UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA DE SÃO CARLOS

**RESOLUÇÃO CINÉTICA DE HALOIDRINAS RACÊMICAS COM A LIPASE B DE *CANDIDA ANTARCTICA* E
BIOTRANSFORMAÇÃO DE PRODUTOS NATURAIS POR MICRO-ORGANISMOS**

Mariana Provedel Martins

Tese apresentada ao Instituto de Química
de São Carlos, da Universidade de São
Paulo, para obtenção do Título de Doutor
em Ciências área de concentração Físico-Química.

Orientador: Prof. Dr. André Luiz Meleiro Porto

São Carlos, 2012.

DIREITO DE REPRODUÇÃO

A consulta a este documento fica condicionada na aceitação das seguintes condições de uso: este trabalho é somente para uso privado de atividades de pesquisa e ensino. Não é autorizada sua reprodução para quaisquer fins lucrativos. Esta reserva de direitos abrange a todos os dados do documento bem como seu conteúdo. Na utilização ou citação de partes do documento é obrigatório mencionar nome da pessoa autora do trabalho.

*Dedico este trabalho aos meus pais Nina
e Tadeu pelo apoio incondicional em
todos os momentos da minha vida.*

AGRADECIMENTOS

A Deus, por tudo que tem me proporcionado até hoje;

Aos meus pais, Nina e Tadeu, e meus irmãos, Eliud e Roberta, por tudo o que eles representam na minha vida;

Ao Professor André por me proporcionar a oportunidade de trabalhar em seu Grupo e pela orientação;

Ao amigo Lenilson pela amizade e por toda a colaboração durante todos esses anos, pela disponibilidade sempre que precisei, pelos artigos enviados e pelas correções da tese;

Aos amigos de laboratório: Julieta, Ana Maria, Yara, Sandra, Natália, Alex, Irlon, Willian e Isac;

Aos técnicos do nosso laboratório João Pedro e Marília;

À Sílvia e Andréia da secretaria de Pós-graduação do Instituto de Química de São Carlos – (IQSC) por tudo que fizeram por mim ao longo desses anos;

À Profa. Dra. Hosana Debonsi e ao Prof. Dr. Roberto Berlinck pelos micro-organismos doados;

Aos técnicos da Central de Análises Químicas (CAQI) André (IV) e Silvana (RMN);

Ao Prof. Dr. Timothy John Brocksom e a Pós-doutoranda Marciana do Laboratório de Química Bio-orgânica (LQBO - UFSCar) pelas análises de rotação óptica;

À minha veterana Milena Elias Teixeira, sempre tão presente em minha vida acadêmica;

Ao Dr. Jamal Ouazanni, por me receber em seu grupo de pesquisa;

Aos técnicos da Unité Pilote: Sylvie, Phillipe, Guillaume e Claudine;

Aos amigos de Paris: Sayonara, Lara, Gustavo, Caion, Érika, Renata, Karina, Roberta, Valéria, Telma, Malu, Hélio, Christoph, Eda, Diego, Anne Sophie, Sandra e Wessal;

Ao Instituto de Química de São Carlos/USP, pelo apoio institucional;

À CAPES pela bolsa de doutorado;

À FAPESP e ao CNPq pelo financiamento dos projetos;

E a todos que de alguma forma contribuíram para o sucesso deste trabalho. Muito obrigada!!!

RESUMO

Neste trabalho foram realizadas as resoluções cinéticas das haloidrinas racêmicas (*RS*)-1-benziloxi-3-cloropropan-2-ol (**4a**), (*RS*)-1-benziloxi-3-bromopropan-2-ol (**4b**), (*RS*)-1-cloro-3-(4-metoxifenoxi)propan-2-ol (**5a**), (*RS*)-1-bromo-3-(4-metoxifenoxi)propan-2-ol (**5b**), (*RS*)-1-aliloxi-3-cloro-propan-2-ol (**6a**) e (*RS*)-1-aliloxi-3-bromo-propan-2-ol (**6b**) empregando-se a lipase comercial de *Candida antarctica* CALB como catalisador e acetato de vinila como agente acilante. As razões enantioméricas das resoluções cinéticas foram determinadas com o intuito de avaliar a influência dos grupos substituintes halogênicos presentes nas haloidrinas na eficiência das resoluções cinéticas desses substratos. Os valores de razão enantiomérica obtidos foram: $E = 5,6$, **4a**; $E = 4,3$, **4b**; $E = 98$, **5a**; $E = 6,6$, **5b**; $E = 20$, **6a**; $E = 5,8$, **6b**. Assim, somente as resoluções cinéticas das cloroidrinas **5a** e **6a** apresentaram valores de E característicos de resoluções eficientes, fornecendo os produtos (*R*)-1-cloro-3-(4-metoxifenoxi)propan-2-ol **5a** com rendimento de 46% e $ee = 40\%$; (*S*)-acetato de 1-cloro-3-(4-metoxifenoxi)propan-2-ila **8a** com rendimento de 40% e $ee = 97\%$; (*R*)-1-aliloxi-3-cloro-propan-2-ol (*R*)-**6a** com rendimento de 45% e $ee = 72\%$ e (*S*)-acetato de 1-aliloxi-3-cloro-propan-2-ila (*S*)-**9a** com rendimento de 41% e $ee = 81\%$. Realizou-se também uma triagem com os fungos de origem marinha *Bostryospharia* sp. Br09, *Eutypella* sp. Br23, *Hidropisphaera* sp. Br27, *Xylaria* sp. Br61, *Aspergillus sydowii* Ce19, *Aspergillus sydowii* Ce15, *Penicillium raistrickii* Ce16, *Penicillium oxalicum* F30 e *Penicillium citrinum* F53 frente aos produtos naturais sclareol, ambrox e sclareolide, a fim de selecionar os micro-organismos capazes de promover reações de bio-oxidação nesses substratos. Os metabólitos hidroxilados obtidos nas reações de biotransformação foram: 3 β -hidroxi-ambrox **10a** (rendimentos de 17% e 11%, com os fungos Br09 e Br23, respectivamente); 1 β -hidroxi-ambrox **10b** (rendimento de 14% com o fungo Ce19); 3 β -hidroxi-sclareol **11a** (rendimentos de 31%, 69% e 55%, com os fungos Br61, Br09 e Br23, respectivamente); 18-hidroxi-sclareol **11b** (rendimento de 10% com o fungo Br61); 3 β -hidroxi-sclareolide **12a** (rendimentos de 34% e 7%, com os fungos Br09 e Br23, respectivamente). Realizou-se também um estudo utilizando-se três meios de cultura líquidos (meio sintético, meio YM e meio PDB) para a reação de biotransformação do sclareol **11** no composto ambradiol **13** com a levedura *Hyphozyma roseonigra*. Observou-se que a reação com o meio de cultura líquido PDB apresentou os melhores resultados, com uma grande eficiência na conversão do substrato no produto de interesse, o qual foi obtido com um rendimento de 82%. Esta reação foi realizada também através de um processo fermentativo conduzido em biorreator, apresentando bons resultados quanto à conversão da reação, porém com a desvantagem do alto custo do meio de cultura PDB, o que dificulta a realização deste processo fermentativo em larga escala.

ABSTRACT

In this work we performed kinetic resolutions of the racemic halohydrins (*RS*)-1-benzyloxy-3-chloropropan-2-ol (**4a**), (*RS*)-1-benzyloxy-3-bromopropan-2-ol (**4b**), (*RS*)-1-chloro-3-(4-methoxyphenoxy)propan-2-ol (**5a**), (*RS*)-1-bromo-3-(4-methoxyphenoxy)propan-2-ol (**5b**), (*RS*)-1-allyloxy-3-chloro-propan-2-ol (**6a**) and (*RS*)-1-allyloxy-3-bromo-propan-2-ol (**6b**) using the lipase from *Candida antarctica* CALB as catalyst and vinyl acetate as acylating agent. The enantiomeric ratios of the kinetic resolutions were determined in order to evaluate the influence of the halogen substituents present in halohydrins in the efficiency of the kinetic resolutions of these substrates. The enantiomeric ratio values obtained were: $E = 5.6$, **4a**; $E = 4.3$, **4b**; $E = 98$, **5a**; $E = 6.6$, **5b**; $E = 20$, **6a**; $E = 5.8$, **6b**. Thus, only the kinetic resolutions of the chlorohydrins **5a** and **6a** showed characteristic values of E of efficient resolutions, providing the products (*R*)-1-chloro-3-(4-methoxyphenoxy)propan-2-ol **5a** with 46% yield and $ee = 40\%$; (*S*)-1-chloro-3-(4-methoxyphenoxy)propan-2-yl acetate **8a** with 40% yield and $ee = 97\%$; (*R*)-1-allyloxy-3-chloro-propan-2-ol (*R*)-**6a** with 45% yield and $ee = 72\%$ and (*S*)-1-allyloxy-3-chloro-propan-2-yl acetate (*S*)-**9a** with 41% yield and $ee = 81\%$. We also performed a screening with the marine fungi *Bostryospharia* sp. Br09, *Eutypella* sp. Br23, *Hidropisphaera* sp. Br27, *Xylaria* sp. Br61, *Aspergillus sydowii* Ce19, *Aspergillus sydowii* Ce15, *Penicillium raistrickii* Ce16, *Penicillium oxalicum* F30 and *Penicillium citrinum* F53 using the natural products ambrox, sclareol and sclareolide in order to select the microorganisms capable of promoting bio-oxidation reactions of these substrates. The hydroxylated metabolites obtained from the biotransformation reactions were: 3 β -hydroxy-ambrox **10a** (17% and 11% yield with Br09 and Br23, respectively); 1 β -hydroxy-ambrox **10b** (14% yield with Ce19); 3 β -hydroxy-sclareol **11a** (31%, 69% and 55% yield with Br61, Br23 and Br09, respectively); 18-hydroxy-sclareol **11b** (10% yield with Br61); 3 β -hydroxy-sclareolide **12a** (34% and 7% yields with Br09 Br23, respectively). We also performed a study employing three liquid culture media (synthetic, YM and PDB media) for the biotransformation reaction of sclareol **11** into ambradiol **13** using *Hyphozyma roseonigra* as catalyst. The reaction with the liquid culture media PDB showed the best results, with a high efficiency in the conversion of the substrate into the desired product, which was obtained in 82% yield. This reaction was also performed using a fermentation process conducted in a bioreactor, with good results, however with the disadvantage of the high cost of culture media PDB, which hinders the performance of this large-scale fermentation.

SUMÁRIO

CAPÍTULO I- Resolução cinética de halodrinhas racêmicas com a CALB

I.1	INTRODUÇÃO	01
I.1.1	Enzimas.....	03
I.1.2	Resolução cinética ou quimio-enzimática.....	07
I.1.3	Lipases.....	09
I.1.4	Lipase de <i>Candida antarctica</i> (CALB).....	14
I.2	OBJETIVOS	18
I.3	PARTE EXPERIMENTAL	19
I.3.1	Síntese de halodrinhas racêmicas a partir de epóxidos.....	19
I.3.2	Síntese de acetatos racêmicos a partir de halodrinhas.....	21
I.3.3	Resolução cinética das halodrinhas racêmicas pela CALB.....	22
I.3.4	Derivatização dos acetatos 9a e 9b no epóxido 3	23
I.4	RESULTADOS E DISCUSSÕES	24
I.4.1	Resolução cinética do (RS)-1-benziloxi-3-cloropropan-2-ol (4a).....	25
I.4.2	Resolução cinética do (RS)-1-benziloxi-3-bromopropan-2-ol (4b).....	27
I.4.3	Resolução cinética do (RS)-1-cloro-3-(4-metoxifenoxi)propan-2-ol (5a).....	29
I.4.4	Resolução cinética do (RS)-1-bromo-3-(4-metoxifenoxi)propan-2-ol (5b).....	31
I.4.5	Resolução cinética do (RS)-1-aliloxi-3-cloropropan-2-ol (6a).....	33
I.4.6	Resolução cinética do (RS)-1-aliloxi-3-bromopropan-2-ol (6b).....	35
I.4.7	Determinação da configuração absoluta dos compostos.....	36
I.4.8	Influência dos substituintes halogênicos nos valores das razões enantioméricas <i>E</i>	38
I.5	CONCLUSÕES	41

CAPÍTULO II- Biotransformação de produtos naturais por micro-organismos

II.1	INTRODUÇÃO	42
II.1.1	Oxidoredutases.....	42
II.1.2	Mono-oxigenases do citocromo P-450.....	46
II.1.3	Uso de micro-organismos marinhos em reações de bio-oxidação.....	50
II.1.4	Reações de biotransformação dos terpenos ambrox, sclareol e sclareolide.....	52
II.2	OBJETIVOS	57
II.3.	PARTE EXPERIMENTAL	58
II.3.1	Biotransformação de produtos naturais por fungos marinhos.....	58
II.3.1.1	Substratos empregados nas reações de biotransformação.....	58
II.3.1.2	Micro-organismos empregados nas reações de biotransformação.....	58
II.3.1.3	Meios de cultura empregados para o crescimento dos fungos marinhos.....	59
II.3.1.4	Triagens dos fungos marinhos para as reações de biotransformação.....	60
II.3.1.5	Isolamento e purificação dos produtos de biotransformação.....	60
II.3.2	Estudo da reação de biotransformação do sclareol pelo micro-organismo <i>Hyphozyma roseonigra</i>	61
II.3.2.1	Obtenção e adaptação do micro-organismo <i>H. roseonigra</i>	61
II.3.2.2	Meios de cultura sólidos para o crescimento da levedura <i>H. roseonigra</i>	62
II.3.2.3	Reação de biotransformação do sclareol com a levedura <i>H. roseonigra</i>	62
II.3.2.4	Isolamento, purificação e determinação dos rendimentos dos produtos de biotransformação.....	63
II.3.2.5	Reação de biotransformação do sclareol com a levedura <i>H. roseonigra</i> por processo fermentativo descontínuo.....	64
II.4	RESULTADOS E DISCUSSÕES	66
II.4.1	Biotransformação de produtos naturais por fungos marinhos.....	66
II.4.1.1	Reações de biotransformação do (-)-ambrox com fungos marinhos.....	66
II.4.1.2	Reações de biotransformação do sclareol com fungos marinhos.....	73

II.4.1.3	Reações de biotransformação do (+)-sclareolide com fungos marinhos.....	81
II.4.2	Estudo da reação de biotransformação do sclareol pelo micro-organismo <i>Hyphozyma roseonigra</i>	85
II.4.2.1	Reação de biotransformação do sclareol com o micro-organismo <i>Hyphozyma roseonigra</i>	85
II.5	CONCLUSÕES	94
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	95
III.	CAPÍTULO III- ANEXOS	100

LISTA DE FIGURAS

I.1	Formação da ligação peptídica entre dois aminoácidos.....	04
I.2	Modelo “chave fechadura” proposto por Emil Fischer.....	04
I.3	Modelo do “ajuste induzido” de Koshland.....	05
I.4	Diagrama de energia para uma reação enantiosseletiva catalisada por uma enzima.....	07
I.5	Representações gráficas tridimensionais das estruturas secundárias e terciária da lipase B de <i>Candida antarctica</i> (CALB) obtidas por raios-X.....	10
I.6	Ativação interfacial das lipases com interfaces hidrofóbicas.....	12
I.7	Encaixe dos enantiômeros no sítio ativo da CALB de acordo com Kazlauskas.....	15
I.8	Cromatogramas obtidos por GC-FID para a haloidrina 4a	25
I.9	Cromatogramas obtidos por GC-FID para a haloidrina 4b	27
I.10	Cromatogramas obtidos por GC-FID para a haloidrina 5a	29
I.11	Cromatogramas obtidos por GC-FID para a haloidrina 5b	31
I.12	Cromatogramas obtidos por GC-FID para a haloidrina 5b	32
I.13	Cromatogramas obtidos por GC-FID para a haloidrina 6a	33
I.14	Cromatogramas obtidos por GC-FID para a haloidrina 6b	35
I.15	Posicionamento de um álcool secundário no sítio ativo da CALB de acordo com o tamanho dos grupos substituintes ligados ao estereocentro.....	39
II.1	Classificação geral das oxidorreduções.....	42
II.2	Reações típicas catalisadas por mono-oxigenases.....	43
II.3	Coenzimas NAD(P)H e NAD(P) ⁺ e seu centro reativo.....	48
II.4	Estrutura do grupo heme.....	48
II.5	Ciclo catalítico das mono-oxigenases do citocromo P-450.....	49
II.6	Substratos empregados nas reações de biotransformação.....	58
II.7	Estrutura química dos compostos empregados como padrões nas análises de HPLC....	63
II.8	Biotransformação do sclareol com a levedura <i>H. roseonigra</i>	64
II.9	Processo fermentativo da biotransformação do sclareol com o micro-organismo <i>H. roseonigra</i>	65

II.10	Cromatogramas obtidos por GC-FID para a biotransformação do (-)-ambrox 10	66
II.11	Constantes de acoplamento vicinal de H-3 (δ 3,18).....	69
II.12	Constantes de acoplamento vicinal de H-1 (δ 3,36).....	71
II.13	Cromatogramas obtidos por HPLC para a biotransformação do sclareol 11	73
II.14	Constantes de acoplamento dos hidrogênios vinílicos do composto 11a	75
II.15	Constantes de acoplamento vicinal de H-3 (δ 3,25).....	76
II.16	Cromatogramas obtidos por HPLC para a biotransformação do (+)-sclareolide 12	81
II.17	Constantes de acoplamento vicinal de H-3 (δ 3,19).....	83
II.18	Reativação da levedura <i>H. roseonigra</i> em placa de Petri contendo o meio de cultura sólido YM por 5 dias.....	86
II.19	Reação de biotransformação do sclareol 11 com a levedura <i>H. roseonigra</i> nos meios de cultura líquidos PDB, YM e sintético.....	87
II.20	Cromatogramas obtidos por HPLC para as reações de biotransformação do sclareol 11 com a levedura <i>H. roseonigra</i> nos meios de cultura líquidos PDB, YM e sintético.	88
II.21	Cromatogramas obtidos por HPLC para as reações de biotransformação do sclareol 11 com a levedura <i>H. roseonigra</i> nos meios de cultura líquidos PDB e YM.....	89
II.22	Cromatogramas obtidos por HPLC para as reações de biotransformação do sclareol 11 com a levedura <i>H. roseonigra</i> no meio de cultura líquido sintético modificado.....	91
III.1	Espectro de RMN de ^1H do composto 4a (200 MHz, CDCl_3).....	103
III.2	Espectro de RMN de ^{13}C do composto 4a (50 MHz, CDCl_3).....	103
III.3	Espectro de IV do composto 4a	104
III.4	Espectro de RMN de ^1H do composto 4b (200 MHz, CDCl_3).....	105
III.5	Espectro de RMN de ^{13}C do composto 4b (50 MHz, CDCl_3).....	105
III.6	Espectro de IV do composto 4b	106
III.7	Espectro de RMN de ^1H do composto 5a (200 MHz, CDCl_3).....	107
III.8	Espectro de RMN de ^{13}C do composto 5a (50 MHz, CDCl_3).....	107
III.9	Espectro de IV do composto 5a	108
III.10	Espectro de RMN de ^1H do composto 5b (200 MHz, CDCl_3).....	109
III.11	Espectro de RMN de ^{13}C do composto 5b (50 MHz, CDCl_3).....	109

III.12	Espectro de IV do composto 5b	110
III.13	Espectro de RMN de ^1H do composto 6a (200 MHz, CDCl_3).....	111
III.14	Espectro de RMN de ^{13}C do composto 6a (50 MHz, CDCl_3).....	111
III.15	Espectro de IV do composto 6a	112
III.16	Espectro de RMN de ^1H do composto 6b (200 MHz, CDCl_3).....	113
III.17	Espectro de RMN de ^{13}C do composto 6b (50 MHz, CDCl_3).....	113
III.18	Espectro de IV do composto 6b	114
III.19	Espectro de RMN de ^1H do composto 7a (200 MHz, CDCl_3).....	115
III.20	Espectro de RMN de ^{13}C do composto 7a (50 MHz, CDCl_3).....	115
III.21	Espectro de IV do composto 7a	116
III.22	Espectro de RMN de ^1H do composto 7b (200 MHz, CDCl_3).....	117
III.23	Espectro de RMN de ^{13}C do composto 7b (50 MHz, CDCl_3).....	117
III.24	Espectro de IV do composto 7b	118
III.25	Espectro de RMN de ^1H do composto 8a (200 MHz, CDCl_3).....	119
III.26	Espectro de RMN de ^{13}C do composto 8a (50 MHz, CDCl_3).....	119
III.27	Espectro de IV do composto 8a	120
III.28	Espectro de RMN de ^1H do composto 8b (200 MHz, CDCl_3).....	121
III.29	Espectro de RMN de ^{13}C do composto 8b (50 MHz, CDCl_3).....	121
III.30	Espectro de IV do composto 8b	122
III.31	Espectro de RMN de ^1H do composto 9a (200 MHz, CDCl_3).....	123
III.32	Espectro de RMN de ^{13}C do composto 9a (50 MHz, CDCl_3).....	123
III.33	Espectro de IV do composto 9a	124
III.34	Espectro de RMN de ^1H do composto 9b (200 MHz, CDCl_3).....	125
III.35	Espectro de RMN de ^{13}C do composto 9b (50 MHz, CDCl_3).....	125
III.36	Espectro de IV do composto 9b	126
III.37	Espectro de RMN de ^1H do composto 10a (300 MHz, CDCl_3).....	127
III.38	Espectro de RMN de ^{13}C do composto 10a (75 MHz, CDCl_3).....	127

III.39	Espectro de RMN de ^{13}C - DEPT 135° do composto 10a (75 MHz, CDCl_3).....	128
III.40	Espectro de IV do composto 10a	128
III.41	Espectro de HSQC do composto 10a (300 e 75 MHz, CDCl_3).....	129
III.42	Espectro de HMBC do composto 10a (300 e 75 MHz, CDCl_3).....	130
III.43	Espectro de massas do composto 10a (IE, 70 eV).....	130
III.44	Espectro de RMN de ^1H do composto 10b (400 MHz, CDCl_3).....	131
III.45	Espectro de RMN de ^{13}C do composto 10b (100 MHz, CDCl_3).....	131
III.46	Espectro de RMN de ^{13}C - DEPT 135° do composto 10b (100 MHz, CDCl_3).....	132
III.47	Espectro de IV do composto 10b	132
III.48	Espectro de HSQC do composto 10b (400 e 100 MHz, CDCl_3).....	133
III.49	Espectro de HMBC do composto 10b (400 e 100 MHz, CDCl_3).....	134
III.50	Espectro de massas do composto 10b (IE, 70 eV).....	134
III.51	Espectro de RMN de ^1H do composto 11a (300 MHz, CDCl_3).....	135
III.52	Espectro de RMN de ^{13}C do composto 11a (75 MHz, CDCl_3).....	135
III.53	Espectro de RMN de ^{13}C - DEPT 135° do composto 11a (75 MHz, CDCl_3).....	136
III.54	Espectro de IV do composto 11a	136
III.55	Espectro de HSQC do composto 11a (300 e 75 MHz, CDCl_3).....	137
III.56	Espectro de massas do composto 11a (IE, 70 eV).....	137
III.57	Espectro de HMBC do composto 11a (300 e 75 MHz, CDCl_3).....	138
III.58	Espectro de RMN de ^1H do composto 11b (300 MHz, CDCl_3).....	139
III.59	Espectro de RMN de ^{13}C do composto 11b (75 MHz, CDCl_3).....	139
III.60	Espectro de RMN de ^{13}C - DEPT 135° do composto 11b (75 MHz, CDCl_3).....	140
III.61	Espectro de IV do composto 11b	140
III.62	Espectro de HSQC do composto 11b (300 e 75 MHz, CDCl_3).....	141
III.63	Espectro de massas do composto 11b (IE, 70 eV).....	141
III.64	Espectro de HMBC do composto 11b (300 e 75 MHz, CDCl_3).....	142
III.65	Espectro de RMN de ^1H do composto 12a (300 MHz, CDCl_3).....	143

III.66	Espectro de RMN de ^{13}C do composto 12a (75 MHz, CDCl_3).....	143
III.67	Espectro de RMN de ^{13}C - DEPT 135° do composto 12a (75 MHz, CDCl_3).....	144
III.68	Espectro de IV do composto 12a	144
III.69	Espectro de HSQC do composto 12a (300 e 75 MHz, CDCl_3).....	145
III.70	Espectro de HMBC do composto 12a (300 e 75 MHz, CDCl_3).....	146
III.71	Espectro de massas do composto 12a (IE, 70 eV).....	146

LISTA DE ESQUEMAS

I.1	Processo CSIR para a síntese industrial do (-)-ambrox.....	03
I.2	Síntese da 11 α -hidroxiprogesterona com o fungo <i>Rhizopus arrhizus</i>	06
I.3	Resolução cinética do 1-cloro-3-(naftalen-1-iloxi)propan-2-ol catalisada pela PCL.....	06
I.4	Ciclo catalítico de uma reação de acilação enantiosseletiva de um álcool secundário quiral catalisada pela CALB.....	11
I.5	Reações catalisadas por lipases com diferentes nucleófilos.....	11
I.6	Resolução cinética por transesterificação de álcool primário catalisada pela PCL.....	13
I.7	Síntese do (<i>R</i>)-ácido mandélico via resolução cinética do mandelato de metila pela CALB.....	13
I.8	Resolução cinética da kjellmanianona catalisada pela CALB.....	14
I.9	Resolução cinética de álcoois secundários pela CALB.....	16
I.10	Esquema geral da síntese e resolução cinética de haloidrinas a partir de epóxidos.....	16
I.11	Resolução cinética de haloidrina racêmica com a CALB para a síntese do <i>Hennoxazole A</i>	17
I.12	Síntese de haloidrinas racêmicas a partir de epóxidos.....	19
I.13	Síntese de acetatos racêmicos a partir de haloidrinas.....	21
I.14	Resolução cinética de haloidrinas pela CALB.....	23
I.15	Derivatização dos acetatos 9a e 9b no epóxido 3	23
I.16	Esterificação da haloidrina racêmica 4a com a CALB em 16h.....	26
I.17	Esterificação da haloidrina racêmica 4b com a CALB em 28h.....	28
I.18	Esterificação da haloidrina racêmica 5a com a CALB em 4h.....	30
I.19	Esterificação da haloidrina racêmica 5b com a CALB em 33h.....	33
I.20	Esterificação da haloidrina racêmica 6a com a CALB em 24h.....	34
I.21	Esterificação da haloidrina racêmica 6b com a CALB em 27h.....	36

II.1	Reação de oxidação enzimática por mono-oxigenases.....	43
II.2	Bio-oxidação do limoneno por <i>Bacillus stearothermophilus</i>	43
II.3	Reações catalisadas por di-oxigenases.....	44
II.4	Reações de di-hidroxilação catalisadas por di-oxigenases.....	44
II.5	Reação de oxidação catalisada por oxidases.....	45
II.6	Reação de oxidação da glicose via enzima glicose oxidase.....	45
II.7	Reação de oxidação catalisada por peroxidases.....	45
II.8	Reações de hidroxilação catalisadas pela peroxidase de <i>C. fumago</i>	46
II.9	Síntese do cortisol a partir da hidroxilação regioseletiva do Reichstein S.....	47
II.10	Biotransformação da aplisistatina pelo fungo marinho <i>R. atrovirens</i>	51
II.11	Biotransformação do palasadina A com o fungo marinho <i>Rhinocladiella</i> sp.....	51
II.12	Biotransformação do pacifenol com o fungo marinho <i>P. brevicompactum</i>	51
II.13	Biotransformação do (-)-ambrox com o fungo <i>F. lini</i>	53
II.14	Reações de biotransformação do (-)-ambrox com os fungos <i>R. stolonifer</i> , <i>C. luneta</i> e <i>C. elegans</i>	53
II.15	Biotransformação do (+)-sclareolide com o fungo <i>C. elegans</i>	54
II.16	Biotransformação do sclareol pelo fungo <i>R. stolonifer</i>	54
II.17	Biotransformação do (-)-ambrox por células suspensas de <i>A. deliciosa</i>	55
II.18	Biotransformação do (+)-sclareolide com o fungo <i>A. niger</i> no meio de cultura A.....	55
II.19	Biotransformação do (+)-sclareolide com o fungo <i>A. niger</i> no meio de cultura B.....	56
II.20	Biotransformação do (-)-ambrox pelos fungos <i>Cunninghamella</i> sp. e <i>A. alternata</i>	56
II.21	Reação de biotransformação do (-)-ambrox 10 com os fungos <i>Bostryospharia</i> sp. Br09 e <i>Eutypella</i> sp. Br23.....	67
II.22	Reação de biotransformação do (-)-ambrox 10 com o fungo <i>A. sydowii</i> Ce19.....	67
II.23	Reação de biotransformação do sclareol 11 com o fungo <i>Xylaria</i> sp. Br61.....	74

II.24	Reação de biotransformação do sclareol 11 com os fungos <i>Bostryospharia</i> sp. Br09 e <i>Eutypella</i> sp. Br23.....	74
II.25	Reação de biotransformação do (+)-sclareolide 12 com os fungos <i>Bostryospharia</i> sp. Br09 e <i>Eutypella</i> sp. Br23.....	82
II.26	Síntese industrial biocatalítica do (-)-ambrox a partir do composto sclareol.....	85
II.27	Reação de biotransformação do sclareol com a levedura <i>H. roseonigra</i> em meio de cultura líquido PDB.....	90
II.28	Reação de biotransformação do sclareol com a levedura <i>H. roseonigra</i> em meio de cultura líquido sintético modificado.....	91
II.29	Reação de biotransformação do sclareol com a levedura <i>H. roseonigra</i> em biorreator..	92

