, *J* = 6,7 Hz, 1H), 5,25 (dd, *J* = 11,9, 1,6 Hz, 1H), 4,99 – 4,93 (m, 1H), 2,32 (ddd, *J* = 12,8, 6,1, 1,9 Hz, 1H), 1,90 (ddd, *J* = 12,7, 12,0, 10,9 Hz, 1H); RMN de ¹³C (125 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm) = 153,8, 140,3, 131,3, 128,2, 128,0, 127,4, 127,1, 120,8, 120,3, 115,6, 75,6, 63,6, 39,0; EM (IE, 70 eV) *m/z* = 304 (M⁺), 287, 207, 182, 152, 131, 121 (100), 103, 89, 77, 65, 51.

cis-(±)-2-(3-clorofenil)chroman-4-ol (**4g**)

Produto *Cis*: C₁₅H₁₃ClO₂, 260,72 g mol⁻¹; rendimento 90%; sólido branco; pf = 80-81 °C; IV (KBr) ν (cm⁻¹) = 3319, 3260, 2974, 2928, 2862, 1582, 1483, 1458, 1437, 1231, 1065, 1038, 1024, 1013, 845, 783, 777, 754, 723, 706, 685; RMN de ¹H (500 MHz, CDCl₃) δ (ppm) = 7,52 – 7,49 (m, 1H), 7,46 (dt, *J* = 2,4, 1,3 Hz, 1H), 7,35 – 7,29 (m, 3H), 7,21 (dddd, *J* = 8,1, 7,3, 1,7, 0,7 Hz, 1H), 6,99 (td, *J* = 7,5, 1,2 Hz, 1H), 6,90 (dd, *J* = 8,2, 1,1 Hz, 1H), 5,14 (dd, *J* = 11,7, 1,9 Hz, 1H), 5,08 (dd, *J* = 9,8, 6,5 Hz, 1H), 2,50 (ddd, *J* = 13,1, 6,2, 2,0 Hz,

¹H), 2,11 – 2,02 (m, 1H), 1,90 (sl, 1H); RMN de ¹³C (125 MHz, CDCl₃) δ (ppm) = 154,1, 142,6, 134,6, 129,9, 129,3, 128,3, 126,9, 126,3, 125,6, 124,1, 121,2, 116,7, 76,1, 65,6, 40,1; EM (IE, 70 eV) m/z = 260 (M⁺•), 241, 207, 178, 138, 122 (100), 103, 77, 65.

3.3. Cultivo dos microrganismos

3.3.1. Fungos de ambiente marinho utilizados como biocatalisadores

As linhagens de fungos de ambiente marinho utilizados para a biotransformação de derivados de flavonoides fazem parte da coleção do Grupo de Química Orgânica e Biocatálise e as colônias estão apresentadas na Figura 12. Os fungos foram isolados a partir de esponjas marinhas e fornecidas pelo Prof. Dr. Roberto G. S. Berlink (IQSC/USP) e pela Profa. Dra. Mirna H. R. Seleglim (DBE/UFSCar).

Figura 12 – Micélios de fungos de ambiente marinho empregados nas reações de biotransformação de derivados de flavonoides.

Os microrganismos foram manipulados em cabine de fluxo laminar (Veco). A água do mar artificial utilizada para o cultivo dos fungos de ambiente marinho foi composta pelos seguintes sais: $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (1,36 g L⁻¹), $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (9,68 g L⁻¹), KCl (0,61 g L⁻¹), NaCl (30,0 g L⁻¹), Na_2HPO_4 (0,140 g L⁻¹), Na_2SO_4 (3,47 g L⁻¹), NaHCO_3 (0,170 g L⁻¹), KBr (0,10 g L⁻¹), $\text{SrCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (0,04 g L⁻¹), H_3BO_3 (0,03 g L⁻¹).

3.3.2. Cultivo dos fungos de ambiente marinho em meio de cultura sólido

O meio de cultivo sólido foi preparado utilizando-se extrato de malte 2% (m/v) e 1,0 L de água do mar artificial. O pH do meio foi ajustado para 7 com auxílio de um pHmetro (Qualxtron, 8010) previamente calibrado, quando necessário foi utilizado soluções de HCl 0,5 M ou NaOH 0,1 M. Em seguida, Agar 2% (m/v) foi adicionado ao meio de cultivo e o mesmo foi esterilizado em autoclave (Phoenix, Av-50) à temperatura de 121 °C durante 20 minutos. Após resfriado (~ 45 °C) o meio foi vertido em placas de Petri previamente esterilizadas nas dimensões de 90 x 15 mm. As placas foram vedadas com parafilmes e permaneceram durante 24 h em estufa incubadora BOD (Nova Ética) à temperatura de 32 °C para verificar se não ocorreu crescimento de microrganismos.

O repique e inóculo dos fungos foram realizados com o auxílio de uma alça de inoculação, em que os esporos/micélios dos fungos previamente cultivados em placas de Petri foram transferidos para os meios de cultura sólido. Os fungos foram cultivados por 7 dias à temperatura de 32 °C em estufa incubadora BOD.

3.3.3. Cultivo dos fungos de ambiente marinho em meio de cultura líquido

O cultivo dos fungos em meio líquido foi preparado utilizando-se extrato de malte 2% (m/v) em 1,0 L de água do mar artificial e o pH do meio foi ajustado para 7. Em seguida 100 mL de meio foram transferidos para frascos Erlenmeyer (250 mL) e esterilizados em autoclave à temperatura de 121 °C durante 20 minutos. Após resfriar o meio de cultura até atingir a temperatura ambiente foi realizado o inóculo. Com o auxílio de um cortador foram transferidos para cada frasco Erlenmeyer 10 discos (5,0 mm de diâmetro) de Agar contendo os fungos previamente cultivados em meio sólido. Assim, o inóculo foi realizado de acordo com a área de micélios/esporos dos discos obtidos (Figura 13).

Figura 13 - Discos utilizados no cultivo dos fungos em meio de cultura líquido. (A) Placa com as colônias de fungos de onde foram retirados 10 discos contendo os micélios. (B) Discos contendo os micélios que foram inoculados em meio líquido.

Os frascos Erlenmeyer foram mantidos em shaker orbital (Tecnal, TE-421) por 7 dias, 130 rpm, 32 °C. Após 7 dias de cultivo dos fungos, os mesmos foram filtrados a vácuo e os micélios/esporos úmidos foram utilizados nas reações de biotransformação dos derivados de flavonoides (Figura 14).

Figura 14 - Ilustração das etapas de filtração dos micélios/esporos dos fungos derivados de ambiente marinho. (A) crescimento dos fungos em estufa incubadora BOD (7 dias, 130 rpm, 32 °C). (B e C) Filtração dos micélios em funil de Büchner para obtenção da massa úmida dos fungos. (D) Frasco Erlenmeyer contendo o meio líquido e os micélios/esporos dos fungos após filtração e pesagem da massa úmida dos mesmos.

3.4. Reações de biotransformação dos derivados de flavonoides

Neste estudo foram realizadas reações de biotransformação de derivados de flavonoides utilizando células íntegras de fungos derivados de ambiente marinho (Esquema 15). Inicialmente foi realizada uma triagem de fungos para biotransformar a chalcona **1a** (*Primeira etapa*), em seguida os fungos que apresentaram resultados promissores foram utilizados para realizar reações específicas (*Segunda etapa*). Na *Terceira etapa* foi realizada uma nova triagem para a biotransformação da flavanona **3a** onde foram selecionados os

fungos para realizar a redução das flavanonas (**3a-g**) em flavan-4-óis (**4a-g**) (*Quarta etapa*). Por fim, um fungo foi selecionado para realizar reações com a chalcona **1a**, a diidrochalcona **2a**, a flavanona **3a** e o flavan-4-ol **4a**. A metodologia utilizada nas reações de biotransformação estão descritas nas Seções 3.4.1 a 3.4.5.

Esquema 15 - Etapas realizadas na biotransformação de derivados de flavonoides por fungos derivados de ambiente marinho.

3.4.1. Reações de biotransformação das chalconas 1a-h com os fungos de ambiente marinho

3.4.1.1. Triagem de fungos de ambiente marinho para a biotransformação da chalcona 1^a

Em frascos Erlenmeyer (50 mL) foram adicionadas 20 mL de tampão fosfato ($\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$ 0,07 mol L⁻¹, pH = 7 e 8) e 1,0 g de células úmidas dos fungos (*Penicillium raistrickii* CBMAI 931, *Cladosporium* sp. CBMAI 1237, *Aspergillus sydowii* CBMAI 935, *Penicillium oxalicum* CBMAI 1996, *Penicillium citrinum* CBMAI 1186, *Mucor racemosus* CBMAI 847, *Westerdykella* sp. CBMAI 1679 e *Aspergillus sclerotiorum* CBMAI 849). Em seguida foram adicionados 10 mg (0,045 mmol) da 2'-hidroxichalcona 1a previamente dissolvida em 200 µL de DMSO. As reações foram mantidas em shaker orbital (7 dias, 130 rpm, 32 °C). Os experimentos foram realizados em duplicata. Todas as reações de biotransformações descritas nas Seções 3.4.1–3.4.4 foram preparadas seguindo as etapas do procedimento experimental apresentado na Figura 15.

Figura 15 - Etapas envolvidas no procedimento experimental para as reações de biotransformação dos derivados de flavonoides.

3.4.1.2. Método de extração das reações de biotransformação

Todas as reações de biotransformação e os controles bióticos e abióticos (Seções de 3.4.1 a 3.4.5) seguiram o seguinte protocolo de extração: Após o período determinado para as reações de biotransformação, foram adicionados aos frascos reacionais acetato de etila na proporção de 1:1 em relação a quantidade de meio reacional utilizado. Os frascos foram mantidos em agitação magnética à temperatura ambiente por 30 min. Em seguida, a mistura foi transferida para tubos Falcon (250 mL) e centrifugados (10000 rpm, 20 min) (Hitachi, CR22GIII). Mesmo após a centrifugação algumas partículas dos fungos filamentosos ficaram em suspensão, assim foi necessário realizar a filtração do sobrenadante obtido da

centrifugação. A fase líquida (fase orgânica e fase aquosa) foi transferida para um funil de separação, já os micélios foram lavados com acetato de etila e posteriormente descartados. A fase orgânica da extração foi recolhida e a fase aquosa foi extraída com quantidades equivalentes de acetato de etila. As reações realizadas com 20, 50 e 100 mL de meio reacional foram extraídas por 3 vezes de 10, 25 e 50 mL de acetato de etila, respectivamente. Ao extrato orgânico obtido foi adicionado sulfato de sódio anidro, em seguida filtrado e o solvente foi evaporado em pressão reduzida. Em seguida, o extrato foi dissolvido em acetato de etila e transferido para balão volumétrico de 10 mL e analisadas por métodos cromatográficos. A Figura 16 ilustra o procedimento experimental utilizado nas reações de biotransformação.

Figura 16 - Etapas envolvidas no procedimento experimental para as reações de biotransformação.

3.4.1.3. Reação em maior escala para o isolamento dos produtos de biotransformação da triagem dos fungos

Em frascos Erlenmeyer (250 mL) foram adicionadas 100 mL de tampão fosfato (0,1 mol L⁻¹, Na₂HPO₄/KH₂PO₄, pH = 7 e 8) e 5 g de células úmidas dos fungos (*Penicillium raistrickii* CBMAI 931, *Cladosporium* sp. CBMAI 1237, *Aspergillus sydowii* CBMAI 935, *Penicillium citrinum* CBMAI 1186 e *Mucor racemosus* CBMAI 847). Em seguida foram adicionados 50 mg (0,223 mmol) da 2'-hidroxichalcona **1a** previamente dissolvida em 400 µL de DMSO. As reações foram mantidas em shaker orgital (7 dias, 130 rpm, 32 °C). Após 7 dias de incubação as reações de biotransformação foram finalizadas seguindo o procedimento descrito na Seção 3.4.1.2. O isolamento dos produtos foi realizado por cromatografia em coluna utilizando como gradiente de eluição hexano e acetato de etila na proporção de 9,5:0,5. Os produtos foram caracterizados utilizando as técnicas de IV, EM (IE, 70 eV) e RMN (¹H e ¹³C).

3.4.2. Reações de biotransformação das chalconas **1a-h** com o fungo *P. raistrickii* CBMAI 931

3.4.2.1. Reações de biotransformação das 2'-hidroxichalconas **1a-h** com os micélios do fungo *P. raistrickii* CBMAI 931

Em frascos Erlenmeyer de 125 mL foram adicionados 2,5 g de células úmidas do fungo *P. raistrickii* CBMAI 931, 50 mL do caldo enzimático em que foi cultivado o fungo *P. raistrickii* CBMAI 931, o qual foi obtido após a filtração dos micélios (item 3.8) e 25 mg das 2'-hidroxichalconas **1a-h** dissolvidas em 300 µL de DMSO. As reações foram mantidas em shaker orgital (7 dias ou 14 dias, 130 rpm, 32 °C). Após 7 ou 14 dias de incubação, as reações de biotransformação foram finalizadas através da extração conforme descrito no procedimento experimental apresentado na Seção 3.4.1.2. Em seguida, os extratos obtidos a partir das extrações da mistura reacional foram analisados por técnicas cromatográficas.

3.4.2.2. Reações de biotransformação da 2'-hidroxichalcona **1a** com o caldo enzimático do fungo *P. raistrickii* CBMAI 931

Em frascos Erlenmeyer de 125 mL foram adicionados 50 mL do caldo enzimático em que foi cultivado o fungo *P. raistrickii* CBMAI 931, o qual foi obtido a partir da filtração dos micélios (Seção 3.4.1.2) e 25 mg da 2'-hidroxichalcona **1a** dissolvida em 300 µL de DMSO. A reação foi mantida em shaker orbital (14 dias, 130 rpm, 32 °C). Após 14 dias de incubação foi realizada a extração do substrato e dos produtos conforme procedimento descrito na Seção 3.4.1.2. As amostras foram analisadas utilizando técnicas cromatográficas.

3.4.2.3. Reações de biotransformação da 2'-hidroxichalcona **1a** com o fungo *P. raistrickii* CBMAI 931 em tampão fosfato

Em frascos Erlenmeyer de 125 mL foram adicionados 2,5 g de células úmidas do fungo *P. raistrickii* CBMAI 931, 50 mL tampão fosfato ($\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$ 0,1 mol L⁻¹, pH 5, 6, 7 ou 8), 25 mg da 2'-hidroxichalcona **1a** dissolvida em 300 µL de DMSO. As reações foram mantidas em shaker orbital (7 dias, 130 rpm, 32 °C). Após 7 dias de incubação foi realizada a extração da reação de biotransformação da 2'-hidroxichalcona **1a** com o fungo *P. raistrickii* CBMAI 931 em tampão fosfato utilizando o procedimento experimental descrito na Seção 3.4.1.2. Em seguida, as amostras foram analisadas por meio de técnicas cromatográficas (CG/EM).

3.4.2.4. Reações de biotransformação da 2'-hidroxichalcona **1a** com o fungo *P. raistrickii* CBMAI 931 em tampão imidazol

Em frascos Erlenmeyer de 125 mL foram adicionados 2,5 g de células úmidas do fungo *P. raistrickii* CBMAI 931, 500 mL de tampão imidazol ($\text{C}_3\text{H}_4\text{N}_2/\text{HCl}$ 0,1 mol L⁻¹, pH 7) e 25 mg da 2'-hidroxichalcona **1a** dissolvida em 300 µL de DMSO. A reação foi mantida em shaker orbital (7 dias, 130 rpm, 32 °C). Após 7 dias de incubação, a reação de biotransformação da 2'-hidroxichalcona **1a** pelo fungo *P. raistrickii* CBMAI 931 foi finalizada através da extração conforme descrito no procedimento experimental apresentado na Seção 3.4.1.2. Em seguida foram realizadas análises por técnicas cromatográficas (CG/EM).

3.4.2.5. Isolamento dos produtos de biotransformação **2a-h** obtidos nas reações com o fungo *P. raistrickii* CBMAI 931

Em frascos Erlenmeyer de 125 mL foram adicionados 50 mL de caldo enzimático em que foi cultivado o fungo *P. raistrickii* CBMAI 931, o qual foi obtido a partir da filtração dos micélios (Seção 3.4.1.2) e 25 mg das 2'-hidroxichalcona **1a-h** dissolvidas em 600 μ L de DMSO. A reação foi mantida em shaker orbital (14 dias, 130 rpm, 32 °C). Após a extração dos compostos seguindo o procedimento apresentado na Seção 3.4.1.2, os produtos **2a-h** foram isolados através de CCD preparativa (Saisorb, Plastic Backed 20x20 cm; 200 μ m, G/UV 254 nm) utilizando hexano (P.A.) como solvente de eluição. Cada placa foi eluída por 3 vezes, em seguida o *spot* referente ao composto de interesse foi demarcado a partir de sua absorção na luz ultravioleta (254 nm). A sílica foi retirada com o auxílio de uma espátula e transferida para um frasco Erlenmeyer de 50 mL, ao qual foram adicionados 5,0 mL de acetato de etila. A mistura foi mantida em repouso por 10 min. Em seguida, a sílica foi filtrada utilizando um filtro de vidro sinterizado e lavada com 2 mL de acetato de etila (3 vezes). O filtrado foi evaporado e o rendimento foi determinado. Os produtos foram caracterizados por IV, EM (IE, 70 eV) e RMN (^1H e ^{13}C) (Figura 17).

Figura 17 – Reação de biotransformação de **1a-h** por *P. raistrickii* CBMAI 931.

1-(2-hidroxifenil)-3-fenilpropan-1-ona (**2a**)

$\text{C}_{15}\text{H}_{14}\text{O}_2$, 226,27 g mol⁻¹ (rendimento 60%); óleo amarelo claro; IV

(placa de silício) ν (cm⁻¹) = 3061, 3018, 2930, 1954, 1877, 1809, 1641,

1582, 1489, 1354, 1306, 1260, 1078, 1034, 980, 660, 567, 519, 474;

RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) δ (ppm) = 12,29 (s, 1H), 7,74 (dd, J = 8,0, 1,6 Hz, 1H), 7,46 (ddd, J = 8,5, 7,2, 1,6 Hz, 1H), 7,33 – 7,28 (m, 2H), 7,26 – 7,19 (m, 3H), 6,98 (dd, J = 8,4, 1,1 Hz, 1H), 6,87 (ddd, J = 8,3, 7,2, 1,2 Hz, 1H), 3,36 – 3,30 (t, J = 7,6 Hz, 2H), 3,10 – 3,04 (t, J = 7,6 Hz, 2H); RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) δ (ppm) = 205,4, 162,5, 140,7, 136,3, 129,8,

128,6, 128,4, 126,3, 119,3, 118,9, 118,6, 40,0, 30,0; EM (IE, 70 eV) m/z = 226 (M^{+}), 207, 179, 131, 121 (100%), 104, 91, 77, 65.

1-(2-hidroxifenil)-3-(4-metoxifenil)propan-1-ona (2b)

$C_{16}H_{16}O_3$, 256,30 g mol⁻¹ (rendimento 65%); óleo amarelo; IV (placa de silício) ν (cm⁻¹) = 3005, 2934, 2835, 1639, 1614, 1584, 1514, 1487, 1449, 1354, 1302, 1246, 1198, 1179, 1157, 1036, 980, 829, 756; RMN de ¹H (500 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 12,31 (s, 1H), 7,74 (dd, J = 8,1, 1,6 Hz, 1H), 7,45 (ddd, J = 8,6, 7,2, 1,6 Hz, 1H), 7,18 – 7,13 (m, 2H), 6,98 (dd, J = 8,4, 1,0 Hz, 1H), 6,90 – 6,82 (m, 3H), 3,79 (s, 3H), 3,32 – 3,26 (t, J = 7,6 Hz, 2H), 3,04 – 2,98 (t, J = 7,6 Hz, 2H); RMN de ¹³C (125 MHz, CDCl₃) δ (ppm) = 205,6, 162,5, 158,1, 136,3, 132,7, 129,8, 129,3, 119,3, 118,9, 118,6, 114,0, 55,3, 40,3, 29,2. EM (IE, 70 eV) m/z = 256 (M^{+}), 237, 207, 178, 134, 121 (100%), 93, 77, 65.

3-(4-fluorofenil)-1-(2-hidroxifenil)propan-1-ona (2d)

$C_{15}H_{13}FO_2$, 244,27 g mol⁻¹; rendimento 61%; óleo amarelo claro; IV (placa de silício) ν (cm⁻¹) = 3022, 2955, 2926, 2853, 1732, 1643, 1614, 1582, 1510, 1487, 1449, 1306, 1283, 1261, 1221, 1198, 1157, 980, 831, 756, 729; RMN de ¹H (500 MHz, CDCl₃) δ (ppm) = 12,26 (s, 1H), 7,73 (dd, J = 8,0 e 1,3 Hz, 1H), 7,49 – 7,43 (m, 1H), 7,20 (dd, J = 8,4 e 5,5 Hz, 2H), 7,01 – 6,95 (m, 3H), 6,88 (t, J = 8,0 Hz, 1H), 3,30 (t, J = 7,6 Hz, 2H), 3,04 (t, J = 7,6 Hz, 2H); RMN de ¹³C (125 MHz, CDCl₃) δ (ppm) = 205,1, 162,5, 160,5, 136,4, 136,3, 136,3, 129,8, 129,8, 129,8, 119,3, 118,9, 118,6, 115,4, 115,3, 40,0, 29,2. EM (IE, 70 eV) m/z = 244 (M^{+}), 226, 197, 149, 131, 121 (100%), 109, 93, 83, 65.

3-(3-bromofenil)-1-(2-hidroxifenil)propan-1-ona (2e)

$C_{15}H_{13}BrO_2$, 304,01 g mol⁻¹; rendimento 43%; óleo amarelo; IV (placa de silício) ν (cm⁻¹) = 3057, 2957, 2930, 1732, 1643, 1614, 1582, 1487, 1477, 1447, 1306, 1271, 1260, 1200, 1157, 980, 781, 754, 692; RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm) = 12,22 (s, 1H), 7,73 (dd, J = 8,1, 1,6 Hz, 1H), 7,47 (ddd, J = 8,7, 7,3, 1,6 Hz, 1H), 7,41 (s, 1H), 7,34 (ddd, J = 6,4, 5,2, 1,9 Hz, 1H),

7,20 – 7,14 (m, 2H), 6,99 (dd, $J = 8,4, 0,9$ Hz, 1H), 6,91 – 6,86 (m, 1H), 3,32 (t, $J = 7,6$ Hz, 2H), 3,04 (t, $J = 7,6$ Hz, 2H); RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) δ (ppm) = 204,7, 162,4, 143,1, 136,4, 131,5, 130,1, 129,7, 129,4, 127,1, 122,6, 119,2, 119,0, 118,6, 39,6, 29,5; EM (IE, 70 eV) $m/z = 304$ ($\text{M}^{+\bullet}$), 286, 207, 179, 131, 121 (100%), 93, 77, 65.

3-(4-bromofenil)-1-(2-hidroxifenil)propan-1-ona (2f)

$\text{C}_{15}\text{H}_{13}\text{BrO}_2$, 304,01 g mol $^{-1}$; rendimento 60%; sólido amarelo claro; IV (KBr) ν (cm $^{-1}$) = 3055, 2963, 2928, 2911, 2853, 1736, 1645, 1614, 1582, 1487, 1445, 1356, 1300, 1258, 1198, 1157, 1070, 1011, 829, 808, 756, 729; RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) δ (ppm) = 12,23 (s, 1H), 7,72 (dd, $J = 8,1, 1,6$ Hz, 1H), 7,49 – 7,44 (m, 1H), 7,43 – 7,40 (m, 2H), 7,14 – 7,11 (m, 2H), 6,98 (dd, $J = 8,4, 1,0$ Hz, 1H), 6,88 (ddd, $J = 8,3, 7,2, 1,2$ Hz, 1H), 3,30 (t, $J = 7,6$ Hz, 2H), 3,02 (t, $J = 7,6$ Hz, 2H); RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) δ (ppm) = 204,9, 162,5, 139,7, 136,4, 131,6, 130,2, 129,7, 120,1, 119,2, 119,0, 118,6, 39,7, 29,3; EM (IE, 70 eV) $m/z = 304$ ($\text{M}^{+\bullet}$), 286, 207, 169, 131, 121 (100%), 93, 77, 65.

3-(3-clorofenil)-1-(2-hidroxifenil)propan-1-ona (2g)

$\text{C}_{15}\text{H}_{13}\text{ClO}_2$, 260,72 g mol $^{-1}$; rendimento 31%; óleo amarelo; IV (placa de silício) ν (cm $^{-1}$) = 3057, 2957, 2930, 1732, 1641, 1614, 1599, 1582, 1487, 1449, 1308, 1273, 1261, 1246, 1198, 1157, 982, 783, 756, 696; RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ (ppm) = 12,22 (s, 1H), 7,74 (dd, $J = 8,1$ e 1,6 Hz, 1H), 7,47 (ddd, $J = 8,6, 7,3$ e 1,6 Hz, 1H), 7,25 – 7,17 (m, 3H), 7,13 (dt, $J = 7,2$ e 1,6 Hz, 1H), 6,99 (dd, $J = 8,4$ e 0,9 Hz, 1H), 6,89 (ddd, $J = 8,2, 7,2$ e 1,1 Hz, 1H), 3,33 (t, $J = 7,6$ Hz, 2H), 3,05 (t, $J = 7,6$ Hz, 2H); RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) δ (ppm) = 204,7, 162,4, 142,7, 136,4, 134,3, 129,8, 129,7, 128,5, 126,6, 126,5, 119,2, 119,0, 118,6, 39,6, 29,5; EM (IE, 70 eV) $m/z = 260$ ($\text{M}^{+\bullet}$), 242, 207, 179, 131, 121 (100%), 103, 93, 77, 65.

3-(4-clorofenil)-1-(2-hidroxifenil)propan-1-ona (2h)

$C_{15}H_{13}ClO_2$, 260,06 g mol⁻¹; rendimento 50%; óleo amarelo claro;

IV (placa de silício) ν (cm⁻¹) = 3055, 2922, 2851, 1732, 1638,

1614, 1584, 1491, 1485, 1445, 1360, 1298, 1256, 1200, 1159, 1090, 986, 827, 766, 754; RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm) = 12,23 (s, 1H), 7,72 (dd, J = 8,1, 1,6 Hz, 1H), 7,46 (ddd, J = 8,5, 7,2, 1,6 Hz, 1H), 7,30 – 7,23 (m, 2H), 7,21 – 7,12 (m, 2H), 7,01 – 6,95 (m, 1H), 6,88 (ddd, J = 8,3, 7,2, 1,2 Hz, 1H), 3,30 (t, J = 7,5 Hz, 2H), 3,04 (t, J = 7,5 Hz, 2H); RMN de ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ (ppm) = 204,9, 162,4, 139,1, 136,4, 132,1, 129,8, 129,7, 128,7, 119,2, 118,9, 118,6, 39,7, 29,2; EM (IE, 70 eV) m/z = 260 (M⁺•), 242, 207, 179, 121 (100%), 93, 77, 65.

3.4.3. Reações de biotransformação de flavanonas 3a-h por fungos derivados de ambiente marinho

3.4.3.1. Triagem de fungos de ambiente marinho para a biotransformação da flavanona 3a

Para a triagem dos fungos derivados de ambiente marinho (*Fusarium* sp. CBMAI 1830, *Acremonium* sp. CBMAI 1676, *Aspergillus* sp. CBMAI 1829, *Aspergillus sydowii* CBMAI 935, *Penicillium oxalicum* CBMAI 1996, *Penicillium citrinum* CBMAI 1186, *Penicillium raistrickii* CBMAI 931, *Cladosporium* sp. CBMAI 1237, *Mucor racemosus* CBMAI 847 e *Westerdykella* sp. CBMAI 1679) foram realizados dois experimentos, variando apenas o meio líquido da reação:

- Experimento **A**: reação com 2,5 g de massa úmida dos micélios dos fungos e 50 mL de caldo de cultivo (o mesmo utilizado no crescimento dos fungos);
- Experimento **B**: reação com 2,5 g de massa úmida dos micélios dos fungos e 50 mL de tampão fosfato (Na₂HPO₄/KH₂PO₄ 0,1 mol L⁻¹, pH 7).

As reações foram realizadas em frascos Erlenmeyer (125 mL). Para cada Experimento foram adicionados 25 mg da flavanona **3a** previamente dissolvida em 400 μ L de DMSO. As reações foram mantidas em agitação orbital (7 dias, 130 rpm, 32 °C). Os controles bióticos e abióticos foram realizados seguindo a mesma metodologia utilizada para as reações.

3.4.3.2. Reação de biotransformação de **3a** pelo fungo derivado de ambiente marinho *Acremonium* sp. CBMAI 1676 de acordo com o tempo reacional

Em frascos Erlenmeyer (50 mL) foram adicionados 20 mL de caldo enzimático, 1 g de células úmidas do fungo *Acremonium* sp. CBMAI 1676 e 10 mg da flavanona **3a** previamente dissolvida em 200 μ L de DMSO. As reações foram mantidas em shaker orbital por 24-168 h (130 rpm, 32 °C). Assim, as reações foram monitoradas com 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 e 14 dias de incubação através da extração total como descrita no Seção 3.4.1.2. Os monitoramentos foram realizados em duplicata.

3.4.3.3. Reações de biotransformação das flavanonas **3b-g** com o micélio dos fungos *Acremonium* sp. CBMAI 1676 e *Cladosporium* sp. CBMAI 1237

Após a triagem, os fungos *Acremonium* sp. CBMAI 1676 e *Cladosporium* sp. CBMAI 1237 foram selecionados para biotransformar outros derivados de flavanonas **3b-g**. As reações de **3b-g** com *Cladosporium* sp. CBMAI 1237 foram realizadas com 5 g de massa úmida dos micélios dos fungos e 100 mL de tampão fosfato ($\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$ 0,1 mol L^{-1} , pH 7). Já as reações com *Acremonium* sp. CBMAI 1676 foram realizadas com 5 g de massa úmida dos micélios dos fungos e 100 mL de caldo enzimático (o mesmo utilizado no crescimento dos fungos). Para cada experimento foram adicionados 50 mg da flavanona **3a** previamente dissolvida em 800 μ L de DMSO. Todos os experimentos foram realizados em duplicata. As reações foram mantidas em shaker por 7 dias, 130 rpm e 32 °C. Os produtos de biotransformação foram isolados por cromatografia em coluna usando o sistema de eluição hexano: acetato de etila (9,5:0,5) e caracterizados por RMN (^1H e ^{13}C), EM e IV (Esquema 16). Dados de $[\alpha]_D$ foram realizados para os produtos que foram isolados das reações de biotransformação.

Esquema 16 - Reação de biotransformação das flavanonas **3a-g** pelo fungo *Cladosporium* sp. CBMAI 1237.

2-fenilcroman-4-ol (**4a**)

O flavan-4-ol **4a** foi obtido a partir da reação de biotransformação da flavanona **3a** pelo fungo *Cladosporium* sp. CBMAI 1237 como uma mistura dos estereoisômeros com 83% de rendimento isolado, *r.d.* 44:56 (*cis:trans*), $[\alpha]_D^{23} = +3,7$ (*c* 1,00, CHCl₃).

Produto *cis*-(±)-**4a**: RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm) = 7,54 – 7,50 (m, 1H), 7,49-7,32 (m, 5H, sobreposição com o produto *trans*-**4a**), 7,36-7,32 (m, 1H, sobreposição com o produto *trans*-**4a**), 7,21 (dddd, *J* = 8,1, 7,3, 1,7, 0,7 Hz, 1H), 7,02 – 6,94 (m, 1H, sobreposição com o produto *trans*-**4a**), 6,90 (dd, *J* = 8,2, 12 Hz, 1H), 5,18 (dd, *J* = 11,6, 1,9 Hz, 1H), 5,10 (dd, *J* = 10,4, 6,2 Hz, 1H), 2,52 (ddd, *J* = 13,1, 6,2, 2,0 Hz, 1H), 2,19-2,09 (m, 1H, sobreposição com o produto *trans*-**4a**). RMN de ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ (ppm) = 154,9, 154,5, 140,5, 129,2, 128,7, 128,2, 127,0, 126,1, 125,7, 121,0, 116,7, 76,8, 65,8, 40,1. *ee* = 49% (determinado por CLAE/UV com coluna quiral).

Produto *trans*-(±)-**4a**: RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm) = 7,49-7,32 (m, 5H, sobreposição com o produto *cis*-**4a**) 7,28 – 7,24 (m, 2H), 7,02 – 6,94 (m, 2H, sobreposição com o produto *cis*-**4a**), 5,28 (dd, *J* = 12,0, 2,2 Hz, 1H), 4,84 (t, *J* = 2,9 Hz, 1H), 2,28 (dt, *J* = 14,3, 2,4 Hz, 1H), 2,19-2,09 (m, 2H, sobreposição com o produto *cis*-**4a**). RMN de ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ (ppm) = 154,9, 140,9, 130,0, 130,0, 128,6, 128,0, 126,2, 123,5, 120,8, 117,5, 73,1, 63,9, 38,2. *ee* = 24% (determinado por CLAE/UV com coluna quiral).

2-(4-metoxifenil)croman-4-ol (**4b**)

O flavan-4-ol **4b** foi obtido a partir da reação de biotransformação da flavanona **3b** pelo fungo *Cladosporium* sp. CBMAI 1237 como uma mistura dos estereoisômeros com rendimento isolado de 87%, *r.d.* 61:39 (*cis:trans*), $[\alpha]_D^{23} = +2,6$ (*c* 1,00, CHCl₃).

Produto *cis*-(±)-**4b**: RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm) = 7,51 (dt, *J* = 7,7 e 1,2 Hz, 1H), 7,42 – 7,31 (m, 2H, sobreposição com o produto *trans*-**4b**), 7,19 (dddd, *J* = 8,1, 7,3, 1,7, 0,7 Hz, 1H), 7,00 – 6,91 (m, 3H, sobreposição com o produto *trans*-**4b**), 6,87 (dd, *J* = 8,2, 1,2 Hz, 1H), 5,15 – 5,05 (m, 2H), 3,82 (s, 3H, sobreposição com o produto *trans*-**4b**), 2,48 (ddd, *J* = 13,1, 6,3, 1,9 Hz, 1H), 2,20 – 2,09 (m, 1H, sobreposição com o produto *trans*-**4b**). RMN de ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ (ppm) = 159,6,

154,6, 132,6, 129,1, 127,5, 126,9, 125,7, 120,9, 116,7, 114,1, 76,6, 65,9, 55,3, 39,9. Os dados estão de acordo com a literatura (ZHAO; BEIRING; GLORIUS, 2013).

Produto *trans*-(±)-**4b**: 7,42 – 7,31 (m, 3H, sobreposição com o produto *cis*-**4b**), 7,28 – 7,22 (m, 1H), 7,00 – 6,91 (m, 4H, sobreposição com o produto *cis*-**4b**), 5,22 (dd, $J = 11,9, 2,3$ Hz, 1H), 4,84 (t, $J = 2,9$ Hz, 1H), 3,82 (s, 3H, sobreposição com o produto *cis*-**4b**), 2,24 (dt, $J = 14,3, 2,4$ Hz, 1H), 2,20 – 2,09 (m, 2H, sobreposição com o produto *trans*-**4b**). RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) δ (ppm) = 159,5, 155,0, 133,0, 130,0, 127,7, 123,4, 120,8, 117,5, 114,0, 72,7, 64,0, 38,0.

2-(3-fluorofenil)croman-4-ol (**4c**)

O flavan-4-ol **4c** foi obtido a partir da reação de biotransformação da flavanona **3c** pelo fungo *Cladosporium* sp. CBMAI 1237 como uma mistura dos estereoisômeros com rendimento isolado de 65%, *r.d.* 35:65 (*cis:trans*), $[\alpha]_{\text{D}}^{23} = +2,5$ (c 1,00, CHCl_3).

Produto *cis*-(±)-**4c**: RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ (ppm) = 7,51 (d, $J = 7,7$ Hz, 1H), 7,41 – 7,17 (m, 5H, sobreposição com o produto *trans*-**4c**), 7,06 – 6,95 (m, 2H), 6,90 (dd, $J = 8,2, 1,1$ Hz, 1H), 5,17 (dd, $J = 11,6, 1,9$ Hz, 1H), 5,10 (dd, $J = 10,5, 6,2$ Hz, 1H), 2,52 (ddd, $J = 13,1, 6,2, 2,0$ Hz, 1H), 2,14 – 2,02 (m, 1H, sobreposição com o produto *trans*-**4c**). RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) δ (ppm) = 163,0 (d, $J = 246,0$ Hz), 154,6, 143,6 (d, $J = 7,2$ Hz), 130,2 (d, $J = 8,2$ Hz), 130,1, 129,3, 125,63, 121,7 (d, $J = 2,9$ Hz), 121,2, 117,5, 115,0 (d, $J = 21,1$ Hz), 113,2 (d, $J = 22,4$ Hz), 76,1 (d, $J = 1,9$ Hz), 65,6, 40,1. *ee* = 64% (determinado por CLAE/UV com coluna quiral).

Produto *trans*-(±)-**4c**: RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ (ppm) = 7,41 – 7,31 (m, 5H, sobreposição com o produto *cis*-**4c**), 7,06 – 6,95 (m, 3H), 5,28 (dd, $J = 12,0, 2,1$ Hz, 1H), 4,84 (t, $J = 2,9$ Hz, 1H), 2,28 (dt, $J = 14,3, 2,4$ Hz, 1H), 2,14 – 2,02 (m, 2H, sobreposição com o produto *trans*-**4c**). RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) δ (ppm) = 163,0 (d, $J = 246,0$ Hz, sobreposição com o *cis*-**4c**), 154,1, 143,1 (d, $J = 7,3$ Hz), 130,1 (d, $J = 8,3$ Hz), 129,3, 127,0, 123,4, 121,5 (d, $J = 2,9$ Hz), 121,0, 116,7, 114,8 (d, $J = 21,1$ Hz), 113,1 (d, $J = 22,4$ Hz), 72,4 (d, $J = 1,9$ Hz), 63,7, 38,2. *ee* = 30% (determinado por CLAE/UV com coluna quiral).

2-(4-fluorofenil)croman-4-ol (**4d**)

O flavan-4-ol **4d** foi obtido a partir da reação de biotransformação da flavanona **3d** pelo fungo *Cladosporium* sp. CBMAI 1237 como uma mistura dos estereoisômeros com rendimento isolado de 82%, *r.d.* 42:58 (*cis:trans*), $[\alpha]_D^{23} = +2,2$ (*c* 1,00, CHCl₃).

Produto *cis*-(±)-**4d**: RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm) = 7,53 – 7,50 (m, 1H), 7,47 – 7,39 (m, 2H, sobreposição com o produto *trans*-**4d**), 7,21 (dddd, *J* = 8,1, 7,3, 1,7, 0,7 Hz, 1H), 7,12 – 7,05 (m, 2H, sobreposição com o produto *trans*-**4d**), 7,02 – 6,93 (m, 1H, sobreposição com o produto *trans*-**4d**), 6,88 (dd, *J* = 8,2, 1,2 Hz, 1H), 5,15 (dd, *J* = 11,7, 1,8 Hz, 1H), 5,10 (dd, *J* = 10,5, 6,3 Hz, 1H), 2,49 (ddd, *J* = 13,1, 6,3, 2,0 Hz, 1H), 2,16 – 2,03 (m, 1H, sobreposição com o produto *trans*-**4d**), 1,79 (br, 1H, sobreposição com o produto *trans*-**4d**). RMN de ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ (ppm) = 162,5 (d, *J* = 246,6 Hz), 154,3, 136,3 (d, *J* = 3,0 Hz), 129,2, 127,9 (d, *J* = 8,3 Hz), 126,9, 125,6, 121,1, 116,7, 115,5 (d, *J* = 21,5 Hz), 76,2, 65,8, 40,1.

Produto *trans*-(±)-**4d**: RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm) = 7,47 – 7,39 (m, 2H, sobreposição com o produto *cis*-**4d**), 7,33 (dd, *J* = 7,5, 1,7 Hz, 1H), 7,26 (ddd, *J* = 8,2, 7,4, 1,7 Hz, 1H), 7,12 – 7,05 (m, 2H, sobreposição com o produto *cis*-**4d**), 7,02 – 6,93 (m, 2H, sobreposição com o produto *cis*-**4d**), 5,26 (dd, *J* = 12,1, 2,1 Hz, 1H), 4,84 (t, *J* = 2,9 Hz, 1H), 2,25 (dt, *J* = 14,3, 2,4 Hz, 1H), 2,16 – 2,03 (m, 1H, sobreposição com o produto *cis*-**4d**), 1,79 (br, 1H, sobreposição com o produto *cis*-**4d**). RMN de ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ (ppm) = 162,5 (d, *J* = 246,3 Hz), 154,7, 136,7 (d, *J* = 3,3 Hz), 130,1, 130,0, 128,0 (d, *J* = 8,1 Hz), 123,4, 121,0, 117,5, 115,5 (d, *J* = 21,6 Hz), 72,4, 63,8, 38,2.

2-(3-bromofenil)croman-4-ol (**4e**)

O flavan-4-ol **4e** foi obtido a partir da reação de biotransformação da flavanona **3e** pelo fungo *Cladosporium* sp. CBMAI 1237 como uma mistura dos estereoisômeros com 67% de rendimento isolado, *r.d.* 52:48 (*cis:trans*), $[\alpha]_D^{23} = +1,0$ (*c* 1,00, CHCl₃).

Produto *cis*-(±)-**4e**: RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm) = 7,62 (t, *J* = 1,8 Hz, 1H), 7,53 – 7,49 (m, 1H), 7,47 (ddd, *J* = 7,9, 2,8, 1,5 Hz, 1H, sobreposição com o produto *trans*-**4e**), 7,41 – 7,35 (m, 1H, sobreposição com o produto *trans*-**4e**), 7,30 – 7,24 (m, 1H, sobreposição com o produto *trans*-**4e**), 7,21 (dddd, *J* = 8,1, 7,3, 1,7, 0,7 Hz, 1H), 7,03 – 6,94

(m, 1H, sobreposição com o produto *trans*-**4e**), 6,90 (dd, $J = 8,2, 1,2$ Hz, 1H), 5,13 (dd, $J = 11,8, 2,0$ Hz, 1H), 5,09 (dd, $J = 10,6, 6,4$ Hz, 1H), 2,50 (ddd, $J = 13,1, 6,2, 2,0$ Hz, 1H), 2,17 – 2,01 (m, 1H, sobreposição com o produto *trans*-**4e**). RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) δ (ppm) = 154,1, 142,8, 131,2, 130,2, 129,3, 129,2, 126,9, 125,6, 124,6, 122,7, 121,2, 116,7, 76,0, 65,7, 40,1.

Produto *trans*-($\pm$)-**4e**: RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ (ppm) = 7,65 (t, $J = 1,8$ Hz, 1H), 7,47 (ddd, $J = 7,9, 2,8, 1,5$ Hz, 1H, sobreposição com o produto *cis*-**4e**), 7,41 – 7,35 (m, 1H, sobreposição com o produto *cis*-**4e**), 7,32 (ddd, $J = 8,2, 3,8, 2,4$ Hz, 1H), 7,30 – 7,24 (m, 2H, sobreposição com o produto *cis*-**4e**), 7,03 – 6,94 (m, 2H, sobreposição com o produto *cis*-**4e**), 5,25 (dd, $J = 12,1, 2,1$ Hz, 1H), 4,84 (t, $J = 2,9$ Hz, 1H), 2,26 (dt, $J = 14,3, 2,4$ Hz, 1H), 2,17 – 2,01 (m, 1H, sobreposição com o produto *cis*-**4e**). RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) δ (ppm) = 154,5, 143,3, 131,0, 130,1, 130,1, 129,9, 129,3, 124,8, 123,4, 122,7, 121,1, 117,5, 72,3, 63,7, 38,3.

2-(4-bromofenil)croman-4-ol (**4f**)

O flavan-4-ol **4f** foi obtido a partir da reação de biotransformação da flavanona **3f** pelo fungo *Cladosporium* sp. CBMAI 1237 como uma mistura dos estereoisômeros com rendimento isolado de 77%, *r.d.* 64:32 (*cis:trans*), $[\alpha]_D^{23} = +1,8$ (c 1,00, CHCl_3).

Produto *cis*-($\pm$)-**4f**: RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ (ppm) = 7,52 (m, 2H, sobreposição com o produto *trans*-**4f**), 7,37 – 7,30 (m, 2H, sobreposição com o produto *trans*-**4f**), 7,24 – 7,18 (m, 1H), 7,02 – 6,94 (m, 1H, sobreposição com o produto *trans*-**4f**), 6,88 (dd, $J = 8,2, 1,1$ Hz, 1H), 5,13 (dd, $J = 11,8, 2,0$ Hz, 1H), 5,09 (dd, $J = 11,0, 6,8$ Hz, 1H), 2,49 (ddd, $J = 13,1, 6,2, 2,0$ Hz, 1H), 2,17 – 2,02 (m, 1H, sobreposição com o produto *trans*-**4f**), 1,76 (br, 1H, sobreposição com o produto *trans*-**4f**). RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) δ (ppm) = 154,2, 139,6, 131,7, 129,9, 127,9, 127,7, 126,9, 121,9, 121,2, 116,7, 76,1, 65,7, 40,0.

Produto *trans*-($\pm$)-**4f**: RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ (ppm) = 7,52 (m, 2H, sobreposição com o produto *cis*-**4f**), 7,37 – 7,30 (m, 2H, sobreposição com o produto *cis*-**4f**), 7,27 (ddd, $J = 8,2, 7,5, 1,7$ Hz, 1H), 7,02 – 6,94 (m, 2H, sobreposição com o produto *cis*-**4f**), 5,24 (dd, $J = 12,0, 2,1$ Hz, 1H), 4,84 (t, $J = 2,9$ Hz, 1H), 2,25 (dt, $J = 14,3, 2,4$ Hz, 1H), 2,17 – 2,02 (m, 1H, sobreposição com o produto *cis*-**4f**), 1,76 (br, 1H, sobreposição com o produto *cis*-**4f**).

4f). RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) δ (ppm) = 154,6, 140,0, 131,8, 130,1, 129,3, 125,6, 123,4, 122,0, 121,0, 117,4, 72,4, 63,7, 38,2.

3.4.4. Reações de biotransformação de derivados de flavonoides 1a-4a pelo fungo derivado de ambiente marinho *A. sydowii* CBMAI 935

3.4.4.1. Reações de biotransformação de 1a-4a com o fungo *A. sydowii* CBMAI 935 em tampão fosfato

Em frascos Erlenmeyer de 50 mL foram adicionados 1,0 g de células úmidas do fungo *A. sydowii* CBMAI 935, 20 mL de tampão fosfato ($\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$ 0,1 mol L^{-1} , pH 7 ou 8), 10 mg dos derivados de flavonoides **1a-4a** dissolvidos em 200 μL de DMSO. As reações foram mantidas em shaker orbital (130 rpm, 32 °C). Para cada substrato **1a-4a** foram preparados oito frascos Erlenmeyer e para cada frasco de reação foi realizada extração total (Seção 3.4.1.2.). As reações foram realizadas em duplicata e monitoradas com 8, 24, 48, 72, 96, 120, 144 e 168 horas de incubação.

3.4.5. Experimentos controle

3.4.5.1. Controles bióticos para as reações de biotransformação com os fungos de ambiente marinho

Em frascos Erlenmeyer de 50 mL foram adicionados 1,0 g de células úmidas dos fungos, 20 mL do caldo de cultivo dos fungos, tampão fosfato ($\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$ 0,1 mol L^{-1} , pH 7 ou 8) ou tampão imidazol ($\text{C}_3\text{H}_4\text{N}_2/\text{HCl}$ 0,1 mol L^{-1} , pH 7). As reações foram mantidas em shaker orbital (7 ou 14 dias, 130 rpm, 32 °C) (Figura 18). Após 7 ou 14 dias de incubação foi realizada a extração dos controles bióticos seguindo o procedimento descrito na Seção 3.4.1.2. Em seguida, foram realizadas análises por técnicas cromatográficas.

Figura 18 - Etapas envolvidas no procedimento experimental para os controles bióticos.

3.4.5.2. Controles abióticos para avaliar a estabilidade dos derivados de flavonoides

Frascos Erlenmeyer de 50 mL contendo 20 mL de meio líquido (extrato de malte 2% em água do mar artificial) ou tampão fosfato ($\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$ 0,1 mol L⁻¹, pH 7 e 8) foram esterilizados em autoclave (20 min, 121 °C). Após resfriar os meios (~ 30 °C) foram adicionados 10 mg dos derivados de flavonoides (**1a-4a** e **1b-h**) dissolvidos em 200 µL de DMSO. As reações foram mantidas em shaker orbital (7 ou 14 dias, 130 rpm, 32 °C) (Figura 19). Após 7 ou 14 dias de agitação em shaker orbital foi realizada a extração dos controles abióticos seguindo o procedimento descrito na Seção 3.4.1.2. Em seguida, foram realizadas análises por técnicas cromatográficas.

Figura 19 - Etapas envolvidas no procedimento experimental para os controles abióticos.

3.5. Técnicas cromatográficas e métodos de caracterização estrutural

3.5.1. Análises por Cromatografia a Gás/Espectrometria de Massas

As análises por Cromatografia a Gás/Espectrometria de Massas (CG/EM) foram realizadas em um aparelho Shimadzu GC2010plus acoplado a um detector seletivo de massas (Shimadzu MS2010plus) e o modo de ionização foi por Impacto de Elétrons (IE, 70 eV). As análises foram realizadas com uma coluna DB-5MS (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm, Agilent J & W Advanced). A temperatura inicial do forno foi de 90 °C durante 4 min, com aumento de 10

°C min⁻¹ até atingir 280 °C e assim manteve-se durante 5 min; por fim, a temperatura foi elevada a uma taxa de 10 °C min⁻¹ até atingir 300 °C e manteve durante 10 min. O tempo total de análise foi de 40 min. As temperaturas do injetor e da interface foram mantidas em 250 °C e 270 °C, respectivamente. Hélio foi usado como gás de arraste com um fluxo constante de 0,75 mL min⁻¹ e o volume de injeção foi de 0,5 µL de solução com concentrações de 2,5 mg mL⁻¹ e 5,0 mg mL⁻¹ (razão de *split* de 1:20). Os fragmentos dos íons foram detectados no intervalo de 40-550 Da.

3.5.2. Análises por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

As análises de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE-UV) foram realizadas em um cromatógrafo Shimadzu 2010 equipado com: Controlador CBM-20A, bomba LC-20AT, desgaseificador DGU-20A5, amostrador SIL-20AHT, forno CTO-20A e detector SPD-M20A UV-VIS. A temperatura do forno foi de 40 °C.

As análises para determinação das razões diastereoisoméricas dos flavanóis **4a-h** foram realizadas na coluna Luna C18 (0,46 cm x 25 cm; 5 µm) equipada com uma pré-coluna. As análises das flavanonas e flavonóis racêmicos e/ou enantiomericamente enriquecidos foram realizadas utilizando a coluna quiral Phenomenex LUX[®] (0,46 cm x 25 cm; 5 µm) em fase normal no modo isocrático. Os métodos utilizados para a análise dos compostos na coluna C18 e na coluna quiral Lux ou OD-H estão descritos nas Tabelas 2 e 3, respectivamente.

Tabela 2 – Métodos utilizados para as análises por CLAE-UV das flavanonas **3a-g** e flavanóis **4a-g**.

Composto	Coluna quiral	Hexano 2-propanol	Fluxo (mL/min)	t _a (min)	λ _{detecção} (nm)	t _r (min)	t _{r(cis)} (min)	t _{r(trans)} (min)
3a/4a	C18	70:30	0,7	25 min	246 ^a 275 ^b	15,2	10,6	11,8
3b/4b	C18	70:30	0,7	25 min	275	13,7	9,7	10,6
3c/4c	C18	70:30	0,7	25 min	275		11,8	13,6
3d/4d	C18	70:30	0,7	25 min	275	14,9	11,2	12,8
3e/4e	C18	75:25	0,7	25 min	275	16,3	12,5	14,4
3f/4f	C18	75:25	0,7	25 min	275	16,2	12,6	14,8
3g/4g	C18	75:25	0,7	25 min	275	14,9	11,6	13,3

^aComprimento de onda de detecção das flavanonas **3a-h**.

^bComprimento de onda de detecção dos flavanóis **4a-h** utilizados para o cálculo das razões diastereoisoméricas.

t_a = tempo de análise.

t_r = tempo de retenção das flavanonas **3a-h**.

t_{r(cis)} = tempo de retenção do isômero *cis* dos flavanóis **4a-h**.

t_{r(trans)} = tempo de retenção do isômero *trans* dos flavanóis **4a-h**.

Tabela 3 - Métodos utilizados para as análises por CLAE-UV empregando coluna quiral dos flavan-4-óis **4a-g** obtidos nas reações de biorredução das flavanonas **3a-g**.

Compos to	Coluna quiral	Hexano isopropanol	Fluxo (mL/min)	t _a (min)	λ _{deteção} (nm)	t _{r(S)} (min)	t _{r(R)} (min)	t _{r1(trans)} (min)	t _{r2(trans)} (min)	t _{r1(cis)} (min)	t _{r2(cis)} (min)
3a/4a	OD-H ou Lux	95:5	0,5	60 min	246 ^a 275 ^b	16,5	19,8	26,2	31,8	35,1	42,4
3b/4b	OD-H ou Lux	-	-	-	246 275	20,6	23,9	-	-	-	-
3c/4c	OD-H ou Lux	97:3	0,7	60 min	246 275	13,6	17,7	26,9	28,8	38,2	46,8
3d/4d	OD-H ou Lux	-	-	-	246 275	13,6	15,6	-	-	-	-
3e/4e	OD-H ou Lux	97:3	0,7	60 min	246 276	16,9	24,3	28,5	32,0	47,6	55,6
3f/4f	OD-H ou Lux	97:3	0,7	60 min	246 276	17,3	23,8	29,3	36,4	38,7	52,4
3g/4g	OD-H ou Lux	97:3	0,7	60 min	246 276	15,2	21,4	26,6	28,7	40,8	45,3

^aComprimento de onda de detecção das flavanonas **3a-g** utilizados para o cálculo dos excessos enantioméricos.

^bComprimento de onda de detecção dos flavanóis **4a-g** utilizados para o cálculo dos excessos enantioméricos.

t_a = tempo de análise.

t_{r(S)} = tempo de retenção do enantiômero *S* das flavanonas **3a-g**.

t_{r(R)} = tempo de retenção do enantiômero *R* das flavanonas **3a-g**.

t_{r(cis)} = tempo de retenção do isômero *cis* dos flavanóis **4a-g**.

t_{r(trans)} = tempo de retenção do isômero *trans* dos flavanóis **4a-g**.

3.5.3. Ponto de fusão

A determinação do ponto de fusão dos compostos sólidos foi realizada utilizando capilares fechados em um aparelho da marca Fisatom (modelo 431). Os valores foram reportados sem correção.

3.5.4. Espectroscopia na região de absorção do Infravermelho (IV)

Os espectros de absorção na região do infravermelho foram obtidos utilizando um aparelho Shimadzu, modelo IRAffinity-1, operando com Transformada de Fourier. As análises foram realizadas na Central de Análises Químicas Instrumentais – CAQI/IQSC. As análises foram realizadas utilizando pastilhas de KBr para as amostras sólidas e cristal de silício para as amostras líquidas. Os espectros foram obtidos em comprimentos de onda na região de 400 a 4000 cm⁻¹.

3.5.5. Ressonância Magnética Nuclear (RMN de ^1H e ^{13}C)

As análises de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de ^1H e ^{13}C foram realizadas em um espectrômetro Agilent Technologies 500/54 Premium Shielded ou em um Agilent Technologies 400/54 Premium Shielded. O solvente clorofórmio deuterado (CDCl_3) ou $\text{DMSO}-d_6$ foram utilizados para solubilizar as amostras e o TMS foi empregado como sinal de referência. Os deslocamentos químicos (δ) foram expressos em ppm e as constantes de acoplamento (J) em Hz. As multiplicidades dos sinais foram designadas como segue: s (simpleto), d (duplete), t (triplete), d (duplete), dd (duplo duplete), ddd (duplo duplo duplete), dddd (duplo duplo duplo duplete), m (multiplete), etc.

3.5.6. Medidas de rotação óptica

As medidas de rotação óptica foram realizadas em um polarímetro Jasco modelo P-2000 equipado com lâmpada de sódio ($\lambda = 589 \text{ nm}$) (Central de Análises Químicas Instrumentais – CAQI/IQSC). As medições foram realizadas a 23°C utilizando uma cela de 1,0 dm de comprimento. As amostras foram diluídas em clorofórmio grau espectroscópico com concentrações expressas em g/100 mL.

3.5.7. Outros equipamentos utilizados

Aagitadores rotativos modelo Tecnal TE-421, Superohm G-25 ou Analítica SI-600R. Rotaevaporadores Fisaton e Tecnal T-210 equipados com refrigeração Tecnal modelo TE-2005 e bomba de vácuo TE-058. Balança analítica Shimadzu modelo AY-220. Câmara escura da marca Tecnal.

3.5.8. Reveladores

O revelador anisaldeído foi preparado pela adição de 0,5 mL de anisaldeído em 9 mL de etanol (95%), 0,5 mL de H_2SO_4 concentrado e 0,1 mL de ácido acético glacial.

The background of the page is a solid light yellow color. Overlaid on this background is a repeating pattern of chemical structures in a light gray color. These structures are complex organic molecules, featuring a central benzene ring with various substituents, including hydroxyl groups (-OH), carbonyl groups (C=O), and ether linkages (-O-). Some structures also include alkenyl or alkyl chains. The pattern is dense and covers the entire width of the page.