LISTA DE TABELAS

I.1	Exemplos de aplicações de enzimas no tratamento de efluentes.....	02
I.2	Valores de $\Delta\Delta G^\ddagger$ e correspondentes taxas de velocidade (v_A/v_B) para determinação representativa da pureza enantiomérica de um produto (ee_{produto}) frente a uma reação biocatalisada.....	06
I.3	Resolução cinética da haloidrina racêmica 4a com a CALB.....	26
I.4	Resolução cinética da haloidrina racêmica 4b com a CALB.....	28
I.5	Resolução cinética da haloidrina racêmica 5a com a CALB.....	30
I.6	Resolução cinética da haloidrina racêmica 5b com a CALB.....	31
I.7	Resolução cinética da haloidrina racêmica 6a com a CALB.....	34
I.8	Resolução cinética da haloidrina racêmica 6b com a CALB.....	36
I.9	Compostos obtidos nas resoluções cinéticas das haloidrinas racêmicas.....	37
I.10	Valores de E para as resoluções cinéticas das haloidrinas racêmicas.....	38
II.1	Códigos dos depósitos CBMAI para os fungos marinhos empregados neste trabalho...	59
II.2	Reação de biotransformação do (-)-ambrox 10 por fungos marinhos.....	68
II.3	RMN de ^1H (300 MHz) e RMN de ^{13}C (75 MHz) do composto 10a (CDCl_3).....	70
II.4	RMN de ^1H (300 MHz) e RMN de ^{13}C (75 MHz) do composto 10b (CDCl_3).....	72
II.5	Reação de biotransformação do sclareol 11 por fungos marinhos.....	74
II.6	RMN de ^1H (300 MHz) e RMN de ^{13}C (75 MHz) do composto 11a (CDCl_3).....	77
II.7	Valores de deslocamento químico dos carbonos nos compostos sclareol, 18-hidroxi-sclareol e 19-hidroxi-sclareol.....	79
II.8	RMN de ^1H (300 MHz) e RMN de ^{13}C (75 MHz) do composto 11b (CDCl_3).....	80
II.9	Reação de biotransformação do (+)sclareolide 12 por fungos marinhos.....	82
II.10	RMN de ^1H (300 MHz) e RMN de ^{13}C (75 MHz) do composto 12a (CDCl_3).....	84
III.1	Programas utilizados nas análises por GC-FID para os compostos empregados para o trabalho.....	101

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

Ac ₂ O	Anidrido acético
CAQI	Central de Análises Químicas e Instrumentais
c.a.	Configuração absoluta
CBMAI	Coleção Brasileira de Micro-organismos de Ambiente e Indústria
CC	Cromatografia em coluna
CCD	Cromatografia em camada delgada
CALA	Lipase de <i>Candida antarctica</i> fração A
CALB	Lipase de <i>Candida antarctica</i> fração B
CNRS	Centre National de Recherche Scientifique
CPQBA	Centro de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrárias
d	Duplo
dd	Duplo duplo
dt	Duplo tripleto
GC-FID	Gas chromatography - flame ionization detector (Cromatografo a gás com detector de ionização de chama)
GC-MS	Gas chromatography - Mass Spectrometry (Cromatografo a gás acoplado ao espectrômetro de massas de baixa resolução)
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Correlation
HPLC	High Performance Liquid Chromatography (Cromatografia líquida de alta eficiência)
HSQC	Heteronuclear Single Quantum Coherence
IV	Infravermelho
<i>J</i>	Constante de acoplamento
m	Multiplo
NADH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo na forma reduzida
NADPH	Fosfato de nicotinamida adenina dinucleotídeo
r	Taxa de aquecimento por minuto
RMN de ¹ H	Ressonância Magnética Nuclear de hidrogênio
RMN de ¹³ C	Ressonância Magnética Nuclear de carbono
sl	Singleto largo
t	Tripleto
td	Triplo duplo
T _i	Temperatura inicial
T _f	Temperatura final
TMS	Trimetilsilano
δ	Deslocamento químico em ppm
[α] _D ^T	Rotação óptica específica
PDA	Potato dextrose agar
PDB	Potato dextrose broth

CAPÍTULO I

**Resolução cinética de haloidrinas racêmicas com a
lipase B de *Candida antarctica***

I.1- INTRODUÇÃO

A química tem uma grande participação nos setores econômicos e sociais com a produção de inúmeros produtos fundamentais à humanidade, desde diversos combustíveis aos mais complexos medicamentos. No entanto, a produção química também gera inúmeros inconvenientes, como a formação de subprodutos tóxicos que contaminam o meio ambiente e o próprio homem expostos a esses xenobióticos. A preocupação com esses paradigmas pode ser observada através da pressão sobre as indústrias químicas, tanto pela sociedade, quanto pelas autoridades governamentais e acadêmicas, no sentido de buscar o desenvolvimento de processos que sejam cada vez menos prejudiciais ao meio ambiente. Neste contexto, surgiu um novo caminho delineado pela química denominado de “química verde”, que pode ser definida como “o desenvolvimento e a implementação de produtos e processos químicos para reduzir ou eliminar o uso e a geração de substâncias nocivas à saúde humana e ao meio ambiente” (PRADO, 2003).

As propostas da química verde englobam diversas áreas da ciência e levam em consideração princípios de sustentabilidade como: i) uso de reagentes menos tóxicos e renováveis; ii) a substituição dos solventes tóxicos; iii) melhoramento dos processos naturais, como biossínteses e biocatálises; iv) desenvolvimento de compostos de baixa toxicidade; v) determinação de melhores condições reacionais a fim de se obter maiores rendimentos e menos subprodutos e vi) minimização do consumo de energia (SILVA *et al.*, 2005).

Muitas mudanças em busca de processos mais sustentáveis já foram realizadas. Uma área de estudo em contínua expansão é a da biocatálise, a qual abrange processos em que um catalisador biológico (enzima) é utilizado na conversão de um substrato em um produto de interesse, por um número limitado de etapas enzimáticas (SILVERMAN, 2000).

O emprego da biocatálise possibilita a aplicação dos princípios da química verde, uma vez que as reações biocatalisadas podem ocorrer em condições brandas de pH, temperatura e pressão, apresentando assim um excelente balanço de energia-eficiência. Os produtos de interesse podem ser obtidos de forma altamente específica, evitando a formação de subprodutos e a ocorrência de reações laterais (SILVA *et al.*, 2005).

Assim, a biocatálise transformou-se em uma ferramenta viável e atrativa no desenvolvimento de processos químicos sustentáveis. Como exemplo, pode-se citar a utilização de enzimas para a degradação de poluentes específicos no tratamento de despejos industriais (Tabela I.1) (MENDES *et al.*, 2005).

Tabela I.1- Exemplos de aplicações de enzimas no tratamento de efluentes.

Enzimas e fontes	Poluentes e efluentes
Polifosfatase e fosfotransferase	Remoção de fosfato biológico
Nitrogenase (<i>Klebsiella oxytoca</i>)	Remoção de excesso de lodo e proteínas
Oxidoredutase (<i>Pseudomonas syringae</i>)	Remoção de compostos fenólicos
Catalase (<i>Bacillus</i> sp.)	Remoção de H ₂ O ₂ presente em efluentes de indústrias de branqueamento de tecidos
Lipase (<i>Pseudomonas aeruginosa</i>)	Redução do teor de lipídeos em efluentes de restaurantes
Lipase (pâncreas de porco)	Redução do teor de lipídeos e de sólidos suspensos de efluentes da indústria de derivados lácteos
Peroxidase (peroxidase de soja)	Remoção de compostos fenólicos da indústria de extração de óleo de soja

Também pode-se destacar a substituição de processos químicos industriais convencionais por processos biocatalíticos mais seguros e eficientes. Um exemplo é a síntese industrial do ambrox, um composto de alto valor comercial (US\$ 800/kg) que apresenta um aroma forte de âmbar, sendo muito empregado pelas indústrias de perfumes e fragrâncias como nota de fundo ou fixador (FARBOOD e WILLIS, 1989).

Diversas rotas sintéticas foram desenvolvidas para a obtenção do (-)-ambrox. Comercialmente, esse composto é obtido a partir do produto natural sclareol, um metabólito secundário isolado da planta *Salvia sclarea*, em um processo realizado durante 14 dias, o qual envolve 8 etapas sintéticas, com o uso de reagentes de alta toxicidade, como o butil lítio e o cloreto de tosila, que são substâncias inflamáveis e corrosivas, cuja exposição crônica pode prejudicar os rins, o fígado e o sistema respiratório, representando assim condições de riscos aos operadores. Além disso, a necessidade de temperaturas muito baixas em algumas etapas representa um alto gasto energético na síntese total do (-)-ambrox (CSIR, 2010).

O centro de pesquisas CSIR (“Council for Scientific and Industrial Research”- África do Sul) desenvolveu uma síntese biocatalítica para o (-)-ambrox, a partir do sclareol, em um processo que envolve somente 2 etapas. A primeira etapa consiste na biotransformação do sclareol no composto ambradiol, com o emprego de células totais da levedura *Hyphozyma roseonigra* como catalisador. Essa reação ocorre rapidamente (2-5 h), sendo realizada em meio aquoso, em condições

brandas de temperatura ($T = 20^{\circ}\text{C}$) e sem a formação de subprodutos. A segunda etapa envolve o emprego de zeólitas na conversão do ambradiol no (-)-ambrox, apresentando rendimento de 100% (Esquema I.1) (CSIR, 2010).

Esquema I.1- Processo CSIR para a síntese industrial do (-)-ambrox.

Como pode ser observado, o processo biocatalítico apresenta uma síntese mais sustentável para o (-)-ambrox, uma vez que permite o uso de reagentes de menor toxicidade, reduz o gasto energético da produção e diminui os custos com o tratamento de resíduos. Além disso, a aplicação industrial desse processo permite ampliar a produtividade do (-)-ambrox em 80%, o que torna muito atrativa a substituição da síntese convencional deste composto pelo emprego do processo biocatalítico.

Os sistemas reacionais em biocatálise podem empregar as células íntegras dos organismos ou enzimas isoladas. As células íntegras têm como vantagens o baixo custo e o fato de conter tanto as enzimas quanto as coenzimas necessárias. Contudo, por serem um sistema multi-enzimático, podem apresentar também reações laterais indesejadas. Já as enzimas isoladas oferecem um maior controle do processo, boa produtividade e tolerância a altas concentrações de substrato, embora o seu emprego apresente um custo mais elevado, devido aos gastos envolvidos nos processos de purificação enzimática (FABER, 2011).

Assim, os processos biocatalíticos dependem diretamente do potencial ativo das enzimas, as quais são capazes de executar inúmeras reações químicas que normalmente não ocorreriam com a mesma eficácia na sua ausência. Dessa forma, é muito importante conhecer algumas das características principais desses catalisadores biológicos (SILVA *et al.*, 2005).

I.1.1- Enzimas

As enzimas são normalmente macromoléculas protéicas constituídas de longas sequências (em torno de 35 KDa) de *L*-aminoácidos naturais unidos por ligações peptídicas, que formam estruturas tridimensionais complexas, características de sua funcionalidade biológica (Figura I.1) (GRUNWALD, 2009).

Figura I.1- Formação da ligação peptídica entre dois resíduos de aminoácidos.

Existe uma estreita relação entre a estrutura de uma enzima e sua função catalítica, uma vez que é a estrutura protéica que determina as interações entre a enzima e o substrato envolvidos na catálise. O substrato deve ser capaz de se ligar especificamente à enzima a fim de possibilitar sua transformação em produto. Assim, a estrutura do catalisador deve fornecer um conjunto de interações que permitam a ligação do substrato, expondo grupos químicos capazes de interagir entre si formando, transitoriamente, o complexo enzima-substrato (NELSON e COX, 2000).

O substrato liga-se à enzima através de interações intermoleculares com o sítio ativo, o qual consiste em uma fenda tridimensional localizada na superfície da enzima e é formado por resíduos de aminoácidos que podem estar distantes entre si na sequência primária da molécula protéica. Esses resíduos são capazes de adotar um arranjo conformacional que os aproxima através de interações não covalentes, propiciando um ambiente favorável à ligação do substrato (SILVERMAN, 2000).

Em 1894, Emil Fischer propôs o modelo “chave – fechadura” para elucidar a ação da catálise enzimática. Nesse modelo, a enzima (E) se encaixaria ao substrato específico (S) no sítio ativo como uma chave em uma fechadura (Figura I.2) (FABER, 2011).

Figura I.2- Modelo “chave fechadura” proposto por Emil Fischer.

E= enzima; S= substrato; P₁ e P₂= produtos

Assim, o substrato e o sítio ativo da enzima seriam estruturalmente complementares em tamanho, forma e natureza química, formando um sistema altamente rígido e definido. Esse conceito de rigidez é uma falha do modelo, já que ocorrem mudanças conformacionais durante a interação entre o ligante (substrato) e o receptor (enzima). É justamente essa flexibilidade um dos fatores que permite que moléculas estruturalmente semelhantes apresentem conformações e

orientações relativas distintas no sítio de ligação do receptor e, em consequência, atividades e afinidades também diferentes.

Koshland (1958) propôs o modelo denominado “encaixe por indução”. Esse modelo sugere que, através da complexação enzima-substrato, o substrato induz uma ligeira mudança conformacional na subunidade da enzima com a qual interage. Essa mudança pode ser transmitida às subunidades vizinhas, induzindo na enzima a conformação responsável pelo processo catalítico (Figura I.3) (FABER, 2011).

Figura I.3- Modelo do “encaixe induzido” de Koshland.

E= enzima; S= substrato; P₁ e P₂= produtos

A teoria do encaixe induzido tem sido extensivamente utilizada para explicar a base da catálise enzimática frente a inúmeros substratos não-naturais (xenobióticos), que podem ser perfeitamente transformados por uma única enzima. Foi justamente o conceito de “flexibilidade catalítica” do sítio ativo que proporcionou um grande avanço da catálise enzimática, sobretudo na síntese assimétrica voltada para a produção de fármacos e outros reagentes quirais. Assim, as enzimas são macromoléculas altamente especializadas na catálise de reações químicas, promovendo reações de forma específica e termodinamicamente favorável. As enzimas podem ser também quimio-, regio- e enantiosseletivas frente às reações que catalisam (FABER, 2011).

A quimiosseletividade está relacionada ao fato das enzimas atuarem sobre um tipo de grupo funcional específico, possibilitando que outros grupos funcionais reativos presentes na mesma molécula permaneçam intactos. Como resultado, unicamente o produto de interesse é obtido sem a ocorrência de reações laterais. Já a regioseletividade relaciona-se com a capacidade das enzimas em distinguir grupos funcionais idênticos que estão situados em diferentes regiões da mesma molécula de substrato (SILVERMAN, 2000).

Um exemplo da quimio- e regioseletividade enzimática é a síntese biocatalítica da 11 α -hidroxiprogesterona, um esteróide muito empregado em terapia hormonal. Essa síntese consiste na hidroxilação da progesterona empregando-se o fungo *Rhizopus arrhizus* como catalisador. Essa bioconversão é quimiosseletiva, uma vez que as enzimas presentes no micro-organismo

progesterona

Rhizopus arrhizus
3 dias

11α-hidroxiprogesterona
70% de conversão

A enantiosseletividade enzimática é de extrema importância pois, embora pares de enantiômeros apresentem diferenças apenas na disposição de seus átomos no espaço, quando ligados a outras moléculas quirais, podem apresentar respostas biológicas muito distintas (MOLINARI *et al.*, 2007). Em compostos bioativos, como fármacos e agroquímicos, a atividade biológica pode depender da presença única ou predominante de um dos enantiômeros, enquanto o outro pode reduzir ou inibir sua atividade. Por exemplo, pode-se citar o propranolol, um fármaco anti-hipertensivo indicado para o tratamento e prevenção do infarto do miocárdio, da angina e de arritmias cardíacas. Sabe-se que o enantiômero (*S*)-propranolol é o ativo, sendo a forma (*R*) capaz de reduzir essa atividade. Uma das etapas para a síntese do (*S*)-propranolol consiste na resolução cinética do ($\pm$)-1-cloro-3-(naftalen-1-iloxi)propan-2-ol com a lipase de *Pseudomonas cepacia* (PCL) para a obtenção deste intermediário sintético na sua forma enantiomericamente pura com configuração (*S*) (Esquema I.3) (FÉRNANDEZ, 2006).

$$\text{rac-1-(2-chloro-1-hydroxyethyl) naphthalen-1-yl ether} \xrightarrow[\text{CH}_2\text{Cl}_2]{\text{PCL}} \text{(R)-1-(2-chloro-1-acetoxyethyl) naphthalen-1-yl ether} + \text{(S)-1-(2-chloro-1-hydroxyethyl) naphthalen-1-yl ether}$$

rac (R) (S) Rend = 48%
ee = 99%

Embora muitos fármacos ainda sejam empregados como racematos, esta situação encontra-se em constante mudança. Em 1992, o FDA (Food and Drug Administration- USA) adotou uma política que permite que as indústrias farmacêuticas desenvolvam fármacos na sua forma racêmica, desde que haja uma avaliação rigorosa das atividades biológicas dos seus enantiômeros individuais. Como consequência, muito se tem investido em resoluções cinéticas e induções assimétricas com enzimas, as quais podem produzir enantiômeros de forma altamente seletiva quando comparadas a processos químicos convencionais (FABER, 2011).

I.1.2- Resolução cinética ou quimio-enzimática

As enzimas aceleram as reações biocatalisadas por diminuírem a barreira energética existente entre o substrato e o produto, conhecida como energia de ativação. A origem deste poder catalítico está relacionada à capacidade enzimática de estabilizar o estado de transição da reação, o que ocorre devido às interações de orientação favorável existentes entre a enzima e o seu substrato. Dessa forma, é possível acelerar as velocidades das reações biocatalisadas da ordem de 10^{10} - 10^{23} (FABER, 2011).

Quando um substrato racêmico é submetido a uma reação enzimática, seus enantiômeros podem interagir com o catalisador quiral de formas diferentes, gerando dois estados de transição diastereoisoméricos com diferentes energias livre de Gibbs e, portanto, com diferentes velocidades de reação (Figura I.4) (GHANEM, 2007).

Figura I.4- Diagrama de energia para uma reação enantiosseletiva catalisada por uma enzima.

Como observado na Figura I.4, cada enantiômero do substrato racêmico (A e B) forma um estado de transição diferente com a enzima “Enz” ([EnzA]‡ e [EnzB]‡ respectivamente), sendo a energia de ativação de [EnzA]‡ maior que a energia de ativação de [EnzB]‡. Como consequência, o

enantiômero **B** será convertido no produto **Q** mais rapidamente que **A** no produto **P**. O valor dessa diferença de energia livre $\Delta\Delta G^\ddagger$ é uma medida direta da seletividade da reação, uma vez que determina a taxa de variação das velocidades de reação de **A** (v_A) e **B** (v_B) (Equação 1).

$$\Delta\Delta G^\ddagger = -RT \ln \frac{v_A}{v_B} \quad \text{Equação 1}$$

Esses valores de energia livre são de grande importância experimental, já que permitem prever a pureza enantiomérica dos produtos formados em uma resolução cinética. A eficiência ou grau de seletividade na obtenção preferencial de um dos enantiômeros é conhecido como excesso enantiomérico (*ee*) e é calculado da seguinte forma (Equação 2):

$$ee_{\text{substrato}} = \frac{(A - B)}{(A + B)} \times 100 \quad \text{ou} \quad ee_{\text{produto}} = \frac{(P - Q)}{(P + Q)} \times 100 \quad \text{Equação 2}$$

onde *A* e *B* são as concentrações relativas dos enantiômeros do substrato e *P* e *Q* são as concentrações relativas dos enantiômeros do produto.

A Tabela I.2 correlaciona alguns valores representativos do excesso enantiomérico para um produto com o respectivo $\Delta\Delta G^\ddagger$ da reação de resolução cinética de uma mistura racêmica catalisada por uma enzima (FABER, 2011).

Tabela I.2- Valores de $\Delta\Delta G^\ddagger$ e correspondentes taxas de velocidade (v_A/v_B) para determinação representativa da pureza enantiomérica de um produto (ee_{produto}) frente a uma reação biocatalisada.

$\Delta\Delta G^\ddagger$ (kcal mol ⁻¹)	v_A/v_B	ee_{produto} (%)
0,118	1,2	10
0,651	3	50
1,74	19	90
3,14	199	99
4,50	1999	99,9

Assim, nota-se que uma pequena diferença de energia livre $\Delta\Delta G^\ddagger$ entre os estados de transição diastereoisoméricos dos enantiômeros pode fornecer um valor de excesso enantiomérico considerável. Em uma resolução cinética ideal, a diferença nas velocidades de reação dos enantiômeros é tão grande ($\frac{v_A}{v_B} = 1999$) que um dos enantiômeros é convertido totalmente antes mesmo que o outro enantiômero comece a reagir, obtendo-se assim um *ee* = 99,9%.

Um parâmetro conhecido como razão enantiomérica “*E*” foi desenvolvido a fim de se avaliar a discriminação de uma enzima entre os dois enantiômeros de uma mistura racêmica durante uma reação biocatalisada. Para se determinar o valor de *E*, as constantes de velocidade da reação de

cada enantiômero são descritas pelos valores de k_{cat} (número de moléculas convertidas por segundo por molécula de enzima) e K_M (constante de saturação do substrato) (Equação 3):

$$E = \frac{v_R}{v_S} = \frac{(k_{cat} / K_M)_R}{(k_{cat} / K_M)_S} \quad \text{Equação 3}$$

Chen e col. (1982) desenvolveram uma equação que também pode ser utilizada para o cálculo do valor da razão enantiomérica E de uma reação irreversível, a partir dos valores experimentais da conversão da reação “c” (Equação 4) e dos excessos enantioméricos do substrato (ee_s) e do produto (ee_p) (Equação 5) (CHEN *et al.*, 1982).

$$c = \frac{ee_s}{ee_s + ee_p} \quad \text{Equação 4}$$

$$E = \frac{\ln [(1-c)(1+ee_s)]}{\ln [(1-c)(1-ee_p)]} \quad \text{Equação 5}$$

O cálculo da razão enantiomérica E é uma ferramenta muito valiosa, pois permite aos químicos avaliar a seletividade das resoluções quimio-enzimáticas utilizando somente dados de conversão e excesso enantiomérico, parâmetros que são facilmente mensuráveis através de análises cromatográficas (GC-FID e HPLC) com o emprego de colunas quirais.

A razão enantiomérica E é adimensional e permanece constante durante toda a reação, sendo determinada pelo ambiente do sistema, ou seja, a razão enantiomérica é uma característica própria do processo. Um valor elevado de E é essencial para o sucesso de uma resolução cinética, já que assegura não só um excesso enantiomérico elevado, mas também uma conversão proporcionalmente alta. Assim, para propósitos práticos, um valor de E abaixo de 10 torna inviável qualquer resolução cinética. Valores de E entre 10 e 30 são considerados razoáveis e, acima disto, é considerado excelente, o que permite garantir a eficiência da reação como um processo enantiosseletivo (CHEN *et al.*, 1982).

I.1.3- Lipases

As lipases são enzimas hidrolíticas que possuem massa molar em torno de 40 a 50 kDa, com aproximadamente 300 resíduos de aminoácidos. Em sua maioria, são enzimas extracelulares, o que favorece a sua extração, isolamento e purificação. Estão presentes em diversos organismos incluindo animais, plantas, fungos (*Aspergillus mucor*, *Rhizopus penicillium*, *Geotrichum* sp.),

leveduras (*Tulopsis* sp., *Candida* sp.) e bactérias (*Pseudomonas* sp., *Achromobacter* sp., *Staphylococcus* sp.) (WOOLEY *et al.*, 1994).

As lipases são empregadas principalmente em reações de esterificação, transesterificação e hidrólise de ésteres, sendo as enzimas de maior interesse prático em síntese, pois aceitam uma grande variedade de substratos, possuem uma estabilidade relativamente alta, não necessitam de cofatores e podem ser facilmente obtidas comercialmente e com produtividade elevada (JAEGER e EGGERT, 2002).

Todas as lipases cujas estruturas tem sido elucidadas são membros da família α,β -hidrolase pregueada, com uma arquitetura comum composta de uma sequência de fitas α -hélice e β -pregueada. Essas enzimas hidrolisam as ligações de ésteres e/ou amidas através de uma tríade catalítica composta de um resíduo de serina com caráter nucleofílico em conjunto com resíduos de histidina, aspartato ou glutamato (Ser-His-Asp/Glu) (Figura I.5).

Figura I.5- Representações gráficas tridimensionais das estruturas secundárias [a e b] e terciária [c] da lipase B de *Candida antarctica* (CALB) obtidas por raio-X (NELSON e COX, 2000).

Todos os membros da família de estrutura α,β -hidrolase possuem um mecanismo comum de esterificação de álcoois na presença de um reagente doador de agrupamento acila, o qual ocorre em três etapas (Esquema I.4):

(I) Inicialmente, o arranjo tridimensional dos aminoácidos pertencentes à tríade catalítica diminui o valor do pK_a do grupo hidroxila da serina presente no sítio catalítico, aumentando seu caráter nucleofílico. Assim, ocorre um ataque nucleofílico do oxigênio da hidroxila serínica ao grupo carbonílico do doador acila (no exemplo, o acetato de vinila), o que leva à formação de um intermediário tetraédrico conhecido como complexo acil-enzima, que é estabilizado por ligações de hidrogênio com os átomos de nitrogênio dos resíduos de aminoácidos de glicina e treonina;

(II) Em seguida, o intermediário tetraédrico se desfaz, formando o éster derivado da serina denominado de éster acil-enzima e liberando o álcool derivado do doador acila (neste caso é liberado o enol, que se encontra em equilíbrio tautomérico com o etanal);

(III) Na etapa seguinte, o intermediário acil-enzima reage com um dos enantiômeros do álcool racêmico que é usado como substrato, levando à formação seletiva do produto acetilado e

restabelecendo a tríade catalítica. O outro enantiômero do álcool não reage ou reage mais lentamente. Em uma resolução ideal, um dos enantiômeros do substrato racêmico é esterificado enquanto o outro permanece inalterado no meio reacional.

Esquema I.4- Ciclo catalítico de uma reação de acilação enantiosseletiva de um álcool secundário quiral catalisada pela CALB.

Em reações de biocatálise, o nucleófilo que promove o ataque ao intermediário acil-enzima (no caso acima, o álcool) pode ser substituído por outras espécies nucleofílicas, permitindo, assim, a síntese de uma diversidade de compostos orgânicos por métodos enzimáticos (Esquema I.5) (GHANEM, 2007).

Esquema I.5- Reações catalisadas por lipases com diferentes nucleófilos.

As lipases possuem um aspecto interessante em relação ao mecanismo de acesso do substrato ao sítio ativo, o qual apresenta uma espécie de “tampa” constituída por aminoácidos polares na parte externa e por aminoácidos apolares na parte interna. Quando estão em solução

aquosa, as lipases mantêm a “tampa” fechada, com a parte polar em contato com a água, impedindo assim o acesso das moléculas de substrato ao seu sítio ativo, o que faz com que a atividade das lipases seja relativamente baixa em solução aquosa. No entanto, na presença de solventes hidrofóbicos, a enzima sofre uma alteração conformacional que mantém a “tampa” na posição aberta, permitindo assim que o sítio ativo fique acessível ao substrato. Este fenômeno é conhecido como ativação interfacial e permite que as lipases sejam relativamente estáveis na presença de solventes orgânicos (Figura I.6) (CABRAL *et al.*, 2003).

Figura I.6- Ativação interfacial das lipases com interfaces hidrofóbicas (REBOCHO, 2008).

As reações empregando lipases em meio orgânico apresentam algumas vantagens, tais como (SCHMID e VERGER, 1998):

- a) Aumento da solubilidade de substratos apolares e/ou produtos hidrófobicos;
 - b) O baixo ponto de ebulição dos solventes orgânicos facilita a recuperação dos produtos formados nas reações;
 - c) A desnaturação das enzimas é minimizada em solventes orgânicos, uma vez que muitas das reações que causam a desnaturação enzimática são reações hidrolíticas;
 - d) Diminuição do risco de contaminação microbiana, devido à toxicidade dos solventes orgânicos frente aos micro-organismos;
 - e) Possibilidade de realizar reações que são termodinamicamente desfavoráveis em água.
- Por exemplo, no caso das hidrolases, que catalisam em meio aquoso as reações de hidrólise, é possível favorecer a reação inversa (de esterificação) no meio orgânico.

Assim, o emprego das lipases em síntese orgânica é muito útil, sobretudo como catalisadores enantiosseletivos em sínteses assimétricas, onde pode-se destacar o seu uso em resoluções cinéticas envolvendo a esterificação de álcoois ou a hidrólise de ésteres para a obtenção de compostos enantiomericamente puros (GHANEM, 2007).

As lipases são frequentemente utilizadas na esterificação enantiosseletiva de álcoois secundários. A resolução cinética de álcoois primários pode ser dificultada devido à facilidade de

esterificação desses substratos, o que pode acarretar em produtos de baixa pureza enantiomérica. Já, a resolução cinética de álcoois terciários é bem mais difícil de ser alcançada, sobretudo devido ao maior impedimento estérico existente nas moléculas desses substratos, o que dificulta o seu acesso ao sítio catalítico das enzimas. Alguns exemplos do emprego de lipases na síntese de álcoois enantiomericamente puros podem ser demonstrados:

a) Os norsesquiterpenos são compostos estruturalmente únicos, que apresentam importantes atividades biológicas, como antimicrobiana, antitumoral e anti-inflamatória. Uma das etapas para a síntese de norsesquiterpenos enantiomericamente puros consiste na resolução cinética do álcool primário ($\pm$)-2-*p*-tolil-hept-6-en-1-ol com a enzima PCL, para a obtenção de produtos enantioméricos puros como o (*R*)-2-*p*-tolil-hept-6-en-1-ol e o (*S*)-acetato de 2-*p*-tolil-hept-6-enila. A PCL é uma enzima que apresenta alta enantiosseletividade frente a álcoois primários. Nesse caso, por exemplo, a reação apresentou uma razão enantiomérica $E = 331$, o que caracteriza uma resolução cinética altamente seletiva (Esquema I.6) (GHANEM, 2007).

Esquema I.6- Resolução cinética por transesterificação de álcool primário catalisada pela PCL.

b) Álcoois secundários são frequentemente empregados, com bons resultados, em resoluções cinéticas catalisadas por diversas lipases. Por exemplo, pode-se citar a resolução cinética do ($\pm$)-mandelato de metila catalisada pela enzima CALB. O (*R*)-mandelato de metila obtido na resolução é empregado na síntese do (*R*)-(-)-ácido mandélico, um composto de interesse para as indústrias de cosméticos, uma vez que promove a regeneração do colágeno e da elastina da pele, sendo empregado em produtos para o tratamento dos sinais da idade (Esquema I.7).