Resultados e Discussão

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Triagem de fungos derivados de ambiente marinho para a biotransformação da 2'-hidroxichalcona **1a**

Chalconas podem sofrer reações de biotransformação para a obtenção de uma variedade de compostos, dentre os quais destacam-se os produtos de hidrogenação, hidroxilação, metilação e ciclização. Esta diversidade de produtos é resultado dos vários sítios passíveis de transformação encontrados no esqueleto estrutural das chalconas. Como exemplo, as 2'-hidroxichalconas, podem sofrer reações de redução da ligação dupla, redução da carbonila, ciclização para formação de flavanonas, adição de substituintes nos anéis aromáticos e até mesmo formar ligações C-C através de adições de Michael (Figura 20). Diante de tantas possibilidades de transformação, as 2'-hidroxichalconas são substratos interessantes para o estudo das potencialidades biocatalíticas de fungos derivados de ambiente marinho. Assim, para alcançar os objetivos propostos neste trabalho, as 2'-hidroxichalconas **1a-h** (Seção 3.2.1) foram sintetizadas e utilizadas em reações de biotransformação por fungos de ambiente marinho.

Figura 20 - Possíveis sítios de reação no esqueleto estrutural da 2'-hidroxichalcona **1a**.

A 2'-hidroxichalcona **1a** foi utilizada como substrato modelo na triagem de oito linhagens de fungos de ambiente marinho capazes de empregar suas enzimas em reações de biotransformação. Os fungos de ambiente marinho selecionados para a triagem foram o *Penicillium raistrickii* CBMAI 931, *Cladosporium* sp. CBMAI 1237, *Aspergillus sydowii* CBMAI 935, *Penicillium oxalicum* CBMAI 1996, *Penicillium citrinum* CBMAI 1186, *Mucor racemosus* CBMAI 847, *Westerdykella* sp. CBMAI 1679 e *Aspergillus sclerotiorum* CBMAI 849. A escolha destes fungos foi baseada em resultados promissores obtidos pelo nosso grupo de pesquisa utilizando esses microrganismos em reações de redução e biotransformação (ALVARENGA et al., 2014; FERREIRA et al., 2014).

Os experimentos foram realizados utilizando os micélios dos fungos em tampão fosfato ($\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$ 0,07 mol L⁻¹, pH 7 e 8) por 7 dias. O tampão fosfato foi utilizado em dois valores de pH. O pH 7 foi selecionado por ser neutro e o como a água do mar é levemente alcalina, com pH entre 7,4 e 8,5, o pH 8 também foi utilizado nestes estudos. A partir dos experimentos foi observado que diferentes produtos foram formados a depender do fungo utilizado e das condições reacionais empregadas (Tabela 4). Através das análises por CG/EM foi observado que houve majoritariamente a formação de produtos de redução, ciclização e hidroxilação (Figura 21).

Tabela 4 - Biotransformação da 2'-hidroxichalcona **1a** por fungos de ambiente marinho em tampão fosfato ($\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$ 0,07 mol L⁻¹, pH 7, pH 8, 7 dias, 130 rpm, 32°C).

Conversão (%) ^a								
Produto	<i>P. raistrickii</i> CBMAI 931		<i>Cladosporium</i> sp. CBMAI 1237		<i>P. oxalicum</i> CBMAI 1996		<i>A. sydowii</i> CBMAI 935	
	pH 7	pH 8	pH 7	pH 8	pH 7	pH 8	pH 7	pH 8
2a	72	46	18	28	49	17	10	36
3a	18	46	7	8	9	45	9	1
(<i>trans</i>)- 4a	-	-	-	8	-	-	-	-
(<i>cis</i>)- 4a	-	-	-	5	-	-	-	-
5a	-	-	-	-	-	-	29	46
	<i>Westerdykella</i> sp. CBMAI 1679		<i>P. citrinum</i> CBMAI 1186		<i>M. racemosus</i> CBMAI 847		<i>A. sclerotiorum</i> CBMAI 849	
	pH 7	pH 8	pH 7	pH 8	pH 7	pH 8	pH 7	pH 8
2a	67	48	13	8	8	8	81	68
3a	6	8	22	51	20	47	7	23
(<i>trans</i>)- 4a	-	-	-	-	-	-	-	-
(<i>cis</i>)- 4a	-	-	-	-	-	-	-	-
5a	-	-	-	-	-	-	-	-

Condições reacionais: Células úmidas dos fungos (1,0 g) e 2'-hidroxichalcona **1a** (10 mg/200 µL de DMSO) em tampão fosfato ($\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$ 0,07 M, 20 mL, pH 7 e pH 8) incubado em agitador orbital (7 dias, 130 rpm, 32 °C).

^aPercentual relativo determinado por CG/EM (IE, 70 eV).

ee = excesso enantiomérico determinado por CLAE-UV.

rd = razão diastereoisomérica determinada por CLAE-UV.

Figura 21 – Cromatogramas obtidos por CG/EM da triagem de fungos de ambiente marinho para a biotransformação da 2'-hidroxichalcona **1a** em tampão fosfato ($\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$ 0,07 mol L⁻¹, pH 7, pH 8, 7 dias, 130 rpm, 32 °C).

Condições de análise: Coluna DB-5: 90 °C durante 2 min, 6 °C min⁻¹ até 150 °C e mantida por 1 min, 10 °C min⁻¹ até 180 °C e mantida por 4 min, 20 °C min⁻¹ até 280 °C e mantida por 15 min. O tempo total de análise foi 40 min. Tempos de retenção: **1a** (24,6 min), **2a** (23,2 min), **3a** (25,5 min) **5a** (25,6 min).

Todos os fungos derivados de ambiente marinho empregados na biotransformação de **1a** foram capazes de promover a redução quimiosseletiva da ligação dupla C-C do sistema α,β -insaturado da 2'-hidroxichalcona **1a**, com destaque para os fungos *P. raistrickii* CBMAI 931 e *A. sclerotiorum* CBMAI 849. De um modo geral, a condição reacional empregando tampão fosfato pH 7 foi a que mais favoreceu a biorredução de **1a**. Em pH 7, o fungo *P. raistrickii* CBMAI 931 promoveu a formação de 72% da 2'-hidroxi-diidrochalcona **2a** e 18% da flavanona **3a**. Em tampão fosfato pH 8 a formação de **2a** (46%) foi um pouco mais baixa enquanto houve um aumento na formação de **3a** (46%) (Tabela 4). As reações com *A.*

sclerotiorum CBMAI 849 seguiram o mesmo padrão de formação dos compostos, onde em pH 7 foi obtido maior formação de **2a** (81%) comparado com **3a** (7%), enquanto em pH 8 ocorreu um aumento na formação da flavanona **3a** (23%) e uma diminuição na formação de **2a** (68%). Nas análises por CLAE-UV empregando coluna quiral foi observado que tanto a reação de **1a** com *P. raistrickii* CBMAI 931 quanto com *A. sclerotiorum* CBMAI 849 não apresentou seletividade para a flavanona **3a**, apresentando-se na forma racêmica (Figura 22).

Figura 22 - Cromatogramas obtidos por CLAE-UV empregando coluna quiral de **1a** por *P. raistrickii* CBMAI 931 e por *A. sclerotiorum* CBMAI 849.

Condições de análise: Cromatogramas obtidos por CLAE-UV (coluna Lux® Phenomenex, hexano/isopropanol 9,5:0,5, 0,5 mL min⁻¹, 40 min, λ = 246 nm); **1a** (t_r = 15,9 min), **2a** (t_r = 14,8 min), (*S*)-**3a** (t_r = 17,2 min), (*R*)-**3a** (t_r = 20,9 min). Obs.: o pico em t_r = 7,5 min é referente a resíduo do solvente acetato de etila.

O fungo *Westerdykella* sp. CBMAI 1679 também promoveu majoritariamente a biotransformação de **1a** na 2'-hidroxi-diidrochalcona **2a** com 67% e 48% em tampão fosfato pH 7 e pH 8, respectivamente. Já o fungo *Cladosporium* sp. CBMAI 1237 apresentou as melhores conversões em tampão fosfato pH 8, obtendo 28% do produto **2a** e 8% de **3a**. *Cladosporium* sp. CBMAI 1237 promoveu ainda a formação de dois outros compostos com baixas conversões, os quais não foram isolados, mas diante da análise por CG/EM de baixa resolução, sugeriu-se se tratar dos isômeros *cis* e *trans* do flavan-4-ol **4a** (confirmado por

padrão sintético). Nas reações de **1a** com *Westerdykella* sp. CBMAI 1679 e *Cladosporium* sp. CBMAI 1237 a flavanona **3a** foi formada como uma mistura racêmica dos dois enantiômeros (Figura 23).

Figura 23 - Cromatogramas obtidos por CLAE-UV empregando coluna quiral de **1a** por *Westerdykella* sp. CBMAI 1679 e por *Cladosporium* sp. CBMAI 1237 após 7 dias de incubação.

Condições de análise: Cromatogramas obtidos por CLAE-UV (coluna Lux® Phenomenex, hexano/isopropanol 9,5:0,5, 0,5 mL min⁻¹, 40 min, λ = 246 nm); **2a** (t_r = 14,8 min), **1a** (t_r = 15,9 min), (*S*)-**3a** (t_r = 17,2 min), (*R*)-**3a** (t_r = 20,9 min). Obs.: o pico em t_r = 7,5 min é referente a resíduo do solvente acetato de etila.

As enzimas responsáveis por catalisar reduções (assimétricas) de ligações duplas conjugadas com grupos retiradores de elétrons são conhecidas como Ene Redutases (ERs). Estas enzimas são dependentes da Flavina Mononucleotídeo (FMN) e fazem parte da família das OYEs (“Old Yellow Enzymes”) (FOREJTŇÍKOVÁ et al., 2005; SKROBISZEWSKI et al., 2013). Os fungos derivados de ambiente marinho se mostraram fontes de enzimas ERs e para avaliar a atuação dessas enzimas, o fungo *P. raistrickii* CBMAI 931 foi selecionado para ser empregado em reações de biorredução de uma série 2'-hidroxichalconas substituídas **1a-h** e estes estudos estão descritos na Seção 4.2.

O fungo *A. sydowii* CBMAI 935 promoveu a formação de três compostos, a 2'-hidroxi-diidrochalcona **2a** (10%, pH 7), a flavanona **3a** (9%, pH 7) e um composto

hidroxilado **5a** (29%, pH 7) (Tabela 4). As reações realizadas em pH 8 apresentaram as melhores conversões para a 2'-hidroxi-diidrochalcona **2a** (36%) e para o produto hidroxilado **5a** (46%) (Esquema 17). O composto hidroxilado foi verificado a partir do espectro de massas em que apresentou o íon molecular M^{++} 242 (34%), indicando a adição de um grupo hidroxila ao produto dihidrogenado **2a** (M^{++} 226, 35%). O composto hidroxilado **5a** foi isolado por cromatografia em coluna e sua estrutura foi confirmada por análises espectroscópicas. O composto foi identificado como sendo o 1-(2'-hidroxifenil)-3-(4-hidroxifenil)propan-1-ona **5a**. Detalhes da caracterização estão apresentados na Seção 4.4. Alargon et al. (2013) relataram a formação de produtos de ciclização (27%) e hidroxilação (22%) na reação de biotransformação da 2'',4''-dimetoxi-2'-hidroxichalcona pelo fungo *A. niger*.

Esquema 17 - Biotransformação da 2'-hidroxichalcona **1a** empregando o fungo *A. sydowii* CBMAI 935.

A presença do grupo hidroxila na posição 2' do anel A da 2'-hidroxichalcona permite que ocorra a ciclização da chalcona para a formação da flavanona, pois o oxigênio da hidroxila pode se ligar ao $C\beta$ da ligação dupla da 2'-hidroxichalcona **1a** formando o produto ciclizado **3a**. *P. citrinum* CBMAI 1186 e *M. racemosus* CBMAI 847 apresentaram maior formação do produto ciclizado **3a** quando comparados com os demais fungos (Tabela 4). Em valores de pH 8 foram obtidos valores de conversões mais elevados para a formação do produto de ciclização **3a**, com 51% e 47% para o *P. citrinum* CBMAI 1186 e *M. racemosus* CBMAI 847, respectivamente.

Assim, os controles abióticos e a flavanona **3a** isoladas nas reações biocatalíticas com os fungos *P. citrinum* CBMAI 1186 (rend. 36%) e *M. racemosus* CBMAI 847 (rend. 30%) foram analisadas por CLAE-UV empregando coluna quiral, onde foi possível verificar que o produto **3a** foi obtido em uma mistura racêmica (Figura 24).

Figura 24 - Cromatogramas obtidos por CLAE-UV empregando coluna quiral: (A) reações com *P. citrinum* CBMAI 1186; (B) reações com *M. racemosus* CBMAI 847; (C) Flavanona **3a** isoladas das reações com *P. citrinum* CBMAI 1186 e *M. racemosus* CBMAI 847 após 7 dias de incubação.

Condições de análise: Cromatogramas obtidos por CLAE-UV (coluna Lux® Phenomenex, hexano/isopropanol 9,5:0,5, 0,5 mL min⁻¹, 40 min, λ = 246 nm); **2a** (t_r = 14,8 min), **1a** (t_r = 15,9 min), (*S*)-**3a** (t_r = 17,2 min), (*R*)-**3a** (t_r = 20,9 min). Obs.: o pico em t_r = 7,5 min é referente a resíduo do solvente acetato de etila.

Contudo, é conhecido que em solução aquosa a 2'-hidroxichalcona pode ser convertida espontaneamente em flavanona (JEZ; NOEL, 2002). Assim, com o objetivo de avaliar a interferência do meio reacional na transformação de **1a** os controles abióticos foram realizados em tampão fosfato em pH 7 e 8. No entanto, observou-se que a 2'-hidroxichalcona

1a sofreu ciclização espontânea em ambas as faixas de pH, apresentando percentuais significativos tanto em pH 7 (24%) quanto em pH 8 (39%) (Tabela 5). Tendo em vista a proximidade dos resultados obtidos nos controles abióticos com os das reações de biotransformação, buscou-se realizar novos experimentos em uma faixa de pH onde a ciclização espontânea fosse minimizada. Assim também foram realizados controles abióticos em tampão fosfato em pH 5 e 6.

Tabela 5 - Controles abióticos em tampão fosfato ($\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$ 0,07 mol L⁻¹) após 7 dias de reação com a 2'-hidroxichalcona **1a**.

Condições	Conversão (%) ^a	3a
	3a	ee (%)
Tampão Fosfato pH 5	10	rac
Tampão Fosfato pH 6	6	rac
Tampão Fosfato pH 7	24	rac
Tampão Fosfato pH 8	39	rac

Condições reacionais: 2'-hidroxichalcona **1a** (10 mg/200 µL de DMSO) em tampão fosfato ($\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$ 0,07 M, 20 mL, pH 5-8) incubado em agitador orbital (7 dias, 130 rpm, 32 °C).

^aPercentual relativo determinado por CG/EM (IE, 70 eV).

ee = excesso enantiomérico determinado por CLAE-UV.

A partir dos controles abióticos foi observado que, com o aumento do pH do meio houve também um aumento na ciclização de **1a** em **3a**. Como o controle abiótico em tampão fosfato (pH 6) apresentou menor formação da flavanona **3a** foram realizados experimentos como os fungos *P. citrinum* CBMAI 1186 e *M. racemosus* CBMAI 847 neste valor de pH para avaliar a atuação das enzimas dos fungos nestas condições. Nas reações realizadas em tampão fosfato pH 6 foram observadas baixas formações de **3a** tanto para o *P. citrinum* CBMAI 1186 (**3a**, 6%) quanto para o *M. racemosus* CBMAI 847 (**3a**, 2%) (Tabela 6, Figura 25), indicando a elevada influência do meio reacional nas reações de ciclização. Em contrapartida, o produto de diidrogenação **2a** foi favorecido nestas condições, sendo obtido com 10% e 41% para *P. citrinum* CBMAI 1186 e *M. racemosus* CBMAI 847, respectivamente.

Tabela 6 - Biotransformação da 2'-hidroxichalcona **1a** pelos fungos *P. citrinum* CBMAI 1186 e *M. racemosus* CBMAI 847 em tampão fosfato ($\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$ 0,07 mol L⁻¹, pH 6, 7dias, 130 rpm).

Fungos	Conversão (%)		3a ee (%)
	2a	3a	
<i>P. citrinum</i> CBMAI 1186	10	6	-
<i>M. racemosus</i> CBMAI 847	41	2	-

Condições reacionais: 2'-hidroxichalcona **1a** (25 mg/300 µL de DMSO) em tampão fosfato ($\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$ 0,07 M, 50 mL, pH 6) incubado em agitador orbital (7 dias, 130 rpm, 32 °C);

^aPercentual relativo determinado por CG/EM (IE, 70 eV).

ee = excesso enantiomérico determinado por CLAE-UV.

Figura 25 - Cromatogramas obtidos por CG/EM das reações de **1a** com os fungos *P. citrinum* CBMAI 1186 e *M. racemosus* CBMAI 847 em tampão fosfato pH 6 após 7 dias de incubação.

Condições de análise: Coluna DB-5, 90 °C durante 2 min, 6 °C min⁻¹ até 150 °C e mantida por 1 min, 10 °C min⁻¹ até 180 °C e mantida por 4 min, 20 °C min⁻¹ até 280 °C e mantida por 15 min. O tempo total de análise foi 40 min. Tempos de retenção: **1a** (t_r = 24,6 min), **2a** (t_r = 23,2 min), **3a** (t_r = 25,5 min)

Em estudos na literatura o fungo *Aspergillus niger* promoveu a ciclização de uma série de 2'-hidroxichalconas substituídas, os rendimentos obtidos variaram entre 10-27% e não foram observados excessos enantioméricos (ALARCÓN et al., 2013). O fungo *Aspergillus alliaceus* UI 315 promoveu a ciclização de 2'-hidroxi-2,3-metoxichalcona com baixos rendimentos 6-16% e sem enantiosetelividade (SANCHEZ-GONZALEZ; ROSAZZA, 2004). A ciclização de xanthohumol para as formas aurona e flavanona empregando fungos também foi reportada na literatura porém não há discussões sobre a seletividade (HERATH; FERREIRA; KHAN, 2003; TRONINA et al., 2013, 2014).

A ciclização estereosseletiva de chalconas para obtenção de flavononas enantiomericamente enriquecidas é catalisada pela enzima Chalcona Isomerase (CHI). Estudos da ciclização de 2'-hidroxichalconas substituídas utilizando a enzima CHI mostraram que a desprotonação do grupo 2-hidroxila ocorre facilmente e que a presença de grupos retiradores de elétrons no anel B melhoram a reatividade do monoânion (Figura 26) (JEZ; NOEL, 2002).

Figura 26 – Proposta de sequência de reação para a ciclização da 2'-hidroxichalcona **1a** catalisada pela enzima chalcona isomerase.

Fonte: Jez e Noel (2002)

Diante da ausência de enantiosseletividade nas reações empregando *P. citrinum* CBMAI 1186 e *M. racemosus* CBMAI 847 e da proximidade dos valores de conversão obtidos com os controles abióticos em pH 7 (24%) e pH 8 (39%), possivelmente a ciclização da 2'-hidroxichalcona **1a** nas reações de biotransformação foram provenientes do meio reacional ou até mesmo de aminoácidos presentes nas células/micélios dos fungos. Visto que, aminoácidos, tais como, L-prolina, L-alanina, L-serina e L-leucina têm sido empregados como aditivos na ciclização intramolecular de 2'-hidroxichalconas em meio básico formando uma mistura racêmica das flavanonas correspondentes (TANAKA; SUGINO, 2001; JIANG et al., 2011).

Diante dos resultados pode-se concluir que as reações de biotransformação com os fungos *P. citrinum* CBMAI 1186 e *M. racemosus* CBMAI 847 foram as mais eficientes em promover a ciclização do substrato **1a** na flavanona **3a** correspondente, porém não apresentaram enantiosseletividade e os valores de conversões foram próximos aos observados

no controle abiótico. A condição que mais favoreceu a bio-hidrogenação da ligação dupla ocorreu com o fungo *P. raistrickii* CBMAI 931 em pH 7.

Tendo em vista os resultados obtidos com as reações biocatalíticas empregando os fungos de ambiente marinho, os fungos *P. raistrickii* CBMAI 931 e *A. sydowii* CBMAI 935 foram utilizados com os compostos **1a-h** e **1a-4a**, respectivamente.

4.2. Redução quimiosseletiva de 2'-hidroxichalconas 1a-h pelo fungo derivado de ambiente marinho *P. raistrickii* CBMAI 931

A hidrogenação direta de chalconas por métodos químicos é relativamente difícil, pois a redução da ligação C=C do sistema α,β -insaturado requer, em geral, a utilização de complexos e sais metálicos como catalisadores, tais como paládio (CHU; WU; LEE, 2004; GANJI et al., 2013), rutênio (LI; WU, 2015), irídio (CHEN; LU; CAI, 2015) e níquel (JANA; SARMA; BARUAH, 2008) e adicionalmente, a reação com gás hidrogênio deve ser realizada com cautela, tendo em vista a alta inflamabilidade, bem como uma possível redução do grupo carbonílico (FERREIRA et al., 2014; STOMPOR; KAŁUŻNY; ŻAROWSKA, 2016).

As chalconas são caracterizadas pela presença de um sistema contendo uma carbonila α,β -insaturada. Compostos com essas características possuem deficiência em elétrons no C β da ligação dupla, causada pelo efeito eletrônico retirador de elétron do grupo C=O. De acordo com a literatura, reação de redução quimiosseletiva de chalconas é facilitada quando grupos retiradores de elétrons estão presentes no anel B, que aumentam a reatividade do átomo de carbono β . No entanto, a presença de substituintes ligados ao anel A, sejam eles doadores ou receptores de elétrons, não devem interferir eletronicamente na reação de hidrogenação (SILVA; STAMBUK; NASCIMENTO, 2010). Dessa forma, a influência dos grupos substituintes no anel B nas 2'-hidroxichalconas **1a-h** sintetizadas neste trabalho foram avaliadas frente a biotransformação pelo fungo *P. raistrickii* CBMAI 931.

Como foi apresentado na triagem de fungos de ambiente marinho (Seção 4.1), as reações de biotransformação empregando o fungo *P. raistrickii* CBMAI 931 levou preferencialmente a hidrogenação da ligação dupla C=C da 2'-hidroxichalcona **1a**. Assim, a 2'-hidroxichalcona **1a** foi utilizada na avaliação das condições reacionais mais apropriadas para a realização dos experimentos com o fungo *P. raistrickii* CBMAI 931. A 2'-hidroxichalcona **1a** foi utilizada como substrato modelo devido a ausência de substituintes no anel B.

As reações de biotransformação da 2'-hidroxichalcona **1a** foram realizadas utilizando os micélios dos fungos em diferentes meios líquidos: tampão fosfato ($\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$ 0,07 mol L⁻¹, pH 6-8); tampão imidazol ($\text{C}_3\text{H}_4\text{N}_2/\text{HCl}$ 0,1 mol L⁻¹, pH 7); e meio onde os fungos foram cultivados (malte 2%, pH ~ 6,4). A partir das análises por CG/EM foi observado que após 7 dias de incubação do *P. raistrickii* em tampão fosfato pH 7 ocorreu a conversão de

90% de **1a** para formação de dois produtos, a 2'-hidroxi-diidrochalcona **2a** (72%) e a flavanona **3a** (18%) (Tabela 7). Quando foi utilizado o tampão imidazol pH 7 foi formado 61% da 2'-hidroxi-diidrochalcona **2a** e 10% da flavanona **3a**. Na condição utilizando as células totais (caldo enzimático + micélios) por 7 dias obteve-se 64% de **2a** e baixa formação de **3a** (5%).

Tabela 7 - Condições reacionais para a biotransformação da 2'-hidroxichalcona **1a** pelo fungo *P. raistrickii* CBMAI 931 após 7 dias de incubação.

Condições	Percentual relativo (%) ^a		3a ee (%)
	2a	3a	
Células totais ^b	64	5	rac
Tampão fosfato pH 6	60	7	rac
Tampão fosfato pH 7	72	18	rac
Tampão fosfato pH 8	47	43	rac
Tampão imidazol pH 7	61	10	rac

Condições reacionais: Células úmidas dos fungos (2,5 g) e 2'-hidroxichalcona **1a** (25 mg/300 µL de DMSO) em tampão fosfato (Na₂HPO₄/KH₂PO₄ 0,07 M, 20 mL, pH 6-8), tampão imidazol (C₃H₄N₂/HCl 0,1 mol L⁻¹, pH 7) ou no caldo onde o fungo foi cultivado (malte 2%, pH ~ 6,4) e incubado em agitador orbital (7 dias, 130 rpm, 32 °C).

^aPercentual relativo determinado por CG/EM (IE, 70 eV).

^bCélulas totais = reação realizada com as células úmidas dos fungos + caldo onde o fungo foi cultivado.

ee = excesso enantiomérico determinado por CLAE-UV empregando coluna quiral.

Mesmo dissolvida em DMSO a 2'-hidroxichalcona **1a** apresentou baixa solubilidade em meio aquoso, dificultando assim o acesso do substrato às células do fungo e consequentemente a sua conversão. Assim, com o objetivo de aumentar o tempo de interação dos substratos com as enzimas presentes no fungo, a condição empregando células totais foi realizada com 14 dias de incubação. Também foram realizados experimentos com a 2'-hidroxichalcona **1a** na ausência dos micélios do fungo *P. raistrickii* CBMAI 931, neste caso, o próprio caldo de cultivo do fungo atuou como fonte de enzimas para promover as transformações. Este experimento na ausência dos micélios do fungo foi realizado para verificar se enzimas extracelulares estariam envolvidas na biotransformação do substrato **1a** (Tabela 8).

A partir das análises por CG/EM foi possível observar que quando a reação foi mantida por 14 dias ocorreu um aumento na formação do produto hydrogenado **2a** (83%) e a conversão na flavanona **3a** (4%) se manteve baixa em relação aos experimentos realizados em 7 dias de incubação. Porém, no experimento realizado no caldo de cultivo também houve a

formação de **2a** (76%) e baixa formação de **3a** (5%), indicando que enzimas ene-reductases do fungo *P. raistrickii* CBMAI 931 podem ter sido excretadas das células para o meio líquido. A partir dos experimentos realizados com 14 dias de incubação foi possível observar ainda, que a formação de **2a** foi um pouco maior quando a reação foi realizada com as células totais (83%) quando comparada a reação no caldo do cultivo (76%), isso pode ser resultado da contínua produção de enzimas pelas células dos fungos fazendo com que uma maior concentração do substrato **1a** fosse convertido no produto **2a** no mesmo período de tempo.

Tabela 8 – Biotransformação de **1a** pelo fungo *P. raistrickii* CBMAI 931 nas células totais e no caldo do cultivo após 14 dias de incubação.

Condições	Percentual relativo (%) ^a		3a ee (%)
	2a	3a	
Células totais ^b	83	4	-
Caldo do cultivo (sem micélios)	76	5	-

Condições reacionais: Células totais – células úmidas dos fungos (2,5 g) e 2'-hidroxichalcona **1a** (25 mg/300 µL de DMSO) no meio onde os fungos foram cultivados (malte 2%, pH ~ 6,4) e incubado em agitador orbital (7 dias, 130 rpm, 32 °C); Caldo do cultivo – 2'-hidroxichalcona **1a** (25 mg/200 µL de DMSO) no caldo onde o fungo foi cultivado (malte 2%, pH ~ 6,4) e incubado em agitador orbital (7 dias, 130 rpm, 32 °C).

^aPercentual relativo determinado por CG/EM (IE, 70 eV).

^bCélulas totais = reação realizada com as células úmidas dos fungos + caldo onde o fungo foi cultivado.

ee = excesso enantiomérico determinado por CLAE-UV.

Assim, para dar continuidade aos estudos, além da 2'-hidroxichalcona **1a** foram sintetizadas sete 2'-hidroxichalconas **1b-h** substituídas, dentre as quais se encontram chalconas halogenadas nas posições *meta* ou *para* do anel B. As 2'-hidroxichalconas halogenadas foram escolhidas devido aos recentes estudos que apresentaram atividades farmacológicas promissoras de chalconas contendo grupos halogênios nos anéis aromáticos (CABRERA et al., 2007, 2010; HSIEH et al., 2012; BURMAOGLU et al., 2016; BIST et al., 2017). Além disso, fungos derivados de ambiente marinho apresentam grande potencial para a biotransformação de compostos orgânicos halogenados, pois o seu habitat natural é rico em diversos sais, tais como os cloretos (CaCl₂, NaCl) e brometos (KBr).

A condição utilizando as células totais por 14 dias foi empregada para os demais compostos **1b-h**, pois foi a condição em que se obteve a maior formação do produto **2a** e a menor formação de **3a**. Dessa forma, as reações foram realizadas por 14 dias, 130 rpm e 32 °C e os cromatogramas obtidos estão apresentados na Figura 27.

Figura 27 - Cromatogramas obtidos por CG/EM das reações de biotransformação de **1a-h** pelo fungo *P. raistrickii* CBMAI 931 após 14 dias de incubação.

Condições de análise: CG/EM (IE, 70 eV); Coluna DB-5: 90 °C durante 2 min, 6 °C min⁻¹ até 150 °C e mantida por 1 min, 10 °C min⁻¹ até 180 °C e mantida por 4 min, 20 °C min⁻¹ até 280 °C e mantida por 15 min. O tempo total de análise foi de 40 min. Tempos de retenção: **1a** (t_r = 24,6 min), **2a** (t_r = 23,2 min), **3a** (t_r = 25,5 min), **1b** (t_r = 26,7 min), **2b** (t_r = 25,2 min), **3b** (t_r = 25,6 min), **1c** (t_r = 24,3 min), **2c** (t_r = 23,1 min), **3c** (t_r = 23,8 min), **1d** (t_r = 24,5 min), **2d** (t_r = 23,2 min), **3d** (t_r = 23,8 min), **1e** (t_r = 26,6 min), **2e** (t_r = 25,5 min), **3e** (t_r = 25,7 min), **1f** (t_r = 26,8 min), **2f** (t_r = 25,6 min), **3f** (t_r = 25,9 min), **1g** (t_r = 25,8 min), **2g** (t_r = 24,8 min), **3g** (t_r = 25,0 min), **1h** (t_r = 25,9 min), **2h** (t_r = 24,9 min), **3h** (t_r = 25,1 min).

Os resultados mostraram que todos os substratos **1a-h** sejam eles receptores ou doadores de elétrons foram biotransformados pelo fungo *P. raistrickii* CBMAI 931, levando a formação das 2'-hidroxi-diidrochalconas **2a-h** correspondentes com conversões que variaram de 25 a 83% em 14 dias de reação (Tabela 9). O fungo *P. raistrickii* biotransformou a 2'-hidroxichalcona **1b** com formação de 53% do produto **2b**. Este composto possui um grupo

doador de elétrons (-OCH₃) na posição *para* do anel aromático B e apresentou melhor conversão do que o composto **2h**, por exemplo, que possui um grupo eletronegativo (-Cl) na mesma posição. Dessa forma, pode-se inferir que assim como o efeito eletrônico, possivelmente outros efeitos tiveram influência, como por exemplo, o efeito estérico e interações eletrostáticas, bem como pelo uso das células totais do fungo onde mais de uma enzima pode ter atuado nas reações.

Tabela 9 - Hidrogenação quimiosseletiva das 2'-hidroxichalconas **1a-h** pelo fungo *P. raistrickii* CBMAI 931 após 14 dias de reação.

Substratos	Percentual relativo (%) ^a		3a-h ee (%)
	2a-h	3a-h	
1a (-H)	83	4	<i>rac</i>
1b (4-OCH ₃)	53	6	<i>rac</i>
1c (3-F)	42	6	<i>rac</i>
1d (4-F)	73	12	<i>rac</i>
1e (3-Br)	34	14	<i>rac</i>
1f (4-Br)	59	3	<i>rac</i>
1g (3-Cl)	25	5	<i>rac</i>
1h (4-Cl)	41	5	<i>rac</i>

Condições reacionais: Células totais – células úmidas dos fungos (2,5 g) e 2'-hidroxichalcona **1a** (25 mg/300 µL de DMSO) no meio onde os fungos foram cultivados (malte 2%, pH ~ 6,4) e incubado em agitador orbital (14 dias, 130 rpm, 32 °C). Reações realizadas em duplicata.

^aPercentual relativo determinado por CG/EM (IE, 70 eV).

ee = excesso enantiomérico determinado por CLAE-UV.

As 2'-hidroxichalconas **1c-h** possuem grupos halogênicos nas posições *meta* e *para* do anel B. Diante dos resultados foi observado que em todos os casos as melhores conversões foram obtidas com os substituintes na posição *para* do anel B. A 4-flúor-2'-hidroxichalcona **1d** obteve a melhor formação da diidrochalcona correspondente **2d** (73%), seguida pela 4-bromo-2'-hidroxi-diidrochalcona **2f** (59%) e pela 4-cloro-2'-hidroxichalcona **1h** que foi convertida em 4-cloro-2'-hidroxi-diidrochalcona **2g** (41%) (Figura 28).

Figura 28 - Reações de bio-hidrogenação com substituintes halogênicos na posição *para* do anel B das 2'-hidroxichalconas **1d**, **1f** e **1h**.

Os resultados mostraram ainda a importância dos grupos substituintes e as suas propriedades, tais como, a lipofilicidade relativa. Substituintes mais lipofílicos podem facilitar uma melhor permeação do substrato através das membranas celulares podendo influenciar na conversão do substrato. De modo geral, a ordem de lipofilicidade para os substituintes halogênicos no anel aromático segue a sequência $\text{Br} > \text{Cl} > \text{F}$. Neste estudo constatou-se que as 2'-hidroxichalconas bromo-substituídas **1e** e **1f** apresentaram maiores conversões nas 2'-hidroxi-diidrochalconas **2e** e **2f** quando comparadas com as 2'-hidroxichalconas cloro-substituídas **1g** e **1h**. De modo geral, os substituintes na posição *para* do anel também possuem maior lipofilicidade do que seus correspondentes na posição *meta*. Estas considerações estão em conformidade com os resultados obtidos para as 2'-hidroxichalconas bromo e cloro-substituídas.

No entanto, foi observado que as reações envolvendo 2'-hidroxichalconas **1c** e **1d** contendo o átomo de flúor apresentaram maiores valores de conversão do que para as demais 2'-hidroxichalconas halogenadas nas mesmas posições do anel B. Assim, pode-se sugerir que outros fatores contribuam para biotransformação destes compostos. No caso das 2'-hidroxichalconas flúor-substituídas **1c** e **1d**, a maior formação do produto hidrogenado provavelmente está relacionada com as fortes ligações hidrogênio que compostos contendo flúor podem realizar com os resíduos de aminoácidos presentes no sítio ativo da enzima responsável por catalisar a reação (BURMAOGLU et al., 2016). Contudo, a compreensão desses fatores torna-se difícil, pois as reações são realizadas com micélios e não com enzimas isoladas.

Existem relatos na literatura acerca da utilização de células totais de fungos e bactérias para a obtenção de diidrochalconas. Bactérias dos gêneros *Rhodococcus* e *Gordonia*, por exemplo, têm sido empregadas na obtenção de diidrochalconas a partir de flavanonas e chalconas em bons rendimentos que variaram de 13-94% (STOMPOR et al., 2013). Silva,

Stambuk e Nascimento (2010) sintetizaram uma série de chalconas contendo grupos metoxila e nitro que foram usadas como substratos em reações de biotransformações mediadas por três linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* em sistema bifásico. Mas a influência dos grupos de substituintes nos anéis A e B das chalconas foram, em geral, pouco significativas e não foi observada nenhuma correlação entre grupos doadores ou receptores de elétrons.

Nos experimentos apresentados na Tabela 9 as 2'-hidroxichalconas **1a-h** foram solubilizadas em 300 µL de DMSO, mas em contato com o meio líquido da reação ocorreu a precipitação de parte desses compostos. Para minimizar este problema e aumentar a solubilidade dos compostos no meio aquoso foram realizados experimentos onde **1a-h** foram solubilizados com 600 µL de DMSO. É sabido que quantidades de DMSO superiores a 20% da massa microbiana pode comprometer a integridade das células microbianas, porém, como nos experimentos realizados na ausência dos micélios (somente no caldo em que os fungos foram cultivados) foi observado que houve formação do produto desejado, notou-se que não havia a necessidade de manter as células íntegras no final da reação. Assim, o aumento de DMSO para solubilizar as amostras foi usada para avaliar a importância da solubilidade das 2'-hidroxichalconas **1a-h** nas reações de biotransformação e verificar se esse foi um fator que pode ter influenciado na conversão dos substratos.

No final dos 14 dias de reação foi observado que os micélios do fungo *P. raistrickii* CBMAI 931 não apresentavam mais a forma de bolinha, o que já era de se esperar tendo em vista a quantidade de DMSO utilizada e até mesmo por alguma toxicidade das chalconas para o fungo. Porém, a utilização de maior quantidade de DMSO não afetou o desempenho das enzimas envolvidas nas reações de redução da ligação dupla C-C.

A partir das análises por CG/EM das reações de biotransformação com as 2'-hidroxichalconas **1a-h** solubilizadas em 600 µL de DMSO observou-se que houve maior conversão de **1a-h** pra formação das 2'-hidroxi-diidrochalconas **2a-h** correspondentes do que nos experimentos apresentados anteriormente, principalmente no que se refere as 2'-hidroxi-diidrochalconas contendo bromo e cloro como grupos substituintes (Tabela 10). Com o aumento na quantidade de DMSO usada para solubilizar as amostras, a formação de **2e** passou de 34% para 84% enquanto a formação de **2f** passou de 59% para 93%, um valor significativo para reações realizadas no mesmo período de tempo, 14 dias. As 2'-hidroxichalconas contendo cloro **1g** e **1h** como grupo substituinte também apresentaram maior formação das respectivas 2'-hidroxi-diidrochalconas **2g** (86%) e **2h** (78%) quando comparado com os experimentos realizados utilizando 300 µL de DMSO.

Tabela 10 - Hidrogenação quimiosseletiva das 2'-hidroxichalconas **1a-h** dissolvidas em 600 μ L de DMSO após 14 dias de incubação.

Substratos	Percentual relativo (%)	
	2a-h	3a-h
1a (-H)	97 (60) ^b	3
Controle abiótico 1a	3	9
1b (4-OCH ₃)	99 (65)	-
Controle abiótico 1b	-	12
1c (3-F)	-	-
Controle abiótico 1c	2	13
1d (4-F)	94 (61)	5
Controle abiótico 1d	3	10
1e (3-Br)	84 (43)	9
Controle abiótico 1e	9	22
1f (4-Br)	93 (60)	3
Controle abiótico 1f	-	13
1g (3-Cl)	86 (31)	6
Controle abiótico 1g	-	9
1h (4-Cl)	78 (50)	5
Controle abiótico 1h	-	11

Condições reacionais: Células totais – células úmidas dos fungos (2,5 g) e 2'-hidroxichalcona **1a** (25 mg/600 μ L de DMSO) no meio onde os fungos foram cultivados (malte 2%, pH ~ 6,4) e incubado em agitador orbital (14 dias, 130 rpm, 32 °C). Reações realizadas em duplicata.

^aPercentual relativo determinado por CG/EM (IE, 70 eV).

^bRendimento isolado.

As 2'-hidroxichalconas **1a**, **1b** e **1d** foram quase que totalmente convertidas nas 2'-hidroxi-diidrochalconas correspondentes **2a** (97%), **2b** (99%) e **2d** (94%) (Figura 29). Em todos os casos a formação das flavanonas foram baixas (3-9%). A partir desses experimentos foi possível ainda realizar o isolamento e a caracterização das 2'-hidroxi-diidrochalconas **2a-h**, com exceção da 2'-hidroxi-diidrochalcona **2c**, pois a 2'-hidroxichalcona **1c** apresentou comportamento distinto das demais chalconas. Curiosamente, após 14 dias de reação a 2'-hidroxichalcona **1c** foi totalmente consumida, porém os cromatogramas por CG/EM indicou baixa formação do produto de biotransformação, levantando a suspeita de uma possível biodegradação do composto. A reação com a 2'-hidroxichalcona **1c** foi novamente realizada em triplicata apresentando o mesmo comportamento, impossibilitando o isolamento e a identificação dos possíveis produtos de biotransformação ou de biodegradação.

Figura 29 - Cromatogramas obtidos por CG/EM das reações de biotransformação de **1a-h** dissolvidas em 600 μ L de DMSO por *P. raistrickii* CBMAI 931 após 14 dias de incubação.

Condições de análise: CG/EM (IE, 70 eV); Coluna DB-5: 90 °C durante 2 min, 10 °C min⁻¹ até 280 °C seguido por aumento de 10 °C min⁻¹ até 300 °C e mantida por 10. O tempo total de análise foi de 40 min. Tempos de retenção: **1a** (20,1 min), **2a** (18,4 min), **3a** (18,8 min), **1b** (22,9 min), **2b** (20,9 min), **3b** (21,4 min), **1c** (19,7 min), **2c** (18,4 min), **3c** (18,6 min), **1d** (19,9 min), **2d** (18,4 min), **3d** (18,7 min), **1e** (22,7 min), **2e** (21,3 min), **3e** (21,7 min), **1f** (22,9 min), **2f** (21,6 min), **3f** (21,8 min), **1g** (21,7 min), **2g** (20,4 min), **3g** (20,7 min), **1h** (21,9 min), **2h** (20,5 min), **3h** (20,8 min).

Ferreira et al. (2014) estudaram a redução quimiosseletiva das chalconas (*E*)-3-(4-fluorofenil)-1-fenilprop-2-en-1-ona, (*E*)-3-(4-bromofenil)-1-fenilprop-2-en-1-ona, (*E*)-3-(4-metoxifenil)-1-fenilprop-2-en-1-ona, (*E*)-3-(4-metoxifenil)-1-fenilprop-2-en-1-ona e (*E*)-3-(3-nitrofenil)-1-fenilprop-2-en-1-ona onde obtiveram as diidrochalconas correspondentes com boas conversões utilizando as células inteiras (42-98%) e imobilizadas (80-93%) do fungo de ambiente marinho *Penicillium citrinum* CBMAI1186. As chalconas bromo e flúor-substituídas não possuíam o grupo hidroxila no C2' e formaram os produtos diidrogenados 4-bromo-diidrochalcona (49%) e 4-flúor-diidrochalcona (98%) de conversão em 6 dias de reação. No presente estudo, a reação levou 14 dias para catalisar a biotransformação de 4-flúor-2'-hidroxi-diidrochalcona **1d** e 4-bromo-2'-hidroxi-diidrochalcona **1f**. Dessa forma, possivelmente a presença do grupo hidroxila no C2' do anel A influenciou nas conversões dos substratos.

As chalconas sintetizadas neste trabalho apresentam um grupo hidroxila na posição *orto* do anel A. A presença do grupo hidroxila nesta posição permite a formação de uma ligação hidrogênio intramolecular entre a hidroxila na posição 2' do anel A e o oxigênio da carbonila (Figura 30). Esta característica pode resultar em um efeito estérico/eletrônico tornando a 2'-hidroxichalcona menos reativa ao sítio ativo das enzimas envolvidas no processo de biotransformação (STOMPOR; KAŁUŻNY; ŻAROWSKA, 2016). Estudos recentes apontaram que a hidrogenação de 2'-hidroxi-4-metoxichalcona ocorreu mais lentamente do que a da 4-metoxichalcona, a qual não apresenta o grupo hidroxila no C2' da estrutura (STOMPOR; KAŁUŻNY; ŻAROWSKA, 2016).

Figura 30 - Ligação hidrogênio intramolecular da 2'-hidroxichalcona **1a**.

Quando se trata de reação de redução de ligação dupla C-C, as ene redutases (ERs) – pertencentes a família das OYEs – são as principais enzimas que catalisam reações de hidrogenação em ligação C=C ativadas. Apesar do mecanismo de redução catalítica se assemelhar a uma adição de Michael, a reação utilizando a enzima é estereosseletiva formando uma *trans*-hidrogenação da ligação dupla. No mecanismo, o átomo de oxigênio da carbonila α,β -insaturada forma ligações hidrogênio com os resíduos de aminoácidos de Histidina e Asparagina, presentes no sítio ativo da ER (Figura 31). Dessa forma, ocorre o

alinhamento do C β do substrato com a Flavina Mononucleotídeo que transfere um íon hidreto estereosseletivamente para o C β , ao passo que o ânion formado no C α do substrato abstrai um próton de um resíduo de Tirosina para formação da diidrochalcona (FABER, 2011; TOOGOOD; SCRUTTON, 2014; KNAUS; TOOGOOD; SCRUTTON, 2016).

Figura 31 - Proposta de sequência de reação para a redução quimiosseletiva de C=C da 2'-hidroxichalcona **1a** mediada por ene redutases (ERs).

A utilização do fungo de ambiente marinho *P. raistrickii* CBMAI 931 se apresentou como uma estratégia importante, pois, além da quimiosseletividade das reações permitiu a hidrogenação de 2'-hidroxichalconas **1c-h** halogenadas sem que ocorresse a desalogenação das mesmas. Pois, uma síntese química convencional de 2'-hidroxi-diidrochalconas halogenadas utilizando Pd/C e gás H₂, por exemplo, pode resultar na desalogenação total ou parcial dos compostos. A síntese química de **1a-d** resultou nos produtos desejados 2'-hidroxi-diidrochalcona **2a**, 2'-hidroxi-4-metoxi-diidrochalcona **2b**, 3-flúor-2'-hidroxi-diidrochalcona **2c** e 4-flúor-2'-hidroxi-diidrochalcona **2d**, respectivamente. Porém com as 2'-hidroxichalconas **1g** e **1h** ocorreu a desalogenação parcial sendo formados a 2'-hidroxi-diidrochalcona **2a** em ambos os casos, além da 3-cloro-2'-hidroxi-diidrochalcona **2g** e 4-cloro-2'-hidroxi-diidrochalcona **2h** correspondentes. No caso de **1e** e **1f** ocorreu a desalogenação completa dos compostos visto que só foi identificada a formação da 2'-hidroxi-diidrochalcona **2a** (Figura 32).

Figura 32 - Desalogenação de 2'-hidroxichalconas **1e-h** em reações de hidrogenação com Pd/C e H₂.

A partir desses estudos pode-se concluir que o fungo de ambiente marinho *P. raistrickii* CBMAI 931 possibilitou o desenvolvimento de metodologias de obtenção de 2'-hidroxi-diidrochalconas **2a-h** a partir de 2'-hidroxichalconas **1a-h**, pois se mostrou fonte de enzimas ene redutases ao mediar eficientemente a biotransformação de 2'-hidroxichalconas substituídas **1a-h** com controle quimio- e regioseletivo, através a redução da ligação dupla C-C α,β -insaturada. A partir dos experimentos foi possível concluir ainda que a solubilidade das 2'-hidroxichalconas **1a-h** no meio líquido foi provavelmente mais importante para as biotransformações do que os fatores estéricos e/ou eletrônicos.

O estudo de métodos de síntese e obtenção de diidrochalconas são importantes tendo em vista as potencialidades de utilização desses compostos na indústria farmacêutica e de alimentos. Em geral, as diidrochalconas são potenciais aditivos alimentares devido sua segurança e estabilidade, além de apresentarem uma variedade de atividades biológicas (STOMPOR et al., 2013).

4.3. Reações de biotransformação de flavanonas 3a-g por fungos derivados de ambiente marinho

Assim como as 2'-hidroxichalconas, as flavanonas apresentam vários sítios passíveis de biotransformação para a obtenção de produtos interessantes para aplicações industriais, tais como álcoois e compostos hidroxilados. Neste sentido, o objetivo dessa parte do trabalho foi avaliar o potencial de fungos derivados de ambiente marinho frente a biotransformação de flavanonas.

Contudo, nos experimentos realizados anteriormente com a série de chalconas foi observado que vários produtos poderiam ser obtidos a depender do fungo empregado, então foi realizada uma triagem de fungos para as reações de biotransformação das flavanonas **3a-g**. A flavanona **3a** foi utilizada como modelo para os experimentos, onde dez fungos derivados de ambiente marinho (*Fusarium* sp. CBMAI 1830, *Acremonium* sp. CBMAI 1676, *Aspergillus* sp. CBMAI 1829, *Aspergillus sydowii* CBMAI 935, *Penicillium oxalicum* CBMAI 1996, *Penicillium citrinum* CBMAI 1186, *Penicillium raistrickii* CBMAI 931, *Cladosporium* sp. CBMAI 1237, *Mucor racemosus* CBMAI 847 e *Westerdykella* sp. CBMAI 1679) foram testados frente à biotransformação. Para cada fungo foram realizados dois experimentos, variando apenas o meio líquido da reação.

- Experimento **A**: meio líquido utilizado no crescimento dos fungos;
- Experimento **B**: tampão fosfato ($\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$ 0,07 mol L⁻¹, pH 7).

A partir das análises por CLAE-UV e CG/EM das reações de biotransformação foi observado que diferentes produtos foram obtidos a depender do microrganismo utilizado, sendo formados produtos de redução, hidroxilação e clivagem do anel heterocíclico (Esquema 18) (Figura 33). O controle abiótico de **3a** também foi realizado nas duas condições, porém não foi observado nenhuma transformação após 7 dias em agitador orbital.

Esquema 18 - Biotransformação da flavanona **3a** para obtenção de diidrochalcona, flavanol e/ou diidroxi-diidrochalcona por fungos de ambiente marinho.

Figura 33 - Cromatogramas obtidos por CLAE-UV das reações de biotransformação de **3a** por fungos derivados de ambiente marinho após 7 dias de incubação.

Condições de análise: CLAE-UV com coluna Phenomenex C18 (0,46 cm x 25 cm; 5 μm), modo de eluição gradiente metanol e água (70:30), com fluxo de 0,7 mL min⁻¹, tempo de análise de 25 min. Cromatogramas obtidos no comprimento de onda de 215 nm. Tempos de retenção: **5a** (t_r = 10,6 min), *cis*-(±)-**4a** (t_r = 10,6 min), *trans*-(±)-**4a** (t_r = 11,8 min), (±)-**3a** (t_r = 15,2 min), **2a** (t_r = 25,5 min).

S = resíduo dos solventes acetato de etila (7,0 min) e isopropanol (3,8 min).

Além de já possuírem um centro estereogênico e consequentemente um par de enantiômeros (*S*)-**3a** e (*R*)-**3a**, as flavanonas apresentam também uma cetona pro-estereogênica em sua estrutura, podendo assim fornecer um novo centro de quiralidade na molécula. Quando o grupo -C=O (hibridização sp^2) de **3a** é reduzido ao grupo -C-OH (hibridização sp^3) para formar o flavan-4-ol **4a** ocorre a formação de um novo centro estereogênico, obtendo-se assim um par de diastereoisômeros e dois pares de enantiômeros. Assim, o flavan-4-ol **4a** formado nas reações podem apresentar os estereoisômeros *cis*-(2*R*,4*R*)-**4a** e *cis*-(2*S*,4*S*)-**4a** e/ou *trans*-(2*R*,4*S*)-**4a** e *trans*-(2*S*,4*R*)-**4a**, onde a relação entre os produtos estereoisoméricos vai ser determinada pelas seletividades das enzimas envolvidas no processo de redução (Figura 34).

Figura 34 - Estruturas dos estereoisômeros da flavanona **3a** e do flavan-4-ol **4a**.

O fungo *P. raistrickii* CBMAI 931 promoveu a abertura do anel C da flavanona **3a** para formação da diidrochalcona **2a** tanto no experimento **A** quanto no experimento **B** (Figura 35) (Tabela 11). Em geral, a abertura do anel C de flavanonas leva a formação de chalconas, no entanto, diante dos resultados não foi possível observar a formação da chalcona **1a** pelo fungo. A diidrochalcona **2a** foi isolada com 30% de rendimento nas condições do experimento **A**. Foi observado ainda que houve maior seletividade para o consumo da (*S*)-**3a** para a formação da diidrochalcona **2a**, pois, após 7 dias de reação a (*R*)-**3a** foi obtida com excesso enantiomérico de 57% e 56% nos experimentos **A** e **B**, respectivamente.

Figura 35 - Cromatogramas obtidos por CLAE/UV utilizando coluna quiral da biotransformação de **3a** por *P. raistrickii* CBMAI 931 após 7 dias de incubação.

Condições de análise: CLAE-UV com coluna quiral Lux® Phenomenex (0,46 cm x 25 cm; 5 µm), gradiente de eluição isocrático hexano e isopropanol (95:5), com fluxo de 0,5 mL min⁻¹, tempo de análise de 60 min. Cromatogramas obtidos no comprimento de onda de 215 nm. Tempos de retenção: **2a** (t_R = 14,7 min), (*S*)-**3a** (t_R = 16,2 min), (*R*)-**3a** (t_R = 20,2 min), *cis*-(±)-**4a** (35,1 min e 42,4 min). S = resíduo dos solventes acetato de etila (7,0 min) e isopropanol (3,8 min). NI = não identificado.

Tabela 11 - Reações de hidrogenação e hidroxilação da flavanona **3a** promovidas por fungos derivados de ambiente marinho após 7 dias de incubação.

3a				
Condição	(%) remanescente	<i>ee</i> (%)	2a (%)	5a (%)
<i>Penicillium raistrickii</i> CBMAI 931				
Experimento A	45	57 (<i>R</i>)	28	-
Experimento B	45	56 (<i>R</i>)	30	-
<i>Fusarium</i> sp. CBMAI 1830				
Experimento A	57	23 (<i>R</i>)	6	34
Experimento B	7	12 (<i>R</i>)	5	64
<i>Aspergillus sydowii</i> CBMAI 935				
Experimento A	10	22 (<i>R</i>)	3	11
Experimento B	7	-	6	30

Condições reacionais: Experimento A: Células úmidas dos fungos (2,5 g) e a flavanona **3a** (25 mg/400µL DMSO) em caldo enzimático (50 mL) incubado em agitador orbital (7 dias, 130 rpm, 32 °C); Experimento B: Células úmidas dos fungos (2,5 g) e **3a** (25 mg/400µL DMSO) em tampão fosfato (Na₂HPO₄/KH₂PO₄ 0,07 M, 50 mL, pH 7) incubado em agitador orbital (7 dias, 130 rpm, 32 °C);

ee = excesso enantiomérico determinado por CLAE-UV quiral.

As reações de biotransformação de **3a** pelos fungos *Fusarium* sp. CBMAI 1830 e *A. sydowii* CBMAI 935 levaram a formação de dois produtos principais: diidrochalcona **2a** e 2',4-diidroxidiidrochalcona **5a** (Figura 36). Nas reações com o fungo *Fusarium* sp. CBMAI 1830 o consumo da (*S*)-**3a** foi favorecido em ambas as condições experimentais, levando a abertura do anel C da flavanona **3a** e a hidroxilação do anel B para obtenção de **2a** e **5a**, respectivamente. A biotransformação da (*S*)-**3a** também foi favorecida nas reações com *Fusarium* sp. CBMAI 1830, onde foram obtidos excessos enantioméricos de 23 e 12% para a (*R*)-**3a** nas condições dos experimentos A e B, respectivamente.

Figura 36 - Produtos da biotransformação de **3a** por *A. sydowii* CBMAI 935 ou *Fusarium* sp. CBMAI 1830.

Condições de análise: CLAE-UV com coluna quiral Phenomenex Lux[®] (0,46 cm x 25 cm; 5 μm), gradiente de eluição isocrático hexano e isopropanol (95:5), com fluxo de 0,5 mL min⁻¹, tempo de análise de 80 min. Cromatogramas obtidos no comprimento de onda de 254 nm. Tempos de retenção: **2a** (t_R= 14,7 min), (*S*)-**3a** (t_R= 16,2 min), (*R*)-**3a** (t_R= 20,2 min), **5a** (t_R= 61,4 min)

Assim como nas reações com a 2'-hidroxichalcona **1a**, o fungo *A. sydowii* CBMAI 935 mostrou-se rico em enzimas capazes de promover a hidroxilação da 2'-hidroxidiidrochalcona **2a** (Figura 36). Para entender melhor os aspectos relacionados a esta transformação, o fungo *A. sydowii* CBMAI 935 foi selecionado para promover a biotransformação da 2'-hidroxichalcona **1a**, 2'-hidroxidiidrochalcona **2a**, flavanona **3a** e flavan-4-ol **4a**. Os resultados obtidos a partir destes experimentos estão descritos na Seção 4.4 em Resultados e discussão.

O desenvolvimento de métodos de síntese assimétrica de álcoois a partir de cetonas pro-quirais é um dos principais focos de estudos tanto na química orgânica sintética quanto da biocatálise. Os álcoois enantiomericamente puros ou enriquecidos são frequentemente

utilizados como blocos de construção de moléculas de interesse industrial. Mas, a redução de flavanonas sejam elas naturais ou sintéticas para formação de flavan-4-óis ainda é pouco estudada. Na triagem dos microrganismos, várias espécies de fungos derivados de ambiente marinho foram capazes de realizar a biorredução da flavanona **3a**. Os fungos *Westerdykella* sp. CBMAI 1679, *Acremonium* sp. CBMAI 1676 e *Cladosporium* sp. CBMAI 1237 foram os mais efetivos na redução da carbonila da flavanona **3a** para formação do flavan-4-ol **4a** correspondente. As reações foram realizadas de acordo com os experimentos **A** e **B** (Tabela 12).

Tabela 12 - Reações de biorredução da flavanona **3a** promovidas por fungos derivados de ambiente marinho após 7 dias de incubação.