Esquema I.7- Síntese do (*R*)-ácido mandélico via resolução cinética do ($\pm$)-mandelato de metila pela CALB.

enzimática”, a qual é constituída por duas cavidades de tamanhos diferentes, uma grande (G) e outra pequena (P) (ANTHONSEN e HOFF, 1998).

Kazlauskas (1991) desenvolveu uma regra empírica que relaciona a existência dessa “zona de estereo-especificidade enzimática” com a alta capacidade da CALB em discriminar os enantiômeros de substratos racêmicos, sobretudo de álcoois secundários. Assim, segundo a regra postulada por Kazlauskas, na resolução cinética de álcoois secundários pela CALB, o enantiômero que reage mais rapidamente, normalmente o de configuração *R*, posiciona seus grupos substituintes de tamanho *grande* e *pequeno* nas cavidades *grande* e *pequena* do sítio ativo, respectivamente, apresentando assim um encaixe que favorece preferencialmente a sua conversão. O enantiômero mais lento, de configuração *S*, fica estericamente mais impedido e é forçado a acomodar seu grupo substituinte grande na cavidade pequena, desfavorecendo sua ligação ao sítio ativo e retardando a sua conversão (Figura I.7) (FABER, 2011).

Figura I.7- (a) Encaixe do enantiômero mais rápido e (b) encaixe do enantiômero mais lento, no sítio ativo da CALB de acordo com a regra de Kazlauskas.

As diferentes disposições dos grupos G e P nas Figuras **I.7a** e **I.7b** correspondem aos enantiômeros de configuração *R* e *S*, respectivamente, desde que apresentem as mesmas prioridades nas atribuições da configuração absoluta segundo à Regra de Cahn-Ingold-Prelog.

Assim, de acordo com a Regra de Kazlauskas, quanto maior for a diferença de “tamanho” entre os grupos substituintes de um álcool secundário, maior será a diferença entre as velocidades de conversão dos enantiômeros e, portanto, mais enantiosseletiva será a resolução enzimática. Por exemplo, no trabalho realizado por Jacobsen e col. (2003) sobre a resolução cinética de álcoois secundários por transesterificação com a CALB, pode-se destacar que a reação com o substrato 1-fenoxibutan-2-ol, onde o grupo substituinte é uma etila ($R = CH_3$) apresentou uma elevada razão enantiomérica $E = 460$, sendo a reação altamente enantiosseletiva. Já, a reação com o álcool 1-fenoxipentan-2-ol, que apresenta o grupo propila como um substituinte mais volumoso ($R = CH_2CH_3$), apresentou um menor valor de razão enantiomérica $E = 20$, o que caracteriza uma resolução pouco enantiosseletiva (Esquema I.9) (JACOBSEN *et al.*, 2003).

Esquema I.9- Resolução cinética de álcoois secundários pela CALB.

Como demonstrado, a CALB tem sido amplamente empregada em resoluções cinéticas para a obtenção de álcoois enantiomericamente puros ou enriquecidos, apresentando bons resultados. Nesse contexto, pode-se destacar a resolução cinética de haloidrinas, que são β -halo-álcoois que apresentam um átomo de halogênio (F, Cl, Br, I) e um grupo hidroxila ligados a carbonos vicinais. As haloidrinas podem ser facilmente obtidas a partir de epóxidos, através da abertura do anel oxirano por haletos de hidrogênio (Esquema I.10) (RANU *et al.*, 2005).

Esquema I.10- Esquema geral da síntese e resolução cinética de haloidrinas a partir de epóxidos.

Haloidrinas e epóxidos são reagentes conhecidos como “*chiral building blocks*” ou “*synthons*”, por serem compostos amplamente empregados como fragmentos na síntese de moléculas bioativas como fármacos e agroquímicos, o que desperta o interesse na obtenção desses compostos como enantiômeros puros. Como exemplo, pode-se citar a síntese do *Hennoxazole A*, um importante agente antiviral que combate o vírus causador da herpes tipo 1, além de apresentar atividade analgésica. A síntese do *Hennoxazole A* requer como “*synthon*” o (*S*)-2-(1,3-ditian-2-il)metiloxirano, o qual pode ser sintetizado através da ciclização da cloroidrina (*S*)-1-cloro-3-(1,3-ditian-2-il)propan-2-ol, que é obtida com elevada pureza enantiomérica (*ee* = 99%) através da resolução cinética do seu racemato com a CALB (Esquema I.11) (SUNDBY *et al.*, 2004).

Esquema I.11- Resolução cinética de halodrina racêmica com a CALB para a síntese do Hennoxazole A.

Assim, pode-se comprovar a eficiência do emprego de enzimas na resolução cinética de álcoois racêmicos e halodrinhas racêmicas. Estes resultados despertam o interesse no desenvolvimento de novas metodologias biocatalíticas, mais eficientes, seletivas e ambientalmente aceitáveis, para serem empregadas na síntese assimétrica de uma diversidade de compostos orgânicos.

I.2- OBJETIVOS

Geral

O objetivo deste trabalho foi realizar um estudo sobre a resolução cinética de uma série de haloidrinas racêmicas, utilizando-se a CALB como catalisador, a fim de se obter as haloidrinas e seus respectivos acetatos em formas enantioméricas puras ou enriquecidas.

Objetivos específicos

- ✓ Sintetizar as haloidrinas (cloroidrinas e bromoidrinas) racêmicas a partir dos epóxidos comerciais 2-(benziloximetil)-oxirano, 2-[(4-metoxifenoxi)metil]oxirano e 2-(aliloximetil)-oxirano;
- ✓ Sintetizar os acetatos das haloidrinas racêmicas para serem empregados como padrões nas análises por cromatografia a gás;
- ✓ Realizar a resolução cinética das haloidrinas racêmicas com a enzima CALB;
- ✓ Isolar, purificar e caracterizar os produtos obtidos nas resoluções cinéticas, determinando-se os rendimentos, os excessos enantioméricos e as configurações absolutas dos compostos;
- ✓ Calcular as razões enantioméricas (*E*) para as diferentes resoluções cinéticas, analisando-se a influência das estruturas químicas dos substratos.

I.3- PARTE EXPERIMENTAL

Materiais e equipamentos utilizados

A descrição dos materiais e equipamentos utilizados encontra-se em anexo (Capítulo III).

I.3.1- Síntese de haloidrinas racêmicas a partir de epóxidos

Os epóxidos comerciais **1-3** foram utilizados na síntese das haloidrinas racêmicas **4-6** empregadas como substratos nas resoluções cinéticas com a CALB (Esquema I.12).

Esquema I.12- Síntese de haloidrinas racêmicas a partir de epóxidos.

As reações foram realizadas em balões de 100 mL, sob agitação magnética e à temperatura ambiente, por 40 min. Para cada reação adicionou-se o epóxido (10 mmol), CH_2Cl_2 (10 mL) e HCl 36% (3 mL) ou HBr 48% (3 mL). Após a reação ter sido completada, a mistura reacional foi lavada com uma solução saturada de NaHCO_3 até a neutralização do meio e então extraída com CH_2Cl_2 (3 x 20 mL). À fase orgânica, adicionou-se Na_2SO_4 anidro, filtrou-se e evaporou-se o solvente. Os produtos obtidos foram purificados por cromatografia em coluna (CC) utilizando-se sílica gel como fase estacionária e misturas de hexano e acetato de etila nas proporções 9:1 ou 8:2 como eluentes. A caracterização dos compostos **4a-6a** e **4b-6b** foi realizada por espectroscopia na região do infravermelho (IV), ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN de ^1H) e de carbono (RMN de ^{13}C) e é apresentada a seguir:

(*RS*)-1-benziloxi-3-cloropropan-2-ol (**4a**)

Rendimento: 84%. Óleo amarelado. **RMN de ^1H** (CDCl_3 , 200 MHz) δ = 7,34 (m, 3H); 7,26 (m, 2H); 4,57 (s, 2H); 3,66-3,59 (m, 5H); 2,04 (s, 1H).

RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 50 MHz): 133,0; 128,5 (2C); 127,9; 127,7 (2C); 73,5; 70,7; 70,3; 46,0. **IV** filme em pastilha de silício (cm^{-1}): 3400 (O-H).

(*RS*)-1-benziloxi-3-bromopropan-2-ol (4b)

Rendimento: 72%. Óleo amarelado. **RMN de ^1H** (CDCl_3 , 200 MHz) δ = 7,34 (m, 3H); 7,22 (m, 2H); 4,57 (s, 2H); 3,70-3,55 (m, 5H); 2,10 (s, 1H).

RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 50 MHz): 134,7; 128,5 (2C); 127,9; 127,8 (2C); 73,5; 71,4; 69,9; 35,1. **IV** filme em pastilha de silício (cm^{-1}): 3450 (O-H).

(*RS*)-1-cloro-3-(4-metoxifenoxi)propan-2-ol (5a)

Rendimento: 80%. Óleo incolor. **RMN de ^1H** (CDCl_3 , 200 MHz) δ = 6,85 (s, 4H); 4,19 (m, 1H); 4,03 (d, J = 6, 2H); 3,77 (s, 3H); 3,73 (m, 2H); 2,64 (sl, 1H). **RMN de ^{13}C** (CDCl_3 , 50 MHz): 154,3; 152,4; 115,6

(2C); 114,7 (2C); 69,9; 69,3; 55,7; 45,9. **IV** filme em pastilha de silício (cm^{-1}): 3500 (O-H).

(*RS*)-1-bromo-3-(4-metoxifenoxi)propan-2-ol (5b)

Rendimento: 70%. Óleo incolor. **RMN de ^1H** (CDCl_3 , 200 MHz) δ = 6,84 (s, 4H); 4,17 (m, 1H); 4,04 (dd, J = 4 e 2, 2H); 3,76 (s, 3H); 3,66-3,53 (m, 2H); 2,34 (sl, 1H). **RMN de ^{13}C** (CDCl_3 , 50 MHz): 154,3;

152,3; 115,6 (2C); 114,7 (2C); 69,9; 69,5; 55,7; 34,9. **IV** filme em pastilha de silício (cm^{-1}): 3300 (O-H).

(*RS*)-1-aliloxi-3-cloro-propan-2-ol (6a)

Rendimento: 96%. Óleo incolor. **RMN de ^1H** (CDCl_3 , 200 MHz) δ = 5,90 (m, 1H); 5,35 (dd, J = 18 e 4, 2H); 4,10 (dt, J = 6 e 2, 2H); 4,03 (m, 1H); 3,65-

3,45 (m, 4H); 2,40 (1sl, 1H). **RMN de ^{13}C** (CDCl_3 , 50 MHz): 134,2; 117,5; 72,4; 71,7; 70,5; 46,8. **IV** filme em pastilha de silício (cm^{-1}): 3480 (O-H).

(*RS*)-1-aliloxi-3-bromo-propan-2-ol (6b)

Rendimento: 76%. Óleo incolor. **RMN de ^1H** (CDCl_3 , 200 MHz) δ = 6,00-

5,81 (m, 1H); 5,25 (td, J = 18, 10, 2; 2H); 4,04 (dt, J = 6 e 2, 2H); 3,96 (m, 1H); 3,58-3,42 (m, 4H); 2,36 (1sl, 1H). **RMN de ^{13}C** (CDCl_3 , 50 MHz): 134,2; 117,6; 72,4; 71,3; 69,9; 35,0. **IV** filme em pastilha de silício (cm^{-1}): 3400 (O-H).

I.3.2- Síntese de acetatos racêmicos a partir de haloidrinas

Os acetatos racêmicos **7(a,b)**-**9(a,b)** foram sintetizados a partir das haloidrinas **4(a,b)**-**6(a,b)**, para serem empregados como padrões nas análises por cromatografia a gás (GC-FID), (Esquema I.13).

Esquema I.13- Síntese de acetatos racêmicos a partir de haloidrinas.

As reações foram realizadas em balões de 25 mL, adicionando-se a haloidrina **4(a,b)**-**6(a,b)** (2 mmol), anidrido acético (300 µL) e piridina (300 µL) e mantendo-se sob agitação magnética por 24 h. Posteriormente, adicionou-se HCl 10% (10 mL). Extraíu-se com 10 mL de acetato de etila e ajustou-se o pH da fase orgânica para 7. Extraíu-se novamente com acetato de etila (5 mL). À fase orgânica, adicionou-se Na₂SO₄ anidro, filtrou-se e evaporou-se o solvente. Os produtos obtidos foram purificados por CC utilizando-se sílica gel como fase estacionária e misturas de hexano e acetato de etila nas proporções 9:1 ou 8:2 como eluentes. A caracterização dos compostos **7a-9a** e **7b-9b** foi realizada por IV, RMN de ¹H e RMN de ¹³C e é apresentada a seguir:

(*RS*)- acetato de-1-benziloxi-3-cloropropan-2-ila (**7a**)

Rendimento: 84%. Óleo amarelado. **RMN de ¹H** (CDCl₃, 200 MHz) δ = 7,50-7,25 (m, 5H); 5,15 (m, 1H); 4,62 (s, 2H); 3,86-3,60 (m, 4H); 2,13 (s, 3H). **RMN de ¹³C** (CDCl₃, 50 MHz): 170,2; 137,6; 128,4 (2C); 127,8; 127,7 (2C); 73,4; 71,7; 68,1; 42,7; 20,9. **IV** filme em pastilha de silício (cm⁻¹): 1746 (C=O).

(*RS*)-acetato-1-benziloxi-3-bromopropan-2-ila (**7b**)

Rendimento: 80%. Óleo amarelado. **RMN de ¹H** (CDCl₃, 200 MHz) δ = 7,33-7,26 (m, 5H); 5,17 (m, 1H); 4,70 (s, 2H); 3,90-3,70 (m, 4H); 2,20 (s, 3H). **RMN de ¹³C** (CDCl₃, 50 MHz): 170,2; 137,6; 128,4 (2C); 127,8; 127,6 (2C); 73,4; 71,7; 68,1; 32,6; 20,9. **IV** filme em pastilha de silício (cm⁻¹): 1750 (C=O).

(*RS*)-acetato-1-cloro-3-(4-metoxifenoxi)propan-2-ila (8a)

 Rendimento: 90%. Óleo incolor. **RMN de ^1H** (CDCl_3 , 200 MHz) δ = 6,85 (s, 4H); 5,30 (m, 1H); 4,12 (d, J = 6, 2H); 3,85 (m, 2H); 3,77 (s, 3H); 2,11 (s, 3H). **RMN de ^{13}C** (CDCl_3 , 50 MHz): 170,2; 154,3; 152,4; 115,6 (2C); 114,7 (2C); 73,4; 69,3; 55,7; 45,9; 20,9. **IV** filme em pastilha de silício (cm^{-1}): 1731 (C=O).

(*RS*)-acetato-1-bromo-3-(4-metoxifenoxi)propan-2-ila (8b)

 Rendimento: 70%. Óleo incolor. **RMN de ^1H** (CDCl_3 , 200 MHz) δ = 6,80 (s, 4H); 5,32 (m, 1H); 4,20 (d, 2H); 3,87 (m, 2H); 3,68 (s, 3H); 2,40 (s, 3H). **RMN de ^{13}C** (CDCl_3 , 50 MHz): 171,1; 154,2; 152,4; 117,6 (2C); 115,7 (2C); 72,4; 68,1; 55,7; 35,0; 20,3. **IV** filme em pastilha de silício (cm^{-1}): 1741 (C=O).

(*RS*)-acetato-1-aliloxi-3-cloro-propan-2-ila (9a)

 Rendimento: 92%. Óleo incolor. **RMN de ^1H** (CDCl_3 , 200 MHz) δ = 5,90 (m, 1H); 5,30 (d, J = 4, 2H); 4,52 (m, 1H); 4,10 (d, J = 2, 2H); 3,65 (m, 4H); 2,30 (1s, 3H). **RMN de ^{13}C** (CDCl_3 , 50 MHz): 134,1; 117,5; 72,3; 71,6; 68,0; 42,7; 20,9. **IV** filme em pastilha de silício (cm^{-1}): 1712 (C=O).

(*RS*)-acetato-1-aliloxi-3-bromo-propan-2-ila (9b)

 Rendimento: 70%. Óleo incolor. **RMN de ^1H** (CDCl_3 , 200 MHz) δ = 5,95 (m, 1H); 5,40 (d, J = 4, 2H); 4,50 (m, 1H); 4,15 (d, J = 2, 2H); 3,60 (m, 4H); 2,30 (1s, 3H). **RMN de ^{13}C** (CDCl_3 , 50 MHz): 170,2; 137,6; 117,6; 73,4; 72,4; 71,3; 34,2; 20,9. **IV** filme em pastilha de silício (cm^{-1}): 1741 (C=O).

I.3.3- Resolução cinética das haloidrinas 4(a,b)-6(a,b) pela CALB

Na resolução cinética das haloidrinas **4(a,b)-6(a,b)** foi utilizado como biocatalisador a enzima CALB, a qual é produzida industrialmente através de um processo fermentativo com os fungos modificados geneticamente *Aspergillus niger* ou *A. oryzae*. Posteriormente, a lipase produzida é separada do micro-organismo e purificada, sendo então adsorvida em uma resina acrílica macroporosa e comercializada na forma imobilizada.

Em frascos Erlenmeyer de 50 mL foram adicionados hexano (2 mL), acetato de vinila (0,5 mL), CALB (40 mg) e a halodrina **4(a,b)-6(a,b)** (0,2 mmol). As reações foram levadas ao agitador orbital (150 rpm, 32°C) e monitoradas por GC-FID com coluna quiral. Para o isolamento dos produtos formados, as reações foram realizadas em quintuplicata, tendo sido interrompidas após atingir uma conversão de aproximadamente 50%. As misturas reacionais foram filtradas em papel filtro para a separação da enzima e o solvente foi evaporado em rota-evaporador. Os produtos obtidos foram purificados por CC utilizando-se sílica gel como fase estacionária e misturas de hexano e acetato de etila nas proporções 9:1 ou 8:2 como eluentes (Esquema I.14).

Esquema I.14- Resolução cinética de halodrinas **4(a,b)-6(a,b)** pela CALB.

I.3.4- Derivatização dos acetatos **9a** e **9b** no epóxido **3** para determinação da configuração absoluta

Em um balão de 10 mL foram adicionados o acetato (0,5 mmol), etanol 95% (0,5 mL) e LiOH (40 mg, 2 mmol). A reação foi mantida sob agitação magnética por 24 h à temperatura ambiente. Posteriormente, a mistura reacional foi diluída com água, o etanol foi evaporado em rota-evaporador e os produtos formados foram extraídos com éter (2 x 20 mL). À fase orgânica, adicionou-se Na₂SO₄ anidro, filtrou-se e evaporou-se o solvente. Os produtos obtidos foram analisados por GC-FID (Esquema I.15).

Esquema I.15- Derivatização dos acetatos **9a** e **9b** no epóxido **3**.

I.4- RESULTADOS E DISCUSSÕES

As resoluções cinéticas das haloidrinas racêmicas catalisadas pela CALB foram monitoradas por GC-FID, determinando-se as concentrações percentuais relativas das haloidrinas e dos acetatos formados. Os excessos enantioméricos foram calculados somente para os acetatos, uma vez que as haloidrinas não apresentaram separação enantiomérica na coluna quiral empregada (CP-Chirasil-Dex CB). As reações foram realizadas em quintuplicata, sendo interrompidas quando a concentração dos produtos formados foi próxima de 50%, para a determinação dos rendimentos, excessos enantioméricos e configurações absolutas dos compostos obtidos.

I.4.1- Resolução cinética do (*RS*)-1-benziloxi-3-cloropropan-2-ol (**4a**)

Os cromatogramas e os dados obtidos na resolução cinética da cloridrina **4a** são apresentados a seguir (Figura I.8; Tabela I.3).

Figura I.8- Cromatogramas obtidos por GC-FID para a resolução cinética da halodrina **4a** com a CALB.

(A) Padrão da cloridrina **4a**; (B) Padrão do acetato **7a**; Esterificação da cloridrina **4a** com a CALB por (C) 4h de reação, (D) 16h de reação, (E) 19h de reação; (F) Acetato **7a** obtido na reação de 16h; (G) Derivatização da cloridrina **4a** obtida na reação de 16h via reação de acetilação.

Condições de análise: T_i = 160°C; T_f = 200°C; r = 2°C/min; coluna CP-Chirasil-Dex CB.

Tabela I.3- Resolução cinética da haloidrina racêmica **4a** com a CALB.^a

Tempo (h)	c (%) 4a	ee (%) 4a	c.a. 4a	c (%) 7a	ee (%) 7a	c.a. 7a	<i>E</i>
4	87	-	-	13	> 99	(<i>S</i>)	-
7	84	-	-	16	77	(<i>S</i>)	-
9	83	-	-	17	70	(<i>S</i>)	-
16	44	42*	(<i>R</i>)	56	58	(<i>S</i>)	5,6
17	41	-	-	59	47	(<i>S</i>)	-
19	27	-	-	73	31	(<i>S</i>)	-

^acondições de reação: 2 mL de hexano; 0,5 mL de acetato de vinila; 40 mg de CALB; 0,2 mmol de haloidrina **4a**; 150 rpm; 32°C; c (%) = concentração determinada por GC-FID; ee (%) = excesso enantiomérico; c.a.= configuração absoluta; *E* = razão enantiomérica.

*ee determinado após derivatização via reação de acetilação.

A CALB catalisou a esterificação da haloidrina **4a** no respectivo acetato **7a**. Verificou-se que no intervalo de tempo até 4 h de reação, somente o acetato (*S*)-**7a** foi formado ($ee_{\text{acetato}} > 99\%$), embora com uma concentração baixa ($c = 13\%$). Após esse intervalo, observou-se também a formação do acetato (*R*)-**7a**. As concentrações relativas da haloidrina **4a** e do acetato **7a** foram próximas de 50% ($c = 44\%$, **4a**; $c = 56\%$, **7a**) em 16h de reação. Nessas condições, a haloidrina (*R*)-**4a** foi obtida com rendimento de 40% e $ee = 42\%$ (calculado por derivatização via acetilação) e o acetato (*S*)-**7a** foi obtido com 41% de rendimento e $ee = 58\%$ (Esquema I.16).

Esquema I.16- Esterificação da haloidrina racêmica **4a** com a CALB em 16h.

Determinou-se a razão enantiomérica para esta resolução $E = 5,6$, o que caracteriza uma resolução cinética ineficiente ($E < 10$), uma vez que a reação com a CALB foi pouco enantiosseletiva frente à esterificação da haloidrina **4a**, gerando compostos de purzas enantioméricas moderadas ($ee = 42\%$, **4a**; $ee = 58\%$, **7a**).

I.4.2- Resolução cinética do (*RS*)-1-benziloxi-3-bromopropan-2-ol (**4b**)

Os cromatogramas e os dados obtidos na resolução cinética da bromoidrina **4b** são apresentados a seguir (Figura I.9; Tabela I.4).

Figura I.9- Cromatogramas obtidos por GC-FID para a resolução cinética da haloidrina **4b** com a CALB.

(A) Padrão da bromoidrina **4b**; (B) Padrão do acetato **7b**; Esterificação da bromoidrina **4b** com a CALB por (C) 23h de reação, (D) 28h de reação, (E) 34h de reação; (F) Acetato **7b** obtido na reação de 28h; (G) Derivatização da bromoidrina **4b** obtida na reação de 28h via reação de acetilação.

Condições de análise: T_i = 160°C; T_f = 200°C; r = 2°C/min; coluna CP-Chirasil-Dex CB.

Tabela I.4- Resolução cinética da haloidrina racêmica **4b** com a CALB.^a

Tempo (h)	c (%) 4b	ee (%) 4b	c.a. 4b	c (%) 7b	ee (%) 7b **	c.a. 7b	<i>E</i>
10	92	-	-	8	94	(<i>S</i>)	-
16	84	-	-	16	78	(<i>S</i>)	-
23	62	-	-	38	62	(<i>S</i>)	-
28	54	33*	(<i>R</i>)	46	52	(<i>S</i>)	4,3
34	42	-	-	58	45	(<i>S</i>)	-
38	38	-	-	62	41	(<i>S</i>)	-

^acondições de reação: 2 mL de hexano; 0,5 mL de acetato de vinila; 40 mg de CALB; 0,2 mmol de haloidrina **4b**; 150 rpm; 32°C; c (%) = concentração determinada por GC-FID; ee (%) = excesso enantiomérico; c.a.= configuração absoluta; *E* = razão enantiomérica.

*ee determinado após derivatização via reação de acetilação.

** cálculo aproximado do ee **7b**.

A CALB também promoveu a esterificação da haloidrina **4b** no respectivo acetato **7b**, embora a conversão da bromoidrina **4b** tenha ocorrido mais lentamente que a conversão da cloroidrina **4a**. O cálculo do ee do acetato **7b** apresentou valores aproximados já que não foi observada uma boa separação enantiomérica deste composto na coluna quiral disponível. As concentrações relativas da haloidrina **4b** e do acetato **7b** foram próximas de 50% (c = 54%, **4b**; c = 46%, **7b**) em 28h de reação. Nessas condições, a haloidrina (*R*)-**4b** foi obtida com rendimento de 32% e ee = 33% (calculado por derivatização via acetilação) e o acetato (*S*)-**7b** foi obtido com 41% de rendimento e ee = 52% (Esquema I.17).

Esquema I.17- Esterificação da haloidrina racêmica **4b** com a CALB em 28h.

Determinou-se a razão enantiomérica para esta resolução *E* = 4,3, o que caracteriza uma resolução cinética ineficiente (*E* < 10), com a formação de produtos com baixos excessos enantioméricos (ee = 33%, **4b**; ee = 52%, **7b**). Verificou-se que a razão enantiomérica para a resolução cinética da bromoidrina **4b** (*E* = 4,3) foi ligeiramente menor que a razão enantiomérica para a resolução cinética da cloroidrina **4a** (*E* = 5,6), embora ambas as resoluções tenham sido pouco enantiosseletivas.

I.4.3- Resolução cinética do (*RS*)-1-cloro-3-(4-metoxifenoxi)propan-2-ol (**5a**)

Os cromatogramas e os dados obtidos na resolução cinética da cloridrina **5a** são apresentados a seguir (Figura I.10; Tabela I.5).

Figura I.10- Cromatogramas obtidos por GC-FID para a resolução cinética da haloidrina **5a** com a CALB.

(A) Padrão da cloridrina **5a**; (B) Padrão do acetato **8a**; Esterificação da cloridrina **5a** com a CALB por (C) 2h de reação, (D) 4h de reação, (E) 5h de reação, (F) 7h de reação; (G) Acetato **8a** obtido na reação de 4h; (H) Derivatização da cloridrina **5a** obtida na reação de 4h via reação de acetilação.

Condições de análise: $T_i = 160^\circ\text{C}$; $T_f = 200^\circ\text{C}$; $r = 2^\circ\text{C}/\text{min}$; coluna CP-Chirasil-Dex CB.

Tabela I.5- Resolução cinética da halodrina racêmica **5a** com a CALB.^a

Tempo (h)	c (%) 5a	ee (%) 5a	c.a. 5a	c (%) 8a	ee (%) 8a	c.a. 8a	<i>E</i>
1	85	-	-	15	>99	(<i>S</i>)	-
2	71	-	-	29	>99	(<i>S</i>)	-
3	62	-	-	38	>99	(<i>S</i>)	-
4	47	40*	(<i>R</i>)	53	97	(<i>S</i>)	98
5	42	-	-	58	92	(<i>S</i>)	-
7	34	-	-	66	86	(<i>S</i>)	-

^acondições de reação: 2 mL de hexano; 0,5 mL de acetato de vinila; 40 mg de CALB; 0,2 mmol de halodrina **5a**; 150 rpm; 32°C; c (%) = concentração determinada por GC-FID; ee (%) = excesso enantiomérico; c.a. = configuração absoluta; *E* = razão enantiomérica.

*ee determinado após derivatização via reação de acetilação.

Observou-se que a CALB esterificou enantiosseletivamente a halodrina **5a**, fornecendo o acetato (*S*)-**8a** com elevada pureza enantiomérica. Verificou-se que no intervalo de tempo até 3h de reação, somente o acetato (*S*)-**8a** foi formado ($ee_{\text{acetato}} > 99\%$), apresentando uma concentração moderada (c = 38%). Após esse intervalo, observou-se uma formação mais lenta do acetato (*R*)-**8a**, permitindo assim uma boa resolução enantiomérica do acetato formado. As concentrações relativas da halodrina **5a** e do acetato **8a** foram próximas de 50% (c = 47%, **5a**; c = 53%, **8a**) em 4h de reação. Nessas condições, a halodrina (*R*)-**5a** foi obtida com rendimento de 46% e ee = 40% (calculado por derivatização via acetilação) e o acetato (*S*)-**8a** foi obtido com 40% de rendimento e ee = 97% (Esquema I.18).

Esquema I.18- Esterificação da halodrina racêmica **5a** com a CALB em 4h.

A razão enantiomérica calculada para essa resolução foi $E = 98$, o que caracteriza uma resolução cinética altamente enantiosseletiva, com a obtenção do acetato **8a** com um elevado excesso enantiomérico $ee = 97\%$. Dessa forma, a CALB foi um catalisador eficiente para a resolução cinética da halodrina **5a**.

I.4.4- Resolução cinética do (*RS*)-1-bromo-3-(4-metoxifenoxi)propan-2-ol (**5b**)

O acompanhamento da resolução cinética da halodrina **5b** com a CALB foi realizado por GC-FID. Não foi possível monitorar esta reação com o uso da coluna quiral, uma vez que a halodrina **5b** e o acetato **8b** apresentaram tempos de retenção muito próximos e os sinais nos cromatogramas apareciam sobrepostos. Assim, optou-se pelo uso da coluna aquiral DB-5, a qual permitiu a determinação das concentrações percentuais relativas da halodrina **5b** e do acetato **8b** durante a reação de transesterificação com a CALB. Os cromatogramas e os dados obtidos na resolução cinética da bromodrina **5b** são apresentados a seguir (Figura I.11; Tabela I.6).