Condição	3a		4a			
	remanescente (%)	<i>ee</i> (%)	(<i>cis</i>)- 4a (%)	(<i>cis:trans</i>)- 4a <i>rd</i>	<i>ee</i> (%)	
					<i>cis</i>	<i>trans</i>
<i>Westerdykella</i> sp. CBMAI 1679						
Experimento A	14	0	57	82:18	13	49
Experimento B	39	12 (<i>R</i>)	36	72:28	29	43
<i>Acremonium</i> sp. CBMA 1676						
Experimento A	28	28 (<i>R</i>)	11	85:15	96	98
Experimento B	62	27 (<i>R</i>)	22	91:9	97	88
<i>Cladosporium</i> sp. CBMAI 1237						
Experimento A	13	91 (<i>R</i>)	25	42:58	54	24
Experimento B	11	38 (<i>R</i>)	35	44:56	49	24
<i>Aspergillus</i> sp. CBMAI 1829						
Experimento A	75	-	8	78:22	-	-
Experimento B	71	-	<2	68:32	-	-
<i>Penicillium oxalicum</i> CBMAI 1996						
Experimento A	68	2 (<i>R</i>)	<2	47:53	-	-
Experimento B	75	1 (<i>R</i>)	<2	30:70	-	-
<i>Penicillium citrinum</i> CBMAI 1186						
Experimento A	72	1 (<i>R</i>)	<2	26:74	-	33
Experimento B	76	3 (<i>R</i>)	<2	33:67	-	19
<i>Mucor racemosus</i> CBMAI 847						
Experimento A	62	1 (<i>R</i>)	<2	22:78	-	23
Experimento B	62	7 (<i>R</i>)	6	29:71	-	3

Condições reacionais: Experimento **A**: Células úmidas dos fungos (2,5 g) e a flavanona **3a** (25 mg/400µL DMSO) em caldo enzimático (50 mL) incubado em agitador orbital (7 dias, 130 rpm, 32 °C); Experimento **B**: Células úmidas dos fungos (2,5 g) e **3a** (25 mg/400µL DMSO) em tampão fosfato (Na₂HPO₄/KH₂PO₄ 0,07 M, 50 mL, pH 7) incubado em agitador orbital (7 dias, 130 rpm, 32 °C);

ee = excesso enantiomérico determinado por CLAE-UV com coluna quiral.

rd = razão diastereoisomérica determinada por CLAE-UV.

O fungo derivado de ambiente marinho *Westerdykella* sp. CBMAI 1679 promoveu a formação do flavanol **4a** a partir da flavanona ($\pm$)-**3a**, como uma mistura de diastereoisômeros. A razão diastereoisomérica para o flavan-4-ol **4a** formado por *Westerdykella* sp. CBMAI 1679 no experimento **A** foi de 82:18 (*cis:trans*) e no experimento **B** foi de 72:28 (*cis:trans*). Os excessos enantioméricos nos experimentos **A** (*ee* 13% para o pico 2 do *cis*-**4a**; *ee* 49% para o pico 1 do *trans*-**4a**) e **B** (*ee* 29% para o pico 2 do *cis*-**4a**; *ee* 43% para o pico 1 do *trans*-**4a**) foram próximos (Figura 37). Além da melhor diastereosseletividade, no experimento **A** apresentou ainda maior conversão de **3a** (*c* = 83%) quando comparada com o experimento **B** (*c* = 59%). Possivelmente o meio líquido utilizado no experimento **A** apresentou maior concentração de enzimas, visto que a reação foi realizada utilizando o mesmo meio líquido onde o fungo foi cultivado. O flavan-4-ol **4a** formado na reação de **3a** por *Westerdykella* sp. CBMAI 1679 foi isolado nas condições do experimento **A** com rendimento de 63% e excesso enantiomérico de 49% para o *trans*-**4a** e 13% para o *cis*-**4a**. Contudo, não foi possível isolar os diastereoisômeros do flavan-4-ol *cis*-**4a** e *trans*-**4a** por cromatografia em coluna, sendo obtidos apenas uma mistura dos diastereoisômeros.

Figura 37 - Cromatogramas obtidos por CLAE-UV com coluna quiral da biotransformação de **3a** por *Westerdykella* sp. CBMAI 1679 após 7 dias de incubação.

Condições de análise: CLAE-UV com coluna quiral Phenomenex Lux[®] (0,46 cm x 25 cm; 5 μ m), gradiente de eluição isocrático hexano e isopropanol (95:5), com fluxo de 0,5 mL min⁻¹, tempo de análise de 60 min. Cromatogramas obtidos no comprimento de onda de 215 nm. Tempos de retenção: (*S*)-**3a** (*t_r* = 16,5 min), (*R*)-**3a** (*t_r* = 19,8 min), *trans*-**4a** (*t_r* = 26,2 min e 31,8 min), *cis*-**4a** (*t_r* = 35,1 min e 42,4 min). S = resíduo dos solventes acetato de etila (*t_r* = 7,0 min) e isopropanol (*t_r* = 3,8 min). NI = não identificado.

Embora as reações com o fungo *Acremonium* sp. CBMAI 1676 tenham apresentado menor formação de **4a**, estas mostraram-se mais seletivas quando comparadas com as reações empregando os fungos *Westerdykella* sp. CBMAI 1679 e *Cladosporium* sp. CBMAI 1237. A diastereosseletividade do flavan-4-ol **4a** formado no experimento **A** foi de 85:15 (*cis:trans*),

enquanto para o experimento **B** foi de 91:9 (*cis:trans*). Para o diastereoisômero *cis*-**4a** foram obtidos *ee* = 96% e 97% (pico 2) nos experimentos **A** e **B**, respectivamente. Já os excessos enantioméricos para o par do diastereoisômero *trans*-**4a** nos experimentos **A** e **B** foram *ee* = 98% e 88% (pico 1), respectivamente (Figura 38). O flavan-4-ol **4a** formado foi isolado da reação do experimento **A** com 31% de rendimento e excesso enantiomérico de 98% para o *trans*-**4a** e 96% para o *cis*-**4a**.

Figura 38 - Cromatogramas obtidos por CLAE-UV com coluna quiral da biotransformação de **3a** por *Acremonium* sp. CBMAI 1676 após 7 dias de incubação.

Condições de análise: CLAE-UV com coluna quiral Phenomenex Lux[®] (0,46 cm x 25 cm; 5 μ m), gradiente de eluição isocrático hexano e isopropanol (95:5), com fluxo de 0,5 mL min⁻¹, tempo de análise de 60 min. Cromatogramas obtidos no comprimento de onda de 215 nm. Tempos de retenção: (*S*)-**3a** (t_r = 16,5 min), (*R*)-**3a** (t_r = 19,8 min), *trans*-**4a** (t_r = 26,2 min e 31,8 min), *cis*-**4a** (t_r = 35,1 min e 42,4 min). S = resíduo dos solventes acetato de etila (t_r = 7,0 min) e isopropanol (t_r = 3,8 min). NI = não identificado.

A flavanona **3a** que não reagiu foi isolada com excesso enantiomérico de 28% para a (*R*)-**3a** que apresentou $[\alpha]_D^{23}$ = +4,2 (*c* 1,00, CHCl₃) e foi designada por comparação com a literatura $[\alpha]_D^{20}$ = +54,8 (*c* 0,80, CHCl₃, *ee* 85%) (JANECZKO et al., 2014).

Nas reações de biotransformação utilizando os fungos *Acremonium* sp. CBMAI 1676, *Westerdykella* sp. CBMAI 1679 e *Aspergillus* sp. CBMAI 1829 a formação do produto *cis*-**4a** foi predominante. O mesmo comportamento foi observado nas reações de síntese dos padrões de flavanóis empregando NaBH₄ e metanol, onde o produto *cis*-($\pm$)-**4a** foi obtido numa proporção 95:5 em relação ao produto *trans*-**4a**. No entanto, as reações biocatalíticas foram mais enantiosseletivas, porém formou todos os possíveis diastereoisômeros.

Nas reações de redução de cetonas proquirais utilizando catalisadores aquirais, a transferência de um íon hidreto para o carbono carbonílico – que possui uma geometria trigonal planar – pode ocorrer a partir de qualquer uma das faces da carbonila, chamadas de faces *Re* e *Si*. Essas faces são determinadas utilizando as mesmas regras de prioridades de

Cahn-Ingold-Prelog. A ($\pm$)-flavanona **3a** possui um centro estereogênico e uma cetona pró-estereogênica em sua estrutura, logo, cada enantiômero da flavanona pode fornecer os enantiômeros *R* e *S* a depender da face onde a transferência do íon hidreto irá ocorrer (Figura 39). Assim, a transferência de um íon hidreto para o carbono trigonal pela face *Si* da (*R*)-**3a** fornece o enantiômero *cis*-(2*R*,4*R*)-**4a** enquanto pela face *Re* fornece o *trans*-(2*R*,4*S*)-**4a**. Se a transferência do íon hidreto ocorrer pela face *Si* da (*S*)-**3a** é obtido o enantiômero *cis*-(2*S*,4*R*)-**4a** e pela face *Re* é obtido o *trans*-(2*S*,4*S*)-**4a**.

Figura 39 - Representação do ataque nucleofílico do íon hidreto pelas faces *Re* e *Si* da cetona pró-estereogênica da flavanona para formação dos flavan-4-óis **4a**.

Diante disso, a formação majoritária do produto *cis*-**4a** sugere que o hidrogênio foi adicionado de modo que, durante a aproximação, o nucleófilo sofresse o mínimo de impedimento estérico possível. Para que isso aconteça, o ataque deve ser realizado pela face contrária ao grupo substituinte mais volumoso (anel B) localizado no centro estereogênico da flavanona. Assim, o ataque nucleofílico a carbonila do enantiômero *R* da flavanona ocorre pela face *Si*, enquanto ataque nucleofílico ao enantiômero *S* ocorre pela face *Re* da cetona pró-estereogênica.

A biotransformação de **3a** pelo fungo *Cladosporium* sp. CBMAI 1237 resultou na formação das formas *cis* e *trans* do flavan-4-ol **4a**, com uma discreta seletividade para o diastereoisômero *trans*-**4a**. A partir das análises por CLAE/UV a razão diastereoisomérica de **4a** foi determinada obtendo-se 42:58 (*cis:trans*) no experimento **A** e 44:56 (*cis:trans*) no experimento **B**. No experimento **A** com fungo *Cladosporium* sp. CBMAI 1237 a enantiosseletividade para o par de diastereoisômero *cis*-**4a** foi *ee* = 54% (pico 2) e para o

diastereoisômero *trans*-**4a** foi $ee = 24\%$ (pico 1) (Figura 40). Já no experimento **B** a enantiosseletividade para o par de diastereoisômero *cis*-**4a** foi de $ee = 49\%$ (pico 2) e para o diastereoisômero *trans*-**4a** foi de $ee = 24\%$ (pico 1). Apesar de ter apresentado diastereosseletividade mais baixa, o experimento **B** apresentou conversão de **3a** ($c = 90\%$) um pouco superior quando comparado com o experimento **A**, **3a** (87%). O flavanol **4a** foi então isolado a partir do experimento **B** como uma mistura de diastereoisômeros com 83% de rendimento.

Figura 40- Cromatogramas da biotransformação de **3a** por *Cladosporium* sp. CBMAI 1237 obtido por CLAE-UV com coluna quiral após 7 dias de incubação.

Condições de análise: CLAE-UV com coluna quiral Phenomenex Lux® (0,46 cm x 25 cm; 5 μ m), gradiente de eluição isocrático hexano e isopropanol (95:5), com fluxo de 0,5 mL min⁻¹, tempo de análise de 60 min. Cromatogramas obtidos no comprimento de onda de 215 nm. Tempos de retenção: (*S*)-**3a** ($t_r = 16,5$ min), (*R*)-**3a** ($t_r = 19,8$ min), *trans*-**4a** ($t_r = 26,2$ min e 31,8 min), *cis*-**4a** ($t_r = 35,1$ min e 42,4 min). S = resíduo dos solventes acetato de etila ($t_r = 7,0$ min) e isopropanol ($t_r = 3,8$ min). NI = não identificado.

Nas reações com os fungos *Fusarium* sp. CBMAI 1830, *Aspergillus* sp. CBMAI 1829, *A. sydowii* CBMAI 934, *P. citrinum* CBMAI 1186, *M. racemosus* CBMAI 847 e *A. sclerotiorum* CBMAI 849 também houve formação de flavan-4-ol **4a**, no entanto, com baixa conversão.

Apesar das baixas conversões, as reações com os fungos *P. citrinum* CBMAI 1186 e *M. racemosus* CBMAI 847 apresentaram uma característica interessante, pois, diferentemente das demais reações, a formação da forma *trans* do flavan-4-ol **4a** foi favorecida tanto nas condições no experimento **A** quanto no experimento **B**. A razão diastereoisomérica obtida nas reações com *M. racemosus* CBMAI 847 foram de 22:78 e 29:71 (*cis:trans*) nos experimentos **A** e **B**, respectivamente (Figura 41). Contudo, os ee_s do diastereoisômero *trans*-**4a** foram baixos para ambos os experimentos **A** e **B** com 27% e 3% (pico1), respectivamente. Como as conversões foram baixas (8-10%) não foi possível determinar o ee do diastereoisômero *cis*-**4a**.

Para as reações com o fungo *P. citrinum* CBMAI 1186 as razões diastereoisoméricas foram de 26:74 (*cis:trans*) no experimento **A** e 33:67 (*cis:trans*) no experimento **B**, apresentando *ee* = 33% (pico 1) no experimento **A** e *ee* = 19% (pico 2) no experimento **B** no diastereoisômero *trans*-**4a**.

Figura 41 - Cromatogramas obtidos por CLAE-UV com coluna quiral da biotransformação de **3a** por *M. racemosus* CBMAI 847 após 7 dias de incubação.

Condições de análise: CLAE-UV com coluna quiral Phenomenex Lux[®] (0,46 cm x 25 cm; 5 μ m), gradiente de eluição isocrático hexano e isopropanol (95:5), com fluxo de 0,5 mL min⁻¹, tempo de análise de 60 min. Cromatogramas obtidos no comprimento de onda de 215 nm. Tempos de retenção: (*S*)-**3a** (t_r = 16,5 min), (*R*)-**3a** (t_r = 19,8 min), *trans*-**4a** (t_r = 26,2 min e 31,8 min), *cis*-**4a** (t_r = 35,1 min e 42,4 min). S = resíduo dos solventes acetato de etila (t_r = 7,0 min) e isopropanol (t_r = 3,8 min). NI = não identificado.

A biotransformação da flavanona **3a** foi relatada na literatura por Janeczko et al. (2014) que descreveram a biorredução por leveduras dos gêneros *Rhodotorula*, *Candida* e *Saccharomyces* para formação do flavan-4-ol **4a**. Os autores observaram que na maioria dos casos, a biorredução do enantiômero *R* da flavanona foi favorecida. Porém, as leveduras do gênero *Rhodotorula* foram mais seletivas para a formação dos enantiômeros *trans*-**4a** com altos excessos enantioméricos (>99%) para o *trans*-(2*R*,4*S*)-flavan-4-ol **4a**, enquanto os enantiômeros *cis*-**4a** apresentaram seletividade para o *cis*-(2*S*,4*S*)-flavan-4-ol **4a**.

Nos trabalhos reportados na literatura, as reações promovidas pelos fungos do gênero *Aspergillus* foram em geral seletivas para a formação dos enantiômeros *cis* dos flavanóis. Nos estudos de Kostrzewa-Susłow e Janeczko (2012) o fungo de ambiente terrestre *Aspergillus niger* KB reduziu a carbonila da 7-metoxiflavanona racêmica e levou a formação do ($\pm$)-2,4-*cis*-7-metoxiflavan-4-ol, sendo assim seletiva para a formação de apenas um dos pares de diastereoisômeros possíveis. O fungo *A. niger* KB também promoveu a biotransformação da flavanona e da 6-hidroxiflavanona para obtenção do ($\pm$)-*cis*-flavan-4-ol e do ($\pm$)-2,4-*cis*-6-

hidroxiflavan-4-ol, respectivamente. E, as linhagens dos fungos *A. niger* 13/5 e *A. niger* SBP além de reduzir a flavanona ao flavan-4-ol, hidroxilou a posição C7 do flavan-4-ol para formar o 7-hidroxiflavan-ol (KOSTRZEWA-SUSŁOW et al., 2006).

A bavachinina, um flavonoide que pode ser encontrado em espécies do gênero *Psoralea* (*P. corylifolia*, *P. corylifolia*s) é utilizado no tratamento de asma e diarreia, foi submetido à biotransformação pelo fungo de ambiente terrestre *P. raistrickii* ATCC 10490 resultando em uma alta seletividade para a produção do (2*S*,4*R*)-2-(4-hidroxifenil)-7-metoxi-6-(3-metilbut-2-en-1-il)cromen-4-ol com 73% de rendimento (LUO et al., 2014).

As álcool desidrogenases (ADH) são as enzimas empregadas em reações de redução de aldeídos e cetonas para a obtenção de álcoois enantiomericamente puros ou enriquecidos (Figura 42). As enzimas ADHs são dependentes de cofatores, tais como, NAD^+ ou NADP^+ , que na sua forma reduzida (NAD(P)H) possuem íons hidreto que podem ser transferidos para outras moléculas, mas essas coenzimas são muito caras e por isso devem ser acompanhadas de um sistema de reciclagem utilizando um co-substrato barato e de fácil acesso, por exemplo, o 2-pronanol.

Figura 42 – Sistema de reação de redução catalisada por desidrogenases e reciclagem de cofator.

Em reações enzimáticas utilizando células inteiras de microrganismos como neste trabalho, a adição de cofatores e/ou co-substratos não é necessária, pois os fungos produzem uma variedade de enzimas que são capazes de aceitar substratos naturais e não naturais, além de todos os cofatores e as vias metabólicas necessárias para sua regeneração. Como múltiplas enzimas desidrogenases podem ser produzidas pelo organismo vivo, cada uma delas pode apresentar diferentes especificidades para os enantiômeros do substrato. Nas reações de biotransformação de **3a** foram formados tanto os isômeros *cis*-**4a** quanto os *trans*-**4a**, dessa forma, não se pode estabelecer que uma única oxidoredutase foi responsável pela transformação do substrato.

Com o objetivo de avaliar o decorrer da reação e a tendência de formação dos produtos foi realizado o acompanhamento da reação de biotransformação de **3a** pelo fungo *Acremonium* sp. CBMAI 1676 empregando as condições do experimento **A** por um período de 1, 3, 6, 7 e 14 dias de incubação. A partir desses experimentos foi observado que o flavanol **4a** foi formado à medida que a flavanona **4a** foi sendo consumida (Tabela 13).

Tabela 13 - Acompanhamento da biorredução da flavanona **3a** promovida pelo fungo *Acremonium* sp. CBMAI 1676 de 1 a 14 dias.

Tempo (dias)	3a		4a	<i>ee</i> (%) de 4a	
	<i>c</i> (%) remanescente	<i>ee</i> (%)	<i>rd</i> (<i>cis:trans</i>)	<i>cis</i>	<i>trans</i>
1	86	4 (<i>R</i>)	95:5	>99	-
3	80	13 (<i>R</i>)	95:5	99	>99
5	70	17 (<i>R</i>)	95:5	90	>99
7	64	26 (<i>R</i>)	94:5	>99	>99
14	53	27 (<i>R</i>)	85:16	96	93

Condições reacionais: ^aCélulas úmidas dos fungos (1,0 g) e flavanona **3a** (10 mg/200 μ L de DMSO) em caldo enzimático (20 mL) incubado em agitador orbital (7 dias, 130 rpm, 32 °C).

c = concentração de **3a** remanescente determinada por curva analítica em CLAE-UV.

ee = excesso enantiomérico determinado por CLAE-UV.

rd = razão diastereoisomérica determinada por CLAE-UV.

Através do acompanhamento da reação de biotransformação de **3a** pelo fungo *Acremonium* sp. CBMAI 1676 foi possível observar a formação de **4a** já nas primeiras 24 h de reação com razão diastereoisomérica de 95:5 (*cis:trans*). Com o passar do tempo ocorreu um aumento na biotransformação de **3a** em **4a**, passando de 14% em 1 dia de incubação para 36% em 7 dias de incubação e a diastereosseletividade se manteve alta durante este período. Com 14 dias de incubação foi observado que a conversão de **3a** em **4a** continuou aumentando (53%), porém houve uma diminuição na razão diastereoisomérica do **4a** formado em 85:16 (*cis:trans*), bem como na enantioseletividade dos isômeros *cis* (96%) e *trans* (93%). Como pode ser observado na Tabela 13, houve um aumento no excesso enantiomérico para a (*R*)-**3a** com o passar dos dias de incubação, indicando que a biotransformação do (*S*)-**3a** foi favorecida nestas condições.

Apesar do aumento progressivo na conversão da flavanona **3a** nas reações com o fungo *Acremonium* sp. CBMAI 1676, foi observado que a conversão de **3a** em **4a** ocorreu lentamente e com perda de seletividade com o passar do tempo. Dessa forma, optou-se por realizar a biotransformação das flavanonas **3b-g** pelo fungo *Acremonium* sp. CBMAI 1676 na condição do experimento A com 7 dias de incubação. O fungo *Cladosporium* sp. CBMAI 1237 também foi escolhido para ser empregado na biotransformação das flavanonas **3a-g**, pois apresentou maiores rendimentos na formação dos isômeros *cis*-**4a** e *trans*-**4a**.

As medidas de rotação óptica para as flavanonas **3a-g** e dos flavan-4-óis **4a-g** obtidos a partir das reações com os fungos *Acremonium* sp. CBMAI 1676 e *Cladosporium* sp. CBMAI 1237 estão apresentadas na Seção 4.9, Tabela 16.

Assim, as flavanonas racêmicas **3b-g** foram submetidas à biotransformação com os fungos *Acremonium* sp. CBMAI 1676 e *Cladosporium* sp. CBMAI 1237 para a formação dos respectivos flavan-4-óis **4b-g** (Figura 43). Os flavan-4-óis **4a-g** formados nas reações com o fungo *Cladosporium* sp. CBMAI 1237 foram obtidos em bons rendimentos isolados (67-87%), e os obtidos das reações com *Acremonium* sp. CBMAI 1676 apresentam rendimentos isolados inferiores (15-46%).

Figura 43 - Cromatogramas obtidos por CLAE-UV das reações de biotransformação de **3b-g** pelo fungo *Cladosporium* sp. CBMAI 1237.

Condições de análise: CLAE-UV com coluna Phenomenex C18 (0,46 cm x 25 cm; 5 μ m), modo de eluição gradiente metanol e água (70:30), com fluxo de 0,7 mL min⁻¹, tempo de análise de 25 min. Cromatogramas obtidos no comprimento de onda de 275 nm. Tempos de retenção: **3b** (t_r = 13,7 min), *cis*-**4b** (t_r = 9,7 min), *trans*-**4b** (t_r = 10,6 min), *cis*-**4c** (t_r = 11,8 min), *trans*-**4c** (t_r = 13,6 min), **3d** (t_r = 14,9 min), *cis*-**4d** (t_r = 11,2 min), *trans*-**4d** (t_r = 12,8 min), **4e** (t_r = 16,3 min), *cis*-**4e** (t_r = 12,5 min), *trans*-**4e** (t_r = 14,4 min), **3f** (t_r = 16,2 min), *cis*-**4f** (t_r = 12,6 min), *trans*-**4f** (t_r = 14,8 min), **3g** (t_r = 14,9 min), *cis*-**4g** (t_r = 11,6 min), *trans*-**4g** (t_r = 13,3 min).

Como pode ser observado na Tabela 14, as razões diastereoisoméricas foram baixas nas reações com o fungo *Cladosporium* sp. CBMAI 1237, mas foi possível observar que os compostos com substituintes menos volumosos **3a** (-H), **3c** e **3d** (-F) e **3g** (-Cl) apresentaram alguma predominância para formação dos isômeros *trans*, enquanto as flavanonas com substituintes mais volumosos **3b** (-OCH₃), **3e** e **3f** (-Br) favoreceram a formação dos isômeros *cis*. Essas observações já foram notadas em experimentos com células integras de leveduras, em que os diastereoisômeros *cis* foram predominantes em substratos com substituintes menos volumosos, mas a diastereosseletividade oposta foi observada quando substituintes mais volumosos foram testados (FABER, 2011).

Tabela 14 - Biorreduções das flavanonas **3b-e** promovidas pelos fungos *Cladosporium* sp. CBMAI 1237 e *Acremonium* sp. CBMAI 1676 após 7 dias de incubação.

3b e 4b ($R_1 = H$; $R_2 = OCH_3$)
3c e 4c ($R_1 = F$; $R_2 = H$)
3d e 4d ($R_1 = H$; $R_2 = F$)
3e e 4e ($R_1 = Br$; $R_2 = H$)
3f e 4f ($R_1 = H$; $R_2 = Br$)
3g e 4g ($R_1 = Cl$; $R_2 = H$)

Produto	Rendimento isolado (%)	rd (cis:trans)	ee (%)	
			cis	trans
Cladosporium sp. CBMAI 1237 ^a				
4a	83	44:56	49 (pico 2)	24
4b	87	61:39	-	-
4c	65	35:65	64 (pico 2)	30 (pico 2)
4d	82	42:58	-	-
4e	67	52:48	4	3
4f	77	64:36	22 (pico 2)	29 (pico 2)
4g	72	45:55	4	2
Acremonium sp. CBMAI 1676 ^b				
4a	31	85:15	96 (pico 2)	>99
4b	46	96:4	94 (pico 2)	>99
4c	44	66:34	77 (pico 2)	>99
4d	29	76:24	-	-
4e	15	81:19	97 (pico 2)	95
4f	19	54:46	95 (pico 2)	>99
4g	25	75:25	93 (pico 2)	97

Condições reacionais: ^aCélulas úmidas dos fungos (5 g) e flavanonas **3b-g** (50 mg/800 μ L de DMSO) em tampão fosfato (Na_2HPO_4/KH_2PO_4 0,07 M, 100 mL, pH 7) incubado em agitador orbital (7 dias, 130 rpm, 32 °C);

^bCélulas úmidas dos fungos (5 g) e flavanonas **3b-g** (50 mg/800 μ L de DMSO) em caldo de cultivo (100 mL) incubado em agitador orbital (7 dias, 130 rpm, 32 °C).

ee = excesso enantiomérico determinado por CLAE-UV quiral.

rd = razão diastereoisomérica determinada por CLAE-UV.

Dentre os flavanóis obtidos nas reações de biotransformação promovidas pelo fungo *Cladosporium* sp. CBMAI 1237, o flavanol **4c** foi o que apresentou maior seletividade com razão diastereoisomérica de 35:65 (*cis:trans*) e excesso enantiomérico de 64% para o *cis*-(2*S**,4*S**)-**4c** e ee 30% para o *trans*-(2*R**,4*S**)-**4c** (Figura 44). Já as reações com a flavanona **3c** utilizando o fungo *Acremonium* sp. CBMAI 1676 apresentou razão diastereoisomérica oposta para o flavan-4-ol **4c** 66:34 (*cis:trans*) quando comparada àquela obtida com o fungo *Cladosporium* sp. CBMAI 1237, apresentando ee de 77% para o *cis*-(2*S**,4*S**)-**4c** e ee >99% para o *trans*-(2*R**,4*S**)-**4c**.

Figura 44 - Cromatogramas obtidos por CLAE-UV com coluna quiral de **4c** isolado da reação de biotransformação promovida pelo fungo *Cladosporium* sp. CBMAI 1237 e *Acremonium* sp. CBMAI 1676 após 7 dias de incubação.

Condições de análise: CLAE-UV com coluna quiral Chiralcel ODH (0,46 cm x 25 cm; 5 μm), gradiente de eluição isocrático hexano e isopropanol (97:3), com fluxo de 0,7 mL min⁻¹, tempo de análise de 60 min. Cromatogramas obtidos no comprimento de onda de 275 nm. Tempos de retenção: *trans*-**4c** (t_r = 26,9 min e 28,8 min), *cis*-**4c** (t_r = 38,2 min e 46,8 min).

A reação de biotransformação da flavanona **3e** com o fungo *Acremonium* sp. CBMAI 1676 apresentou maior seletividade do que a reação com a linhagem de *Cladosporium* sp. CBMAI 1237. O flavanol **4e** foi isolado da reação com *Acremonium* sp. CBMAI 1676 como uma mistura dos diastereoisômeros com 15% de rendimento e razão diastereoisomérica de 81:19 (*cis*:*trans*) (Figura 45).

Figura 45 - Cromatogramas obtidos por CLAE-UV com coluna quiral de **4e** isolados das reações de biotransformação promovidas pelos fungos *Cladosporium* sp. CBMAI 1237 e *Acremonium* sp. CBMAI 1676.

Condições de análise: CLAE-UV com coluna quiral Chiralcel ODH (0,46 cm x 25 cm; 5 μm), gradiente de eluição isocrático hexano e isopropanol (97:3), com fluxo de 0,7 mL min⁻¹, tempo de análise de 60 min. Cromatogramas obtidos no comprimento de onda de 276 nm. Tempos de retenção: *trans*-**4e** (t_r = 28,5 min e 32,0 min), *cis*-**4e** (t_r = 47,6 min e 55,6 min).

Os enantiômeros *trans*-(2*R**,4*S**)-4e e *cis*-(2*S**,4*S**)-4e foram formados com *ee* de 97% e 95%, respectivamente, destacando que as enzimas do fungo *Acremonium* sp. CBMAI 1676 apresentaram seletividade para a transferência do íon hidreto pela face *Si* da flavanona 3e. O flavanol 4e foi obtido da reação com *Acremonium* sp. CBMAI 1676 com 67% de rendimento e razão diastereoisomérica de 52:48 (*cis:trans*), porém com baixos excessos enantioméricos (<4%).

A biorredução da flavanona 3f pelo fungo *Cladosporium* sp. CBMAI 1237 seguiu o mesmo comportamento observado nas demais reações de biotransformação promovidas por esse fungo. O flavan-4-ol 4f foi obtido como uma mistura dos diastereoisômeros com rendimento de 77%, apresentando razão diastereoisomérica de 64:36 (*cis:trans*) e excessos enantioméricos de 22% (pico 2) para o diastereoisômero *cis*-4f e 29% (pico 2) para o diastereoisômero *trans*-4f. Já nas reações empregando o fungo *Acremonium* sp. CBMAI 1676 foi observado uma menor seletividade na formação dos diastereoisômeros quando comparado com os demais flavan-4-óis (Tabela 14), obtendo-se razão diastereoisomérica de 54:46 (*cis:trans*) com 19% de rendimento isolado. No entanto, a seletividade enantiomérica não foi afetada, pois o flavan-4-ol 4f foi obtido com *ee* > 99% (pico 2) para o diastereoisômero *cis*-(2*S**,4*S**)-4f e *ee* = 95% para o diastereoisômero *trans*-(2*R**,4*S**)-4f (Figura 46).

Figura 46 - Cromatogramas obtidos por CLAE-UV com coluna quiral do flavan-4-ol 4f isolados das reações de biotransformação promovidas pelos fungos *Cladosporium* sp. CBMAI 1237 e *Acremonium* sp. CBMAI 1676.

Condições de análise: CLAE-UV com coluna quiral Chiralcel ODH (0,46 cm x 25 cm; 5 μ m), gradiente de eluição isocrático hexano e isopropanol (97:3), com fluxo de 0,7 mL min⁻¹, tempo de análise de 60 min. Cromatogramas obtidos no comprimento de onda de 276 nm. Tempos de retenção: *trans*-4f (*t_r* = 27,2 min e 33,3 min), *cis*-4f (*t_r* = 36,7 min e 49,4 min).

Os flavanóis obtidos a partir das reações com o fungo *Cladosporium* sp. CBMAI 1237 foram isolados como uma mistura dos dois diastereoisômeros *cis*-**4g** e *trans*-**4g** com bom rendimento 72%. No entanto, os flavanóis **4g** apresentaram baixas diastereosseletividades 45:55 (*cis:trans*) e enantioseletividades (2 e 4%).

Já a reação de biotransformação de **3g** promovida pelo fungo *Acremonium* sp. CBMAI 1676 apresentou rendimento isolado mais baixo para o **4g** (25%) quando comparado com o obtido com o fungo *Cladosporium* sp. CBMAI 1237, porém a seletividade da reação foi mais significativa tanto para a diastereosseletividade quanto para a enantioseletividade. O flavan-4-ol **4g** obtido das reações com *Acremonium* sp. CBMAI 1676 foi isolado como uma mistura dos diastereoisômeros *cis* e *trans* (75:25) e com altos excessos enantioméricos para o *trans*-(2*R**,4*S**)-**4g** (*ee* = 97%) e para o *cis*-(2*S**,4*S**)-**4g** (*ee* = 93%) (Figura 47).

Figura 47 - Cromatogramas obtidos por CLAE-UV com coluna quiral de **4g** isolados das reações de biotransformação promovidas pelos fungos *Cladosporium* sp. CBMAI 1237 e *Acremonium* sp. CBMAI 1676 após 7 dias de incubação.

Condições de análise: CLAE-UV com coluna quiral Chiralcel ODH (0,46 cm x 25 cm; 5 μ m), gradiente de eluição isocrático hexano e isopropanol (97:3), com fluxo de 0,7 mL min⁻¹, tempo de análise de 60 min. Cromatogramas obtidos no comprimento de onda de 276 nm. Tempos de retenção: *trans*-**4g** (*t_r* = 26,6 min e 28,7 min), *cis*-**4g** (*t_r* = 40,8 min e 45,3 min).

De modo geral, as reações de biotransformação das flavanonas **1a-g** pelo o fungo derivado de ambiente *Cladosporium* sp. CBMAI 1237 resultaram em boas conversões dos substratos em seus respectivos flavan-4-óis **4a-g** com diferentes diastereosseletividades e enantioseletividades. A baixa seletividade pode ser decorrente da presença de diferentes enzimas produzidas pelos fungos capazes de realizar o mesmo tipo de reação, assim, os flavan-4-óis **4a-g** não foram formados necessariamente por uma única álcool desidrogenase. Isso acaba sendo uma das desvantagens da utilização de células íntegras de microrganismos,

pois a ação de mais de uma enzima pode estar relacionada a um mesmo tipo de transformação. Assim, o fungo *Clasdosporium* sp. CBMAI 1237 demonstrou ser uma fonte de enzimas ADHs.

Já as reações de biotransformação promovidas pelo fungo *Acremonium* sp. CBMAI 1676 foram as mais seletivas ao formar majoritariamente um enantiômero para cada diastereoisômero das flavanonas. Foi observado ainda que a presença de substituintes nos substratos não alterou a seletividade das enzimas ADHs presentes no fungo. Diante de nossos conhecimentos este é o primeiro relato do estudo da biorredução de derivados sintéticos de flavanonas halogenadas promovidas por fungos derivados de ambiente marinho.

4.4. Hidroxilação de derivados de flavonoides 1a-4a empregando o fungo *A. sydowii* CBMAI 935

O fungo derivado de ambiente marinho *A. sydowii* CBMAI 935 se destacou na triagem de fungos promissores em catalisar reações com a 2'-hidroxichalcona **1a** e a flavanona **3a** utilizadas neste trabalho. O complexo enzimático do fungo *A. sydowii* CBMAI 935 promoveu a redução da ligação C=C α,β -insaturada e a hidroxilação da posição *para* do anel B da 2'-hidroxichalcona **1a**, formando como produtos a 2'-hidroxi-diidrochalcona **2a** e a 2',4-diidroxi-diidrochalcona **5a**, respectivamente. Com o objetivo de entender o escopo da sequência reacional de hidroxilação de derivados de flavonoides o fungo *A. sydowii* CBMAI 935 foi utilizado nas reações de biotransformação da 2'-hidroxi-diidrochalcona **2a**, flavanona **3a** e flavan-4-ol **4a** (Figura 48).

Os experimentos foram realizados com a condição que apresentou o melhor percentual de conversão na triagem dos fungos apresentada na Seção 4.1 (tampão fosfato pH 8, 7 dias, 130 rpm, 32 °C). A formação dos compostos foi acompanhada diariamente através da extração total das reações e seguida de análises por CG/EM e CLAE-UV. As reações de biotransformação foram realizadas com 8, 24, 48, 72, 96, 120, 144 e 168 h de incubação.

Figura 48 - Cromatogramas obtidos por CG/EM das reações de **1a-4a** com o fungo *A. sydowii* CBMAI 935. A) Biotransformação da 2'-hidroxichalcona **1a**. B) Biotransformação de **2a**. C) Biotransformação de **3a**. D) Biotransformação de **4a**.

Condições de análise: Coluna DB-5: 90 °C durante 4 min, 10 °C min⁻¹ até 280 °C e mantida por 5 min, 10 °C min⁻¹ até 300 °C e mantida por 10 min. O tempo total de análise foi 40 min. Tempos de retenção: **2a** (t_r = 18,5 min), flavanona **3a** (t_r = 18,8 min), flavan-4-ol **4a** (t_r = 19,3 min) e **5a** (t_r = 21,5 min).

A partir da reação de biotransformação de **2a** com o fungo *A. sydowii* CBMAI 935 foi observado que em 8 h de incubação a formação da 2',4-diidroxi-diidrochalcona **5a** (9%) já havia sido iniciada. Com 24 h de incubação, 48% de **2a** havia sido consumido enquanto 30% de **5a** foi formado. A partir da Figura 49 pode se notar que até 48 h de incubação a concentração de **5a** foi aumentando à medida que **2a** foi sendo consumida. Após 72 h de incubação observou-se uma queda na concentração de **5a** (31%), porém, o substrato **2a** (79%) continuou sendo consumido. Ao final do período de incubação (168 h) foi observado que 94%

de **2a** foi consumido e apenas 14% de **5a** foi obtido, indicando que tanto o substrato quanto o produto das reações de biotransformação poderiam estar sendo biotransformados ou biodegradados pelo fungo.

Figura 49 - Biotransformação da 2'-hidroxi-diidrochalcona **2a** pelo fungo *A. sydowii* CBMAI 935 para a formação da 2',4-diidroxi-diidrochalcona **5a**.

Como mencionado anteriormente na Seção 4.3, a reação de biotransformação da flavanona **3a** promovida pelo fungo *A. sydowii* CBMAI apresentou a formação da 2'-hidroxi-diidrochalcona **2a** e a 2',4-diidroxi-diidrochalcona **5a** (Figura 50).

Figura 50 – Reação de biotransformação da flavanona **3a** pelo fungo *A. sydowii* CBMAI 935 para a formação de **2a** e **5a** em diferentes tempos reacionais.

Após 8 h de incubação da flavanona **3a** com o fungo *A. sydowii* CBMAI 935 em tampão fosfato pH 8 foi observado apenas a formação da 2'-hidroxi-diidrochalcona **2a** (4%). Embora a presença da chalcona **1a** não foi observada em 8 h de reação, a abertura do anel C da flavanona **3a** provavelmente ocorreu com a formação da chalcona **1a** como intermediário que, em seguida sofreu redução da ligação dupla C-C para a obtenção da 2'-hidroxi-diidrochalcona **2a** (Figura 51). A redução da 2'-hidroxichalcona **1a** pelo fungo *A. sydowii* CBMAI 935 já foi relatada anteriormente na Seção 4.1, o que corrobora com a hipótese de que ocorreu a formação da 2'-hidroxichalcona **1a**.

Figura 51 – Sequência provável de reação para a abertura do anel C da flavanona **3a** para formação da 2'-hidroxi-diidrochalcona **2a** pelo fungo *A. sydowii* CBMAI 935.

Em 24 h de reação foi possível observar a formação de dois novos compostos que foram identificados como a 2',4-diidroxi-diidrochalcona **5a** (20%) e a 4'-hidroxiflavanona **6a**. A formação destes compostos a partir da flavanona **3a** já foi discutida por Kostrzewa-Susłow et al. (2008) que estudaram a biotransformação da flavanona **3a** pelo fungo de ambiente terrestre *Penicillium chermesinum*. Os autores observaram a formação dos mesmos produtos de hidroxilação, a 4'-hidroxiflavanona (11,8%) e a 2',4-diidroxi-diidrochalcona **5a** (36,5%)

em 9 dias de incubação. Através do monitoramento da reação, Kostrzewa-Susłow et al. (2008) sugeriram que primeiro ocorreu a hidroxilação do anel B para depois ocorrer a clivagem do anel C da flavanona **3a**.

Em contrapartida, em nosso presente estudo, além da 4'-hidroxiflavanona e da 2',4-diidroxi-diidrochalcona **5a** foi observado a formação da 2'-hidroxi-diidrochalcona **2a**, que também pode ser convertida em **5a**. Porém, com 48 h de incubação não foi mais possível detectar a formação da 4'-hidroxiflavanona **6a**, mas foi observado que a medida que a flavanona **3a** foi sendo consumida houve um aumento na formação da 2',4-diidroxi-diidrochalcona **5a** e uma diminuição da formação da 2'-hidroxi-diidrochalcona **2a** (Esquema 19). Assim, os resultados sugerem que tanto a 4'-hidroxiflavanona **6a** quanto a 2'-hidroxi-diidrochalcona **2a** podem ter sido biotransformadas na 2',4-diidroxi-diidrochalcona **5a**.

Esquema 19 - Biotransformação da flavanona **3a** pelo fungo *A. sydowii* CBMAI 935 após 8, 24 e 48 h de incubação.

A partir de 72 h de incubação foi observado apenas 7% da flavanona **3a** que não reagiu, além disso, houve um decréscimo na concentração dos produtos **2a** e **5a** (Tabela 15). O decréscimo na concentração do substrato e dos produtos foi observado até 144 h de reação, onde apenas 2% de **3a** e 2% de **2a** ainda não tinham sido consumidos, restando 22% de **5a** após 144 h de incubação, indicando uma possível biodegradação ou biotransformação desses compostos.

A partir dos cromatogramas obtidos por CG/EM foi observado o surgimento de um pico em 4,54 min que foi posteriormente identificado como o fenol, que é um dos possíveis produtos de degradação da flavanona (Figura 52). A biodegradação de derivados da flavanona também foi relatada por Kostrzewa-Susłow et al. (2008) ao monitorar a reação da flavanona com o fungo *A. niger* e *P. chermesinum* por 10 dias, resultando na completa degradação do substrato e produtos.

Figura 52 - Reação de biotransformação da flavanona **3a** pelo fungo *A. sydowii* CBMAI 935 após 72 h de incubação. A) Cromatograma obtido por CG/EM da reação de 72 h com surgimento do fenol. B) Espectro de massas (IE, 70 eV) do fenol.

Condições de análise: Coluna DB-5: 90 °C durante 4 min, 10 °C min⁻¹ até 280 °C e mantida por 5 min, 10 °C min⁻¹ até 300 °C e mantida por 10 min. O tempo total de análise foi 40 min. Tempos de retenção: fenol (t_r = 4,5 min), **2a** (t_r = 18,5 min), flavanona **3a** (t_r = 18,8 min), **5a** (t_r = 21,5 min).

A flavanona **3a** possui um centro estereogênico em sua estrutura e as reações empregando o fungo *A. sydowii* CBMAI 935 mostrou que as enzimas foram seletivas na biotransformação de um dos enantiômeros de **3a** para a formação dos produtos. Assim, os produtos de biotransformação foram formados mediante resolução cinética da flavanona **3a**, onde o consumo do enantiômero *S* da flavanona **3a** pelo fungo *A. sydowii* CBMAI 935 foi favorecido nas condições reacionais empregadas (Tabela 15). Foi observado que o excesso enantiomérico para a (*R*)-**3a** aumentou com o tempo de até 72 h de incubação, passando de *ee* = 10% em 8 h para *ee* = 85% em 72 h de reação.

Tabela 15 – Monitoramento da biotransformação da flavanona **3a** pelo fungo *A. sydowii* CBMAI 935.

Tempo de incubação (h)	Produtos de biotransformação (%) ^a		3a remanescente	
	2a	5a	(%) ^a	ee (%) ^b
8	4	1	78	10 (R)
24	15	20	28	54 (R)
48	11	36	12	73 (R)
72	9	30	7	85 (R)
96	8	27	5	16 (R)
120	3	18	2	53 (R)
144	2	15	2	47 (R)
168	4	22	2	27 (R)

Condições reacionais: Células úmidas dos fungos (1,0 g) e a flavanona **3a** (10 mg/200 µL DMSO) em tampão fosfato (Na₂HPO₄/KH₂PO₄ 0,07 M, 20 mL, pH 8) incubado em agitador orbital (7 dias, 130 rpm, 32 °C).

^aConcentração determinada por curva analítica em CLAE-UV.

^bExcesso enantiomérico determinado por CLAE-UV com coluna quiral.

A partir de 72-168 h de reação, à medida que a flavanona **3a** foi sendo consumida houve um decréscimo no valor do excesso enantiomérico de **3a** remanescente (Figura 53). O decréscimo do excesso enantiomérico com o passar do tempo reacional pode ser resultado do consumo do enantiômeros e da biodegradação e/ou biotransformação dos compostos.

Figura 53 - Cromatogramas obtidos por CLAE-UV com coluna quiral do monitoramento da biotransformação de **3a** por *A. sydowii* CBMAI 935.

Condições de análise: cromatogramas obtidos por CLAE-UV quiral (coluna Lux[®] Phenomenex, hexano/isopropanol 9,5:0,5, 0,5 mL min⁻¹, 60 min); Tempos de retenção: **2a** (t_r = 14,7 min), (*S*)-**3a** (t_r = 16,2 min), (*R*)-**3a** (t_r = 20,2 min), **5a** (t_r = 43,3 min).

A reação com a flavanona **3a** foi realizada em maior escala para o isolamento dos compostos. Para as reações foram preparados quatro frascos Erlemmeyer de 250 mL contendo em cada frasco 5 g das células úmidas do fungo *A. sydowii* CBMAI 935 e 100 mL de tampão fosfato pH 8. Em seguida, a cada frasco Erlenmeyer foram adicionados 50 mg de **3a** dissolvida em 400 µL de DMSO. Após 72 h de incubação a reação foi finalizada por meio da extração com solvente orgânico. Os compostos foram então purificados por CC, onde foram obtidos 31% de **2a** (62,8 mg), 28% de **5a** (55,8 mg) e 21% de **3a** (42,7 mg) que não reagiu com *ee* de 91% para a (*R*)-**3a**.

A configuração absoluta para a flavanona (*R*)-**3a** obtida da reação com o fungo *A. sydowii* CBMAI 935 foi determinada pela comparação da medida da rotação óptica de **3a** $[\alpha]_D^{23} = +62,3$ (*c* 1,00, CHCl₃, *ee* 91%) com a rotação descrita na literatura $[\alpha]_D^{20} = +54,8$ (*c* 0,80, CHCl₃, *ee* 85%) (JANECZKO et al., 2014).

Em todos os casos a hidroxilação ocorreu na posição C-4 do anel B dos derivados de flavonoides. De modo geral, microrganismos tendem a hidroxilar flavanonas nas posições C-5, 6 e 4 (CAO et al., 2015). Ibrahim e Abul-Hajj (1990) descreveram a biotransformação de flavona, isoflavona e flavanona onde postularam um modelo para a interação de flavonoides no sítio ativo de enzimas hidroxilases. Os autores sugeriram que os átomos de oxigênio do anel C estavam ligados em posições hidrofílicas da enzima, orientando o anel B para o sítio hidroxilante da enzima. No entanto, a falta de enantiosseletividade observada nestes estudos sugere que ocorreu uma mudança conformacional no anel C não planar da flavanona, de modo que a posição 4' dos dois estereoisômeros seja igualmente acessível ao sítio hidroxilante da enzima. Nesse sentido, o sítio ativo das enzimas hidroxilases presentes no fungo *A. sydowii* CBMAI 935 apresentou maior seletividade para a hidroxilação do enantiômero *S* da flavanona **3a**.

Com o objetivo de avaliar a influência que as estruturas dos derivados de flavonoides nas reações de hidroxilação, o flavan-4-ol **4a** também foi submetido à reação de biotransformação empregando o fungo de ambiente marinho *A. sydowii* CBMAI 935, porém não foi observado a formação de nenhum produto (Figura 54). A baixa reatividade do flavan-4-ol **4a** provavelmente está relacionada com a presença do grupo hidroxila na posição C2 do anel C, levando a inferir que a presença da carbonila na flavanona **3a**, 2'-hidroxichalcona **1a** e 2'-hidroxi-diidrochalcona **2a** teve papel importante para que a hidroxilação ocorresse.

Figura 54 - Cromatograma obtido por CG/EM do monitoramento da reação de biotransformação do flavan-4-ol **4a** pelo fungo *A. sydowii* CBMAI 935 de 24 - 168 h.

Condições de análise: Coluna DB-5: 90 °C durante 4 min, 10 °C min⁻¹ até 280 °C e mantida por 5 min, 10 °C min⁻¹ até 300 °C e mantida por 10 min. O tempo total de análise foi 40 min. Tempos de retenção: *trans*-(±)-**4a** (t_r = 18,9 min), *cis*-(±)-**4a** (t_r = 19,3 min).

A presença de grupos hidroxila na estrutura dos flavonoides, especialmente no anel B, aumentaram significativamente o potencial antioxidante dos compostos (CAO et al., 2015). Diante disso, Kostrzewa-Susłow et al. (2010) avaliaram a atividade antioxidante dos substratos e dos produtos de biotransformação, tais como, 2'-hidroxi-diidrochalcona e 2',4-diidroxi diidrochalcona, e concluíram que os produtos da biotransformação apresentaram maior atividade antioxidante do que o substrato. Dessa, forma o estudo da hidroxilação de derivados de flavonoides pode contribuir para o desenvolvimento de novos métodos de obtenção de flavonoides hidroxilados com propriedades farmacológicas.

A partir das reações de biotransformação empregando o fungo *A. sydowii* CBMAI 935 foi possível obter compostos hidroxilados, destacando que o *A. sydowii* CBMAI 935 apresentou-se como uma fonte de enzimas da classe das oxidoredutases, como as monoxigenases, ao promover a hidroxilação da 2'-hidroxichalcona **1a**, 2'-hidroxi-diidrochalcona **2a** e flavanona **3a** com bons rendimentos em até 72 h de reação.

4.5. Medidas da Rotação óptica dos compostos

As medidas de rotação óptica foram realizadas para as flavanonas 3a-h e para os flavan-4-óis 4a-h obtidos a partir das reações com os fungos derivados de ambiente marinho. A Tabela 16 apresenta os dados de rotação óptica experimentais e os relatados na literatura para estes compostos.

Tabela 16 - Medidas de rotação óptica para as flavanonas **3a-g** e flavan-4-óis **4a-g** isolados das reações com fungos derivados de ambiente marinho.

Composto	Fungo	$[\alpha]_D^{23}$	$[\alpha]_D^{23}_{lit.}$	c.a.
3a	<i>A. sydowii</i> CBMAI 935	+63,2 (c 1,00, CHCl ₃)	+54,8 (c 0,80, CHCl ₃ , ee 85%) (JANECZKO et al., 2014)	<i>R</i>
	<i>Westerdykella</i> sp. CBMAI 1679	+3,8 (c 1,00, CHCl ₃)		
	<i>Acremonium</i> sp. CBMAI 1676	+4,2 (c 1,00, CHCl ₃)		
	<i>Cladosporium</i> sp. CBMAI 1237	+5,6 (c 1,00, CHCl ₃)		
3b	<i>Acremonium</i> sp. CBMAI 1676	+6,5 (c 1,00, CHCl ₃)	+34,6 (c 0,30, CHCl ₃) (MOQUIST; KODAMA; SCHAUS, 2010)	<i>R</i>
	<i>Cladosporium</i> sp. CBMAI 1237	+5,0 (c 0,60, CHCl ₃)		
3c	<i>Acremonium</i> sp. CBMAI 1676	+6,0 (c 1,00, CHCl ₃)	+44,5 (c 0,50, CHCl ₃ , ee 90%) (ZHANG; WANG, 2014)	<i>R</i>
	<i>Cladosporium</i> sp. CBMAI 1237	+0,5 (c 1,00, CHCl ₃)		
3d	<i>Acremonium</i> sp. CBMAI 1676	+8,6 (c 1,00, CHCl ₃)	-45 (c 0,10, CHCl ₃ , ee 99%, enantiômero <i>S</i>) (KORENAGA et al., 2011)	<i>R</i>
	<i>Cladosporium</i> sp. CBMAI 1237	+12,4 (c 1,00, CHCl ₃)		
3e	<i>Acremonium</i> sp. CBMAI 1676	+6,0 (c 1,00, CHCl ₃)	+48,7 (c 0,50, CHCl ₃ , ee 92%) (ZHANG; WANG, 2014)	<i>R</i>
	<i>Cladosporium</i> sp. CBMAI 1237	+13,0 (c 1,00, CHCl ₃)		
3f	<i>Acremonium</i> sp. CBMAI 1676	+2,9 (c 1,00, CHCl ₃)	+50,4 (c 0,50, EtOH, ee 92%) (BIDDLE; LIN; SCHEIDT, 2007)	<i>R</i>
	<i>Cladosporium</i> sp. CBMAI 1237	-		
3g	<i>Acremonium</i> sp. CBMAI 1676	+18,4 (c 1,00, CHCl ₃)	+46,4 (c 0,50, CHCl ₃ , ee 90%) (ZHANG; WANG, 2014)	<i>R</i>
	<i>Cladosporium</i> sp. CBMAI 1237	+17,7 (c 1,00, CHCl ₃)		

$[\alpha]_D^{23}_{lit.}$ = rotação óptica reportada na literatura.

c.a. = configuração absoluta

4.6. Caracterização química dos derivados de flavonoides 1b-4b e 5a

As análises espectroscópicas dos compostos foram fundamentais para a confirmação de suas estruturas químicas. Flavonoides são uma classe de compostos que apresentam alguns sinais espectroscópicos bem característicos, principalmente quando se referem aos sinais de ^1H e ^{13}C observados por Ressonância Magnética Nuclear. Logo, nesta seção serão discutidos, a efeito de ilustração, os dados espectroscópicos do composto sintetizado **1b** e dos produtos de biotransformação **2b-4b** e **5a**. Todos os compostos apresentados neste estudo passaram pelos mesmos processos de identificação e os seus dados espectrais estão apresentados no Apêndice.

4.6.1. Caracterização da (E)-1-(2-hidroxifenil)-3-(4-metoxifenil)prop-2-en-1-ona **1b**

Os espectros de absorções na região do infravermelho (IV) apresentaram perfis semelhantes para as chalconas sintetizadas. A partir do espectro de IV do composto **1b** foi possível verificar a presença dos principais grupos funcionais presentes no composto, como a banda em 1639 cm^{-1} referente ao estiramento $\text{C}=\text{O}$ (Figura 55). A frequência de absorção para o grupo $\text{C}=\text{O}$ foi abaixo de 1700 cm^{-1} devido à conjugação da carbonila ($\text{C}=\text{O}$) com a ligação dupla ($\text{C}=\text{C}$), além da formação de ligação hidrogênio intramolecular da $\text{C}=\text{O}$ com a hidroxila na posição $\text{C}2'$.

O estiramento $\text{C}=\text{C}$ (C , sp^2) característicos de anéis aromáticos foi evidenciado pelas bandas em 1599 , 1580 , 1508 e 1443 cm^{-1} . O grupo hidroxila apresentou uma absorção ampla e rasa em 3005 cm^{-1} , resultante de uma forte ligação de hidrogênio intramolecular entre o grupo $\text{C}=\text{O}$ e grupo $-\text{OH}$, característicos de derivados de 2'-hidroxiacetofenonas. As frequências de absorções em 1209 e 1029 cm^{-1} foram referentes aos estiramentos $\text{C}-\text{O}-\text{C}$, característicos da presença da função éter no composto.

Figura 55 - Espectro de absorção na região do Infravermelho (KBr, cm^{-1}) do composto **1b**.

A partir do espectro de massas (EM, 70 eV) do composto **1b** foi possível verificar o íon molecular M^{+} 254, o pico base com m/z 134 e o fragmento com m/z 121 como picos de maiores intensidades. O fragmento m/z 121 apresentou intensidade elevada (80%) e provavelmente foi resultante de uma ionização partindo do oxigênio da carbonila seguido da clivagem da ligação e formação do oxiânion acílio. O pico base m/z 134 indicou que a ionização possivelmente ocorreu no oxigênio do grupo metoxila, gerando um rearranjo para formar um fragmento conjugado, o que possibilita maior ressonância dos elétrons e consequentemente maior estabilidade do íon (Figura 56).

Figura 56 - Espectro de massas (IE, 70 eV) do composto **1b**.

No espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) de **1b** observou-se a presença de sinais de deslocamentos químicos na região característica de hidrogênios aromáticos (6,00 – 8,00 ppm). Nesta região observou-se os sinais em δ_{H} 7,90 (d, $J = 15,4$ Hz, 1H) e δ_{H} 7,53 (d, $J = 15,4$ Hz, 1H), correspondentes aos hidrogênios ligados aos carbonos sp^2 da instauração olefínica presente nas chalconas. As constantes de acoplamento ($J = 15,4$ Hz) calculadas para estes sinais, indicaram que os hidrogênios estão em posição *trans*. Dessa forma, o composto **1b**, assim como todas as chalconas sintetizadas para este trabalho, apresentaram configuração *E*. O composto em questão apresentou outros dois sinais de RMN de ^1H bem característicos. O sinal em δ_{H} 3,86 (s, 3H) correspondeu a um simpleto referente aos três hidrogênios do grupo metoxila que se encontra ligado ao anel aromático e o sinal em δ_{H} 12,94 (s, 1H) que indicou a presença do hidrogênio do grupo hidroxila formando forte ligação hidrogênio com a carbonila adjacente (Figura 57).

Figura 57 - Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) do composto **1b**.

O espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) de **1b** apresentou quatorze sinais referentes aos dezesseis carbonos da molécula (Figura 58). O sinal em δ_{C} 193,7 foi característico do carbono carbonílico das chalconas e o sinal em δ_{C} 163,5 correspondeu ao carbono *ipso* ligado ao grupo hidroxila. Os sinais dos carbonos da ligação dupla ($\text{C}\alpha$ e $\text{C}\beta$) foram observados em δ_{C} 118,7 e δ_{C} 145,3, respectivamente.