Figura I.11- Cromatogramas obtidos por GC-FID para a resolução cinética da halodrina **5b** com a CALB.

(A) Padrão da bromodrina **5b**; (B) Padrão do acetato **8b**; (C) Esterificação da bromodrina **5b** com a CALB em 33h. Condições de análise: $T_i = 90^\circ\text{C}$; $T_f = 160^\circ\text{C}$; $r = 2^\circ\text{C}/\text{min}$; coluna DB-5.

Tabela I.6- Resolução cinética da halodrina racêmica **5b** com a CALB.^a

$ \begin{array}{c} \text{H}_3\text{CO}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{O}-\text{CH}(\text{OH})-\text{CH}_2\text{Br} \\ \text{(rac) 5b} \end{array} \xrightarrow[\text{acetato de vinila}]{\text{lipase CALB}} \begin{array}{c} \text{H}_3\text{CO}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{O}-\text{CH}(\text{OH})-\text{CH}_2\text{Br} \\ \text{(R) 5b} \end{array} + \begin{array}{c} \text{H}_3\text{CO}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{O}-\text{CH}(\text{OAc})-\text{CH}_2\text{Br} \\ \text{(S) 8b} \end{array} $							
Tempo (h)	c (%) 5b	ee (%) 5b	c.a. 5b	c (%) 8b	ee (%) 8b	c.a. 8b	<i>E</i>
10	89	-	-	11	-	-	-
15	81	-	-	19	-	-	-
22	78	-	-	22	-	-	-
33	47	28*	(<i>R</i>)	53	67	(<i>S</i>)	6,6
39	38	-	-	62	-	-	-

^a condições de reação: 2 mL de hexano; 0,5 mL de acetato de vinila; 40 mg de CALB; 0,2 mmol de halodrina **5b**; 150 rpm; 32°C ; c (%) = concentração determinada por GC-FID; ee (%) = excesso enantiomérico; c.a. = configuração absoluta; *E* = razão enantiomérica.

*ee determinado após derivatização via reação de acetilação.

Em 33h de reação, as concentrações relativas da haloidrina **5b** e do acetato **8b** foram próximas de 50% ($c = 46\%$, **5b**; $c = 54\%$, **8b**). Nessas condições, a reação foi realizada em quintuplicata e os produtos formados foram purificados por CC, sendo posteriormente analisados por GC-FID com coluna quiral para a determinação dos excessos enantioméricos dos produtos. A haloidrina (*R*)-**5b** foi obtida com rendimento de 40% e $ee = 28\%$ (calculado por derivatização via acetilação) e o acetato (*S*)-**8b** foi obtido com 38% de rendimento e $ee = 67\%$. Os cromatogramas obtidos são apresentados na Figura I.12.

Figura I.12- Cromatogramas obtidos por GC-FID para a resolução cinética da haloidrina **5b** com a CALB.

(D) Padrão da bromoidrina **5b**; **(E)** Padrão do acetato **8b**; **(F)** Acetato **8b** obtido na reação de 33h; **(G)** Derivatização da bromoidrina **5b** obtida na reação de 33h via reação de acetilação.

Condições de análise: $T_i = 160^\circ\text{C}$; $T_f = 200^\circ\text{C}$; $r = 2^\circ\text{C}/\text{min}$; coluna CP-Chirasil-Dex CB.

A CALB foi capaz de promover a esterificação da haloidrina **5b** no acetato **8b**. O cálculo do ee do acetato **8b** apresenta um valor aproximado já que não foi observada uma boa separação enantiomérica deste composto na coluna quiral disponível. Comparando-se a resolução cinética da bromoidrina **5b** com a resolução cinética da cloroidrina **5a**, verificou-se uma grande diferença nos tempos de reação (t), já que as reações apresentaram uma conversão de aproximadamente 50% em $t = 3\text{h}$ para a cloroidrina **5a** e $t = 33\text{h}$ para a bromoidrina **5b**. Além disso, enquanto a resolução cinética da cloroidrina **5a** demonstrou-se altamente enantiosseletiva, fornecendo o acetato (*S*)-**8a** com um ótimo $ee = 97\%$, a resolução da bromoidrina **5b** apresentou-se menos seletiva, fornecendo o acetato (*S*)-**8b** com um moderado $ee = 67\%$ (Esquema I.19).

Esquema I.19- Esterificação da halodrina racêmica **5b** com a CALB em 33h.

A razão enantiomérica calculada para a resolução cinética da halodrina **5b** com a CALB foi de $E = 6,6$, o que caracteriza uma resolução cinética ineficiente ($E < 10$).

I.4.5- Resolução cinética do (*RS*)-1-aliloxi-3-cloropropan-2-ol (**6a**)

Os sinais obtidos nos cromatogramas e os dados obtidos na resolução cinética da clorodrina **6a** são apresentados a seguir (Figura I.13; Tabela I.7).

Figura I.13- Cromatogramas obtidos por GC-FID para a resolução cinética da halodrina **6a** com a CALB.

(A) Padrão da clorodrina **6a**; **(B)** Padrão do acetato **9a**; Esterificação da clorodrina **6a** com a CALB por **(C)** 5h de reação, **(D)** 24h de reação, **(E)** 32h de reação; **(F)** Acetato **9a** obtido na reação de 24h; **(G)** Derivatização da clorodrina **6a** obtida na reação de 24h via reação de acetilação.

Condições de análise: $T_i = 90^\circ\text{C}$; $T_f = 150^\circ\text{C}$; $r = 1^\circ\text{C/min}$; coluna CP-Chirasil-Dex CB.

Tabela I.7- Resolução cinética da haloidrina racêmica **6a** com a CALB.^a

Tempo (h)	c (%) 6a	ee (%) 6a	c.a. 6a	c (%) 9a	ee (%) 9a	c.a. 9a	<i>E</i>
1	95	-	-	5	>99	(<i>S</i>)	-
5	80	-	-	20	>99	(<i>S</i>)	-
10	56	-	-	44	86	(<i>S</i>)	-
18	55	-	-	45	85	(<i>S</i>)	-
24	53	72*	(<i>R</i>)	47	81	(<i>S</i>)	20
32	46	-	-	54	77	(<i>S</i>)	-

^acondições de reação: 2 mL de hexano; 0,5 mL de acetato de vinila; 40 mg de CALB; 0,2 mmol de haloidrina **6a**; 150 rpm; 32°C; c (%) = concentração determinada por GC-FID; ee (%) = excesso enantiomérico; c.a.= configuração absoluta; *E* = razão enantiomérica.

*ee determinado após derivatização via reação de acetilação.

A CALB catalisou a esterificação da haloidrina **6a** no acetato **9a**. Verificou-se que no intervalo de tempo até 5h de reação somente o acetato (*S*)-**9a** foi formado ($ee_{\text{acetato}} > 99\%$), embora com uma concentração baixa ($c = 20\%$). Após esse intervalo, observou-se também uma lenta formação do acetato (*R*)-**9a**, permitindo assim uma boa resolução enantiomérica do acetato formado. As concentrações relativas da haloidrina **6a** e do acetato **9a** foram próximas de 50% ($c = 53\%$, **6a**; $c = 47\%$, **9a**) em 24h de reação. Nessas condições, a haloidrina (*R*)-**6a** foi obtida com rendimento de 45% e $ee = 72\%$ (calculado por derivatização via acetilação) e o acetato (*S*)-**9a** foi obtido com 41% de rendimento e $ee = 81\%$ (Esquema I.20).

Esquema I.20- Esterificação da haloidrina racêmica **6a** com a CALB em 24h.

A razão enantiomérica calculada para essa resolução foi $E = 20$, o que caracteriza uma resolução cinética moderadamente seletiva, com a obtenção da haloidrina **6a** e do acetato **9a** com bons excessos enantioméricos ($ee = 72\%$, **6a**; $ee = 81\%$, **9a**). Assim, a CALB foi um catalisador eficiente para a resolução cinética da haloidrina **6a**.

I.4.6- Resolução cinética do (*RS*)-1-aliloxi-3-bromopropan-2-ol (**6b**)

Os cromatogramas e os dados obtidos na resolução cinética da bromodrina **6b** são apresentados a seguir (Figura I.14; Tabela I.8).

Figura I.14- Cromatogramas obtidos por GC-FID para a resolução cinética da halodrina **6b** com a CALB.

(A) Padrão da bromodrina **6b**; (B) Padrão do acetato **9b**; Esterificação da bromodrina **6b** com a CALB por (C) 4h de reação, (D) 15h de reação, (E) 27h de reação; (F) Acetato **9b** obtido na reação de 27h; (G) Derivatização da bromodrina **6b** obtida na reação de 27h via reação de acetilação.

Condições de análise: $T_i = 100^\circ\text{C}$; $T_f = 135^\circ\text{C}$; $r = 1^\circ\text{C}/\text{min}$; coluna CP-Chirasil-Dex CB.

Tabela I.8- Resolução cinética da haloidrina racêmica **6b** com a CALB.^a

Tempo (h)	c (%) 6b	ee (%) 6b	c.a. 6b	c (%) 9b	ee (%) 9b	c.a. 9b	<i>E</i>
4	92	-	-	8	92	(<i>S</i>)	-
9	84	-	-	16	88	(<i>S</i>)	-
15	78	-	-	22	84	(<i>S</i>)	-
21	65	-	-	35	70	(<i>S</i>)	-
27	49	38*	(<i>R</i>)	51	60	(<i>S</i>)	5,8
32	45	-	-	55	54	(<i>S</i>)	-

^acondições de reação: 2 mL de hexano; 0,5 mL de acetato de vinila; 40 mg de CALB; 0,2 mmol de haloidrina **6b**; 150 rpm; 32°C; c (%) = concentração determinada por GC-FID; ee (%) = excesso enantiomérico; c.a.= configuração absoluta; *E* = razão enantiomérica.

*ee determinado após derivatização via reação de acetilação.

A CALB também catalisou a esterificação da haloidrina **6b** no acetato **9b**. Observou-se que a conversão da bromoidrina **6b** ocorreu mais lentamente que a conversão da cloroidrina **6a**. As concentrações relativas da haloidrina **6b** e do acetato **9b** foram próximas de 50% (c = 49%, **6b**; c = 51%, **9b**) em 27h de reação. Nessas condições, a haloidrina (*R*)-**6b** foi obtida com rendimento de 38% e ee = 38% (calculado por derivatização via acetilação) e o acetato (*S*)-**9b** foi obtido com 44% de rendimento e ee = 60% (Esquema I.21).

Esquema I.21- Esterificação da haloidrina racêmica **6b** com a CALB em 27 h.

A razão enantiomérica para esta resolução foi de *E* = 5,8, o que caracteriza uma resolução cinética ineficiente (*E* < 10), com a formação de produtos com baixos excessos enantioméricos.

I.4.7- Determinação das configurações absolutas dos compostos

A determinação das configurações absolutas dos produtos obtidos nas resoluções cinéticas das haloidrinas racêmicas foi realizada por comparação das medidas das rotações ópticas dos compostos com os valores já descritos na literatura ou por comparação da ordem de eluição dos enantiômeros nas análises obtidas por GC-FID com coluna quiral (HOFF e ANTHONSEN, 1999). Nas resoluções cinéticas das haloidrinas **6a** e **6b**, a configuração absoluta dos produtos obtidos foi

inferida a partir da derivatização dos acetatos **9a** e **9b** no epóxido **3** (Procedimento experimental- Seção I.3.4). Determinou-se então a configuração absoluta dos epóxidos obtidos a partir da comparação de suas rotações ópticas com o respectivo valor descrito na literatura. Os rendimentos, os excessos enantioméricos e as configurações absolutas dos produtos obtidos são apresentados na Tabela I.9.

Tabela I.9- Rendimentos, excessos enantioméricos e rotações ópticas específicas para os compostos obtidos nas resoluções cinéticas das haloidrinas racêmicas com a CALB.

Compostos	Rend. (%)	ee (%)	$[\alpha]^{25}_D$ experimental	$[\alpha]^{20}_D$ literatura	c.a.	Ref.
4a	40	42	+ 0,17° (c 0,5; CHCl ₃)	(R) +1,5° (c 0,3; CHCl ₃)	(R)	FENGLAI <i>et al.</i> , 2007
4b	32	33	- 0,11° (c 0,3; EtOH)	(S) +2,9° (c 1,7; EtOH)	(R)	HOFF <i>et al.</i> , 2000
5a	46	40	- 0,23° (c 0,3; CHCl ₃)	(R) -3,3° (c 0,1; CHCl ₃)	(R)	KAMAL <i>et al.</i> , 2005
5b	40	28	N.d.	-	(R)*	HOFF <i>et al.</i> , 1999.
6a	45	72	N.d.	-	(R)*	-
6b	38	38	N.d.	-	(R)*	-
7a	41	58	+ 0,21° (c 0,5; CHCl ₃)	(S) +7,3° (c 0,3; CHCl ₃)	(S)	FENGLAI <i>et al.</i> , 2007
7b	41	52	N.d.	-	(S)*	-
8a	40	97	+ 21,68° (c 0,3; CHCl ₃)	(S) +24,3° (c 0,1; CHCl ₃)	(S)	KAMAL <i>et al.</i> , 2005
8b	38	67	N.d.	-	(S)*	HOFF <i>et al.</i> , 1999.
9a	41	81	+6,40°** (c 0,3; CHCl ₃)	(S) +9,60°** (c 0,9; CHCl ₃)	(S)	TAKATA <i>et al.</i> , 1998
9b	44	60	+2,80°** (c 0,3; CHCl ₃)	(S) +9,60°** (c 0,9; CHCl ₃)	(S)	TAKATA <i>et al.</i> , 1998

N.d. = não determinado;

*configuração absoluta inferida através da ordem de eluição dos enantiômeros nas análises por GC-FID;

** dados para o epóxido **3** obtido por derivatização dos acetatos **9a** e **9b**.

Observou-se que as resoluções cinéticas das haloidrinas racêmicas com a CALB apresentaram uma enantiopreferência pela esterificação de (*S*)-haloidrinas, fornecendo (*S*)-acetatos e (*R*)-haloidrinas enantiomericamente enriquecidos. Este resultado está de acordo com a regra empírica postulada por Kazlauskas, a qual afirma que nas resoluções cinéticas de álcoois secundários pela CALB, o enantiômero do substrato que é esterificado mais rapidamente apresenta uma orientação espacial, baseada no tamanho dos grupos substituintes conectados ao estereocentro

da molécula, com configuração *R*, fornecendo assim (*R*)-acetatos. No caso de substratos como as haloidrinas, a orientação espacial dos grupos substituintes continua a mesma, porém na nomenclatura Cahn-Ingold-Prelog a ordem de prioridade é alterada, uma vez que o átomo de halogênio, que representa o grupo substituinte de tamanho *pequeno*, pode apresentar uma prioridade maior que o grupo substituinte de tamanho *grande*. Assim, nas resoluções cinéticas das haloidrinas com a CALB, a configuração absoluta do enantiômero que é esterificado mais rapidamente é a (*S*), favorecendo então a formação de (*S*)-acetatos e (*R*)-haloidrinas.

I.4.8-Influência dos substituintes halogênicos nos valores das razões enantioméricas *E*

Com o objetivo de avaliar a influência do substituinte halogênio nas resoluções cinéticas das haloidrinas racêmicas com a CALB, foram determinadas as razões enantioméricas para cada uma das resoluções cinéticas realizadas (Tabela I.10).

Tabela I.10- Valores de *E* para as resoluções cinéticas das haloidrinas **4(a,b)**-**6(a,b)**.

Composto	X	<i>E</i>
4a	Cl	5,6
4b	Br	4,3
5a	Cl	98
5b	Br	6,6
6a	Cl	20
6b	Br	5,8

Observou-se que as resoluções cinéticas das bromoidrinas (**4b**, **5b** e **6b**) apresentaram valores de *E* menores que as resoluções cinéticas das respectivas cloroidrinas (**4a**, **5a** e **6a**). Essa diferença foi bem acentuada nas resoluções cinéticas dos pares **5a-5b** e **6a-6b**, nos quais as cloroidrinas apresentaram valores de *E* característicos de resoluções cinéticas eficazes (*E* = 98, **5a**; *E* = 20, **6a**) e as respectivas bromoidrinas apresentaram valores de *E* < 10, representando resoluções cinéticas ineficientes. Este fato também foi observado em trabalhos realizados por Hoff e col. (2000) sobre a resolução cinética de uma série de álcoois secundários com a CALB, empregando diferentes doadores acila. Esse estudo demonstrou que as resoluções cinéticas de substratos que apresentavam átomos de halogênio como grupos substituintes de tamanho *pequeno* apresentaram menores valores de razão enantiomérica. A ordem decrescente dos valores de *E* determinados para os álcoois secundários substituídos foi H > F > Cl > Br. Assim, verificou-se que os átomos pequenos e com poucos elétrons disponíveis (H e F) apresentaram maiores valores de *E* que os átomos de tamanho maior e mais polarizáveis (Cl e Br). Esse resultado foi atribuído às interações

não favoráveis existentes entre os átomos de halogênio e o sistema π -eletrônico do resíduo de triptofano 104, localizado na parte inferior da “cavidade” existente no sítio ativo da CALB. Além disso, o tamanho dos átomos dos halogênios também pode dificultar a sua acomodação na “cavidade” enzimática (Figura I.15). Dessa forma, as haloidrinas empregadas como substratos apresentam uma baixa tendência em posicionar o átomo de halogênio na zona de estereoespecificidade enzimática, o que pode dificultar a esterificação desses substratos (HOFF *et al.*, 2000).

Figura I.15- Posicionamento de um álcool secundário no sítio ativo da CALB de acordo com o tamanho dos grupos substituintes ligados ao estereocentro (XU *et al.*, 2010).

Além dos efeitos causados pelos substituintes halogênicos, a estrutura química do outro grupo substituinte ligado ao estereocentro nos álcoois secundários também influencia na eficiência das resoluções cinéticas desses compostos. Este fato pode ser observado nas resoluções cinéticas do par **4a-4b**, no qual tanto a cloroidrina **4a** quanto a bromoidrina **4b** apresentaram valores de $E < 10$, caracterizando resoluções ineficientes. Nesse caso, a diferença entre os valores de E foi muito pequena ($E = 5,6$, **4a**; $E = 4,3$, **4b**). Assim, levou-se em consideração a influência do grupo $-OCH_2Ph$ como substituinte. Hoff e Anthonsen (1999) realizaram um estudo cinético sobre o efeito dos grupos substituintes de álcoois secundários nas resoluções cinéticas com a CALB. Este trabalho demonstrou que as resoluções cinéticas de substratos com grupos substituintes $-OCH_2Ph$ apresentaram menores valores de razão enantiomérica. A razão para essa observação foi atribuída a um aumento da velocidade de esterificação do enantiômero que reage mais lentamente, o que acarreta em uma pequena diferença entre as velocidades de reação dos dois enantiômeros,

resultando na formação de produtos com baixa pureza enantiomérica. Estudos de modelagem molecular revelaram que a orientação espacial do agrupamento $-\text{OCH}_2\text{Ph}$, no enantiômero mais lento, permite uma acomodação melhor desse enantiômero no sítio ativo da enzima, o que favorece a sua esterificação e aumenta a sua velocidade de reação (HOFF *et al.*, 2000; HOFF e ANTHONSEN, 1999). Assim, verificou-se que a natureza dos grupos substituintes presentes nos álcoois secundários possui uma importante influência na eficiência das resoluções cinéticas desses substratos.

1.5- CONCLUSÕES

Neste trabalho foram sintetizadas haloidrinas racêmicas a partir de epóxidos comerciais, com bons rendimentos, para serem empregadas como substratos em resoluções cinéticas utilizando-se a enzima CALB como catalisador.

A CALB promoveu a esterificação enantiosseletiva de todas as haloidrinas utilizadas como substratos. Contudo, somente as resoluções cinéticas das haloidrinas **5a** e **6a** foram eficientes, apresentando valores de razão enantiomérica consideráveis ($E = 98$, **5a**; $E = 20$, **6a**). O melhor resultado foi obtido na resolução cinética altamente enantiosseletiva da haloidrina **5a**, com a formação do acetato (*S*)-**8a** com um elevado excesso enantiomérico ($ee = 97\%$).

A CALB apresentou uma enantiopreferência pela esterificação de (*S*)-haloidrinas, fornecendo (*R*)-haloidrinas e (*S*)-acetatos enantiomericamente enriquecidos. Este resultado está de acordo com a regra empírica postulada por Kazlauskas para a resolução cinética de álcoois secundários com a CALB.

Verificou-se que a natureza dos grupos substituintes presentes nos substratos teve um papel fundamental na eficiência das resoluções cinéticas realizadas. Assim, as resoluções cinéticas das cloroidrinas apresentaram valores de E maiores que as resoluções cinéticas das bromoidrinas. Além disso, a presença do grupo substituinte $-\text{OCH}_2\text{Ph}$ nos substratos **4a** e **4b** dificultou a resolução enantiosseletiva desses substratos, gerando produtos com baixos excessos enantioméricos.

Algumas alternativas podem ser sugeridas com o intuito de obter melhores resultados nas resoluções cinéticas das haloidrinas racêmicas propostas: (i) uma nova enzima ou uma enzima modificada pode ser testada; (ii) modificação estrutural dos substratos; (iii) o meio reacional pode ser modificado (como o uso de outros solventes) e (iv) uso de diferentes doadores acilas que permitam uma menor reversibilidade da reação de esterificação.

CAPÍTULO II

Biotransformação de produtos naturais por micro-organismos

II.1- INTRODUÇÃO

II.1.1- Oxidorredutases

As oxidorredutases são, em sua maioria, enzimas intracelulares que podem ser encontradas em todos os organismos vivos, atuando como catalisadores de suas vias metabólicas. Essas enzimas catalisam reações de redução e oxidação através da transferência de elétrons, a qual ocorre com a participação essencial dos cofatores, substâncias não protéicas que fornecem os “reagentes químicos” necessários para que as reações redox ocorram. Os cofatores podem ser íons inorgânicos (K^+ , Mn^{2+} , Ca^{2+} e Zn^{2+}), grupos prostéticos permanentemente ligados às enzimas ou moléculas orgânicas que se ligam transitoriamente denominadas coenzimas, tais como derivados de vitaminas (flavinas, tiamina, niacina, ácido ascórbico) e NAD(P)H (GRUNWALD, 2009).

A grande variedade de oxidorredutases conhecidas pode ser classificada de acordo com os cofatores necessários ou com a natureza de seus substratos em três grandes subclasses: oxigenases, oxidases e peroxidases (Figura II.1).

Figura II.1- Classificação geral das oxidorredutases.

a) Oxigenases

As oxigenases geralmente empregam flavinas, ferro e cobre como cofatores. Essas enzimas promovem reações de oxidação interessantes, já que são capazes de catalisar a funcionalização de ligações C=C ou C-H não-ativadas, levando a processos de epoxidação e hidroxilação, respectivamente. As oxigenases são classificadas em mono-oxigenases e di-oxigenases, dependendo da quantidade de átomos de oxigênio que são capazes de incorporar aos produtos (BLANK, 2010).

As *mono-oxigenases* catalisam a introdução de um átomo de oxigênio na molécula do substrato. Apesar dos mecanismos de reação das várias mono-oxigenases diferirem bastante dependendo do tipo de substrato, o modo de ativação do oxigênio é sempre o mesmo. Enquanto um átomo da molécula de oxigênio é transferido para o substrato (Sub), o outro átomo é reduzido para

formar uma molécula de água, sendo a transferência eletrônica intermediada pelo cofator, normalmente NADH ou NADPH (Esquema II.1) (BURTON, 2003).

Esquema II.1- Reação de oxidação enzimática por mono-oxigenases.

As mono-oxigenases catalisam uma grande variedade de reações de oxidação (Figura II.2). O tipo de oxidação é geralmente dependente do grupo prostético presente na enzima, assim, as reações de hidroxilação e epoxidação são catalisadas por mono-oxigenases dependentes do citocromo P-450 e as reações de oxidação de hetero-átomos e Baeyer- Villiger são catalisadas por enzimas dependentes de flavinas (FABER, 2011).

Figura II.2- Reações típicas catalisadas por mono-oxigenases.

Dentre as reações realizadas por mono-oxigenases, a hidroxilação de carbonos não-ativados é uma das mais úteis biotransformações catalisadas por essas enzimas, devido ao fato desse processo ser dificilmente realizado por métodos sintéticos convencionais. Um exemplo dessa aplicação ocorre na síntese biocatalítica do álcool perílico, um monoterpênóide que apresenta atividade contra alguns tipos de câncer, como o câncer pancreático. O álcool perílico pode ser obtido em larga escala a partir da bio-oxidação regioseletiva do limoneno, um monoterpene constituinte do óleo da casca da laranja, em altas temperaturas (55-70°C), utilizando células íntegras do micro-organismo *Bacillus stearothermophilus* (Esquema II.2) (ORIEL e CHANG, 1996).

Esquema II.2- Bio-oxidação do limoneno por *Bacillus stearothermophilus*.

As *di-oxigenases* são enzimas capazes de incorporar dois átomos de oxigênio na molécula do substrato. Essas enzimas catalisam principalmente reações de hidroperoxidação, de clivagem ou *cis*-di-hidroxição de aromáticos, possibilitando assim a obtenção de dióis com substituintes hidroxila em diferentes posições (Esquema II.3) (MATSUDA *et al.*, 2009).

Esquema II.3- Reações catalisadas por di-oxigenases.

As di-oxigenases presentes nos micro-organismos são responsáveis pela degradação de compostos aromáticos xenobióticos. Essas enzimas apresentam uma grande utilidade na remoção de compostos aromáticos tóxicos de regiões contaminadas por derramamentos de óleo. Os micro-organismos *Pseudomonas putida* e *Caldariomyces fumago* podem ser empregados nessa função, pois catalisam reações de di-hidroxição de arenos e de dienos conjugados, permitindo a obtenção de dióis com bons rendimentos (Esquema II.4) (DUETZ *et al.*, 2001; SANFILIPINO, 2002).

Esquema II.4- Reações de di-hidroxição catalisadas por di-oxigenases.

Como pode ser observado, as oxigenases são enzimas que apresentam uma alta regiosseletividade em suas biotransformações, sendo bem mais seletivas que as demais oxidorreduções. As oxidases e as peroxidases reagem com o oxigênio, como oxigênio molecular ou peróxido, respectivamente, formando intermediários bastante reativos, o que possibilita a ocorrência de reações laterais com a formação de vários subprodutos, tornando algumas reações catalisadas por essas enzimas pouco específicas (BURTON, 2003).

b) Oxidases

As oxidases empregam flavo- ou hemoproteínas como coenzimas, catalisando reações de oxidação onde um oxigênio molecular atua como aceptor de elétrons, sendo reduzido a peróxido de hidrogênio no produto final (Esquema II.5).

Esquema II.5- Reação de oxidação catalisada por oxidases.

Embora sejam pouco empregadas em sínteses biocatalíticas, as enzimas oxidases podem apresentar importantes aplicações, como exemplo a D-glicose oxidase (GOx), que é produzida comercialmente a partir do fungo *Aspergillus niger*. Essa enzima apresenta diversas aplicações em indústrias farmacêuticas e alimentícias, tendo importância na indústria de vinhos, onde é utilizada para reduzir o teor alcoólico das bebidas através da biotransformação da glicose (que seria convertida em álcool) na D-gluconolactona, permitindo assim a produção de vinhos com um teor alcoólico cerca de 2% menor (Esquema II.6) (BANKAR *et al.*, 2009).

Esquema II.6- Reação de oxidação da glicose via enzima glicose oxidase.

c) Peroxidases

As peroxidases são, em sua maioria, hemoproteínas que apresentam como grupo prostético uma protoporfirina férrica, podendo apresentar também magnésio, vanádio, selênio ou flavinas em seus centros ativos. Essas enzimas reagem por mecanismos via radicais livres, usando H₂O₂ como aceptor de elétrons nas reações (Esquema II.7) (BURTON, 2003).

Esquema II.7- Reação de oxidação catalisada por peroxidases.

As peroxidases são utilizadas como catalisadores de diversas reações, como epoxidações de olefinas, halogenações, sulfoxidações e hidroxilações. Nesse contexto, as peroxidases assemelham-se às mono-oxigenases, apresentando mecanismos de ação semelhantes. Contudo, o emprego das peroxidases apresenta a vantagem de não necessitar do uso e da regeneração dos

cofatores NADH ou NADPH, embora essas enzimas apresentem como desvantagem uma baixa estabilidade operacional (ADAM *et al.*, 1999).

Muitos estudos vêm sendo realizados com o objetivo de explorar a capacidade catalítica dessas enzimas. Por exemplo, a cloroperoxidase (CPO, EC1.11.1.10) isolada do fungo marinho *Caldariomyces fumago* é muito empregada em reações de hidroxilação enantiosseletivas, gerando compostos com elevada pureza enantiomérica. Embora as hidroxilações alílicas catalisadas pela CPO não sejam muito eficientes, as hidroxilações benzílicas são realmente efetivas e os produtos formados (álcoois secundários) podem ser obtidos com elevados excessos enantioméricos (Esquema II.8) (HAGER, 1998).

Esquema II.8- Reações de hidroxilação catalisadas pela peroxidase de *C. fumago*.

As peroxidases e as mono-oxigenases correspondem às oxidorreduções mais utilizadas em reações de biotransformação. O interesse no emprego dessas enzimas é justificado uma vez que estas são facilmente encontradas nos mais diversos organismos. Além disso, essas enzimas fazem uso de reagentes como o O₂ e a H₂O₂, que são reagentes de baixo custo e ambientalmente favoráveis, já que a redução desses compostos gera uma molécula de água. Como resultado, as oxidações biocatalíticas, além de serem eficientes, representam uma contribuição para a química verde. Recentemente, vários trabalhos têm investigado o uso das mono-oxigenases do citocromo P-450, também conhecidas como CYPs, uma vez que essas enzimas apresentam potencial para diversos tipos de bio-oxidação (BLANK *et al.*, 2010).

II.1.2- Mono-oxigenases do citocromo P-450

As mono-oxigenases do citocromo P-450 pertencem a uma família de heme-enzimas que apresenta mais de 10.000 membros. Essas enzimas podem ser encontradas em todos os organismos vivos, onde participam das mais diversas vias metabólicas, como na biossíntese de hormônios em animais e de metabólitos secundários em plantas ou mesmo na biodegradação de xenobióticos nos mamíferos, através de processos de detoxificação, nos quais realizam a oxidação dos substratos,

aumentando sua polaridade e tornando-os mais hidrossolúveis, facilitando assim sua excreção (URLACHER e SCHMID, 2002; FASAN, 2012).

Um exemplo do uso das CYPs na síntese de hormônios consiste na 11 β -hidroxilação do composto Reichstein S para a obtenção da hidrocortisona, comercialmente conhecida como cortisol, um hormônio da família dos esteróides empregado como anti-inflamatório no combate à alergias, artrite reumatóide e alguns tipos de câncer. O cortisol é produzido industrialmente a partir da biotransformação do Reichstein S com o micro-organismo *Curvalaria* sp., a uma escala de 100 toneladas por ano, em um processo atribuído às CYPs, o que permite a hidroxilação enantio- e regiosseletiva do substrato (Esquema II.9) (URLACHER e EIBEN, 2006).

Esquema II.9- Síntese do cortisol a partir da hidroxilação regiosseletiva do Reichstein S.

As CYPs também aceitam uma variedade de substratos, como ácidos graxos, terpenos, prostaglandinas, poli-aromáticos, fármacos e pesticidas. Dentre as várias oxidações catalisadas por mono-oxigenases, reações como a hidroxilação de alcanos, *N*-oxidação, desaminação, desalogenação e epoxidação de olefinas são atribuídas às mono-oxigenases do citocromo P-450. Essas enzimas dependem dos cofatores NADH (dinucleotídeo de nicotinamida e adenina) e do seu análogo fosfatado NADPH, que são moléculas orgânicas que se associam às enzimas através de ligações não covalentes (forças de van der Waals, ligações de hidrogênio), sendo consideradas grupos prostéticos transitórios, já que essas coenzimas dissociam-se do sítio ativo após a catálise enzimática. O NADH e NADPH podem existir também nas formas oxidadas de NAD⁺ e NADP⁺, respectivamente. Essas moléculas são responsáveis pelo transporte de elétrons nas reações de oxidorredução, através de um processo contínuo no qual as espécies NAD(P)⁺ recebem um íon hidreto (:H⁻) com a oxidação do substrato, sendo transformadas novamente em suas formas reduzidas NAD(P)H. O anel nicotinamida presente nessas coenzimas contém o sítio no qual a transferência eletrônica ocorre, sendo a porção restante da molécula responsável pelas interações seletivas com as enzimas (Figura II.3) (URLACHER e GIRHARD, 2012).

Figura II.3- Estruturas das coenzimas NAD(P)H e NAD(P)⁺ e seus centros reativos.

As CYPs também apresentam um grupo prostético fixo constituído por uma ferroporfirina, denominado grupo heme, no qual existem espécies Fe^{+3} coordenadas equatorialmente pelo meio heme e axialmente por um átomo de enxofre de um resíduo de cisteína presente no sítio catalítico da enzima (Figura II.4) (FASAN, 2012).

Figura II.4- Estrutura do grupo heme.

O mecanismo de oxidação das CYPs é conhecido e suas principais etapas são resumidas a seguir:

- (I) O substrato a ser oxidado (R-H) liga-se ao sítio ativo da enzima através da substituição de uma molécula de H_2O existente em uma cavidade próxima à molécula de ferroporfirina;
- (II) A espécie Fe^{+3} da molécula de porfirina é reduzida ao seu estado ferroso (Fe^{+2}), sendo a transferência eletrônica realizada pelo NAD(P)H via um flavonucleotídeo ou uma ferredoxina;
- (III) Posteriormente, uma molécula de O_2 é ligada formando um complexo $[\text{O}_2\text{-CYP450}]$;
- (IV) Ocorre uma segunda transferência eletrônica com a oxidação do Fe^{+2} a Fe^{+3} , seguida de uma protonação que resulta na formação do *composto 0*. Após a protonação, há o enfraquecimento da ligação O-O, o que acarreta na quebra da molécula de O_2 , com a liberação de um átomo de oxigênio na forma de água e a formação do *composto I*, correspondente ao cátion radical oxoferro(IV).

(V) O *composto I* age como um eletrófilo forte que reage com o substrato, resultando na sua oxidação. O produto formado é então liberado na sua forma oxidada, reconstituindo as espécies Fe^{3+} e completando o ciclo catalítico (Figura II.5) (FASAN, 2012).

Figura II.5- Ciclo catalítico das mono-oxigenases do citocromo P-450.

Reações enzimáticas catalisadas por CYPs são frequentemente realizadas com células íntegras, pois os organismos vivos fornecem um sistema de reciclagem natural das coenzimas intracelulares, além de permitir que as enzimas fiquem protegidas do meio externo pelas membranas e paredes celulares. A utilização de CYPs como enzimas isoladas apresenta algumas dificuldades, tais como, a baixa estabilidade dessas enzimas na sua forma isolada, a necessidade de proteínas associadas (como a ferredoxina ou flavoproteínas) e a necessidade de procedimentos que permitam a reciclagem dos cofatores NAD(P)H (URLACHER e SCHMID, 2002).

A maioria das biotransformações catalisadas por CYPs fazem uso de micro-organismos, como exemplo, os fungos *Aspergillus niger*, *Glomerella cingulata*, *Mucor plumbeus*, *Penicillium caseifulvum*; as bactérias *Pseudomonas putida*, *Rhodococcus erythropolis*, *Escherichia coli*, *Xanthobacter* sp. e as leveduras *Schizosaccharomyces octosporus*, *Kluyveromyces lactis*, *Pichia quercuum* (BURTON, 2003).

A exploração da biodiversidade por técnicas de seleção de micro-organismos, como triagens de alto desempenho (*High Throughput Screening*, HTS), biologia computacional e engenharia genética, representam os métodos tradicionais na descoberta de novas fontes de enzimas

a fim de se desenvolverem biocatalisadores mais ativos, estáveis e seletivos (OLIVEIRA *et al.*, 2009). Dentre os diferentes ecossistemas, o habitat marinho representa uma valiosa e pouco estudada fonte de micro-organismos para a produção de novas enzimas e metabólitos com aplicações biotecnológicas (KENNEDY *et al.*, 2008).

II.1.3- Uso de micro-organismos marinhos em reações de bio-oxidação

Estima-se que o ambiente marinho apresente um total de $3,67 \times 10^{30}$ micro-organismos e que mais de três quartos da superfície da Terra seja coberta pelos oceanos. Assim, o ecossistema marinho apresenta uma enorme biodiversidade a ser explorada pela biotecnologia, o que se denomina de “biotecnologia azul” (KENNEDY *et al.*, 2008).

Organismos marinhos como algas, esponjas, moluscos e micro-organismos são fontes valiosas de enzimas que podem apresentar características muito particulares, as quais estão vinculadas à complexidade do ambiente marinho, que envolve a alta salinidade e pressão, baixas temperaturas e condições especiais de iluminação. Assim, há um interesse na exploração do potencial biocatalítico de organismos marinhos a fim de se obter novas enzimas com características interessantes para serem aplicadas em reações de biotransformação. Nos últimos anos, foram isoladas diversas enzimas como proteases, carboidrases e peroxidases a partir de micro-organismos marinhos (ZHANG e KIM, 2010).

Os fungos marinhos são encontrados normalmente associados a diferentes organismos, tais como, poríferos, peixes, cnidários, tunicados e algas. Os fungos marinhos podem ser divididos em dois grandes grupos: o primeiro, definido como “obrigatórios”, que são representados por fungos que crescem e esporulam exclusivamente em habitats marinhos ou estuários; e o segundo, chamado de “facultativos”, são representados por fungos provenientes de águas continentais e ambientes terrestres, os quais crescem, sobrevivem e adaptam-se em ambientes marinhos (LOQUE, 2009).

Existe um interesse na busca de novas espécies de fungos marinhos para serem empregados em estudos ecológicos, evolutivos e biotecnológicos. Na literatura são citados alguns trabalhos sobre biotransformações de produtos naturais empregando-se fungos marinhos como catalisadores. Nesse contexto, a biotransformação de terpenos por fungos marinhos tem sido explorada mais recentemente (FENG *et al.*, 2010).

Como exemplo, os bromosesquiterpenos aplisistatina e palasadina A, ambos isolados da alga vermelha *Laurencia luzonensis*, apresentam atividade antileucêmica. Com o intuito de se obter derivados terpenóides mais bioativos, foi realizada a biotransformação desses bromosesquiterpenos com dois tipos de fungos marinhos: *Rhinocladiella atrovirens* NRBC 32362 e *Rhinocladiella* sp. K-

001, ambos isolados da alga marrom *Styopodium zonale*. Assim, o fungo *R. atrovirens* foi capaz de bioconverter a aplisistatina em três metabólitos denominados de 5 α -hidroxi-aplisistatina, 5 α -hidroxi-iso-aplisistatina e 9 β -hidroxi-aplisistatina (Esquema II.10) (KOSHIMURA *et al.*, 2009).

Esquema II.10- Biotransformação da aplisistatina pelo fungo marinho *R. atrovirens*.

A biotransformação do palasadina A com o fungo marinho *Rhinocladiella* sp. resultou na desalogenação do terpeno, obtendo-se o derivado 9,10-de-hidrobromopalasadina A com uma conversão de 18% (Esquema II.11).

Esquema II.11- Biotransformação do palasadina A com o fungo marinho *Rhinocladiella* sp.

Outro exemplo da biotransformação de terpenos com fungos marinhos é a bio-oxidação do pacifenol, um sesquiterpeno poli-halogenado obtido da alga vermelha *Laurencia claviformis*. A incubação do pacifenol por seis dias com o fungo marinho *P. brevicompactum* resultou na hidroxilação regioselectiva do terpeno, gerando um produto hidroxilado que apresenta alta atividade antibiótica (Esquema II.12) (ROVISORA *et al.*, 1989).

Esquema II.12- Biotransformação do pacifenol com o fungo marinho *P. brevicompactum*.

Dessa forma, pode-se destacar o potencial biocatalítico dos fungos marinhos em reações de biotransformação de produtos naturais, as quais permitem a obtenção de novas moléculas ou

metabólitos que podem apresentar atividades biológicas interessantes para serem utilizadas pelas indústrias farmacêuticas, agroquímicas, cosméticas, alimentícias, entre outras. Esses resultados comprovam a importância de triagens para a descoberta de novas enzimas de organismos marinhos, uma vez que o emprego destes biocatalisadores pode contribuir não só para a descoberta de novos compostos, como também para ampliar o conhecimento humano sobre o ambiente marinho, colaborando assim para a sua preservação e seu uso sustentável (ZHANG e KIM, 2010).

II.1.4- Reações de biotransformação dos terpenos ambrox, sclareol e sclareolide

A utilização de produtos naturais como matéria-prima para a síntese de novas substâncias bioativas tem sido amplamente relatada ao longo do tempo. Neste contexto, destacam-se os terpenos, que são compostos formados por unidades de isopreno e que constituem a maior família de produtos naturais, com cerca de 30.000 moléculas conhecidas. Existe um interesse comercial na obtenção de terpenos, uma vez que esses compostos podem apresentar atividades biológicas interessantes, como anti-inflamatória, antitumoral e inseticida. Além disso, a oxidação de terpenos produz derivados terpenóides que são responsáveis pelo aroma de óleos essenciais, sendo amplamente empregados nas indústrias alimentícias e de perfumes como aromatizantes e fragrâncias (DE CARVALHO e DA FONSECA, 2006).

Os terpenos ambrox, sclareol e sclareolide destacam-se por sua utilização em várias propostas sintéticas e pelas atividades biológicas descritas. O (-)-ambrox é um sesquiterpeno de origem animal (isolado do ambergris, uma concreção patológica produzida no intestino da baleia azul) e é um composto de alto valor comercial (US\$ 800/kg) muito empregado pela indústria de perfumes por apresentar um odor sutil que lembra alga marinha, madeira e musgo (TENIUS e SCHROEDER, 2000). O sclareol é um diterpeno isolado do óleo essencial da planta *Salvia sclarea* que apresenta atividades antifúngica e antibiótica, além de ser utilizado como fixador pela indústria de perfumes e como aromatizante na indústria do tabaco (ABRAHAM, 1994). O (+)-sclareolide é um sesquiterpeno isolado de várias espécies de plantas (como exemplo, a *Arnica angustifolia*) que apresenta atividades antifúngica, fitotóxica e antitumoral (CANO *et al.*, 2011).

Diversos trabalhos que relatam a utilização desses terpenos como materiais de partida para a obtenção de novas moléculas são encontrados na literatura, onde destacam-se alguns estudos recentes envolvendo a biotransformação destes compostos com o uso de células íntegras de leveduras, fungos e plantas como biocatalisadores.

Choudhary e col. (2004) realizaram uma triagem utilizando quatro linhagens de fungos comerciais (*Fusarium lini* NRRL 68751, *Rhizopus stolonifer* ATCC 10404, *Cunninghamella*

elegans NRRL 1392 e *Curvularia lunata* NRRL 2178) com o intuito de promover reações de biotransformação nos substratos (-)-ambrox e (+)-sclareolide. Os quatro micro-organismos selecionados foram capazes de bioconverter o (-)-ambrox, com destaque para a reação com o fungo *F. lini*, a qual resultou em quatro metabólitos inéditos resultantes de hidroxilações regioseletivas nos carbonos C₁, C₆ e C₁₁ (Esquema II.13) (CHOUDHARY *et al.*, 2004).

Esquema II.13- Biotransformação do (-)-ambrox com o fungo *F. lini*.

A incubação do (-)-ambrox com os fungos *R. stolonifer*, *C. lunata* e *C. elegans* resultou nos metabólitos oxigenados 3-oxo-ambrox; 3 β -hidroxi-ambrox; 3 β ,6 β -di-hidroxi-ambrox e 12-oxo-ambrox (Esquema II.14), os quais foram descritos pela primeira vez na literatura em reações de biotransformação com o fungo *Cephalosporium aphidicola* (HANSON e TRUNEH, 1996).

Esquema II.14- Reações de biotransformação do (-)-ambrox com os fungos *R. stolonifer*, *C. lunata* e *C. elegans*.

Na triagem dos fungos para a biotransformação do (+)-sclareolide, somente o fungo *C. elegans* bioconverteu o (+)-sclareolide, resultando em dois metabólitos inéditos (2 α -hidroxisclareolide e 2 α ,3 β -di-hidroxisclareolide) e em três metabólitos conhecidos (3-oxo-sclareolide, 3 β -hidroxisclareolide e 1 α ,3 β -di-hidroxisclareolide), os quais apresentaram alta atividade citotóxica contra várias linhagens de células tumorais humanas (Esquema II.15) (CHOUDHARY *et al.*, 2004).

Esquema II.15- Biotransformação do (+)-sclareolide com o fungo *C. elegans*.

Díez e col. (2005) realizaram a biotransformação do sclareol empregando células em crescimento do fungo *Rhizopus stolonifer* como biocatalisador. Após oito dias de reação, foram obtidos os metabólitos hidroxilados 18-hidroxisclareol e 3 β -hidroxisclareol (Esquema II.16) (DÍEZ *et al.*, 2005). Na literatura, estes compostos foram obtidos também em reações de biotransformação com os fungos *Cephalosporium aphidicola* (HANSON *et al.*, 1994), *Cunninghamella* sp. (KOUZI e CHESNEY, 1991) e *Mucor plumbeus* (ARANDA e LALLEMAND, 1991).

Esquema II.16- Biotransformação do sclareol pelo fungo *R. stolonifer*.

Nasib e col. (2006) realizaram a biotransformação do (-)-ambrox utilizando células suspensas de folhas da planta *Actinidia deliciosa* (árvore produtora de kiwi) como biocatalisador. Após quinze dias de reação, foram isolados quatro metabólitos oxigenados já descritos na literatura: 3-oxo-ambrox; 3 β -hidroxiambrox; 1 α -hidroxiambrox e 3 β ,6 β -di-hidroxiambrox e dois

metabólitos inéditos: 1 α ,6 β -di-hidroxi-ambrox e 1 α ,3 β -di-hidroxi-ambrox (Esquema II.17) (NASIB *et al.*, 2006).

Esquema II.17- Biotransformação do (-)-ambrox por células suspensas de *A. deliciosa*.

Cano e col. (2011) realizaram um estudo sobre a influência do meio de cultura na reação de biotransformação do (+)-sclareolide com o fungo *Aspergillus niger*. Foram preparados dois meios de cultura: meio A [glicose (10 g.L⁻¹), glicerol (10 g.L⁻¹), peptona (5 g.L⁻¹), extrato de levedura (5 g.L⁻¹), KH₂PO₄ (5 g.L⁻¹) e NaCl (5 g.L⁻¹)] e meio B [peptona (10 g.L⁻¹), extrato de levedura (10 g.L⁻¹), extrato de carne (10 g.L⁻¹) e glicose (50 g.L⁻¹)]. Quando cultivado no meio de cultura A, o fungo *A. niger* bioconverteu o (+)-sclareolide em dois metabólitos oxigenados: 3-oxo-sclareolide e 3 β -hidroxi-sclareolide (Esquema II.18). A utilização de um meio de cultura mais rico em nutrientes, como o meio B, resultou na formação de quatro metabólitos oxigenados inéditos (3 α ,6 β -di-hidroxi-sclareolide; 1-oxo-sclareolide; 3-oxo-15-hidroxi-sclareolide e 3 β ,15-di-hidroxi-sclareolide), além dos metabólitos 3-oxo-sclareolide e 3 β -hidroxi-sclareolide (Esquema II.19) (CANO *et al.*, 2011).

Esquema II.18- Biotransformação do (+)-sclareolide com o fungo *A. niger* no meio de cultura A.

Esquema II.19- Biotransformação do (+)-sclareolide com o fungo *A. niger* no meio de cultura B.

Allendes e col. (2012) promoveram a biotransformação do (-)-ambrox com os fungos filamentosos *Cunninghamella* sp. e *Alternaria alternata*. A incubação do (-)-ambrox com o fungo *Cunninghamella* sp. resultou no metabólito hidroxilado inédito 1β-hidroxi-ambrox. Já a incubação do substrato com o fungo *A. alternata* formou o metabólito 3β-hidroxi-ambrox. As reações catalisadas por estes micro-organismos são interessantes por serem altamente regioseletivas, fornecendo exclusivamente um produto de hidroxilação (Esquema II.20) (ALLENDES, 2012).

Esquema II.20- Biotransformação do (-)-ambrox pelos fungos *Cunninghamella* sp. e *A. alternata*.

Dessa forma, pode-se destacar o uso de reações de biotransformação como uma ferramenta eficiente para a obtenção de novas moléculas ou metabólitos a partir de produtos naturais. Estes trabalhos ressaltam a importância de triagens para a descoberta de novas enzimas que apresentem características particulares quanto à seletividade nas reações, fornecendo assim uma quimiodiversidade de compostos que podem apresentar atividades biológicas interessantes para serem exploradas pelas indústrias farmacêuticas, agroquímicas, alimentícias, cosméticas, entre outras.

II.2- OBJETIVOS

- Geral

Promover reações de biotransformação de produtos naturais e bioativos por micro-organismos selecionados.

- Específicos

- Promover um *screening* com os fungos de origem marinha *Bostryospharia* sp. Br09, *Eutypella* sp. Br23, *Hidropisphaera* sp. Br27, *Xylaria* sp. Br61, *Aspergillus sydowii* Ce19, *Aspergillus sydowii* Ce15, *Penicillium raistricki* Ce16, *Penicillium oxalicum* F30 e *Penicillium citrinum* F53 frente aos produtos naturais (-)-ambrox, sclareol e (+)-sclareolide;
- Explorar o potencial biocatalítico desses fungos marinhos visando à detecção de mono-oxigenases;
- Selecionar os fungos marinhos capazes de promover reações de hidroxilação de carbonos não-ativados eletronicamente nos substratos;
- Isolar e caracterizar estruturalmente os compostos biotransformados;
- Realizar um estudo sobre a bioconversão do sclareol no composto ambradiol pela levedura *Hyphozyma roseonigra*, variando-se a composição dos meios de cultura empregados no crescimento do micro-organismo, a fim de se estabelecer a melhor condição experimental para ser testada em um processo fermentativo de pequena escala.

II.3- PARTE EXPERIMENTAL

A descrição dos materiais e equipamentos utilizados neste trabalho encontra-se em anexo (Capítulo III).

II.3.1- Biotransformação de produtos naturais por fungos marinhos

II.3.1.1- Substratos empregados nas reações de biotransformação

Na Figura II.6 são apresentadas as estruturas químicas dos terpenos utilizados como substratos nas reações de biotransformação.

Figura II.6- Substratos empregados nas reações de biotransformação com fungos marinhos.

II.3.1.2- Descrição dos fungos marinhos empregados como biocatalisadores nas reações de biotransformação

As linhagens de fungos marinhos *Bostryospharia* sp. Br09, *Eutypella* sp. Br23, *Hidropisphaera* sp. Br27 e *Xylaria* sp. Br61 foram isoladas da alga marinha *Bostrychia radicans*, a qual foi coletada no Litoral Norte do Estado de São Paulo, em Ubatuba. A coleta da alga e o isolamento dos fungos foram realizados pelo grupo de Química Orgânica do Ambiente Marinho coordenado pela Prof. Dra. Hosana Maria Debonsi (FCFRP-USP). A identificação dos fungos foi realizada usando-se o método convencional e molecular pela Dra. Lara Durães Sette (CBQBA/UNICAMP).

As linhagens de fungos marinhos *Aspergillus sydowii* Ce19, *Aspergillus sydowii* Ce15 e *Penicillium raistrickii* Ce16 foram isoladas da esponja marinha *Chelonaplysilla erecta*. *Penicillium oxalicum* F30 e *Penicillium citrinum* F53 foram isoladas da alga marinha *Caulerpa* sp. Esses micro-organismos foram isolados a partir de esponjas e algas coletadas no Litoral Norte do Estado de São Paulo, em São Sebastião, e fazem parte da coleção do Prof. Dr. Roberto G. S. Berlinck (IQSC-USP). Os fungos foram isolados pelo grupo da Prof. Dra. Mirna H. R. Seleghim (UFSCar) e as cepas encontram-se depositadas no laboratório de Microbiologia da Universidade Federal de São

Carlos. A identificação foi realizada usando-se o método convencional e molecular pela Dra. Lara Durães Sette (CBQBA/UNICAMP).

As linhagens de fungos marinhos utilizadas neste trabalho fazem parte da Coleção Brasileira de Micro-organismos de Ambiente e Indústria (CBMAI). Os códigos dos depósitos CBMAI para os fungos marinhos descritos são apresentados na Tabela II.1.

Tabela II.1- Códigos dos depósitos CBMAI para os fungos marinhos empregados neste trabalho.

Fungos	Código CBMAI
<i>Aspergillus sydowii</i> Ce15	CBMAI 935
<i>Penicillium raistricki</i> Ce16	CBMAI 931
<i>Aspergillus sydowii</i> Ce19	CBMAI 934
<i>Hidropisphaera</i> sp. Br27	CBMAI 1194
<i>Xylaria</i> sp. Br61	CBMAI 1195
<i>Eutypella</i> sp. Br23	CBMAI 1196
<i>Bostryosphaeria</i> sp. Br09	CBMAI 1197
<i>Penicillium oxalicum</i> F30	CBMAI 1185
<i>Penicillium citrinum</i> F53	CBMAI 1186

II.3.1.3- Meios de cultura empregados para o crescimento dos fungos marinhos

As culturas dos fungos marinhos foram mantidas em meio de cultura sólido de extrato de malte 2% contido em placas de Petri.

Composição do meio de cultura sólido de extrato de malte 2%: água do mar artificial* (1L), extrato de malte (20 g.L⁻¹) e ágar (20 g.L⁻¹). O pH da solução foi ajustado para pH = 8 utilizando-se uma solução de KOH 2M.

**Composição da água do mar artificial:* água destilada, CaCl₂.2H₂O (1,36 g.L⁻¹), MgCl₂.6H₂O (9,68 g.L⁻¹), KCl (0,61 g.L⁻¹), NaCl (30,0 g.L⁻¹), Na₂HPO₄ (0,014 mg.L⁻¹), Na₂SO₄ (3,47 g.L⁻¹), NaHCO₃ (0,17 g.L⁻¹), KBr (0,1 g.L⁻¹), SrCl₂.6H₂O (0,040 g.L⁻¹), H₃BO₃ (0,030 g.L⁻¹).

Preparou-se o meio de cultura sólido de extrato de malte 2%, o qual foi esterilizado em autoclave a 120°C por 20 min. Posteriormente, verteu-se aproximadamente 15 mL do meio de cultura em cada placa de Petri e esperou-se pela sua solidificação. As placas de Petri foram então levadas à estufa a 25°C por três dias, para verificar se haveria o desenvolvimento de qualquer tipo de contaminação. Após esse período, as placas de Petri que não apresentaram contaminação foram utilizadas para o repique dos micro-organismos. Assim, com o uso de uma alça inoculadora, transferiu-se os micélios dos fungos para as placas de Petri. Posteriormente, as placas inoculadas

foram levadas novamente à estufa a 25°C para o crescimento dos micro-organismos por uma semana. Após esse período, as placas de Petri foram mantidas sob refrigeração a 4°C.

Nas reações de biotransformação, os fungos marinhos foram cultivados em meio de cultura líquido de extrato de malte 2%, previamente esterilizado em autoclave a 120°C por 20 min.

Composição do meio de cultura líquido de extrato de malte 2%: água do mar artificial* (1L) e extrato de malte (20 g.L⁻¹). O pH da solução foi ajustado para pH = 8 utilizando-se uma solução de KOH 2M.

II.3.1.4- Triagens dos fungos marinhos para as reações de biotransformação

Em frascos Erlenmeyer de 250 mL contendo 100 mL do meio de cultura líquido de extrato de malte 2%, previamente esterilizado, foram inoculados dois fragmentos (0,5 x 0,5 cm), cortados com uma espátula, do meio de cultura sólido contendo os micélios dos fungos selecionados. Os frascos Erlenmeyer foram levados ao agitador orbital (25°C, 150 rpm) para o crescimento dos micro-organismos por 72 h. Posteriormente, 20 mg de substrato (0,085 mmol de ambrox; 0,065 mmol de sclareol; 0,079 mmol de sclareolide) foram adicionados em cada frasco Erlenmeyer. O monitoramento das reações foi realizado a cada 24 h, coletando-se 2 mL de amostra em um tubo Falcon de 15,0 mL, extraído-se com acetato de etila (2 mL) e analisando-se a fase orgânica por CCD, HPLC ou GC-FID. Reações controle, sem a adição de substrato, foram realizadas seguindo o mesmo procedimento experimental.

II.3.1.5- Isolamento e purificação dos produtos de biotransformação

Experimentos adicionais foram realizados em quintuplicata, como descrito anteriormente, com os fungos que apresentaram bioconversões dos substratos empregados, para o isolamento, a purificação e a caracterização dos compostos formados. Para a extração dos produtos, adicionou-se 50 mL de acetato de etila nos frascos Erlenmeyer contendo o meio reacional e manteve-se sob agitação magnética por 30 min. Posteriormente, filtrou-se em funil de Büchner, separando-se a fase orgânica da fase aquosa. Repetiu-se a extração das fases aquosas com acetato de etila por três vezes (3 x 50 mL). As fases orgânicas foram reunidas, secas com Na₂SO₄ anidro e então evaporadas em rota-evaporador. Os extratos obtidos foram purificados por CC de sílica gel (230–400 mesh), sendo utilizadas como eluentes misturas de acetato de etila: heptano nas proporções 1:1 ou 6:4. Os compostos obtidos foram caracterizados por RMN de ¹H e RMN de ¹³C, sendo utilizadas nas suas interpretações as técnicas de RMN 2D (HSQC e HMBC).

II.3.2- Estudo da reação de biotransformação do sclareol pelo micro-organismo *Hyphozyma roseonigra*

Este trabalho foi realizado na Unidade Piloto do Instituto de Química de Substâncias Naturais (ICSN-CNRS), em Gif-sur-Yvette, na França, sob a orientação do Dr. Jamal Ouazzani.

II.3.2.1- Obtenção e adaptação do micro-organismo *H. roseonigra*

A levedura *H. roseonigra* foi obtida comercialmente através da “*American Type Culture Collection*” (ATCC/USA). O código do depósito desse micro-organismo é ATCC 20624. A levedura foi adquirida na sua forma liofilizada contida em pequenas ampolas de 5 mL, as quais foram mantidas sob refrigeração a -10°C. Para a reativação e o crescimento em meio de cultura sólido do micro-organismo, foi realizado o seguinte procedimento experimental de acordo com as normas recomendadas pela ATCC:

- i) A ampola contendo a levedura liofilizada foi retirada do congelador e levada à capela de fluxo laminar previamente esterilizada, onde retirou-se o lacre protetor para a abertura da ampola;
- ii) Preparou-se um tubo de ensaio contendo 6 mL de água destilada esterilizada em autoclave a 121°C por 15 min. Com o uso de uma pipeta estéril coletou-se 1 mL da água destilada esterilizada e transferiu-se o conteúdo para a ampola contendo a levedura. Agitou-se com o auxílio da pipeta até a formação de uma suspensão;
- iii) Transferiu-se a suspensão obtida (levedura + água destilada esterilizada), com o uso da pipeta, para o tubo de ensaio contendo os 5 mL de água destilada esterilizada restantes. Deixou-se o tubo de ensaio repousar à temperatura ambiente (25°C), sem nenhuma agitação, durante 10 h, para permitir a re-hidratação efetiva da levedura;
- iv) Após o período de repouso, agitou-se a solução com o auxílio de uma pipeta estéril para a sua homogeneização;
- v) O inóculo do micro-organismo em meio de cultura sólido foi realizado adicionando-se gotas da solução, com o uso da pipeta, em placas de Petri contendo o meio de cultura sólido YM (ATCC 200) constituído por: água destilada (1L), extrato de levedura (3 g.L⁻¹), extrato de malte (3 g.L⁻¹), peptona (5 g.L⁻¹), dextrose (10 g.L⁻¹) e ágar (20 g.L⁻¹).
- vi) As placas de Petri inoculadas com a levedura foram levadas à estufa à temperatura de 25°C. O monitoramento do crescimento do micro-organismo foi realizado diariamente. Placas de Petri sem o inóculo da levedura foram preparadas como controle para identificar qualquer tipo de contaminação.