O carbono do grupo metoxila apresentou δ_{C} 55,4, já o sinal em δ_{C} 114,5 foi referente aos carbonos C3 e C5 do anel aromático que apresentam o mesmo ambiente químico, o mesmo ocorreu para os carbonos C2 e C6 que apresentaram sinal em δ_{C} 130,5. Esses sinais reforçam a presença de um substituinte na posição *para* do anel aromático B. Os carbonos quaternários em δ_{C} 120,1 e δ_{C} 127,3 foram identificados como os carbonos C1' e C1, respectivamente. Assim, o composto foi caracterizado como (*E*)-1-(2-hidroxifenil)-3-(4-metoxifenil)prop-2-en-1-ona **1b** e os dados espectroscópicos estão concordantes com a literatura (YONG et al., 2013).

Figura 58 - Espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) do composto **1b**.

4.6.2. Caracterização da 1-(2-hidroxifenil)-3-(4-metoxifenil)propan-1-ona **2b**

O espectro de absorção na região do infravermelho para a 2'-hidroxi-diidrochalcona **2b** apresentou algumas bandas distintas das obtidas para a 2'-hidroxichalcona **1b**. Foi possível observar a presença de bandas referentes aos estiramentos C-H com hibridização sp^3 na região de 2934 cm^{-1} (Figura 59). Além disso, a ausência da conjugação da carbonila com a ligação dupla deixou mais evidente a banda referente ao grupo O-H em 3005 cm^{-1} .

Figura 59 - Espectro de absorção na região do Infravermelho (KBr, cm^{-1}) para o composto **2b**.

A partir do espectro de massas (IE, 7 eV) de **2b** foi observado o íon molecular $M^{+\bullet}$ 256 (30%), indicando a perda da ligação dupla e a adição de dois hidrogênios à estrutura da 2'-hidroxichalcona **1b** ($M^{+\bullet}$ 254) (Figura 60). Foi observado ainda o pico base m/z 121 (100%), que possivelmente foi formado pela ionização partindo do oxigênio da carbonila. A ausência da ligação dupla em **2b** dificulta a formação do fragmento m/z 134, como o que foi obtido no espectro de massas de **1b**, sendo assim, o m/z 121 se tornou o fragmento mais estável.

Figura 60 - Espectro de massas (IE, 70 eV) do composto **2b**.

A partir do espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) da 2'-hidroxi-diidrochalcona **2b** foi possível destacar a presença dos sinais em δ_{H} 3,01 (t, $J = 7,3$ Hz, 2H) e 3,29 (t, $J = 7,9$ Hz 2H) referentes a dois tripletos que integram para 2H cada (Figura 61). Estes sinais indicaram a hidrogenação da ligação dupla $\text{C}=\text{C}$ do sistema α,β -insaturado da 2'-hidroxichalcona correspondente **1b**. Assim, o sinal em δ_{H} 3,01 foi atribuído aos hidrogênios do carbono ligado ao anel B e o sinal em δ_{H} 3,29, por estar mais desblindado, correspondeu aos hidrogênios ligados ao carbono adjacente à carbonila.

Figura 61 - Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) do composto **2b**.

A formação da 1-(2-hidroxifenil)-3-(4-metoxifenil)propan-1-ona **2b** foi confirmada a partir da análise do espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) que permitiu observar a presença dos sinais em δ_{H} 29,2 e δ_{H} 40,3 referentes a carbonos com hibridização sp^3 , e a ausência dos sinais referentes a carbono insaturados do sistema α,β -insaturado (Figura 62). Os dados espectroscópicos estão de acordo com a literatura (AHMED; VAN LIER, 2006).

Figura 62 - Espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) do composto **2b**.

4.6.3. Caracterização da 2-(4-metoxifenil)croman-4-ona **3b**

No espectro de absorção na região do infravermelho da flavanona **3b** foi possível destacar as bandas de estiramento C-H na região de 2835-2961 cm^{-1} e a banda em 1113 cm^{-1} referente a vibração de estiramento C-O-C assimétrico evidenciando a presença da função éter na estrutura, que pode estar relacionada ao fechamento do anel heterocíclico de seis membros e ao grupo metoxila ligado ao anel B da flavanona **3a** (Figura 63). Pode-se destacar também a banda em 1694 cm^{-1} referente ao estiramento C=O da carbonila do anel C.

Figura 63 - Espectro de absorção na região do Infravermelho (KBr, cm^{-1}) para o composto **3b**.

No espectro de massas do composto **3b** os picos de maior intensidade foram o íon molecular M^{+} 254 e o pico base m/z 134 (100%), apresentando fragmentos de massas similares aos observados no espectro de massas de **1b**. Outros picos de menor intensidade como os de m/z 121, 91 e 65 também foram observados (Figura 64).

Figura 64 - Espectro de massas (IE, 70 eV) do composto **3b**.

As flavanonas foram sintetizadas a partir das 2'-hidroxichalconas previamente preparadas. No espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) de **3b**, além dos hidrogênios na região de aromáticos δ_{H} 6,94-7,94, foram verificados a presença dos sinais referentes aos

hidrogênios ligados ao carbono C3 em δ_H 2,86 (dd, $J = 16,8$ e $2,8$ Hz, $1H_a$) e δ_H 3,11 (dd, $J = 16,8$ e $13,3$ Hz, $1H_b$) e ao hidrogênio ligado ao carbono C2 δ_H 5,43 (dd, $J = 13,3$ e $2,8$ Hz, $1H$), indicando a formação do sistema ACB característico dos flavonoides (Figura 65). As constantes de acoplamento de $16,8$ Hz indicaram a relação geminal entre os hidrogênios ligado a C3 (H_a -axial e H_b -equatorial), já as interações vicinais de H_a e H_b com o H ligado a C2 foi observada pelas constantes de acoplamento em $13,3$ Hz (H_2 com H_a) e $2,8$ Hz (H_2 com H_b).

Figura 65 - Espectro de RMN de 1H (500 MHz, $CDCl_3$) do composto **3b**.

A partir do espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, $CDCl_3$) de **3b** foi possível identificar ainda os sinais em δ_C 44,5 e 79,4 que foram atribuídos aos carbonos C3 e C2, respectivamente, sugerindo a formação do sistema ACB. O sinal em δ_C 55,4 foi atribuído ao carbono do grupo metoxila (Figura 66). Já os sinais em δ_C 114,2, 127,0, 127,7 e 136,2 foram atribuídos aos carbonos que formam o anel B, em que os carbonos C3 e C5 e os carbonos C2 e C6 apresentam-se no mesmo ambiente químico, logo, foram identificados pelos sinais em δ_C 114,2 e δ_C 127,7, respectivamente. Enquanto o sinais em δ_C 127,0 e 136,6 foram atribuídos aos C1' e C4', respectivamente. Estes sinais confirmaram ainda que o grupo metoxila está ligado na posição *para* do anel aromático B. Por fim, os sinais em δ_C 118,1, 120,9, 121,5,

130,8, 160,0 e 161,6 foram atribuídos aos carbonos que formam o anel A. O grupo carbonílico da flavanona **3b** foi confirmado pelo deslocamento químico característico de RMN de ^{13}C em δ_{C} 192,2. O composto foi identificado como sendo a 2-(4-metoxifenil)croman-4-ona **3b**. Os dados espectroscópicos estão de acordo com a literatura (ZHANG; WANG, 2014).

Figura 66 - Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) do composto **3b**.

4.6.4. Caracterização da 2-(4-metoxifenil)croman-4-ol **4b**

O flavanol **4b** foi obtido a partir da redução da flavanona **3b** utilizando boro-hidreto de sódio com rendimento de 94%. A partir do espectro de absorção na região do infravermelho do flavanol **4b** foi possível identificar a banda em 3372 cm^{-1} referente a estiramento O-H da hidroxila. As bandas na região de $2837\text{-}3048\text{ cm}^{-1}$ foram atribuídas aos estiramentos C-H em hibridização sp^3 e sp^2 e os estiramentos C=C de anel aromático foram observados nas bandas 1518 e 1609 cm^{-1} (Figura 67). As bandas em 1256 e 1229 cm^{-1} foram atribuídas à vibração de estiramento de C-O e C-O-C, respectivamente.

Figura 67 - Espectro de absorção na região do Infravermelho (KBr, cm^{-1}) para o composto **4b**.

No espectro de massas (IE, 70 eV) de **4b** foi possível observar o íon molecular $\text{M}^{+\bullet}$ 256 (10%), indicando a adição de dois hidrogênios a estrutura de **3b** ($\text{M}^{+\bullet}$ 254) (Figura 68). Assim como para **1b** e **3b**, o pico base para **4b** foi o m/z 134 (100%), sugerindo que a ionização em **1b**, **3b** e **4b** partiram do mesmo ponto da molécula, ocorrendo possivelmente no oxigênio do grupo metoxila. Sendo assim, as transformações ocorridas nos compostos (ciclização e/ou redução da carbonila) não alteraram significativamente a fragmentação dos compostos.

Figura 68 - Espectro de massas (IE, 70 eV) do composto **4b**.

A partir do espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) de **4b** foi observado os sinais dos hidrogênios ligados ao C3 mais blindados do que os da flavanona, apresentando em δ_{H} 2,15 (ddd, $J = 13,1, 11,7, 10,5$ Hz, 1H_{a}) e em δ_{H} 2,49 (ddd, $J = 13,1, 6,3$ e $1,9$ Hz, 1H_{b}). Observou-se o sinal em δ_{H} 1,81 (d, $J = 8,3$ Hz, 1H) correspondente ao hidrogênio do grupo hidroxila ligado ao C4. Notou-se ainda a presença dois sinais sobrepostos na região de δ_{H} 5,00 – 5,20, o duplo duplete em δ_{H} 5,13 (dd, $J = 11,7, 1,7$ Hz, 1H_{c}) foi atribuído ao hidrogênio do C2 que acopla com os hidrogênios H_{a} e H_{b} ligados ao C3. A constante de acoplamento de $J = 13,1$ Hz encontradas para os hidrogênios H_{a} e H_{b} são referentes ao acoplamento geminal, enquanto as constantes $J = 11,7$ Hz encontradas em H_{a} e H_{c} são resultantes do acoplamento pseudo axial-axial. Foi observado ainda um acoplamento axial-equatorial com $J = 1,7$ Hz de H_{c} com H_{b} e uma constante de acoplamento com $J = 10,5$ Hz indicando um acoplamento pseudo axial-axial do H_{a} com os sinais em δ_{H} 5,13 – 5,05 (m, 1H), que foram atribuídos ao hidrogênio do carbono carbinólico C4 (Figura 69). Assim, a partir das constantes de acoplamento foi observado que o flavan-4-ol **4b** foi obtido na conformação *cis*.

Figura 69 - Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) do composto **4b**.

No espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) foi possível destacar a ausência do sinal do carbono carbonílico e a presença de um sinal em δ_{C} 65,9 indicando a redução da

carbonila do C4 (Figura 70). Houve ainda uma diminuição na faixa dos deslocamentos químicos dos carbonos C3 e C2 que apresentaram δ_C 39,9 e 76,6, respectivamente. O carbono do grupo metoxila foi atribuído ao sinal em δ_C 55,3. Todos os dados estão de acordo com a literatura (ZHAO; BEIRING; GLORIUS, 2013).

Figura 70 - Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) do composto **4b**.

4.6.5. Caracterização da 1-(2-hidroxifenil)-3-(4-hidroxifenil)propan-1-ona 5a

O composto **6a** foi isolado da reação de biotransformação de **3a** com o fungo *A. sydowii* CBMAI 935. A partir do espectro de absorção na região do infravermelho foi possível visualizar uma banda de estiramento O-H em 3323 cm^{-1} indicando a presença de outro grupo hidroxila na molécula, pois, a banda de O-H nas 2'-hidroxichalconas são fracas e largas devido à formação de ligação de hidrogênio intramolecular (Figura 71). Observou-se ainda a presença de bandas de estiramento C-H com hibridização sp^2 em 3021 cm^{-1} para os núcleos aromáticos e bandas de estiramento C-H com hibridização sp^3 em 2924 cm^{-1} .

Figura 71 - Espectro de absorção na região do Infravermelho (KBr, cm^{-1}) para o composto **6a**.

A partir do espectro de massas (EM, 70 eV) do composto **6a** verificou-se o íon molecular M^{++} 242 (34%), o pico base com m/z 121 (100%) e o fragmento com m/z 107 (87%) como fragmentos de maiores intensidades. O fragmento m/z 107 indicou que a ionização possivelmente ocorreu no oxigênio do grupo hidroxila, gerando um fragmento conjugado (Figura 72) (PAIVA et al., 2012).

Figura 72 - Espectro de massas (IE, 70 eV) do composto **6a**.

Através do espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) foi observado a presença de sinais característicos de hidrogênios em anéis aromáticos *para* substituídos com δ_{H} 6,78 (d, *J*

= 8,6 Hz, 2H) referentes aos hidrogênios ligados aos C2 e C6 do anel B e δ_H 7,10 (d, J = 8,6 Hz, 2H) referentes aos hidrogênios ligados aos C3 e C5 do anel B.

Os sinais em δ_H 6,88 (ddd, J = 8,2, 7,2, 1,2 Hz, 1H), 6,98 (dd, J = 8,4, 1,1 Hz, 1H), 7,45 (ddd, J = 8,6, 7,2, 1,6 Hz, 1H) e 7,74 (dd, J = 8,1, 1,6 Hz, 1H) foram referentes aos hidrogênios ligados aos carbonos C5', C3', C4' e C6' do anel A, respectivamente. Foi observado a presença de dois tripletos característicos das diidrochalconas em δ_H 2,99 (t, J = 7,3 Hz, 2H) e 3,28 (t, J = 7,3 Hz, 2H) (Figura 73). O sinal em δ_H 5,27 foi referente a um simpleto largo correspondente ao hidrogênio do grupo hidroxila na posição *para* do anel B. O sinal referente à hidroxila da posição C2' foi observado em δ_H 12,34 evidenciando a ligação hidrogênio com o grupo cetônico.

Figura 73 - Espectro de RMN de 1H (500 MHz, $CDCl_3$) do composto **6a**.

Nota: Os sinais em δ_H 4,14 (q, 3H), 2,07 (s, 3H) e 1,27 (t, 2H) são referentes a resíduos do solvente acetato de etila.

O espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz, $CDCl_3$) do composto **6a** apresentou treze linhas espectrais de carbono, sendo dois picos característicos de carbonos com grupos hidroxilas ligados à anéis aromáticos em δ_C 154,1, correspondente ao C4 e em δ_C 162,4 atribuído ao C2' (Figura 74). Os sinais em δ_C 129,5 e 115,4 foram atribuídos aos carbonos de mesmo ambiente

químico, C2 e C6 (δ_c 129,5) e C3 e C5 (δ_c 115,4). O composto **6a** foi identificado como 1-(2-hidroxifenil)-3-(4-hidroxifenil)propan-1-ona e os dados espectroscópicos foram concordantes com a literatura (FOREJTŇÍKOVÁ et al., 2005; KOSTRZEWA-SUSŁOW; DMOCHOWSKA-GŁADYSZ; JANEČKO, 2010).

Figura 74 - Espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) do composto **6a**.

5. CONCLUSÃO

A triagem de fungos de ambiente marinho apresentou resultados promissores frente a biotransformação de 2'-hidroxichalconas **1a-h**. Os fungos testados mostraram-se capazes de realizar biotransformações, os resultados evidenciaram a importância de realizar estudos envolvendo fungos de ambiente marinho frente à biotransformação de derivados de flavonoides. As reações obtidas foram de hidrogenação de C=C α,β -insaturada, clivagem do anel heterocíclico de seis membros e hidroxilação no anel aromático. Foi observado que os produtos de ciclização obtidos nas reações com os fungos *P. citrinum* CBMAI 1186 e *M. racemosus* CBMAI 847 não apresentaram enantiosseletividade, possivelmente ocorreram tanto por meio abiótico quanto no biótico.

O fungo de ambiente marinho *P. raistrickii* CBMAI 931 mediu eficientemente a biotransformação de uma série de 2'-hidroxichalconas substituídas **1a-h** apresentando-se como uma fonte de enzimas enoato redutases ao realizar a redução da ligação dupla C=C α,β -insaturada com controle quimio- e regioseletivo. O fungo *A. sydowii* CBMAI 935 apresentou-se como uma fonte de oxidoredutases ao promover a hidroxilação no anel aromático B da 2'-hidroxichalcona **1a**, 2'-hidroxi-diidrochalcona **2a** e da flavanona **3a**.

A partir das reações de biotransformação pode-se concluir que os fungos derivados de ambiente marinho apresentam potencial para serem empregados na redução assimétrica de cetonas com centro pró-estereogênico, visto que vários fungos testados se mostraram ricos em enzimas redutases. O fungo *P. raistrickii* CBMAI 931 apresentou potencial para obtenção de diidrochalconas a partir de flavanonas, assim como os fungos *A. sydowii* CBMAI 935 e *Fusarium* sp. CBMAI que além de produzirem diidrochalconas ainda promoveram a hidroxilação das mesmas.

Por fim, os resultados obtidos abrem caminhos para novos estudos de biotransformação de derivados de flavonoides sintéticos empregando fungos de ambiente marinho.

REFERÊNCIAS

- AHMED, N.; KONDURU, N. K.; PRAVEEN; KUMAR, A.; KAMALUDDIN. Silica supported-double metal cyanides (DMCs): A green and highly efficient catalytic protocol for isomerisation of 2'-hydroxychalcones to flavanones. **Journal of Molecular Catalysis A: Chemical**, v. 373, p. 135–141, 2013.
- AHMED, N.; VAN LIER, J. E. Pd-C/ammonium formate: a selective catalyst for the hydrogenation of chalcones to dihydrochalcones. **Journal of Chemical Research**, v. 40, n. 9, p. 584–585, 2006.
- ALARCÓN, J.; ALDERETE, J.; ESCOBAR, C.; ARAYA, R.; CESPEDES, C. L. *Aspergillus niger* catalyzes the synthesis of flavonoids from chalcones. **Biocatalysis and Biotransformation**, v. 31, n. 4, p. 160–167, 2013.
- ALBUQUERQUE, H. M. T.; SANTOS, C. M. M.; CAVALEIRO, J. A. S.; SILVA, A. M. S. Chalcones as versatile synthons for the synthesis of 5- and 6-membered nitrogen heterocycles. **Current Organic Chemistry**, v. 18, p. 1–26, 2015.
- ALVARENGA, N.; BIROLI, W. G.; SELEGHIM, M. H. R.; PORTO, A. L. M. Biodegradation of methyl parathion by whole cells of marine-derived fungi *Aspergillus sydowii* and *Penicillium decaturense*. **Chemosphere**, v. 117, n. 1, p. 47–52, 2014.
- BANERJEE, S.; SINGH, S.; RAHMAN, L. U. Biotransformation studies using hairy root cultures - A review. **Biotechnology Advances**, v. 30, n. 3, p. 461–468, 2012.
- BEECHER, G. R. Overview of dietary flavonoids: nomenclature, occurrence and intake. **The Journal of nutrition**, v. 133, n. 10, p. 3244S–3246S, 2003.
- BIDDLE, M. M.; LIN, M.; SCHEIDT, K. A. Catalytic enantioselective synthesis of flavanones and chromanones. **Journal of the American Chemical Society**, v. 129, n. 13, p. 3830–3831, 2007.
- BIST, G.; PUN, N. T.; BAHADUR, T.; MAGAR, T.; SHRESTHA, A.; OH, H. J.; KHAKUREL, A.; PARK, P.; LEE, E. Inhibition of LPS-stimulated ROS production by fluorinated and hydroxylated chalcones in RAW 264.7 macrophages with structure-activity relationship study. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 27, p. 1205–1209, 2017.
- BONUGLI-SANTOS, R. C.; VASCONCELOS, M. R. S.; PASSARINI, M. R. Z.; VIEIRA, G. A. L.; LOPES, V. C. P.; MAINARDI, P. H.; SANTOS, J. A.; DUARTE, L. A.; OTERO, I. V. R.; YOSHIDA, A. M. S.; FEITOSA, V. A.; PESSOA, A.; SETTE, L. D. Marine-derived fungi: diversity of enzymes and biotechnological applications. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, p. 1–15, 2015.
- BORNSCHEUER, U. T.; HUISMAN, G. W.; KAZLAUSKAS, R. J.; LUTZ, S.; MOORE, J. C.; ROBINS, K. Engineering the third wave of biocatalysis. **Nature**, v. 485, n. 7397, p. 185–194, 2012.
- BURMAOGLU, S.; ALGUL, O.; ANIL, D. A.; GOBEK, A.; DURAN, G. G.; ERSAN, R. H.; DURAN, N. Synthesis and anti-proliferative activity of fluoro-substituted chalcones. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 26, n. 13, p. 3172–3176, 2016.

- CABRERA, M.; LAVAGGI, M. L.; CROCE, F.; CELANO, L.; THOMSON, L.; FERNÁNDEZ, M.; PINTOS, C.; RAYMONDO, S.; BOLLATI, M.; MONGE, A.; LÓPEZ DE CERÁIN, A.; PIRO, O. E.; CERECETTO, H.; GONZÁLEZ, M. Identification of chalcones as in vivo liver monofunctional phase II enzymes inducers. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 18, n. 14, p. 5391–5399, 2010.
- CABRERA, M.; SIMOENS, M.; FALCHI, G.; LAVAGGI, M. L.; PIRO, O. E.; CASTELLANO, E. E.; VIDAL, A.; AZQUETA, A.; MONGE, A.; DE CERÁIN, A. L.; SAGRERA, G.; SEOANE, G.; CERECETTO, H.; GONZÁLEZ, M. Synthetic chalcones, flavanones, and flavones as antitumoral agents: biological evaluation and structure-activity relationships. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 15, n. 10, p. 3356–3367, 2007.
- CAO, H.; CHEN, X.; JASSBI, A. R.; XIAO, J. Microbial biotransformation of bioactive flavonoids. **Biotechnology Advances**, v. 33, n. 1, p. 214–223, 2015.
- CHEN, S.; LU, G.; CAI, C. A base-controlled chemoselective transfer hydrogenation of α,β -unsaturated ketones catalyzed by $[\text{IrCp}^*\text{Cl}_2]_2$ with 2-propanol. **Royal Society Chemistry Advances**, v. 5, n. 0, p. 13208–13211, 2015.
- CHENG, L. C.; LI, L. A. Flavonoids exhibit diverse effects on CYP11B1 expression and cortisol synthesis. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 258, n. 3, p. 343–350, 2012.
- CHU, H. W.; WU, H. T.; LEE, Y. J. Regioselective hydroxylation of 2-hydroxychalcones by dimethyldioxirane towards polymethoxylated flavonoids. **Tetrahedron**, v. 60, n. 11, p. 2647–2655, 2004.
- COMASSETO, J. V. A re-união da química e da biologia. In: MARSAIOLI, A.; PORTO, A. L. M. **Biocatálise e biotransformação - fundamentos e aplicações**. Salto, SP: Editora Schoba, 2010. v. 1, p. 11-22.
- CORRÊA, M. J. C.; NUNES, F. M.; BITENCOURT, H. R.; GUILHON, G. M. S. P.; ARRUDA, M. S. P.; MARINHO, A. M. R.; SANTOS, A. S.; BRASIL, D. S. B.; SANTOS, L. S. Biotransformation of chalcones by the endophytic fungus *Aspergillus flavus* isolated from *Paspalum maritimum* Trin. **Journal Brazilian Chemical Society**, v. 22, n. 7, p. 1333–1338, 2011.
- DEWICK, P. M. **Medicinal natural products: a biosynthetic approach**. 3rd ed. Chichester: John Wiley, 2009. 359 p.
- FABER, K. **Biotransformation in organic chemistry**. 6th. ed. Graz: Springer, 2011.
- FAGGIO, C.; SUREDA, A.; MORABITO, S.; SANCHES-SILVA, A.; MOCAN, A.; NABAVI, S. F.; NABAVI, S. M. Flavonoids and platelet aggregation: a brief review. **European Journal of Pharmacology**, v. 807, n. October 2016, p. 91–101, 2016.
- FERREIRA, I. M.; MEIRA, E. B.; ROSSET, I. G.; PORTO, A. L. M. ketones by the marine-derived fungus *Penicillium citrinum* CBMAI 1186 in a biphasic system. **Journal of Molecular Catalysis B : Enzymatic**, v. 115, p. 59–65, 2015.
- FERREIRA, I. M.; ROCHA, L. C.; YOSHIOKA, S. A.; NITSCHKE, M.; JELLER, A. H.; PIZZUTI, L.; SELEGHIM, M. H. R.; PORTO, A. L. M. Chemoselective reduction of chalcones by whole hyphae of marine fungus *Penicillium citrinum* CBMAI 1186, free and immobilized on biopolymers. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 3, n. 4, p. 358–364, 2014.

- FOREJTŇÍKOVÁ, H.; LUNEROVÁ, K.; KUBÍNOVÁ, R.; JANKOVSKÁ, D.; MAREK, R.; KAREŠ, R.; SUCHÝ, V.; VONDRÁČEK, J.; MACHALA, M. Chemoprotective and toxic potentials of synthetic and natural chalcones and dihydrochalcones in vitro. **Toxicology**, v. 208, n. 1, p. 81–93, 2005.
- GANJI, S.; MUTYALA, S.; KRISHNA, C.; NEELI, P.; SEETHA, K.; RAO, R.; BURRI, D. R. Selective hydrogenation of the C=C bond of α,β -unsaturated carbonyl compounds over PdNPs-SBA-15 in a water medium. **Royal Society Chemistry AdvancesSC Advances**, v. 3, n. 29, p. 11533–11538, 2013.
- GIRI, A.; DHINGRA, V.; GIRI, C. .; SINGH, A.; WARD, O. P.; NARASU, M. L. Biotransformations using plant cells, organ cultures and enzyme systems: current trends and future prospects. **Biotechnology Advances**, v. 19, n. 3, p. 175–199, 2001.
- GRAF, B. A.; MILBURY, P. E.; BLUMBERG, J. B. Flavonols, flavones, flavanones, and human health: epidemiological evidence. **Journal of medicinal food**, v. 8, n. 3, p. 281–290, 2005.
- GROTEWOLD, E. **The science of flavonoids**. Ohio: Springer, 2006. 273 p.
- HAYTOWITZ, D. B.; BHAGWAT, S.; HOLDEN, J. M. Sources of variability in the flavonoid content of foods. **Procedia Food Science**, v. 2, p. 46–51, 2013.
- HERATH, W. H. M. W.; FERREIRA, D.; KHAN, I. A. Microbial transformation of xanthohumol. **Phytochemistry**, v. 62, p. 673–677, 2003.
- HOMAEI, A.; GHANBARZADEH, M.; MONSEF, F. Biochemical features and kinetic properties of α -amylases from marine organisms. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 83, p. 306–314, 2016.
- HSIEH, C.; HSIEH, T.; EL-SHAZLY, M.; CHUANG, D.; TSAI, Y. Synthesis of chalcone derivatives as potential anti-diabetic agents. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 22, n. 12, p. 3912–3915, 2012.
- IBRAHIM, A.-R.; ABUL-HAJJ, Y. J. Microbiological transformation of ($\pm$)-flavanone and ($\pm$)-isoflavanone. **Journal of Natural Products**, v. 53, n. 3, p. 644–656, 1990.
- ILLANES, A.; CAUERHFF, A.; WILSON, L.; CASTRO, G. R. Recent trends in biocatalysis engineering. **Bioresource Technology**, v. 115, p. 48–57, 2012.
- JANA, P. P.; SARMA, R.; BARUAH, J. B. Reduction of α,β -unsaturated carbonyl compounds by palladium(II) and nickel(II) complexes having nitrogen-containing ligands. **Journal of Molecular Catalysis A: Chemical**, v. 289, n. 1–2, p. 57–60, 2008.
- JANECZKO, T.; DYMARSKA, M.; SIEPKA, M.; GNIŁKA, R.; LEŚNIAK, A.; POPŁOŃSKI, J.; KOSTRZEWA-SUSŁOW, E. Enantioselective reduction of flavanone and oxidation of *cis*- and *trans*-flavan-4-ol by selected yeast cultures. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 109, p. 47–52, 2014.
- JANECZKO, T.; GŁADKOWSKI, W.; KOSTRZEWA-SUSŁOW, E. Microbial transformations of chalcones to produce food sweetener derivatives. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 98, p. 55–61, 2013.
- JEZ, J. M.; NOEL, J. P. Reaction mechanism of chalcone isomerase: pH dependence, diffusion control, and product binding differences. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 2, p. 1361–1369, 2002.