II.3.2.2- Meios de cultura sólidos para o crescimento da levedura *H. roseonigra*

Além das placas de Petri contendo o meio de cultura sólido YM (ATCC 200), foram preparadas também placas de Petri contendo os meios de cultura sólidos sintético e PDA, os quais foram previamente esterilizados em autoclave a 120°C por 20 min. antes de serem vertidos nas placas de Petri em capela de fluxo laminar.

Composição do meio de cultura sólido sintético: água destilada (1L), NH_4NO_3 (1 g.L⁻¹), KH_2PO_4 (1 g.L⁻¹), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (50 mg.L⁻¹), extrato de levedura (1 g.L⁻¹), glicose (25 g.L⁻¹) e ágar (20 g.L⁻¹).

Composição do meio de cultura sólido PDA: água destilada (1L), dextrose de batata (24 g.L⁻¹) e ágar (20 g.L⁻¹).

Para realizar-se o inóculo da levedura *H. roseonigra* nas placas de Petri contendo os meios de cultura sólidos sintético e PDA, foram selecionadas as placas de Petri, contendo o meio YM, que apresentaram o melhor crescimento deste micro-organismo. Preparou-se um tudo de ensaio contendo 10 mL de água destilada esterilizada. Com o auxílio de uma pipeta estéril, transferiu-se 3 mL de água destilada esterilizada para a placa de Petri contendo o meio YM com os micélios da levedura. Espalhou-se a água na superfície da placa de Petri, com o auxílio da pipeta, de modo a formar uma suspensão contendo as células do micro-organismo. Posteriormente, transferiu-se 0,5 mL da suspensão obtida para cada placa de Petri contendo os meios sintético ou PDA. Espalhou-se a suspensão na superfície das placas com o auxílio de uma espátula estéril. As placas de Petri inoculadas foram levadas à estufa à temperatura de 25°C. O monitoramento do crescimento da levedura foi realizado diariamente. Placas de Petri sem o inóculo do micro-organismo foram preparadas como controle para identificar qualquer tipo de contaminação.

II.3.2.3- Reações de biotransformação do sclareol com a levedura *H. roseonigra*

Nas reações de biotransformação do sclareol, a levedura *H. roseonigra* foi cultivada em três meios de cultura líquidos diferentes (meio sintético, meio YM e meio PDB), os quais apresentam a mesma composição química dos meios de cultura sólidos (meio sintético, meio YM e meio PDA, respectivamente), porém sem a adição do agente solidificante (ágar).

As reações de biotransformação foram ensaiadas preparando-se três frascos Erlenmeyer de 250 mL, cada um contendo 100 mL de um dos três meios de cultura líquidos. Esterilizou-se em autoclave a 120°C por 20 min. Posteriormente, realizou-se o inóculo do micro-organismo no meio de cultura líquido, adicionando-se um fragmento (0,5 x 0,5 cm), cortado com uma espátula estéril, do meio de cultura sólido (de mesma composição química do meio de cultura líquido) contendo os micélios do micro-organismo selecionado. Os frascos Erlenmeyer foram levados ao agitador orbital

(25°C, 150 rpm) para o crescimento da levedura por 72 h. Após este período, foram adicionados 50 mg de sclareol (0,1625 mmol), previamente solubilizado em 0,5 mL de Tween 80, em cada frasco Erlenmeyer. O monitoramento das reações foi realizado a cada 24 h, coletando-se 1 mL de amostra em um tubo Eppendorf de 5,0 mL, extraído-se com acetato de etila (1 mL) e analisando-se a fase orgânica por CCD e HPLC. Reações controle, sem a adição de substrato, também foram realizadas seguindo o mesmo procedimento experimental.

II.3.2.4- Isolamento, purificação e determinação dos rendimentos dos produtos de biotransformação

Experimentos adicionais foram realizados em triplicata, como descrito no item II.3.2.3, para o isolamento, a purificação e a caracterização dos compostos formados. Após o término das reações, as células das leveduras foram separadas do meio reacional através de centrifugação com rotação média de 3500 rpm. Posteriormente, realizou-se a extração do meio reacional utilizando-se acetato de etila (3 x 50 mL). As fases orgânicas foram reunidas, secas com Na₂SO₄ anidro e então evaporadas em rota-evaporador. Os extratos obtidos foram purificados por CC de sílica gel (230–400 mesh), sendo utilizada como eluente uma mistura de acetato de etila: heptano na proporção 1:1. Os produtos obtidos foram confirmados a partir de análises de HPLC, através da comparação dos seus tempos de eluição com os padrões químicos obtidos comercialmente dos compostos sclareolide **12** e ambradiol **13** (Figura II.7).

Figura II.7- Estruturas químicas dos compostos empregados como padrões nas análises de HPLC.

Na Figura II.8 é apresentado um fluxograma ilustrativo do procedimento experimental realizado nas reações de biotransformação do sclareol com o micro-organismo *H. roseonigra*.

Figura II.8- Biotransformação do sclareol com a levedura *H. roseonigra*.

II.3.2.5- Reação de biotransformação do sclareol com a levedura *H. roseonigra* por processo fermentativo descontínuo

A reação de bioconversão do sclareol no composto ambradiol **13** pela levedura *H. roseonigra* foi realizada via processo fermentativo descontínuo, em um biorreator com capacidade nominal de 20 L (New MBR, Zurique, Suíça). Este processo de fermentação foi realizado em duas etapas:

- 1- *Preparo da pré-cultura:* Inicialmente, preparou-se 500 mL de meio de cultura líquido PDB em um frasco Erlenmeyer de 1L. Esterilizou-se em autoclave a 120°C por 20 min. Posteriormente, o inóculo do micro-organismo no meio de cultura líquido foi realizado adicionando-se três fragmentos (0,5 x 0,5 cm), cortados com uma espátula estéril, do meio de cultura sólido PDA contendo micélios da levedura *H. roseonigra*. O frasco Erlenmeyer foi levado ao agitador orbital (25°C, 150 rpm) para o crescimento do micro-organismo por 24 h, quando a concentração de células da levedura atingiu o valor de 1×10^7 células.mL⁻¹.
- 2- *Fermentação:* O processo fermentativo foi realizado em um biorreator de 20 L, utilizando-se um volume constante de 10 L de meio de cultura líquido PDB previamente esterilizado.

O biorreator foi operado com o valor fixo de pH = 5,0, o qual foi ajustado através da adição de soluções HCl 2M ou NaOH 5M. Por se tratar de um processo aeróbio, utilizou-se oxigênio dissolvido com saturação acima de 20%, a qual foi mantida pela adição de ar comprimido e pelo controle da velocidade de agitação em 500 rpm. O meio de cultivo foi mantido à temperatura constante de 25°C. O inóculo da levedura foi realizado, de maneira asséptica, transferindo-se 500 mL da pré-cultura da levedura *H. roseonigra* para o biorreator. Posteriormente, foram adicionados 5g de sclareol ao meio de cultivo. O monitoramento do processo fermentativo foi realizado a cada 24h, coletando-se 5 mL de amostra em um tubo Falcon de 15,0 mL, extraindo-se com acetato de etila (2 mL) e analisando-se a fase orgânica por HPLC.

A Figura II.9 apresenta um esquema ilustrativo do processo fermentativo de biotransformação do sclareol com o micro-organismo *H. roseonigra*.

Figura II.9- Processo fermentativo da biotransformação do sclareol com a levedura *H. roseonigra*.

II.4- RESULTADOS E DISCUSSÕES

II.4.1- Biotransformação de produtos naturais por fungos marinhos

II.4.1.1- Reações de biotransformação do (-)-ambrox com fungos marinhos

A triagem dos micro-organismos marinhos para as reações de biotransformação do (-)-ambrox **10** foi realizada conforme o procedimento experimental descrito na Seção II.3.1.4. As reações foram monitoradas a cada 24h por CCD e GC-FID. Reações de controle microbiano (sem a adição do substrato) também foram preparadas. Após 10 dias de reação, observou-se que apenas os fungos *Bostryospharia* sp. Br09, *Eutypella* sp. Br23 e *A. sydowii* Ce19 haviam biotransformado o substrato empregado. Os cromatogramas obtidos nas análises com 10 dias de reação são apresentados na Figura II.10.

Figura II.10- Cromatogramas obtidos por GC-FID para as reações de biotransformação do (-)-ambrox **10**.

(A) Padrão (-)-ambrox **10**; Reações de biotransformação do (-)-ambrox com os fungos (10 dias): (B) Br09; (C) Br23 e (D) Ce19.

Condições de análise: $T_i = 200^\circ\text{C}$; $T_f = 250^\circ\text{C}$; $r = 5^\circ\text{C}/\text{min}$; coluna DB-5.

Verificou-se que mesmo após 10 dias de incubação dos fungos com o (-)-ambrox, uma boa parte do substrato permaneceu inalterada, provavelmente devido à difícil solubilização do (-)-ambrox em meio aquoso. Observou-se que as reações com os três micro-organismos apresentaram sinais nos cromatogramas com tempos de retenção (t) com valores próximos e maiores que do padrão (-)-ambrox ($t_{Br09}= 6,26$ min; $t_{Br23}= 6,27$ min; $t_{Ce19}= 6,37$ min; $t_{ambrox}= 4,22$ min). As análises por GC-FID das reações controle para estes fungos não apresentaram sinais consideráveis nos cromatogramas. Assim, pode-se sugerir que esses micro-organismos foram capazes de biotransformar o (-)-ambrox em produtos de maior polaridade.

As reações de biotransformação com os fungos *Bostryospharia* sp. Br09, *Eutypella* sp. Br23 e *A. sydowii* Ce19 foram realizadas em quintuplicata para o isolamento, a purificação e a identificação dos produtos formados. As análises realizadas por GC-MS, IV, RMN de 1H e RMN de ^{13}C revelaram que estes fungos apresentaram atividade oxidorreductase, promovendo reações de hidroxilação regioseletivas no substrato empregado. Assim, os fungos *Bostryospharia* sp. Br09 e *Eutypella* sp. Br23 bioconverteram o (-)-ambrox **10** no composto 3 β -hidroxi-ambrox **10a**, com rendimentos de 17% e 11%, respectivamente (Esquema II.21).

Esquema II.21- Reações de biotransformação do (-)-ambrox **10** com os fungos *Bostryospharia* sp. Br09 e *Eutypella* sp. Br23.

O fungo *A. sydowii* Ce19 catalisou a biotransformação do (-)-ambrox **10** no composto 1 β -hidroxi-ambrox **10b**, com rendimento de 14% (Esquema II.22).

Esquema II.22- Reação de biotransformação do (-)-ambrox **10** com fungo *A. sydowii* Ce19.

Os resultados obtidos nas reações de biotransformação do (-)-ambrox **10** por fungos marinhos são apresentados na Tabela II.2.

Tabela II.2- Reações de biotransformação do (-)-ambrox **10** por fungos marinhos.^a

Fungos	Tempo de reação (dias)	Produto obtido	Massa isolada produto (mg)	Rendimento (%)
<i>Bostryospharia</i> sp. Br09	10	10a	18	17
<i>Eutypella</i> sp. Br23	10	10a	12	11
<i>A. sydowii</i> Ce19	10	10b	15	14

^aCondições de reação: pré-cultivo dos fungos por 3 dias em 100 mL de meio malte 2%; 20 mg de ambrox, 25°C; 150 rpm (experimentos realizados em quintuplicata).

As reações de hidroxilação do (-)-ambrox catalisadas por estes micro-organismos foram regioseletivas, uma vez que mesmo prolongando-se o tempo de reação até 10 dias, apenas um produto mono-hidroxilado (1β- ou 3β-hidroxi-ambrox) foi obtido em cada reação, embora com modestos rendimentos. A partir de um levantamento bibliográfico realizado nos bancos de dados SciFinder, Scopus e Web of Science constatou-se que o metabólito 3β-hidroxi-ambrox **10a** também foi obtido em reações de biotransformação com os fungos *Alternaria alternata* (9 dias de reação, rendimento de 5%) (ALLENDES *et al.*, 2011), *Cephalosporium aphidicola* (10 dias de reação, rendimento de 8,5%) (HANSON e TRUNEH, 1996) e com células suspensas da planta *Actinidia deliciosa* (15 dias de reação, rendimento de 4,1%) (NASIB *et al.*, 2006). Já o metabólito 1β-hidroxi-ambrox **10b** apresenta somente um relato de sua obtenção na literatura, a partir da incubação do (-)-ambrox por 5 dias com o fungo *Cunninghamella* sp., com rendimento de 23% (ALLENDES *et al.*, 2011).

Caracterização estrutural dos compostos **10a** e **10b**

Os espectros de massas, IV, RMN de ¹H e RMN de ¹³C dos compostos **10a** e **10b** são apresentados em Anexo.

3β-hidroxi-ambrox (**10a**)

O 3β-hidroxi-ambrox **10a** foi isolado como um cristal branco. O espectro de massas deste composto apresentou um pico com m/z 252 [M^{+}], correspondente à fórmula molecular $C_{16}H_{28}O_2$ e um pico base com m/z 237 [$M-15$]⁺ (100%), o qual corresponde à perda de 15 u.m.a. que pode ser atribuída à perda de uma metila. Outros íons significativos observados no espectro de massas foram (m/z): 219 (25%), 135 (30%), 97 (50%) e 43 (45%).

No espectro de IV foi observada uma banda larga na região de 3443 cm^{-1} referente à deformação axial da ligação O-H, o que permitiu sugerir a hidroxilação enzimática do substrato. Para se determinar a posição do substituinte hidroxila na molécula, foram utilizadas as técnicas de RMN de ^1H e ^{13}C mono- e bidimensionais.

No espectro de RMN de ^{13}C foram observadas 16 linhas espectrais, todas correspondentes a carbonos sp^3 . A hidroxilação enzimática foi novamente confirmada pela presença de um carbono carbinólico em $\delta\ 79,0$ (C-3). O padrão de hidrogenação correspondente a cada átomo de carbono foi determinado através do espectro de DEPT 135° , o qual mostrou sinais para seis carbonos metilênicos (sinais com amplitude negativa), três carbonos metínicos e quatro carbonos metílicos (sinais com amplitude positiva). A subtração dos sinais presentes nos espectros de RMN de ^{13}C e DEPT 135° revelou a presença de três carbonos quaternários.

Através do espectro bidimensional de HSQC foi possível associar de forma inequívoca cada sinal de hidrogênio ao seu respectivo carbono. Dessa forma, observou-se que o hidrogênio ligado ao carbono carbinólico em $\delta\ 79,0$ refere-se a um sinal em $\delta\ 3,18$ correspondente a um duplo duplete, cujas constantes de acoplamento são $^3J_{ax-ax}=12,0$ e $^3J_{ax-eq}=6,0$ Hz. Assim, através das magnitudes das constantes de acoplamento dos hidrogênios vicinais, pode-se concluir que este hidrogênio encontra-se em posição axial. Dessa forma, foi possível inferir que o grupo hidroxila ligado ao carbono carbinólico situa-se em posição β -equatorial (Figura II.11).

Figura II.11- Constantes de acoplamento vicinal de H-3 ($\delta\ 3,18$).

Através da análise do espectro de HMBC, observou-se que o carbono carbinólico em $\delta\ 79,0$ apresentou correlações $^3J_{CH}$ com os hidrogênios nas posições H-1, H-14 e H-15 e uma correlação $^2J_{CH}$ com os hidrogênios na posição H-2. Assim, foi possível inferir a localização do substituinte hidroxila no carbono C-3. Os dados obtidos nos experimentos mono- e bidimensionais estão de acordo com a literatura para a estrutura proposta do composto 3 β -hidroxi-ambrox **10a** (HANSON e TRUNEH, 1996). As atribuições completas dos valores de deslocamento químico dos hidrogênios e carbonos são apresentados na Tabela II.3.

Tabela II.3- RMN de ^1H (300 MHz) e RMN de ^{13}C (75 MHz) do composto **10a** (CDCl_3 , δ em ppm, J em Hz).

#C	δ C	δ H	DEPT	HMBC	
				$^2J_{\text{CH}}$	$^3J_{\text{CH}}$
1	38,1	1,47 (1H, t, $J = 3,0$) 1,43 (1H, t, $J = 3,0$)	CH_2		H-16
2	27,1	1,58 (2H, m)	CH_2		
3	79,0	3,18 (1H, dd, $J = 12,0; 6,0$)	CH	H-2	H-1; H-14; H-15
4	38,7	-	C	H-14; H-15	
5	55,9	0,85 (1H, dd, $J = 12,0; 3,0$)	CH		H-1; H-14; H-15; H-16
6	20,4	1,70 (2H, m)	CH_2		
7	39,5	1,88 (1H, dd, $J = 9,0; 3,0$) 1,32 (1H, m)	CH_2		H-13
8	79,7	-	C	H-13	H-12 (1H; δ 3,75)
9	60,0	1,28 (1H, m)	CH	H-11 (1H; δ 1,67)	H-13; H-16
10	35,9	-	C		
11	22,6	1,67 (1H, dd, $J = 9,0; 3,0$) 1,61 (1H, dd, $J = 9,0; 3,0$)	CH_2		
12	64,9	3,86 (1H, m) 3,75 (1H, q, $J = 18,0; 9,0$)	CH_2		
13	21,0	1,02 (3H, s)	CH_3		H-9
14	28,2	0,93 (3H, s)	CH_3		H-15
15	15,1	0,73 (3H, s)	CH_3		H-14
16	15,1	0,78 (3H, s)	CH_3		H-1 (1H; δ 1,43); H-9

1β-hidroxi-ambrox (10b)

O 1β-hidroxi-ambrox **10b** foi isolado como um óleo amarelo, com rotação óptica de $[\alpha]_D^{25} = -0,01^\circ$ ($c = 0,4$; CHCl_3). O espectro de massas deste composto apresentou um pico com m/z 252 $[\text{M}^+]$, correspondente à fórmula molecular $\text{C}_{16}\text{H}_{28}\text{O}_2$ e um pico base com m/z 237 $[\text{M}-15]^+$ (100%), o qual corresponde à perda de 15 u.m.a. que pode ser atribuída à perda de uma metila. A presença do pico com m/z 235 $[\text{M}-17]^+$ (48%) corresponde à perda de 17 u.m.a., o que pode sugerir a perda de uma hidroxila. Outros íons significativos observados no espectro de massas foram (m/z): 163 (38%), 137 (42%), 113 (45%) e 84 (70%).

No espectro de IV foi observada uma banda larga na região de 3422 cm^{-1} referente à deformação axial da ligação O-H, o que permitiu sugerir a hidroxilação enzimática do substrato. A determinação da posição do substituinte hidroxila na molécula foi realizada de forma semelhante ao composto 3β-hidroxi-ambrox **10a**, utilizando-se as técnicas de RMN de ^1H e ^{13}C mono- e bidimensionais.

No espectro de RMN de ^{13}C foram observadas 16 linhas espectrais correspondentes a carbonos sp^3 . A hidroxilação enzimática foi novamente confirmada pela presença de um carbono carbinólico em δ 79,8 (C-1). Através do espectro bidimensional de HSQC, observou-se que o hidrogênio ligado a este carbono carbinólico refere-se a um sinal em δ 3,36 correspondente a um duplo duplete, cujas constantes de acoplamento são $^3J_{ax-ax} = 12,0$ e $^3J_{ax-eq} = 4,0$ Hz. Assim, através das magnitudes das constantes de acoplamento dos hidrogênios vicinais, pode-se concluir que este hidrogênio encontra-se em posição axial. Dessa forma, foi possível inferir que o grupo hidroxila ligado ao carbono carbinólico situa-se em posição β-equatorial (Figura II.12).

Figura II.12- Constantes de acoplamento vicinal de H-1 (δ 3,36).

A análise do espectro bidimensional de HMBC revelou que o carbono carbinólico (δ 79,8) apresenta uma correlação $^3J_{\text{CH}}$ com os hidrogênios na posição H-16 e uma correlação $^2J_{\text{CH}}$ com os hidrogênios na posição H-2. Dessa forma foi possível inferir a ligação do grupo hidroxila ao carbono na posição C-1. Os dados obtidos nos experimentos mono- e bidimensionais estão de acordo com a literatura para a estrutura proposta do composto 1β-hidroxi-ambrox **10b**.

(ALLENDES *et al.*, 2011). As atribuições completas dos valores de deslocamento químico dos hidrogênios e carbonos são apresentados na Tabela II.4.

Tabela II.4- RMN de ^1H (400 MHz) e RMN de ^{13}C (100 MHz) do composto **10b** (CDCl_3 , δ em ppm, J em Hz).

#C	$\delta\text{ C}$	$\delta\text{ H}$	DEPT	HMBC	
				$^3J_{\text{CH}}$	$^4J_{\text{CH}}$
1	79,8	3,36 (1H, dd, $J = 12,0$; 4,0)	CH	H-16	
2	28,0	1,60 (2H, m)	CH_2		H-15
3	40,5	1,43 (1H, m) 1,30 (1H, m)	CH_2	H-14; H-15	
4	32,7	-	C	H-2; H-6 (2H)	
5	55,6	0,92 (1H, m)	CH	H-14; H-15; H-16	H-11
6	20,6	1,42 (1H, m) 1,77 (1H, m)	CH_2		H-15
7	39,4	1,41 (1H, m) 1,96 (1H, m)	CH_2	H-13	
8	80,2	-	C	H-12 (1H; δ 3,85)	
9	58,8	1,47 (1H, m)	CH	H-1; H-13; H-16	
10	41,8	-	C	H-6 (2H)	H-14; H-15
11	25,7	1,90-2,10 (2H, m)	CH_2		
12	64,9	3,85 (1H, q, $J = 16,0$ e 8,0) 3,92 (1H, td, $J = 8,0$ e 4,0)	CH_2		
13	21,1	1,11 (3H, s)	CH_3		H-11
14	20,9	0,85 (3H, s)	CH_3	H-3; H-5	
15	33,0	0,89 (3H, s)	CH_3	H-3; H-5	H-2; H-6 (2H)
16	10,9	0,87 (3H, s)	CH_3	H-1; H-5; H-9	

II.4.1.2- Reações de biotransformação do sclareol com fungos marinhos

A triagem dos micro-organismos marinhos para as reações de biotransformação do sclareol **11** foi realizada conforme o procedimento experimental descrito na Seção II.3.1.4. As reações foram monitoradas a cada 24h por CCD e HPLC. Reações de controle microbiano (sem a adição do substrato) também foram preparadas. Após um período de 3 dias, observou-se que as reações catalisadas pelos fungos *Xylaria* sp. Br61, *Bostryospharia* sp. Br09 e *Eutypella* sp. Br23 apresentaram sinais de biotransformação do substrato empregado, com uma alta conversão do sclareol adicionado. Os cromatogramas obtidos nas análises com 3 dias de reação são apresentados na Figura II.13.

Figura II.13- Cromatogramas obtidos por HPLC para as reações de biotransformação do sclareol **11**.

(A) Padrão sclareol **11**; Reações de biotransformação do sclareol com os fungos (3 dias): (B) Br61; (C) Br09 e (D) Br23.

Condições de análise: fase móvel acetonitrila/água (75:25); fluxo 1mL.min⁻¹.

Dessa forma, as reações de biotransformação com os fungos *Xylaria* sp. Br61, *Bostryospharia* sp. Br09 e *Eutypella* sp. Br23 foram realizadas em quintuplicata para o isolamento, a purificação e a identificação dos produtos formados. As análises realizadas por GC-MS, IV, RMN de ¹H e RMN de ¹³C revelaram que estes fungos apresentaram atividade oxidorrredutase, promovendo reações de hidroxilação no substrato empregado. Assim, o fungo *Xylaria* sp. Br61

biotransformou o sclareol **11** nos compostos 3 β -hidroxi-sclareol **11a** e 18-hidroxi-sclareol **11b**, com rendimentos de 31% e 10%, respectivamente (Esquema II.23).

Esquema II.23- Reação de biotransformação do sclareol **11** com o fungo *Xylaria* sp. Br61.

Os fungos *Bostryospharia* sp. Br09 e *Eutypella* sp. Br23 bioconverteram o sclareol **11** no composto 3 β -hidroxi-sclareol **11a**, com rendimentos de 69% e 55%, respectivamente (Esquema II.24).

Esquema II.24- Reações de biotransformação do sclareol **11** com os fungos *Bostryospharia* sp. Br09 e *Eutypella* sp. Br23.

Os resultados obtidos nas reações de biotransformação do sclareol **11** por fungos marinhos são apresentados na Tabela II.5.

Tabela II.5- Reações de biotransformação do sclareol **11** por fungos marinhos.^a

Fungos	Tempo de reação (dias)	Produto obtido	Massa isolada produto (mg)	Rendimento (%)
<i>Xylaria</i> sp. Br61	3	11a	32	31
<i>Xylaria</i> sp. Br61	3	11b	11	10
<i>Bostryospharia</i> sp. Br09	3	11a	72	69
<i>Eutypella</i> sp. Br23	3	11a	58	55

^aCondições de reação: pré-cultivo dos fungos por 3 dias em 100 mL de meio malte 2%; 20 mg de sclareol, 25°C; 150 rpm (experimentos realizados em quintuplicata).

As reações de hidroxilação do sclareol **11** catalisadas por estes micro-organismos demonstraram-se regiosseletivas, fornecendo os produtos mono-hidroxilados 3 β -hidroxi-sclareol **11a** e 18-hidroxi-sclareol **11b**. A partir de um levantamento bibliográfico realizado nos bancos de dados SciFinder, Scopus e Web of Science constatou-se que esses dois metabólitos também foram

obtidos em reações de biotransformação com os fungos *Rhizopus stolonifer* (8 dias de reação, rendimentos: **11a** = 20%; **11b** = 68%) (DÍEZ *et al.*, 2005), *Cephalosporium aphidicola* (10 dias de reação, rendimentos: **11a** = 2%; **11b** = 10%) (HANSON *et al.*, 1994), *Cunninghamella* sp. (8 dias de reação, rendimentos: **11a** = 28%; **11b** = 37%) (KOUZI e CHESNEY, 1991) e *Mucor plumbeus* (2 dias de reação, rendimentos: **11a** = 84%; **11b** = 5%) (ARANDA e LALLEMAND, 1991).

Caracterização estrutural dos compostos **11a** e **11b**

Os espectros de massas, IV, RMN de ^1H e RMN de ^{13}C dos compostos **11a** e **11b** são apresentados em Anexo.

3 β -hidroxi-sclareol (**11a**)

O 3 β -hidroxi-sclareol **11a** foi isolado como um cristal branco, com rotação óptica de $[\alpha]_D^{25} = -9,30^\circ$ ($c = 0,3$; CHCl_3). O espectro de massas deste composto apresentou um pico base com m/z 289 $[\text{M}+1-36]^+$ (100%). Outros íons significativos observados foram (m/z): 307 $[\text{M}+1-18]^+$ (60%), o qual corresponde à perda de 18 u.m.a. que pode ser atribuída à perda de água e 271 (90%).

No espectro de IV foi observada uma banda larga na região de 3368 cm^{-1} referente à deformação axial da ligação O-H. Não foi possível sugerir pelo espectro de IV a hidroxilação enzimática do sclareol, uma vez que este composto já apresenta duas hidroxilas na sua estrutura.

No espectro de RMN de ^1H foram observados sinais referentes a duplos dupletos em δ 5,96 (H-14); δ 5,25 (H-15) e δ 5,07 (H-15'), os quais correspondem aos hidrogênios vinílicos que são desblindados pelo efeito da anisotropia da ligação dupla. O acoplamento desses hidrogênios foi determinado a partir das magnitudes de suas constantes de acoplamento (Figura II.14).

Figura II.14- Constantes de acoplamento dos hidrogênios vinílicos do composto **11a**.

Observou-se também um sinal de hidrogênio em δ 3,25 correspondente a um duplo duplete, cujas constantes de acoplamento ($^3J_{ax-ax} = 12,0$ e $^3J_{ax-eq} = 3,0$ Hz) revelaram o seu

posicionamento axial. A análise em conjunto com o espectro bidimensional de HSQC revelou que este hidrogênio está ligado a um carbono carbinólico em δ 78,8 (C-3). Assim, foi possível inferir que a hidroxila ligada a este carbono situa-se em posição β -equatorial (Figura II.15).

Figura II.15- Constantes de acoplamento vicinal de H-3 (δ 3,25).

Outros sinais também observados no espectro de RMN de ^1H foram δ 1,31; δ 1,19; δ 1,02; δ 0,79 e δ 0,83, os quais correspondem a singletos referentes às metilas existentes na molécula. A atribuição completa dos valores de deslocamento químico dos hidrogênios para o composto **11a** é apresentada na Tabela II.6.

O espectro de RMN de ^{13}C apresentou 20 linhas espectrais. Foram observados três sinais referentes a carbonos carbinólicos (δ 78,8; δ 74,5 e δ 73,6), o que permitiu confirmar a monohidroxilação do substrato. O padrão de hidrogenação correspondente a cada átomo de carbono foi determinado através do espectro de DEPT 135°, o qual mostrou sinais para sete carbonos metilênicos, quatro carbonos metínicos e cinco carbonos metílicos. A subtração dos sinais presentes nos espectros de RMN de ^{13}C e DEPT 135° revelou a presença de quatro carbonos quaternários.