- JIANG, H.; ZHENG, X.; YIN, Z.; XIE, J. An efficient catalytic synthesis of flavanones under green conditions. **Journal of Chemical Research**, v. 35, n. 4, p. 220–221, 1 abr. 2011.
- JIMENEZ, D. E. Q.; FERREIRA, I. M.; BIROLI, W. G.; FONSECA, L. P.; PORTO, A. L. M. Synthesis and biocatalytic ene-reduction of Knoevenagel condensation compounds by the marine-derived fungus *Penicillium citrinum* CBMAI 1186. **Tetrahedron**, p. 2–7, 2016.
- KNAUS, T.; TOOGOOD, H. S.; SCRUTTON, N. S. Ene-reductases and their applications. In: PATEL, R. N. (Ed.). **Green Chemistry**. New York: John Wiley, 2016. p. 8–12.
- KORENAGA, T.; HAYASHI, K.; AKAKI, Y.; MAENISHI, R. Highly enantioselective and efficient synthesis of flavanones including pinostrobin through the rhodium-catalyzed asymmetric 1,4-addition. **Organic Letters**, v. 13, n. 8, p. 2022–2025, 2011.
- KOSTRZEWA-SUSŁOW, E.; DMOCHOWSKA-GLADYSZ, J.; BIAŁOŃSKA, A.; CIUNIK, Z. Microbial transformations of flavanone by *Aspergillus niger* and *Penicillium chermesinum* cultures. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 52–53, n. 1–4, p. 34–39, 2008.
- KOSTRZEWA-SUSŁOW, E.; DMOCHOWSKA-GLADYSZ, J.; BIAŁOŃSKA, A.; CIUNIK, Z.; RYMOWICZ, W. Microbial transformations of flavanone and 6-hydroxyflavanone by *Aspergillus niger* strains. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 39, n. 1–4, p. 18–23, 2006.
- KOSTRZEWA-SUSŁOW, E.; DMOCHOWSKA-GLADYSZ, J.; JANECZKO, T. Microbial transformation of selected flavanones as a method of increasing the antioxidant properties. **Zeitschrift fur Naturforschung C**, v. 65, n. 1–2, p. 56–60, 2010.
- KOSTRZEWA-SUSŁOW, E.; JANECZKO, T. Microbial Transformations of 7-Methoxyflavanone. **Molecules**, v. 17, n. 12, p. 14810–14820, 2012.
- LI, W.; WU, X. F. Ruthenium-catalyzed conjugate hydrogenation of α,β -enones by in situ generated dihydrogen from paraformaldehyde and water. **European Journal of Organic Chemistry**, v. 2015, n. 2, p. 331–335, 2015.
- LIANG, J.; LALONDE, J.; BORUP, B.; MITCHELL, V.; MUNDORFF, E.; TRINH, N.; KOCHREKAR, D. A.; CHERAT, R. N.; PAI, G. G. Development of a biocatalytic process as an alternative to the (-)-dip-cl-mediated asymmetric reduction of a key intermediate of Montelukast. **Organic Process Research & Development**, p. 193–198, 2010.
- LUO, J.; LIANG, Q.; SHEN, Y.; CHEN, X.; YIN, Z.; WANG, M. Biotransformation of bavachinin by three fungal cell cultures. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 117, n. 2, p. 191–196, 2014.
- MAHAPATRA, D. K.; BHARTI, S. K. Therapeutic potential of chalcones as cardiovascular agents. **Life Sciences**, v. 148, p. 154–172, 2016.
- MONDAL, R.; GUPTA, A.; MALLIK, A. K. Synthesis of flavanones by use of anhydrous potassium carbonate as an inexpensive, safe, and efficient basic catalyst. **Tetrahedron Letters**, v. 52, n. 39, p. 5020–5024, 2011.
- MOQUIST, P. N.; KODAMA, T.; SCHAUS, S. E. Enantioselective addition of boronates to chromene acetals catalyzed by a chiral bronsted acid/Lewis acid system. **Angewandte Chemie - International Edition**, v. 49, n. 39, p. 7096–7100, 2010.

- MOUAD, A. M.; DE OLIVEIRA, A. L. L.; DEBONSI, H. M.; PORTO, A. L. M. Bioreduction of fluoroacetophenone derivatives by endophytic fungi isolated from the marine red alga *Bostrychia radicans*. **Biocatalysis**, v. 1, n. 1, p. 141–147, 2016.
- MUÑOZ SOLANO, D.; HOYOS, P.; HERNÁIZ, M. J.; ALCÁNTARA, A. R.; SÁNCHEZ-MONTERO, J. M. Industrial biotransformations in the synthesis of building blocks leading to enantiopure drugs. **Bioresource Technology**, v. 115, p. 196–207, 2012.
- PAIVA, D. L. et al.. **Introdução à espectrometria**. 4ª ed., São Paulo: Cengage Learning, 2012. 700 p.
- PATEL, R. N.; CHU, L.; MUELLER, R. Diastereoselective microbial reduction of (*S*)- 3-chloro-2-oxo-1-(phenylmethyl)propyl carbamic acid, 1,1-dimethylethyl ester. **Tetrahedron-Asymmetry**, v. 14, n. 20, p. 3105–3109, 2003.
- PIETRUSZKA, J.; SCHÖLZEL, M. Ene reductase-catalysed synthesis of (*R*)-profen derivatives. **Advanced Synthesis and Catalysis**, v. 354, n. 4, p. 751–756, 2012.
- PRASAD, R.; PARAJULI, P.; KOFFAS, M. A. G.; KYUNG, J. Microbial production of natural and non-natural flavonoids: pathway engineering , directed evolution and systems / synthetic biology. **Biotechnology Advances**, v. 34, n. 5, p. 634–662, 2016.
- RAFFA, D.; MAGGIO, B.; RAIMONDI, M. V.; PLESCIA, F.; DAIDONE, G. Recent discoveries of anticancer flavonoids. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 42, p. 213–228, 2017.
- RAGHAV, N.; GARG, S.; RAVISH, I. Conversion of 2'-substituted chalcones in the presence of BSA as evidenced by ¹H NMR studies. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 85, p. 23–28, 2016.
- RAJPUT, S. S.; PATOLE, S. S. Synthesis and uses of chalcone in hetrocyclic synthesis. **World Journal of Pharmaceutical Research**, v. 4, n. 7, p. 1566–1591, 2015.
- RAMADAS, S.; KRUPADANAM, G. L. D. Enantioselective acylation of (±)-*cis*-flavan-4-ols catalyzed by lipase from *Candida cylindracea* (CCL) and the synthesis of enantiopure flavan-4-ones. **Tetrahedron Asymmetry**, v. 15, n. 21, p. 3381–3391, 2004.
- REETZ, M. T. Biocatalysis in organic chemistry and biotechnology: past, present, and future. **Journal of the American Chemical Society**, v. 135, n. 34, p. 12480–12496, 2013.
- RIBEIRO, S. S.; FERREIRA, I. M.; LIMA, J. P. F.; SOUSA, B. A.; CARMONA, R. C.; SANTOS, A. A.; PORTO, A. L. M. Fast microwave-assisted resolution of (±)-cyanohydrins promoted by lipase from *Candida antarctica*. **Journal Brazilian Chemical Society**, v. 26, n. 7, p. 1344–1350, 2015.
- ROCHA, L. C.; SELEGHIM, M. H. R.; COMASSETO, J. V.; SETTE, L. D.; PORTO, A. L. M. Stereoselective bioreduction of α -azido ketones by whole cells of marine-derived fungi. **Marine Biotechnology**, v. 17, n. 6, p. 736–742, 2015.
- ROH, C.; SEO, S. H.; CHOI, K. Y.; CHA, M.; PANDEY, B. P.; KIM, J. H.; PARK, J. S.; KIM, D. H.; CHANG, I. S.; KIM, B. G. Regioselective hydroxylation of isoflavones by *Streptomyces avermitilis* MA-4680. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 108, n. 1, p. 41–46, 2009.

- ROSA, G. P.; SECA, A. M. L.; BARRETO, M. C.; PINTO, D. C. G. A. Chalcone: a valuable scaffold upgrading by green methods. **ACS Sustainable Chemistry and Engineering**, v. 5, n. 9, p. 7467–7480, 2017.
- SANA, B. Marine microbial enzymes: biotechnological and biomedical aspects. In: Kim, S. (Ed.). **Marine microbiology**: bioactive compounds and biotechnological applications. Weinheim: Willey-VCH, 2013. p. 491–508.
- SANCHEZ-GONZALEZ, M.; ROSAZZA, J. P. N. Microbial transformations of chalcones: hydroxylation, *O*-demethylation, and cyclization to flavanones. **Journal of Natural Products**, v. 67, n. 4, p. 553–558, 2004.
- SAVILE, C. K.; JANEY, J. M.; MUNDORFF, E. C.; MOORE, J. C.; TAM, S.; JARVIS, W. R.; COLBECK, J. C.; KREBBER, A.; FLEITZ, F. J.; BRANDS, J.; DEVINE, P. N.; HUISMAN, G. W.; HUGHES, G. J. Biocatalytic asymmetric synthesis of chiral amines from ketones applied to sitagliptin manufacture. **Science**, v. 329, p. 305–309, 2010.
- SHELDON, R. A.; WOODLEY, J. M. Role of biocatalysis in sustainable chemistry. **Chemical Reviews**, v. 118, n. 2, p. 801–838, 2018.
- SIDDAIAH, V.; RAO, C. V.; VENKATESWARLU, S.; SUBBARAJU, G. V. A concise synthesis of polyhydroxydihydrochalcones and homoisoflavonoids. **Tetrahedron**, v. 62, n. 5, p. 841–846, 2006.
- SILVA, V. D.; STAMBUK, B. U.; NASCIMENTO, M. da G. Efficient chemoselective biohydrogenation of 1,3-diaryl-2-propen-1-ones catalyzed by *Saccharomyces cerevisiae* yeasts in biphasic system. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 63, n. 3–4, p. 157–163, 2010.
- SIMON, R. C.; MUTTI, F. G.; KROUTIL, W. Biocatalytic synthesis of enantiopure building blocks for pharmaceuticals. **Drug Discovery Today: Technologies**, v. 10, n. 1, p. 37–44, 2013.
- SKARYDOVÁ, L.; SKARKA, A.; SOLICH, P.; WSÓL, V. Enzyme stereospecificity as a powerful tool in searching for new enzymes. **Current Drug Metabolism**, v. 11, n. 6, p. 547–559, 2010.
- SKROBISZEWSKI, A.; OGÓREK, R.; PLASKOWSKA, E.; GŁADKOWSKI, W. *Pleurotus ostreatus* as a source of enoate reductase. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 2, n. 1, p. 26–31, 2013.
- STOMPOR, M.; KAŁUŻNY, M.; ŻAROWSKA, B. Biotechnological methods for chalcone reduction using whole cells of *Lactobacillus*, *Rhodococcus* and *Rhodotorula* strains as a way to produce new derivatives. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 100, n. 19, p. 8371–8384, 2016.
- STOMPOR, M.; POTANIEC, B.; SZUMNY, A.; ZIELINSKI, P.; ZOLNIERCZYK, A. K.; ANIOL, M. Microbial synthesis of dihydrochalcones using *Rhodococcus* and *Gordonia* species. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 97, p. 283–288, 2013.
- STOYANOV, E. V.; CHAMPAVIER, Y.; SIMON, A.; BASLY, J. P. Efficient liquid-phase synthesis of 2'-hydroxychalcones. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 12, n. 19, p. 2685–2687, 2002.

- SUN, H.; ZHANG, H.; ANG, E. L.; ZHAO, H. Biocatalysis for the synthesis of pharmaceuticals and pharmaceutical intermediates. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, p. 1–10, 2017.
- SUN, J.; HUANG, J.; DING, X.; WANG, P. Efficient enantioselective biocatalytic production of a chiral intermediate of sitagliptin by a newly filamentous fungus isolate. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 180, n. 4, p. 695–706, 2016.
- TANAKA, K.; SUGINO, T. Efficient conversion of 2'-hydroxychalcones into flavanones and flavanols in a water suspension medium. **Green Chemistry**, v. 3, p. 133–134, 2001.
- TANG, P.; FURUYA, T.; RITTER, T. Silver-catalyzed late-stage fluorination. **Journal American Chemical Society**, v. 132, n. 3, p. 12150–12154, 2010.
- TOMÁS-BARBERÁN, F. A.; CLIFFORD, M. N.; TOMAS-BARBERAN, F. A.; CLIFFORD, M. N. Flavanones, chalcones and dihydrochalcones – nature, occurrence and dietary burden. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 1080, p. 1073–1080, 2000.
- TOOGOOD, H. S.; SCRUTTON, N. S. New developments in “ene”-reductase catalysed biological hydrogenations. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 19, n. 1, p. 107–115, 2014.
- TRINCONI, A. Potential biocatalysts originating from sea environments. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 66, n. 3–4, p. 241–256, 2010.
- TRONINA, T.; BARTMANSKA, A.; MILCZAREK, M.; WIETRZYK, J.; POPLONSKI, J.; RÓJ, E.; HUSZCZA, E. Antioxidant and antiproliferative activity of glycosides obtained by biotransformation of xanthohumol. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 23, n. 7, p. 1957–1960, 2013.
- TRONINA, T.; BARTMAŃSKA, A.; POPLONSKI, J.; HUSZCZA, E. Transformation of xanthohumol by *Aspergillus ochraceus*. **Journal of Basic Microbiology**, v. 54, n. 1, p. 66–71, 2014.
- WEI, Y.; XIA, S.; HE, C. Highly enantioselective production of a chiral intermediate of sitagliptin by a novel isolate of *Pseudomonas pseudoalcaligenes*. **Biotechnology Letters**, v. 38, n. 5, p. 841–846, 2016.
- WU, T.; HE, M.; ZANG, X.; ZHOU, Y.; QIU, T.; PAN, S.; XU, X. A structure-activity relationship study of flavonoids as inhibitors of *E. coli* by membrane interaction effect. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1828, n. 11, p. 2751–6, 2013.
- YAO, L. H.; JIANG, Y. M.; SHI, J.; TOMÁS-BARBERÁN, F. A.; DATTA, N.; SINGANUSONG, R.; CHEN, S. S. Flavonoids in food and their health benefits. **Plant Foods for Human Nutrition**, v. 59, p. 113–122, 2004.
- YONG, Y.; AHN, S.; HWANG, D.; YOON, H.; JO, G.; KIM, Y. H.; KIM, S. H.; KOH, D.; LIM, Y. ¹H and ¹³C NMR spectral assignments of 2'-hydroxychalcones. **Magnetic Resonance in Chemistry**, v. 51, n. 6, p. 364–370, jun. 2013.
- ZENGER, K.; DUTTA, S.; WOLFF, H.; GENTON, M. G.; KRAUS, B. In vitro structure-toxicity relationship of chalcones in human hepatic stellate cells. **Toxicology**, v. 336, p. 26–33, 2015.

- ZHANG, C.; KIM, S.-K. Research and application of marine microbial enzymes: status and prospects. **Marine Drugs**, v. 8, n. 6, p. 1920–1934, 2010.
- ZHANG, M.; FANG, X.; NEUMANN, H.; BELLER, M. General and regioselective synthesis of pyrroles via ruthenium- catalyzed multicomponent reactions. **Journal of American Chemical Society**, v. 135, p. 11384–11388, 2013.
- ZHANG, Y. L.; WANG, Y. Q. Enantioselective biomimetic cyclization of 2'-hydroxychalcones to flavanones. **Tetrahedron Letters**, v. 55, n. 21, p. 3255–3258, 2014.
- ZHAO, D.; BEIRING, B.; GLORIUS, F. Ruthenium–NHC-catalyzed asymmetric hydrogenation of flavones and chromones: general access to enantiomerically enriched. **Angewandte Communications International Edition**, v. 52, p. 8454–8458, 2013.
- ZHENG, H. X.; XIAO, Z. F.; YAO, C. Z.; LI, Q. Q.; NING, X. S.; KANG, Y. B.; TANG, Y. Transition-metal-free self-hydrogen-transferring allylic isomerization. **Organic Letters**, v. 17, n. 24, p. 6102–6105, 2015.
- ZHUANG, C.; ZHANG, W.; SHENG, C.; ZHANG, W.; XING, C.; MIAO, Z. Chalcone: a privileged structure in medicinal chemistry. **Chemical Reviews**, v. 117, n. 12, p. 7762–7810, 2017.

APÊNDICE

Espectros na região do Infravermelho das 2'-hidroxichalconas **1a-h**.

Figura 75 - Espectro de absorção na região do Infravermelho (KBr, cm^{-1}) da 2'-hidroxichalcona **1a**.

Figura 76 - Espectro de absorção na região do Infravermelho (KBr, cm^{-1}) da 2'-hidroxichalcona **1b**.

Figura 77 - Espectro de absorção na região do Infravermelho (KBr, cm^{-1}) da 2'-hidroxichalcona **1c**. **Figura 78** - Espectro de absorção na região do Infravermelho (KBr, cm^{-1}) da 2'-hidroxichalcona **1d**. **Figura 79** - Espectro de absorção na região do Infravermelho (KBr, cm^{-1}) da 2'-hidroxichalcona **1e**.

Figura 80 - Espectro de absorção na região do Infravermelho (KBr, cm^{-1}) da 2'-hidroxichalcona **1f**. **Figura 81** - Espectro de absorção na região do Infravermelho (KBr, cm^{-1}) da 2'-hidroxichalcona **1g**. **Figura 82** - Espectro de absorção na região do Infravermelho (KBr, cm^{-1}) da 2'-hidroxichalcona **1h**.

Espectros na região do Infravermelho das 2'-hidroxi-diidrochalconas **2a-h**.

Figura 83 - Espectro de absorção na região do Infravermelho (placa de silício, cm^{-1}) da 2'-hidroxi-diidrochalcona **2a**.

Figura 84 - Espectro de absorção na região do Infravermelho (placa de silício, cm^{-1}) da 2'-hidroxi-diidrochalcona **2b**.

Figura 85 - Espectro de absorção na região do Infravermelho (placa de silício, cm^{-1}) da 2'-hidroxi-diidrochalcona **1d**.

Figura 86 - Espectro de absorção na região do Infravermelho (placa de silício, cm^{-1}) da 2'-hidroxi-diidrochalcona **1e**.

Figura 87 - Espectro de absorção na região do Infravermelho (KBr, cm^{-1}) da 2'-hidroxi-diidrochalcona **1f**.

Figura 88 - Espectro de absorção na região do Infravermelho (placa de silício, cm^{-1}) da 2'-hidroxi-diidrochalcona **1g**.

Figura 89 - Espectro de absorção na região do Infravermelho (placa de silício, cm^{-1}) da 2'-hidroxi-diidrochalcona **1h**.

Espectros na região do Infravermelho das flavanonas **3a-g**.

Figura 90 - Espectro de absorção na região do Infravermelho (KBr, cm^{-1}) da flavanona **3a**.

Figura 91 - Espectro de absorção na região do Infravermelho (KBr, cm^{-1}) da flavanona **3b**.

Figura 92 - Espectro de absorção na região do Infravermelho (KBr, cm^{-1}) da flavanona **3c**. **Figura 93** - Espectro de absorção na região do Infravermelho (KBr, cm^{-1}) da flavanona **3d**. **Figura 94** - Espectro de absorção na região do Infravermelho (KBr, cm^{-1}) da flavanona **3e**.

Figura 95 - Espectro de absorção na região do Infravermelho (KBr, cm^{-1}) da flavanona **3f**. **Figura 96** - Espectro de absorção na região do Infravermelho (KBr, cm^{-1}) da flavanona **3g**.

Espectros na região do Infravermelho dos flavan-4-óis **4a-g**.

Figura 97 - Espectro de absorção na região do Infravermelho (KBr, cm^{-1}) do flavan-4-ol **4a**.

Figura 98 - Espectro de absorção na região do Infravermelho (KBr, cm^{-1}) do flavan-4-ol **4b**.

Figura 99 - Espectro de absorção na região do Infravermelho (KBr, cm^{-1}) do flavan-4-ol **4d**.

Figura 100 - Espectro de absorção na região do Infravermelho (KBr, cm^{-1}) do flavan-4-ol **4e**.

Figura 101 - Espectro de absorção na região do Infravermelho (KBr, cm^{-1}) do flavan-4-ol **4f**.

Figura 102 - Espectro de absorção na região do Infravermelho (KBr, cm^{-1}) do flavan-4-ol **4g**.

Figura 103 - Espectro de absorção na região do Infravermelho (KBr, cm^{-1}) da 2',4-diidroxidiidrochalcona **5a** obtida na reação com o fungo *A. sydowii* CBMAI 935.

Espectros de massas (CG/EM, I.E., 70 eV) das 2'-hidroxichalconas **1a-h**.

Figura 104 - Espectro de massas (IE, 70 eV) para a 2'-hidroxichalcona **1a**.

Figura 105 - Espectro de massas (IE, 70 eV) para a 2'-hidroxichalcona **1b**.

Figura 106 - Espectro de massas (IE, 70 eV) para a 2'-hidroxichalcona **1c**.

Figura 107 - Espectro de massas (IE, 70 eV) para a 2'-hidroxichalcona **1d**.

Figura 108 - Espectro de massas (IE, 70 eV) para a 2'-hidroxichalcona **1e**.

Figura 109 - Espectro de massas (IE, 70 eV) para a 2'-hidroxichalcona **1f**.

Figura 110 - Espectro de massas (IE, 70 eV) para a 2'-hidroxichalcona **1g**.

Figura 111 - Espectro de massas (IE, 70 eV) para a 2'-hidroxichalcona **1h**.

Espectros de massas (CG/EM, I.E., 70 eV) das 2'-hidroxi-diidrochalconas **2a-h**.

Figura 112 - Espectro de massas (IE, 70 eV) para a 2'-hidroxi-diidrochalcona **2a**.

Figura 113 - Espectro de massas (IE, 70 eV) para a 2'-hidroxi-diidrochalcona **2b**.

Figura 114 - Espectro de massas (IE, 70 eV) para a 2'-hidroxi-diidrochalcona **2c**.

Figura 115 - Espectro de massas (IE, 70 eV) para a 2'-hidroxi-diidrochalcona **2d**.

Figura 116 - Espectro de massas (IE, 70 eV) para a 2'-hidroxi-diidrochalcona **2e**.

Figura 117 - Espectro de massas (IE, 70 eV) para a 2'-hidroxi-diidrochalcona **2f**.

Figura 118 - Espectro de massas (IE, 70 eV) para a 2'-hidroxi-diidrochalcona **2g**.

Figura 119 - Espectro de massas (IE, 70 eV) para a 2'-hidroxi-diidrochalcona **2h**.

Espectros de massas (CG/EM, I.E., 70 eV) das flavanonas **3a-g**.

Figura 120 - Espectro de massas (IE, 70 eV) para a flavanona **3a**.

Figura 121 - Espectro de massas (IE, 70 eV) para a flavanona **3b**.

Figura 122 - Espectro de massas (IE, 70 eV) para a flavanona **3c**.

Figura 123 - Espectro de massas (IE, 70 eV) para a flavanona **3d**.

Figura 124 - Espectro de massas (IE, 70 eV) para a flavanona **3e**.

Figura 125 - Espectro de massas (IE, 70 eV) para a flavanona **3f**.

Figura 126 - Espectro de massas (IE, 70 eV) para a flavanona **3g**.

Espectros de massas (CG/EM, I.E., 70 eV) das flavan-4-óis **4a-g**.

Figura 127 - Espectro de massas (IE, 70 eV) para o flavan-4-ol **4a**.

Figura 128 - Espectro de massas (IE, 70 eV) para o flavan-4-ol **4b**.

Figura 129 - Espectro de massas (IE, 70 eV) para o flavan-4-ol **4d**.

Figura 130 - Espectro de massas (IE, 70 eV) para o flavan-4-ol **4e**.

Figura 131 - Espectro de massas (IE, 70 eV) para o flavan-4-ol **4f**. **Figura 132** - Espectro de massas (IE, 70 eV) para o flavan-4-ol **4g**.

Espectros de RMN de ^1H e ^{13}C das 2'-hidroxichalconas **1a-h**.

Figura 133 - Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) para a 2'-hidroxichalcona **1a**.

Figura 135 - Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) da 2'-hidroxichalcona (**1b**).

Figura 136 - Espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) da 2'-hidroxichalcona (**1b**).

Figura 137 - Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) da 2'-hidroxichalcona **1c**. **Figura 138** - Espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) da 2'-hidroxichalcona **1c**.

Figura 139 - Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) para a 2'-hidroxichalcona (**1d**). **Figura 140** - Espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) para a 2'-hidroxichalcona **1d**.

Figura 141 - Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) para a 2'-hidroxichalcona **1e**.

Figura 142 - Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) para a 2'-hidroxichalcona **1e**.

Figura 143 - Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) para a 2'-hidroxichalcona **1f**.

Figura 144 - Espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) para a 2'-hidroxichalcona **1f**.

Figura 145 - Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) para a 2'-hidroxichalcona **1g**.

Figura 146 - Espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) para a 2'-hidroxichalcona **1g**.

Figura 147 - Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) para a 2'-hidroxichalcona **1h**.

Figura 148 - Espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) para a 2'-hidroxichalcona **1h**.

Espectros de RMN de ^1H e ^{13}C das 2'-hidroxi-diidrochalconas **2a-h** isoladas da reação com *P. raistrickii* CBMAI 931.

Figura 149 - Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) para a 2'-hidroxi-diidrochalcona **2a**.

Figura 150 – Espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) para a 2'-hidroxi-diidrochalcona **2a**.

Figura 151 - Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) para a 2'-hidroxi-diidrochalcona **2b**.

Figura 152 - Espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) para a 2'-hidroxi-diidrochalcona **2b**.

Figura 153 - Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) para a 2'-hidroxi-diidrochalcona **2d**. **Figura 154** - Espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) para a 2'-hidroxi-diidrochalcona **2d**.

Figura 155 - Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) para a 2'-hidroxi-diidrochalcona **2e**.

Figura 156 - Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) para a 2'-hidroxi-diidrochalcona **2e**.

Figura 157 - Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) para a 2'-hidroxi-diidrochalcona **2f**.

Figura 158 - Espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) para a 2'-hidroxi-diidrochalcona **2f**.

Figura 159 - Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) para a 2'-hidroxi-diidrochalcona **2g**.

Figura 160 - Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) para a 2'-hidroxi-diidrochalcona **2g**.

Figura 161 - Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) para a 2'-hidroxi-diidrochalcona **2h**.

Figura 162 - Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) para a 2'-hidroxi-diidrochalcona **2h**.

Espectros de RMN de ^1H e ^{13}C das flavanonas **3a-h**.

Figura 163 - Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) da flavanona **3a**.

Figura 164 - Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) da flavanona **3a**.

Figura 165 - Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) da flavanona **3b**. **Figura 166** - Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) da flavanona **3b**.

Figura 167 - Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) para a flavanona **3c**. **Figura 168** - Espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) para a flavanona **3c**.

Figura 169 - Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) para a flavanona **3d**. **Figura 170** - Espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) para a flavanona **3d**.

Figura 171 - Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) da flavanona **3e**.

Figura 172 - Espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) da flavanona **3e**.

Figura 173 - Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) da flavanona **3f**.

Figura 174 - Espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) da flavanona **3f**.

Figura 175 - Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) da flavanona **3g**.

Figura 176 - Espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) da flavanona **3g**.

Espectros de RMN de ^1H e ^{13}C dos flavan-4-óis **4a-g**

Figura 177 - Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) do flavan-4-ol **4a**.

Figura 178 - Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) do flavan-4-ol **4b**.

Figura 179 - Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) do flavan-4-ol **4b**.

Figura 180 - Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) do flavan-4-ol **4b**.

Figura 181 - Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) do flavan-4-ol **4d**. **Figura 182** - Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) do flavan-4-ol **4d**.

Figura 183 - Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) do flavan-4-ol **4e**.

Figura 184 - Espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) do flavan-4-ol **4e**.

Figura 185 - Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) do flavan-4-ol **4f**.

Deslocamento químico em 3,35 ppm referente a água dissolvida no solvente deuterado.

Figura 186 - Espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) do flavan-4-ol **4f**.

Figura 187 - Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) do flavan-4-ol **4g**. **Figura 188** - Espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) do flavan-4-ol **4g**.

Figura 189 - Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) do 2',4-diidroxi-diidrochalcona **5a**.

Nota: Os sinais em δ_H 4,14 (q, $J = 7,1$ Hz), 2,07 (s) e 1,26 (t, $J = 7,1$ Hz) são referentes a resíduos do solvente acetato de etila.

Figura 190 - Espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) da 2',4-diidroxi-diidrochalcona **5a**.

Figura 191 - Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) do flavan-4-ol ($\pm$)-**4a** isolado da reação de biotransformação com o fungo *Cladosporium* sp. CBMAI 1237.

Figura 192 - Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) do flavan-4-ol ($\pm$)-**4a** isolado da reação de biotransformação com o fungo *Cladosporium* sp. CBMAI 1237.

Figura 195 - Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) do flavan-4-ol ($\pm$)-**4c** isolado da reação de biotransformação com o fungo *Cladosporium* sp. CBMAI 1237.

Figura 196 - Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) do flavan-4-ol ($\pm$)-**4c** isolado da reação de biotransformação com o fungo *Cladosporium* sp. CBMAI 1237.

Figura 197 - Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) do flavan-4-ol ($\pm$)-**4d** isolado da reação de biotransformação com o fungo *Cladosporium* sp. CBMAI 1237.

Figura 198 - Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) do flavan-4-ol ($\pm$)-**4d** isolado da reação de biotransformação com o fungo *Cladosporium* sp. CBMAI 1237.

Figura 201 - Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) do flavan-4-ol ($\pm$)-**4f** isolado da reação de biotransformação com o fungo *Cladosporium* sp. CBMAI 1237.

Figura 202 - Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) do flavan-4-ol ($\pm$)-**4f** isolado da reação de biotransformação com o fungo *Cladosporium* sp. CBMAI 1237.