Através do espectro bidimensional de HSQC foi possível associar de forma inequívoca cada sinal de hidrogênio ao seu respectivo carbono. A análise do espectro bidimensional de HMBC permitiu determinar a posição do grupo substituinte hidroxila na molécula. Assim, observou-se que o carbono carbinólico em δ 78,8 apresentou correlações $^3J_{\text{CH}}$ com os hidrogênios nas posições H-18 e H-20 e uma correlação $^2J_{\text{CH}}$ com os hidrogênios na posição H-2. Assim, foi possível inferir a localização do substituinte hidroxila no carbono C-3. Os dados obtidos nos experimentos mono- e bidimensionais estão de acordo com a literatura para estrutura proposta do composto 3 β -hidroxisclareol **11a** (KOUZI e CHESNEY, 1991). As atribuições completas dos valores de deslocamento químico dos hidrogênios e carbonos são apresentados na Tabela II.6.

Tabela II.6- RMN de ^1H (300 MHz) e RMN de ^{13}C (75 MHz) do composto **11a** (CDCl_3 , δ em ppm, J em Hz).

#C	δ C	δ H	DEPT	HMBC	
				$^2J_{\text{CH}}$	$^3J_{\text{CH}}$
1	37,8	1,72-1,69 (2H, m)	CH_2		H-20
2	27,1	1,68 (2H, m)	CH_2		
3	78,8	3,25 (1H, dd, $J = 12,0; 3,0$)	CH	H-2	H-18; H-19
4	38,8	-	C	H-18; H-19	
5	54,9	0,94 (1H, dd, $J = 12,0; 3,0$)	CH		H-18; H-19; H-20
6	20,2	1,70-1,67 (2H, m)	CH_2		
7	44,2	1,89-1,87 (1H, m) 1,40 (1H, m)	CH_2		H-17
8	74,5	-	C	H-17	
9	61,3	1,14 (1H, m)	CH		H-17; H-20
10	38,9	-	C	H-20	
11	19,1	1,52 (2H, m)	CH_2	H-9; H-12	
12	44,8	1,70-1,66 (2H, m)	CH_2		H-16
13	73,6	-	C	H-14; H-16	H-15
14	145,8	5,96 (1H, dd, $J = 18,0; 9,0$)	CH		H-16
15	111,3	5,07 (1H, dd, $J = 12,0; 3,0$) 5,25 (1H, dd, $J = 18,0; 3,0$)	CH_2		
16	27,4	1,31 (3H, s)	CH_3		
17	24,2	1,20 (3H, s)	CH_3		H-7
18	28,1	1,02 (3H, s)	CH_3		H-19
19	15,3	0,79 (3H, s)	CH_3		H-18
20	15,4	0,83 (3H, s)	CH_3		

18-hidroxi-sclareol (**11b**)

O 18-hidroxi-sclareol **11b** foi isolado como um cristal branco, com rotação óptica de $[\alpha]_D^{25} = + 2,30^\circ$ ($c = 0,2$; CHCl_3). O espectro de massas deste composto apresentou picos com m/z : 289 $[\text{M}+1-36]^+$ (100%); 307 $[\text{M}+1-18]^+$ (30%), o qual corresponde à perda de 18 u.m.a. que pode ser atribuída à perda de água e 271 $[\text{M}-54]^+$ (55%).

No espectro de IV foi observada uma banda larga na região de 3422 cm^{-1} referente à deformação axial da ligação O-H. Não foi possível sugerir pelo espectro de IV a hidroxilação do sclareol, uma vez que este composto já apresenta duas hidroxilas na sua estrutura.

No espectro de RMN de ^1H foram observados sinais referentes a duplos dupletos em δ 5,87 (H-14); δ 5,14 (H-15) e δ 4,95 (H-15'), os quais correspondem aos hidrogênios vinílicos, cujos acoplamentos foram determinados a partir das magnitudes de suas constantes de acoplamento: H-14 ($^3J_{trans} = 15,0\text{ Hz}$ e $^3J_{cis} = 9,0\text{ Hz}$); H-15 ($^3J_{cis} = 9,0\text{ Hz}$ e $^3J_{gem} = 3,0\text{ Hz}$) e H-15' ($^3J_{trans} = 18,0\text{ Hz}$ e $^3J_{gem} = 3,0\text{ Hz}$). Foram observados também dois dupletos, referentes a dois hidrogênios diastereotópicos, com deslocamentos de δ 3,36 e δ 3,02, que apresentam as constantes de acoplamento geminais $^3J_{gem} = 12,0$ e $^3J_{gem} = 9,0\text{ Hz}$, respectivamente. A análise do espectro bidimensional de HSQC revelou que estes hidrogênios estão ligados a um carbono carbinólico em δ 71,9 (C-18). Outros sinais também observados no espectro referem-se aos quatro singletos em δ 1,20; δ 1,08; δ 0,65 e δ 0,75, que integram para três hidrogênios cada e correspondem às metilas presentes na molécula. Como o substrato sclareol apresenta em sua estrutura cinco substituintes metila, pode-se inferir que a hidroxilação enzimática ocorreu em uma metila da molécula. A atribuição completa dos valores de deslocamento químico dos hidrogênios para o composto **11b** é apresentada na Tabela II.8.

O espectro de RMN de ^{13}C apresentou 20 linhas espectrais. Foram observados três sinais referentes a carbonos carbinólicos (δ 74,7; δ 73,8 e δ 71,9), o que permitiu confirmar a mono-hidroxilação do substrato. O padrão de hidrogenação correspondente a cada átomo de carbono foi determinado através do espectro de DEPT 135° , o qual mostrou sinais para nove carbonos metilênicos, três carbonos metínicos e quatro carbonos metílicos. A subtração dos sinais presentes nos espectros de RMN de ^{13}C e DEPT 135° revelou a presença de quatro carbonos quaternários.

Através do espectro bidimensional de HSQC foi possível associar cada sinal de hidrogênio ao seu respectivo carbono. A análise do espectro bidimensional de HMBC permitiu determinar as correlações a longa distância presentes na molécula. Para se determinar em qual substituinte metila ocorreu a reação de hidroxilação, comparou-se os dados obtidos no espectro de RMN de ^{13}C com os

dados descritos na literatura para os compostos sclareol, 18-hidroxi-sclareol e 19-hidroxi-sclareol (Tabela II.7). Assim, comparando-se os valores de deslocamento químico dos carbonos do substrato sclareol **11** e do produto obtido **11b**, observou-se que o sinal referente ao carbono na posição C-4 do composto **11b** apresentou um deslocamento em campo mais baixo quando comparado ao padrão sclareol **11** (**11b**- δ 37,6; **11**- δ 33,3), enquanto que os outros carbonos quaternários (C-8, C-10 e C-13) apresentaram valores de deslocamento químico muito próximos nos dois compostos. Assim, foi possível inferir que a reação de hidroxilação enzimática ocorreu em uma das metilas ligadas ao carbono quaternário C-4 (metilas C-18 e C-19). A partir da comparação com os dados existentes na literatura dos deslocamentos químicos dos carbonos para os compostos 18-hidroxi-sclareol e 19-hidroxi-sclareol, concluiu-se que o produto **11b** foi hidroxilado na posição C-18 e se refere ao composto 18-hidroxi-sclareol (Tabela II.7).

Tabela II.7- Valores de deslocamento químico dos carbonos nos compostos sclareol, 18-hidroxi-sclareol, 19-hidroxi-sclareol e do produto de biotransformação **11b** (HANSON *et al.*, 1994).

#C	Sclareol (lit.)	18-hidroxi- sclareol (lit.)	19-hidroxi-sclareol (lit.)	Produto 11b
1	40,1	39,2	39,7	39,2
2	18,8	17,7	18,0	17,7
3	42,3	35,2	35,5	35,2
4	33,3	37,6	38,4	37,6
5	56,4	49,2	56,7	48,9
6	20,9	20,2	20,6	20,2
7	45,2	44,0	44,2	43,8
8	73,4	74,6	74,4	74,7
9	62,2	61,7	61,6	61,6
10	39,6	39,1	39,1	39,1
11	20,2	19,1	19,1	19,0
12	46,5	44,9	44,7	44,8
13	73,1	73,6	73,3	73,8
14	147,6	146,0	146,1	145,8
15	110,8	111,2	110,9	111,3
16	28,4	27,1	26,9	27,0
17	24,8	24,1	23,8	24,1
18	33,6	72,0	26,2	71,9
19	21,7	17,3	64,8	17,3
20	15,7	15,7	15,8	15,7

Os dados obtidos nos experimentos mono- e bidimensionais estão de acordo com a literatura para a estrutura proposta do composto 18-hidroxi-sclareol **11b** (HANSON *et al.*, 1994). As atribuições completas dos valores de deslocamento químico dos hidrogênios e carbonos são apresentados na Tabela II.8.

Tabela II.8- RMN de ^1H (300 MHz) e RMN de ^{13}C (75 MHz) do composto **11b** (CDCl_3 , δ em ppm, J em Hz).

#C	δ C	δ H	DEPT	HMBC	
				$^2J_{\text{CH}}$	$^3J_{\text{CH}}$
1	39,2	1,57 (1H, m)	CH_2		
2	17,7	1,72 (2H, m)	CH_2		
3	35,2	1,68 (2H, m)	CH_2		H-18; H-19
4	37,6	-	C	H-18; H-19	
5	48,9	1,18 (1H, m)	CH		H-18; H-19; H-20
6	20,2	1,65 (2H, m)	CH_2		
7	43,8	1,90-1,87 (1H, m) 1,45 (1H, m)	CH_2		H-17
8	74,7	-	C	H-17	
9	61,6	1,12 (1H, m)	CH		H-17; H-20
10	39,1	-	C	H-20	
11	19,0	1,57 (2H, m)	CH_2	H-12	
12	44,8	1,41 (2H, m)	CH_2		H-16
13	73,8	-	C	H-16	H-11; H-15
14	145,8	5,86 (1H, dd, $J = 15,0; 9,0$)	CH		H-16
15	111,3	4,95 (1H, dd, $J = 9,0; 3,0$) 5,14 (1H, dd, $J = 18,0; 2,0$)	CH_2		
16	27,0	1,21 (3H, s)	CH_3		H-12
17	24,1	1,09 (3H, s)	CH_3		H-7 H-9
18	71,9	3,02 (1H, d, $J = 9,0$) 3,36 (1H, d, $J = 12$)	CH_2		H-19
19	17,3	0,66 (3H, s)	CH_3		H-18 (1H; δ 3,36)
20	15,7	0,76 (3H, s)	CH_3		

II.4.1.3- Reações de biotransformação do (+)-sclareolide com fungos marinhos

A triagem dos micro-organismos marinhos para as reações de biotransformação do (+)-sclareolide **12** foi realizada conforme o procedimento experimental descrito na Seção II.3.1.4. As reações foram monitoradas a cada 24h por CCD e HPLC. Reações de controle microbiano (sem a adição do substrato) também foram preparadas. Após um período de 12 dias, observou-se que apenas as reações catalisadas pelos fungos *Bostryospharia* sp. Br09 e *Eutypella* sp. Br23 apresentaram sinais de biotransformação do substrato empregado. Os cromatogramas obtidos nas análises com 12 dias de reação são apresentados na Figura II.16.

Figura II.16- Cromatogramas obtidos por HPLC para as reações de biotransformação do (+)-sclareolide **12**.

(A) Padrão (+)-sclareolide **12**; Reações de biotransformação do (+)-sclareolide com os fungos (12 dias): (B) Br09 e (C) Br23.

Condições de análise: fase móvel acetonitrila/água (70:30); fluxo 1mL.min⁻¹.

Verificou-se que mesmo após 12 dias de incubação dos fungos com o (+)-sclareolide, uma boa parte do substrato permaneceu inalterada, provavelmente devido à difícil solubilização do (+)-sclareolide em meio aquoso. As reações de biotransformação com os fungos *Bostryospharia* sp. Br09 e *Eutypella* sp. Br23 foram então realizadas em quintuplicata para o isolamento, a purificação e a identificação dos produtos formados. As análises realizadas por GC-MS, IV, RMN de ¹H e RMN de ¹³C revelaram que estes fungos apresentaram atividade oxidorreductase, promovendo reações de hidroxilação regioseletivas no (+)-sclareolide **12**, fornecendo assim o composto 3β-hidroxi-sclareolide **12a**, com rendimentos de 34% com o fungo *Bostryospharia* sp. Br09 e 7% com o fungo *Eutypella* sp. Br23 (Esquema II.25).

Esquema II.25- Reações de biotransformação do (+)-sclareolide **12** com os fungos *Bostryospharia* sp. Br09 e *Eutypella* sp. Br23.

Os resultados obtidos nas reações de biotransformação do (+)-sclareolide **12** por fungos marinhos são apresentados na Tabela II.9.

Tabela II.9- Reações de biotransformação do sclareolide **12** por fungos marinhos.^a

Fungos	Tempo de reação (dias)	Produto obtido	Massa isolada produto (mg)	Rendimento (%)
<i>Bostryospharia</i> sp. Br09	12	12a	36	34
<i>Eutypella</i> sp. Br23	12	12a	8	7

^aCondições de reação: pré-cultivo dos fungos por 3 dias em 100 mL de meio malte 2%; 20 mg de sclareolide, 25°C; 150 rpm (experimentos realizados em quintuplicata).

A partir de um levantamento bibliográfico realizado nos bancos de dados SciFinder, Scopus e Web of Science constatou-se que o metabólito 3β-hidroxi-sclareolide **12a** também foi obtido em reações de biotransformação com diversos fungos, como exemplo, com os fungos *Cephalosporium aphidicola* (10 dias de reação, rendimento de 38%) (HANSON e TRUNEH, 1996), *Aspergillus niger* (14 dias de reação, rendimento de 37%) e *Beauveria bassiana* (14 dias de reação, rendimento de 51%) (CANO *et al.*, 2011).

Caracterização estrutural do composto **12a**

Os espectros de massas, IV, RMN de ¹H e RMN de ¹³C do compostos **12a** são apresentados em Anexo.

3β-hidroxi-sclareolide (**12a**)

O 3β-hidroxi-sclareolide **12a** foi isolado como um cristal branco, com rotação óptica de $[\alpha]^{25}_D = -30^\circ$ ($c = 0,4$; CHCl_3). O espectro de massas deste composto apresentou um pico com m/z 267 $[\text{M}^+ + 1]$ (32%), correspondente à fórmula molecular $\text{C}_{16}\text{H}_{26}\text{O}_3$ e um pico base com m/z 249 $[\text{M} + 1 - 18]^+$ (100%), o qual

corresponde à perda de 18 u.m.a. que pode ser atribuída à perda de água. Outros íons significativos que observados no espectro de massas foram (m/z): 207 (20%), 189 (65%) e 153 (32%).

No espectro de IV foi observada uma banda larga na região de 3490 cm^{-1} referente à deformação axial da ligação O-H, o que permitiu sugerir a hidroxilação enzimática do substrato. Para se determinar a posição do substituinte hidroxila na molécula, foram utilizadas as técnicas de RMN de ^1H e ^{13}C mono- e bidimensionais.

No espectro de RMN de ^{13}C foram observadas 16 linhas espectrais, todas correspondentes a carbonos sp^3 , com exceção do sinal em $\delta\ 176,5$, que se refere ao carbono carbonílico sp^2 (C-12). A hidroxilação enzimática foi novamente confirmada pela presença de um carbono carbinólico em $\delta\ 78,6$ (C-3). O padrão de hidrogenação correspondente a cada átomo de carbono foi determinado através do espectro de DEPT 135° , o qual mostrou sinais para cinco carbonos metilênicos, três carbonos metínicos e quatro carbonos metílicos. A subtração dos sinais presentes nos espectros de RMN de ^{13}C e DEPT 135° revelou a presença de quatro carbonos quaternários.

Através do espectro bidimensional de HSQC foi possível associar cada sinal de hidrogênio ao seu respectivo carbono. Dessa forma, observou-se que o hidrogênio ligado ao carbono carbinólico em $\delta\ 78,6$ refere-se a um sinal em $\delta\ 3,19$ correspondente a um duplo duplete, cujas constantes de acoplamento são $^3J_{ax-ax}=12,0$ e $^3J_{ax-eq}=6,0$ Hz. Assim, através das magnitudes das constantes de acoplamento dos hidrogênios vicinais, pode-se concluir que este hidrogênio encontra-se em posição axial. Dessa forma, foi possível inferir que o grupo hidroxila ligado ao carbono carbinólico situa-se em posição β -equatorial (Figura II.17).

Figura II.17- Constantes de acoplamento vicinal de H-3 ($\delta\ 3,19$).

Através da análise do espectro de HMBC, observou-se que o carbono em $\delta\ 78,6$ apresentou correlações $^3J_{CH}$ com os hidrogênios nas posições H-1, H-14 e H-15 e uma correlação $^2J_{CH}$ com os hidrogênios na posição H-2. Assim, foi possível inferir a localização do substituinte hidroxila no carbono C-3. Os dados obtidos nos experimentos mono- e bidimensionais estão de acordo com a literatura para a estrutura proposta do composto 3β -hidroxi-sclareolide **12a** (HANSON e TRUNEH, 1996). As atribuições completas dos valores de deslocamento químico dos hidrogênios e carbonos são apresentados na Tabela II.10.

Tabela II.10- RMN de ^1H (300 MHz) e RMN de ^{13}C (75 MHz) do composto **12a** (CDCl_3 , δ em ppm, J em Hz).

#C	δ C	δ H	DEPT	HMBC	
				$^2J_{\text{CH}}$	$^3J_{\text{CH}}$
1	37,6	1,38 (1H, m) 1,11 (1H, m)	CH_2		H-16
2	26,8	1,63-1,60 (2H, m)	CH_2		
3	78,6	3,19 (1H, dd, $J = 12,0; 6,0$)	CH	H-2	H-1; H-14; H-15
4	38,8	-	C	H-14; H-15	
5	55,2	0,97-0,92 (1H, m)	CH		H-14; H-15; H-16
6	20,2	1,40-1,34 (1H, m) 1,83-1,78 (1H, m)	CH_2		
7	38,4	2,00 (1H, t, $J = 3$) 2,04 (1H, t, $J = 3$)	CH_2		H-9; H-13
8	86,1	-	C	H-7; H-13	H-6 (1H; δ 1,83-1,78); H-11
9	58,8	1,88-1,82 (1H, m)	CH	H-11 (1H; δ 2,33)	H-13; H-16
10	35,7	-	C	H-16	
11	28,7	2,17 (1H, dd, $J = 15,0$ e $6,0$) 2,35 (1H, m)	CH_2		
12	176,5	-	C	H-11	
13	21,5	1,27 (3H, s)	CH_3		
14	27,8	0,94 (3H, s)	CH_3		H-15
15	15,0	0,74 (3H, s)	CH_3		H-14
16	15,1	0,85 (3H, s)	CH_3		H-1 (1H; δ 1,11)

II.4.2- Estudo da reação de biotransformação do sclareol pelo micro-organismo *Hyphozyma roseonigra*

II.4.2.1- Reação de biotransformação do sclareol pelo micro-organismo *Hyphozyma roseonigra*

A reação de biotransformação do sclareol **11** no composto ambradiol **13** catalisada pela levedura *H. roseonigra* foi descrita por Farbood e col. (1989) na patente US 4,798,799. Neste trabalho, o autor sugere diversas condições experimentais possíveis para esta biotransformação, porém poucas informações sobre a eficiência de cada condição experimental são apresentadas. O autor relata que esta reação de biotransformação é realizada, com bons resultados, a partir do emprego das seguintes condições experimentais:

- A levedura *H. roseonigra* pode ser utilizada em diferentes formas, como através de células suspensas no meio de cultura ou em solução tampão, células imobilizadas ou extratos enzimáticos;
- Este micro-organismo deve ser cultivado em condições aeróbias e em meio aquoso enriquecido com nutrientes, como exemplo, fontes de nitrogênio, sais inorgânicos, fatores de crescimento e fontes de carbono;
- A temperatura de cultivo do micro-organismo deve estar entre 18-28°C;
- O pH do meio de cultura deve ser entre pH = 3 - 6,5;
- A concentração do substrato deve ser entre 0,5 e 30 g/L. O substrato pode ser adicionado na sua forma sólida, solubilizado em solvente orgânico ou na presença de um agente emulsificante como o Tween 80.

Existem poucos trabalhos na literatura que relatam o estudo desta bioconversão (STEENKAMP, 2010) embora haja um grande interesse industrial nesta reação uma vez que o produto obtido (ambradiol **13**) pode ser convertido através do emprego de zeólitas no (-)-ambrox **10**, um composto de grande interesse comercial, como mencionado na Seção II.1.4 (Esquema II.26).

Esquema II.26- Síntese industrial biocatalítica do (-)-ambrox a partir do composto sclareol.

Assim, no presente trabalho foi realizado um estudo utilizando-se três meios de cultura (meio sintético, meio YM e meio PDB) para o crescimento da levedura *H. roseonigra*. As reações

de biotransformação foram promovidas utilizando-se as células da levedura suspensas nos diferentes meios de cultura líquidos, à temperatura de 25°C e pH = 5. O substrato sclareol **11** foi adicionado na forma de uma emulsão com Tween 80 (100 mg/mL) à concentração de 0,5 g/L. Este procedimento experimental foi descrito na Seção II.3.2.3 e está de acordo com as condições experimentais sugeridas na patente US 4,798,799.

O micro-organismo *H. roseonigra* é uma levedura isolada de uma amostra de solo de New Jersey (EUA) e que está depositada na “*American Type Culture Collection*” (ATCC) com o código ATCC 20624. Esta levedura foi obtida comercialmente na sua forma liofilizada e a re-ativação do micro-organismo foi realizada em placas de Petri contendo o meio de cultura sólido YM (ATCC 200) de acordo com o procedimento experimental descrito na Seção II.3.2.1. Após um período de cinco dias, observou-se o crescimento de colônias de coloração rósea, de aspecto liso e brilhante, com um formato redondo ou cilíndrico. Estas características estão de acordo com a morfologia descrita pela ATCC para a levedura *H. roseonigra*. Não foram observados micro-organismos contaminantes nas placas de Petri, o que indicou que a reativação da levedura foi realizada com sucesso (Figura II.18).

Figura II.18- Reativação da levedura *H. roseonigra* em placa de Petri contendo o meio de cultura sólido YM por cinco dias.

As placas de Petri que apresentaram um bom crescimento da levedura *H. roseonigra* no meio de cultura sólido YM foram selecionadas para posteriores repiques nos meios de cultura sólidos sintético e PDA. Em todos os casos, o micro-organismo se desenvolveu com morfologia semelhante e sem a presença de contaminantes.

As reações de biotransformação do sclareol **11** com a levedura *H. roseonigra* foram realizadas nos três meios de cultura líquidos (meios sintético, YM e PDB) de acordo com o procedimento experimental descrito na Seção II.3.2.3. e foram monitoradas a cada 24h por CCD,

HPLC e por medidas de pH. A Figura II.19 apresenta a análise por CCD realizada em uma cromatofolha de sílica gel utilizando-se como eluente uma mistura de acetato de etila: heptano na proporção 1:1 e obtida com 3 dias de reação.

Figura II.19- Reação de biotransformação do sclareol **11** com a levedura *H. roseonigra* nos meios de cultura líquidos PDB, YM e sintético.

Legenda:

Scl- padrão sclareol **11**

Amb- padrão ambradiol **13**

Scd- padrão sclareolide **12**

PDB- Reação de biotransformação do sclareol **11** com a levedura *H. roseonigra* no meio PDB em 72h

YM- Reação de biotransformação do sclareol **11** com a levedura *H. roseonigra* no meio YM em 72h

MS- Reação de biotransformação do sclareol **11** com a levedura *H. roseonigra* no meio sintético em 72 h

Como pode ser observado na Figura II.19, as reações realizadas nos meios de cultura líquidos PDB e YM apresentaram a biotransformação do sclareol **11** no composto ambradiol **13**, embora ainda seja observada a presença do substrato com 3 dias de reação. A reação promovida no meio de cultura líquido sintético não apresentou sinais que evidenciem qualquer biotransformação do substrato empregado. Assim, as reações foram acompanhadas por um período de 5 dias, quando observou-se um consumo praticamente total do sclareol adicionado nas reações realizadas nos meios de cultura PDB e YM, com a obtenção do produto ambradiol **13**. A reação com o meio de cultura sintético novamente não apresentou sinais de biotransformação do substrato. Os cromatogramas obtidos para as reações de biotransformação do sclareol pela levedura *H. roseonigra* nos meios de cultura líquidos sintético, YM e PDB após 5 dias de reação são apresentados na Figura II.20.

Figura II.20- Cromatogramas obtidos por HPLC para as reações de biotransformação do sclareol **11** com a levedura *H. roseonigra* nos meios de cultura líquidos sintético, YM e PDB.

(A) Padrão sclareol **11**; (B) Padrão ambradiol **13**; Reações de biotransformação do sclareol **11** com a levedura *H. roseonigra* nos meios de cultura (5 dias): (C) sintético; (D) YM e (E) PDB.

Condições de análise: fase móvel acetonitrila/água (75:25); fluxo 1 mL.min⁻¹.

Como pode ser observado na Figura II.20, as reações realizadas nos meios de cultura líquidos YM e PDB apresentaram uma alta conversão do sclareol após um período de 5 dias de reação. Essas reações foram promovidas com a concentração mínima de sclareol (0,5 g/L) sugerida pela patente US 4,798,799, a qual afirma que a concentração de substrato empregada nesta reação deve variar na faixa de 0,5 a 30 g/L. Assim, adicionou-se mais 100 mg de sclareol previamente solubilizado em Tween 80 à concentração de 100 mg/mL às reações realizadas nos meios de cultura líquidos YM e PDB. Essas reações foram monitoradas a cada 24h por CCD, HPLC e medidas de pH. Após 14 dias de reação, observou-se que a reação realizada no meio de cultura líquido PDB apresentou uma alta conversão do substrato, com a formação do produto ambradiol **13**. O pH desta biotransformação manteve-se constante (pH = 4,8) durante todo o período de reação. A reação realizada no meio de cultura líquido YM apresentou uma baixa conversão do sclareol adicionado, com a formação dos compostos ambradiol **13** e sclareolide **12**. Observou-se uma alteração nos

valores de pH medidos durante a reação (pH = 5,0 – 9,1), de modo que o pH desta reação apresentou valores fora da faixa de variação de pH sugerida pela patente US 4,798,799 (pH = 3 – 6,5). Os cromatogramas obtidos para as reações de biotransformação do sclareol pela levedura *H. roseonigra* nos meios de cultura líquidos PDB e YM após 15 dias de reação são apresentados na Figura II.21.

Figura II.21- Cromatogramas obtidos por HPLC para as reações de biotransformação do sclareol **11** com a levedura *H. roseonigra* nos meios de cultura líquidos PDB e YM.

(A) Padrão sclareol **11**; (B) Padrão ambradiol **13**; Reações de biotransformação do sclareol **11** com a levedura *H. roseonigra* nos meios de cultura (15 dias): (C) PDB e (D) YM.

Condições de análise: fase móvel acetonitrila/água (75:25); fluxo 1mL.min⁻¹.

Assim, após 15 dias de reação, realizou-se a extração, o isolamento e a purificação das reações promovidas nos meios de cultura líquidos sintético, PDB e YM de acordo com o procedimento experimental descrito na Seção II.3.2.4. Os rendimentos dos produtos obtidos nas reações de biotransformação são apresentados na Tabela II.11.

Tabela II.11- Reações de biotransformação do sclareol **11** com a levedura *H. roseonigra*.

Meio de cultura	Tempo de reação (dias)	Rendimento (%)	
		12	13
sintético	15	-	-
PDB	15	-	82
YM	15	11	32

Como pode ser observado, a reação realizada no meio de cultura líquido PDB apresentou o melhor resultado quanto à biotransformação do sclareol **11** no ambradiol **13**, com um alto rendimento de 82% (Esquema II.27).

Esquema II.27- Reação de biotransformação do sclareol **11** com a levedura *H. roseonigra* em meio de cultura líquido PDB.

Esta reação apresentou algumas vantagens que favorecem a sua aplicação em um processo fermentativo conduzido em biorreator: (i) elevada eficiência na conversão do substrato no produto de interesse; (ii) permitiu o acúmulo do produto no meio de cultura, não havendo a formação de substâncias incompatíveis com o produto que pudessem acarretar em reações laterais indesejadas; (iii) o produto foi liberado facilmente para o meio de cultura, não sendo observado o acúmulo do produto nas células da levedura e (iv) a reação não exigiu condições experimentais complexas, ocorrendo em condições de temperatura (25°C) e pH = 4,8 constantes. No entanto, esta reação apresentou como desvantagem o alto custo do meio de cultura PDB (R\$ 420,00 o frasco de 250g da marca Fluka) o que dificulta a condução desta reação em um processo fermentativo de larga escala. Nesse contexto, o uso do meio de cultura líquido sintético seria interessante, uma vez que este meio de cultura é menos dispendioso e apresenta uma composição química definida, o que facilita o seu emprego em escala industrial, embora não tenha sido observada a biotransformação do sclareol neste meio de cultura.

Assim, realizou-se a reação de biotransformação do sclareol com a levedura *H. roseonigra* utilizando-se o meio de cultura sintético com uma composição química modificada, através da redução da quantidade de glicose adicionada de 25 g.L⁻¹ para 12 g.L⁻¹ e da adição de 10 mg de sclareol como uma nova fonte de carbono, com o intuito de induzir a biotransformação deste substrato pela levedura. As placas de Petri contendo o meio de cultura sólido sintético modificado foram preparadas como descrito na Seção II.3.2.2. A reação de biotransformação do sclareol pela levedura *H. roseonigra* no meio de cultura líquido sintético modificado foi realizada como descrito na Seção II.3.2.3, sendo acompanhada a cada 24h por CCD, HPLC e medidas de pH. Após 10 dias de reação, foi observada a biotransformação do sclareol **11** no produto ambradiol **13**, embora com uma baixa conversão. Os cromatogramas obtidos para a reação de biotransformação do sclareol pela

levedura *H. roseonigra* no meio de cultura líquido sintético modificado após 10 dias de reação são apresentados na Figura II.22.

Figura II.22- Cromatogramas obtidos por HPLC para a reação de biotransformação do sclareol **11** com a levedura *H. roseonigra* no meio de cultura líquido sintético modificado.

(A) Padrão sclareol **11**; (B) Padrão ambradiol **13** e (C) Reação de biotransformação do sclareol **11** com a levedura *H. roseonigra* no meio de cultura líquido sintético modificado (10 dias).

Condições de análise: fase móvel acetonitrila/água (75:25); fluxo 1mL.min⁻¹.

Como pode ser observado, a modificação da composição química do meio de cultura sintético resultou na indução da reação de biotransformação do sclareol **11** no produto ambradiol **13**, embora com uma baixa eficiência, o que inviabiliza o emprego desta condição experimental em um processo fermentativo em maior escala. Após 10 dias de reação, realizou-se a extração, o isolamento e a purificação dos produtos obtidos de acordo com o procedimento experimental descrito na Seção II.3.2.4. O produto de interesse ambradiol **13** foi obtido com um rendimento de 8% (Esquema II.28).

Esquema II.28- Reação de biotransformação do sclareol **11** com a levedura *H. roseonigra* em meio de cultura líquido sintético modificado.

Este resultado sugere que é possível promover a reação de biotransformação do sclareol com a levedura *H. roseonigra* em um meio de cultura de composição menos complexa que o meio de cultura PDB, o qual é preparado a partir de uma infusão de 300 g de batatas fatiadas em 1 L de

água destilada fervente, com a posterior adição de 20 g de dextrose. Assim, este resultado desperta o interesse em um estudo mais aprofundado sobre as necessidades nutricionais da levedura *H. roseonigra* nesta reação de biotransformação, a fim de se determinar um meio de cultura de composição mais simples e baixo custo para ser utilizado na produção do ambradiol em larga escala.

Como a reação de biotransformação do sclareol com a levedura *H. roseonigra* no meio de cultura líquido PDB apresentou o melhor resultado quanto à conversão do substrato no produto de interesse ambradiol **13**, esta condição experimental foi utilizada em um processo fermentativo conduzido em um biorreator de capacidade nominal de 20 L, como descrito na Seção II.3.2.5, com o intuito de se avaliar a reprodutibilidade desta reação em um processo de fermentação. O biorreator foi operado com um valor fixo de pH = 5,0, utilizando-se oxigênio dissolvido com saturação acima de 20%, velocidade de agitação de 500 rpm e temperatura de reação constante a 25°C. A concentração inicial do substrato foi de 0,5 g.L⁻¹. O monitoramento do processo fermentativo foi realizado a cada 24h por HPLC.

Observou-se que a reação de biotransformação do sclareol com a levedura *H. roseonigra* promovida em biorreator demonstrou-se igualmente eficiente na conversão do substrato no composto ambradiol **13**. Conforme era observado por HPLC o consumo total do substrato adicionado, foram adicionados mais 5 g de sclareol ao caldo fermentativo. O processo de fermentação foi acompanhado por um período de 12 dias, sendo adicionado um total de 25 g de sclareol no biorreator. Após o período de 12 dias de reação, coletou-se uma alíquota de 1 L do caldo fermentativo com o intuito de se estimar o rendimento da reação, de acordo com o procedimento experimental descrito na Seção II.3.2.4. As células da levedura *H. roseonigra* foram centrifugadas e posteriormente realizou-se a extração do caldo fermentativo com acetato de etila. O produto de interesse ambradiol **13** foi obtido após purificação por CC com um rendimento de 72% (Esquema II.29)

Esquema II.29- Reação de biotransformação do sclareol **11** com a levedura *H. roseonigra* conduzida em um biorreator.

Como pode ser observado, este processo fermentativo demonstrou-se eficiente para a reação de biotransformação do sclareol no composto ambradiol catalisada pela levedura *H.*

roseonigra, embora ainda seja necessária uma melhor avaliação quanto às necessidades nutricionais do micro-organismo para esta biotransformação e também quanto aos procedimentos de *downstream* para este processo fermentativo, a fim de se obter um maior rendimento do composto ambradiol com o intuito de produzi-lo a nível industrial, em elevada escala e com um menor custo.

II.5- CONCLUSÕES

A partir das reações de biotransformação dos compostos (-)-ambrox **10**, sclareol **11** e (+)-sclareolide **12** com os micro-organismos marinhos *A. sydowii* Ce15, *P. raistriicki* Ce16, *A. sydowii* Ce19, *Hidropisphaera* sp. Br27, *Xylaria* sp. Br61, *Eutypella* sp. Br23, *Bostryospharia* sp. Br09, *P. oxalicum* F30 e *P. citrinum* F53, observou-se que os fungos *A. sydowii* Ce19, *Xylaria* sp. Br61, *Eutypella* sp. Br23 e *Bostryospharia* sp. Br09 apresentaram atividade oxidorreductase, promovendo reações de hidroxilação regiosseletivas nos substratos. Os fungos *Bostryospharia* sp. Br09 e *Eutypella* sp. Br23 catalisaram a biotransformação dos três terpenos utilizados como substratos. Já o fungo *A. sydowii* Ce19 biotransformou somente o (-)-ambrox **10** e o fungo *Xylaria* sp. Br61 biotransformou somente o sclareol **11**.

Observou-se também que as reações de hidroxilação catalisadas pelos fungos *Bostryospharia* sp. Br09, *Eutypella* sp. Br23 e *Xylaria* sp. Br61, todos isolados da alga marinha *Bostrychia radicans*, apresentaram um padrão de hidroxilação, apresentando uma estereopreferência pela hidroxilação na posição equatorial do carbono C-3 dos substratos. Este fato também foi observado em diversas reações de biotransformação catalisadas por diferentes fungos descritas na literatura e acredita-se que este padrão de hidroxilação esteja relacionado aos processos de transformação xenobiótica desses substratos pelas enzimas mono-oxigenases do citocromo P-450 presentes nesses micro-organismos.

Através das reações de biotransformação do sclareol **11** no ambradiol **13** catalisadas pela levedura comercial *H. roseonigra* com o uso de três meios de cultura líquidos diferentes, observou-se que a reação com o meio de cultura líquido PDB apresentou uma boa eficiência na conversão do substrato no produto de interesse, o qual foi obtido com um rendimento de 82%. Esta reação foi realizada também através de um processo fermentativo conduzido em biorreator, apresentando bons resultados quanto à conversão da reação, porém com a desvantagem do alto custo do meio de cultura PDB, o que inviabiliza a realização deste processo fermentativo em larga escala. Assim, se faz necessário uma avaliação mais rigorosa das necessidades nutricionais da levedura *H. roseonigra* para esta biotransformação, a fim de que seja possível a realização desta reação em um meio de cultura menos dispendioso.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAHAM, W.R. Microbial hydroxylation of sclareol. **Phytochemistry**, v. 36, p. 1421-1424, 1994.

ADAM, W.; LAZARUS, M.; SAHA-MÖLLER, C.; WEICHOL, O.; HOCH, U.; HÄRING, D.; SCHRELIER, P. Biotransformation with peroxidases. **Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology**, v. 63, p. 73-108, 1999.

ALLENDES, J.A.; BUSTOS, D.A.; PACCIARONI, A.D.V.; SOSA, V.E.; BUSTOS, D.A. Microbial functionalization of (-)-ambroxide by filamentous fungi. **Biocatalysis and Biotransformation**, v. 29, p. 83-86, 2011.

ANDERSON, E.M.; KARIN, M.; KIRK, O. One biocatalyst – many applications: The use of *Candida antarctica* B-lipase in organic synthesis. **Biocatalysis and Biotransformation**, v. 16, p. 181-204, 1998.

ANTHONSEN, T.; HOFF, B.H. Resolution of derivatives of 1,2-propanediol with lipase B from *Candida antarctica*. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 93, p. 199-207, 1998.

ARANDA, G.; LALLEMAND, J.Y. Microbial hydroxylation of sclareol by *Mucor plumbeus*. **Tetrahedron Letters**, v. 32, p. 1783-1786, 1991.

ATA, A.; CONCI, L.J.; BETTERIDGE, J.; ORHAN, I.; SENER, B. Novel microbial transformations of sclareolide. **Chemical Pharmaceutical Bulletin**, v. 55, p. 118-123, 2007.

BANKAR, S.P.; BULE, M.V.; SINGHAL, R.S.; ANANTHANARAYAN, L.A. Glucose oxidase - An overview. **Biotechnology Advances**, v. 27, p. 489-500, 2009.

BLANK, L.M.; EBERT, B.E.; BUEHLER, K.; BUEHLER, B. Redox biocatalysis and metabolism: Molecular mechanisms and metabolic network analysis. **Antioxidants e Redox Signaling**, v. 13, p. 489-500, 2010.

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

CABRAL, J.M.S.; AIRES-BARROS, M.R.; GAMA, M. **Engenharia Enzimática**. Lisboa: Lidel, 2003. 540 p.

CANO, A.; RAMÍREZ, M.T.; DELGADO, G. Biotransformation of sclareolide by filamentous fungi: Cytotoxic evaluations of the derivatives. **Journal of Brazilian Chemistry Society**, v. 22, p. 1177-1182, 2011.

CHEN, C.S.; FUJIMOTO, Y.; GIRDAUKAS, G.; SIR, C.J. Quantitative analyses of biochemical kinetic resolutions of enantiomers. **Journal of American of Chemical Society**, v. 104, p. 7294-7299, 1982.

CHOUDHARY, M.I.; MUSHARRAF, S.G.; SAMI, A.; RAHMAN, A. Microbial transformation of sesquiterpenes (-)-ambrox and (+)-sclareolide. **Helvetica Chimica Acta**, v. 87, p. 2685-2694, 2004.

CHRISTOFFERS, J.; WERNER, T.; FREY, W.; BARO, A. Straightforward synthesis of (*R*)-(-)-Kjellmanianone. **Chemical European Journal**, v. 10, p. 1042-1045, 2004.

CSIR. Disponível em: <<http://www.csir.co.za>>. Acesso em: 27 abr. 2012.

DE CARVALHO, C.C.C.R.; DA FONSECA, M.M.R. Biotransformation of terpenes. **Biotechnology Advances**, v. 24, p. 134-142, 2006.

DÍEZ, D.; SANCHEZ, J.M.; RODILLA, J.M.; ROCHA, P.M.; MENDES, R.S.; PAULINO, C.; URONES, J.G. Microbial hydroxylation of sclareol by *Rhizopus stolonifer*. **Molecules**, v. 10, p. 1005-1009, 2005.

DOMÍNGUEZ, P.; CARBONI-OERLEMANS, C.; TUIN, B. Biotechnological applications of *Candida antarctica* lipase A: state-of-the-art. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 37, p. 36-46, 2005.

DUETZ, W.A.; VAN BEILEN, J.B.; WITHOLT, B. Using proteins in their natural environment: potential and limitations of microbial whole-cell hydroxylations in applied biocatalysis. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 12, p. 419-425, 2001.

FABER, K. **Biotransformations in organic chemistry**. New York: Springer, 2011. 718 p.

FARBOOD, M.I.; MORRIS, J.A.; DOWNEY, A.E. **Process for producing diol and lactone and microorganisms capable of same**. US n. 4.970.163, 13 nov. 1990.

FARBOOD, M.I.; WILLIS, B.J. **Process for producing diol and furan and microorganism capable of same**. US n. 4.798.799, 17 jan. 1989.

FASAN, R. Tuning P-450 enzymes as oxidation catalysts. **American Chemical Society**, v. 2, p. 647-666, 2012.

FENG, Z.; NENKEP, V.N.; YUN, K.; ZHANG, D.; CHOI, H.D.; KANG, J.S.; SON, B.W. Biotransformation of bioactive (-)-mellein by a marine isolate of bacterium *Stappia* sp., **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 20, p. 985-987, 2010.

FENGLAI, S.; GANG, X.; JIANPING, W.; LERONG, Y. A new and facile preparation of tert-butyl (3*R*,5*S*)-6-hydroxy-3,5-O-isopropylidene-3,5-dihydroxyhexanoate. **Tetrahedron: Asymmetry**, v. 18, p. 2454-2461, 2007.

FÉRNANDEZ, V.G.; BRIEVA, R.; GOTOR, V. Lipases: Useful biocatalysts for the preparation of pharmaceuticals. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 40, p. 111-120, 2006.

GHANEM, A. Trends in lipase-catalyzed asymmetric access to enantiomerically pure/enriched compounds. **Tetrahedron**, v. 63, p. 1721-1754, 2007.

GIRHARD, M.; MACHIDA, K.; ITOH M.; SCHMID, R.D.; ARISAWA, A.; URLACHER, V.B. Regioselective biooxidation of (+)-valencene by recombinant *E. coli* expressing CYP109B1 from *Bacillus subtilis* in a two-liquid-phase system. **Journal of Microbial Cell Factories**, v. 8, p. 01-12, 2009.

GRUNWALD, P. **Biocatalysis-Biochemical Fundamental and Applications**. Editor: Imperial College press, 2009. 717 p.

HAGER, L.P.; LAKNER, F.J.; BASAVAPATHRUNI, A. Chiral synthons via chloroperoxidase catalysis. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 5, p. 95-101, 1998.

HANSON, J.R.; HITCHCOCK, P.B.; NASIR, H.; TRUNEH, A. The biotransformation of the diterpenoid, sclareol, by *Cephalosporium aphidicola*. **Phytochemistry**, v. 36, p. 903-906, 1994.

HANSON, J.R.; TRUNEH, A. The biotransformation of ambrox and sclareolide by *Cephalosporium aphidicola*. **Phytochemistry**, v. 42, p. 1021-1023, 1996.

HOFF, B.H.; ANTHONSEN, T. Gas chromatographic enantiomer separation of C-3 and C-4 synthons: Prediction of absolute configuration from elution order and enzymatic resolution. **Chirality**, v. 11, p. 760-767, 1999.

HOFF, B.H.; LJONES, L.; RONSTAD, A.; ANTHONSEN, T. Influence of substituents on enantiomeric ratio in transesterification of racemic C-3 synthons using lipase B from *Candida Antarctica*. **Journal of Molecular Catalysis B**, v. 8, p. 51-60, 2000.

JACOBSEN, E.E.; HELLEMOND, E.; MOEN, A.R.; PRADO, L.C.V.; ANTHONSEN, T. Enhanced selectivity in Novozym 435 catalyzed kinetic resolution of secondary alcohols and butanoates caused by the (*R*)-alcohols. **Tetrahedron Letters**, n. 44, p. 8453-8455, 2003.

JAEGER, K.E.; EGGERT, T. Lipases for biotechnology. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 13, p. 390-397, 2002.

KAMAL, A.; SANDBHOR, M.; SHAIK, A.A.; MALIK, M.S. A facile and convenient chemoenzymatic synthesis of optically active *O*-(4-methoxyphenyl)-glycidol and 1,2-diacyl-sn-glycerol. **Tetrahedron: Assymetry**, v. 16, p. 1855-1859, 2005.

KENNEDY, J.; MARCHESI, J.R.; DOBSON, A.D.W. Marine metagenomics: strategies for the discovery of novel enzymes with biotechnological applications from marine environments. **Journal of Microbial Cell Factories**, v. 7, p. 01-08, 2008.

KOSHIMURA, M.; UTSUKIHARA, T.; KAWAMOTO, M.; SAITO, M.; HORIUCHI, C.A.; KUNIYOSHI, M. Biotransformation of bromosquiterpenes by marine fungi. **Phytochemistry**, v. 70, p. 2023-2026, 2009.

KOUZI, S.A.; CHESNEY, J.D. Fungal metabolism of the diterpene sclareol by *Cunninghamella species*. **Journal of Natural Products**, v. 54, p. 483-490, 1991.

LOQUE, Carolina Pessanha. **Fungos algícolas associados a macroalgas do litoral do Paraná e Península Antártica**. 2009. 79 f. Dissertação (Mestrado em Ecologia e Ciências Biológicas)-Instituto de Ciências Exatas e Biológicas da Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 2009.

MATSUDA, T.; YAMANAKA, R.; NAKAMURA, K. Recent progress in biocatalysis for asymmetric oxidation and reduction. **Tetrahedron: Assymetry**, v. 20, p. 513-557, 2009.

- MENDES, A.A.; CASTRO, H.F.; PEREIRA, E.B; JÚNIOR, A.F. Aplicação de lipases no tratamento de águas residuárias com elevados teores de lipídeos. **Química Nova**, v. 28, p. 296-305, 2005.
- MOLINARI, F.; ROMANO, D.; GANDOLFI, R.; GUALANDRIS, R.; FERRARA, N. Biocatalysis for use in pharmaceutical manufacturing. **Journal of Biotechnology**, v. 131, p. 98-121, 2007.
- NASIB, A.; MUSHARRAF, S.G.; HUSSAIN, S.; KHAN, S.; ANJUM, S.; ALI, S.; RAHMAN, A.; CHOUDHARY, M.I. Biotransformation of (-)-ambrox by cell suspension cultures of *Actinidia deliciosa*. **Journal of Natural Products**, v. 69, p. 957-959, 2006.
- NELSON, D. L.; COX, M.M. **Lehninger: Principles of Biochemistry**. New York: Worth Publishers, 2000. 1152 p.
- OLIVEIRA, G.L.; MANTOVANI, M.S. Transformações biológicas: Contribuições e Perspectivas. **Química Nova**, v. 32, p. 742-756, 2009.
- ORIEL, P.J.; CHANG, H.C. **Production of perillyl cpds. such as perillyl alcohol, perillyl aldehyde and alpha-terpineol from limonene - using a *Bacillus stearothermophilus* strain**. US 5487988-A, 29 jan. 1996.
- PRADO, A.G.S. Química verde, os desafios da química do novo milênio. **Química Nova**, v. 26, p. 738-744, 2003.
- RANU, B.C.; BANERJEE, S. Ionic liquid as reagent. A green procedure for the regioselective conversion of epoxides to vicinal halohydrins using [AcMIm]X under catalyst- and solvent-free conditions. **Journal of Organic Chemistry**, v. 70, p. 4517-4519, 2005.
- REBOCHO, Sílvia Andreia da Siva Fernandes. Síntese de acetato de decilo por catálise enzimática em meio supercrítico. 2008. 49 f. Tese (Mestrado em Biotecnologia)- Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa, Lisboa, 2008.
- ROVIROSA, J.; ASTUDILLO, L.; SANCHEZ, I.; PALACIOS, Y.; SAN-MARTIN, A. Antimicrobial activity of halogenated sesquiterpenes of *Laurencia claviformis* from Easter Island. **Boletín de la Sociedad Chilena de Química**, v. 34, p. 147-152, 1989.
- SANFILIPINO, C.; NICOLOSI, G. Catalytic behaviour of chloroperoxidase from *Caldariomyces fumago* in oxidation of cyclic conjugated dienes. **Tetrahedron Asymmetry**, v. 13, p. 1889-1892, 2002.
- SCHMID, R.D.; VERGER, R. Lipases: interfacial enzymes with attractive applications. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 37, p. 1608-1633, 1998.
- SILVA, F.M.; LACERDA, P.S.B.; JUNIOR, J. Desenvolvimento sustentável e química verde. **Química Nova**, v. 28, p. 103-110, 2005.
- SILVERMAN, R.B. **The organic chemistry of enzyme-catalyzed reactions**. San Diego: Academic Press, 2000. 717 p.

STEENKAMP, L.H.; TAKA, M. **Process for the production of ambrafuran**. US 2010/0248316 A1, 30 set. 2010.

SUNDBY, E.; HOLT, J.; VIK, A.; ANTHONSEN, T. Chemoenzymatic synthesis of (2*S*)- and (2*R*)-2-(1,3-dithian-2-ylmethyl)oxirane. **European Journal of Organic Chemistry**, v. 46, p. 1239-1243, 2004.

TAKAHATA, H.; TAKAHASHI, S.; KUONO, S-I.; MOMOSE, T.J. Symmetry assisted synthesis of C₂-symmetric trans- α,α' -bis(hydroxymethyl)pyrrolidine and -piperidine derivatives via double sharpless asymmetric dihydroxylation of $\alpha\omega$ -terminal dienes. **Journal of Organic Chemistry**, v. 63, p. 2224-2231, 1998.

TENIUS, B.S.M.; SCHROEDER, E.K. Ambergris: perfume e síntese. **Química Nova**, v. 23, p. 225-230, 2000.

URLACHER, V.B.; EIBEN, S. Cytochrome P-450 monooxygenases: perspectives for synthetic application. **Trends in Biotechnology**, v. 24, p. 26-36, 2006.

URLACHER, V.B.; GIRHARD, M. Cytochrome P-450 monooxygenases: an update on perspectives for synthetic application. **Trends in Biotechnology**, v. 30, p. 324-330, 2012.

URLACHER, V.; SCHMID, R.D. Biotransformations using prokaryotic P-450 monooxygenases. **Current opinion in Biotechnology**, v. 13, p. 557-564, 2002.

WOOLEY, P.; PETERSEN, S.B. **Lipases, their structure, biochemistry and application**. Cambridge: University Press, 1994. 41 p.

XU, C.; ZHONGHUA, Y.; RONG, Z.; GAI, Y. Production of chiral aromatic alcohol by asymmetric reduction with vegetable catalyst. **Chinese Journal of Chemical Engineering**, v. 18, p. 1029-1033, 2010.

XU, T.; ZHANG, L.; SU, E.; CUI, D.; WANG, X.; WEI, D. Disparity in productive binding mode of the slow-reacting enantiomer determines the novel catalytic behavior of *Candida antarctica* lipase B. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 62, p. 288-296, 2010.

ZHANG, C.; KIM, S-K. Research and application of marine microbial enzymes: status and prospects. **Marine Drugs**, v. 8, p. 1920-1934, 2010.

CAPÍTULO III

ANEXOS

III. ANEXOS

III.1- MATERIAIS E EQUIPAMENTOS UTILIZADOS

Reagentes e solventes

Os reagentes (epóxidos, ácidos HCl e HBr, anidrido acético, piridina, acetato de vinila, KOH, LiOH, ambrox, sclareol, sclareolide e ambradiol), os sais (água do mar artificial e Na₂SO₄), os meios de cultura, o ágar e os solventes (hexano, acetato de etila, diclorometano, etanol, heptano e éter dietílico) foram obtidos de fontes comerciais (Sigma-Aldrich, Fluka, Synth, Acumedia, Merck e Vetec) e utilizados sem prévia purificação.

Instrumentação e condições

Os espectros de RMN de ¹H e RMN de ¹³C foram obtidos nos espectrômetros: Bruker/AC-200 (CAQI-IQSC)- frequências: 200 MHz (RMN de ¹H) e 50 MHz (RMN de ¹³C); Bruker/AVANCE III (UFSCar)- frequências: 400 MHz (RMN de ¹H) e 100 MHz (RMN de ¹³C); Bruker/AVANCE III (CNRS)- frequências: 300 MHz (RMN de ¹H) e 75 MHz (RMN de ¹³C).

O solvente utilizado foi o clorofórmio deuterado (CDCl₃) e os deslocamentos químicos (δ) foram expressos em parte por milhão (ppm) em relação ao padrão interno tetrametilsilano (TMS). A multiplicidade dos sinais observados foi indicada pelas seguintes abreviaturas: s = singleto, sl = singleto largo, d = duplete, t = tripleto, q = quarteto, m = multiplete, dd = duplo duplete e td = triplo duplete. O número de hidrogênios foi determinado pela integral relativa e a constante de acoplamento (*J*) foi expressa em Hertz (Hz).

Os espectros de DEPT (Distortionless Enhancement by Polarization Transfer) com ângulo de 135° foram utilizados para determinar o tipo dos carbonos nos espectros de ¹³C, de acordo com a convenção: C (carbono quaternário, determinado pela comparação com o espectro de RMN de ¹³C desacoplado), CH (carbono metínico), CH₂ (carbono metilênico) e CH₃ (carbono metílico).

Foram utilizadas nas interpretações dos compostos as técnicas de RMN 2D (¹H e ¹³C HSQC e ¹H e ¹³C HMBC).

Os espectros de absorção na região do infravermelho (IV) foram obtidos em um espectrofotômetro de infravermelho com transformada de Fourier Bomem/MB-102 e calibração interna. As amostras foram preparadas na forma de filmes (líquidos) e em pastilhas de KBr (sólidos) e as frequências de absorção foram expressas em cm⁻¹.

As análises de cromatografia a gás (GC-FID) foram realizadas em um cromatógrafo a gás Shimadzu modelo 2010 GC/FID. As colunas utilizadas foram: a) VARIAN WCOT Fused Sílica (25

m x 0,25 mm x 0,39 μ m) fase estacionária CP-Chirasil-Dex CB e b) DB-5 (25m x 0,25mm e 0,25 μ m de espessura de filme). O gás de arraste foi o nitrogênio a 60 kPa e as temperaturas do injetor e do detector foram mantidas ambas a 200°C. As condições de análise foram determinadas para cada composto e estão apresentadas na Tabela III.1.

Tabela III.1- Programas utilizados nas análises por GC-FID para os compostos empregados neste trabalho.

Composto	T _i (°C)	t _i (min)	T _f (°C)	t _f (min)	r (°C/min)	t _r (min)
1	100	2	180	5	2	(S)16,6 e (R)16,8
2	100	2	180	5	2	26
3	60	2	180	5	2	(S)8,2 e (R)8,4
4a	160	2	200	5	2	8,2
4b	160	2	200	5	2	8,8
5a	160	2	200	5	2	13,8
5b	160	2	200	5	2	16,9
6a	90	2	150	5	1	(R)11,2 e (S)11,4
6b	100	2	135	5	1	16,8
7a	160	2	200	5	2	(R)9,2 e (S) 9,4
7b	160	2	200	5	2	(R)9,7 e (S)9,9
8a	160	2	200	5	2	(R)14,6 e (S)14,8
8b	160	2	200	5	2	(R)17,4 e (S)17,6
9a	90	2	150	5	1	(R)12,4 e (S)13,7
9b	100	2	135	5	1	(R)17,8 e (S)18,6
5b	90	2	160	5	2	9
8b	90	2	160	5	2	12,9
10	200	2	250	5	5	4,2
10a	200	2	250	5	5	6,3
10b	200	2	250	5	5	6,4

□ coluna VARIAN WCOT Fused Sílica (25 m x 0,25 mm x 0,39 μ m) fase estacionária CP-Chirasil-Dex CB.

■ coluna DB-5 (25 m x 0,25 mm e filme 0,25 μ m).

T_i = temperatura inicial; t_i = tempo inicial; T_f = temperatura final; t_f = tempo final; r = taxa de aquecimento; t_r = tempo de retenção.

As análises de espectrometria de massas de baixa resolução foram realizadas em um espectrômetro de massas acoplado a um cromatógrafo a gás modelo Shimadzu modelo QP2010-GCMS empregando-se a técnica de ionização por elétrons, com 70 eV de voltagem de ionização. A coluna empregada foi a DB-5. O gás de arraste foi o hélio a 63 kPa. A programação utilizada foi: temperatura inicial: 50°C, velocidade de aquecimento: 10°C.min⁻¹, temperatura final: 270°C, temperatura do injetor: 250°C e temperatura do detector: 250°C. O volume injetado das amostras, adequadamente diluídas, foi *ca.* 1 μ L na concentração de 1 mg.mL⁻¹.

As análises por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) foram realizadas em um sistema cromatográfico composto de uma bomba para gradiente quaternário Waters® 2695 associada a um detector de ultravioleta Waters® 2996. A coluna analítica utilizada foi a Sunfire C18 (4,6 x 150 mm, 3,5 µm) e as fases móveis empregadas nas análises foram misturas de acetonitrila:água nas proporções 75:25 ou 70:30, com fluxo de 1 mL.min⁻¹. Os tempos de eluição (t) dos compostos nas análises por HPLC foram: **11** (t = 43,5 min); **11a** (t = 25,0 min); **11b** (t = 28,5 min); **13** (t = 35,0 min) com fase móvel acetonitrila:água na proporção 75:25 e **12** (t = 43,0 min); **12a** (t = 25,0 min) com fase móvel acetonitrila:água na proporção 70:30.

As cromatografias em coluna (CC) foram realizadas utilizando-se sílica gel *flash* 60 230-400 da Across. As cromatografias em camada delgada (CCD) foram realizadas em cromatofolhas de sílica gel 60 F₂₅₄ da Sorbent Technologies. A revelação das cromatofolhas foi realizada com soluções de anisaldeído (100 mL de ácido acético, 1 mL de anisaldeído e 1 mL de ácido sulfúrico) ou de vanilina (135 mL H₂O destilada, 30 mL de H₂SO₄, 35 mL MeOH e 3,0 g vanilina). Para as fases móveis foram determinadas as misturas de solventes mais adequadas em cada situação.

As medidas de rotação óptica foram realizadas no DQ-UFSCar em um polarímetro Perkin-Elmer modelo 241 (Waltham MA, USA) equipado com lâmpada de Na (λ = 589 nm). As amostras foram diluídas em 1 mL de CHCl₃ grau espectroscópico e os experimentos foram realizados a 25°C.

Outros equipamentos utilizados

- Balança analítica modelo AY 220 da marca Shimadzu;
- Capelas de fluxo laminar das marcas Veco e Heralus-Kendro modelo D-63450;
- Autoclaves verticais da marca Phoenix;
- Medidor de pH modelo 8010 da marca Qualxtron;
- Centrífuga da marca Hermle;
- Centrífuga para eppendorfs modelo Centrifuge 5417C;
- Agitadores rotativos modelos Tecnal TE-421, Superohn e New Brunswick Scientific;
- Rota-evaporadores Fisaton e Tecnal T-210, ambos equipados com bomba de vácuo TE - 058 e refrigeração Tecnal modelo TE-2005.
- Fermentador com capacidade nominal de 20 L da marca New MBR, Suíça.

ESPECTROS

Figura III.1- Espectro de RMN de ^1H do composto **4a** (200 MHz, CDCl_3)

Figura III.2- Espectro de RMN de ^{13}C do composto **4a** (50 MHz, CDCl_3)

Figura III.3- Espectro de IV do composto **4a**

Figura III.4- Espectro de RMN de ^1H do composto **4b** (200 MHz, CDCl_3)

Figura III.5- Espectro de RMN de ^{13}C do composto **4b** (50 MHz, CDCl_3)

Figura III.6- Espectro de IV do composto **4b**

Figura III.7- Espectro de RMN de ^1H do composto **5a** (200 MHz, CDCl_3)

Figura III.8- Espectro de RMN de ^{13}C do composto **5a** (50 MHz, CDCl_3)

Figura III.9- Espectro de IV do composto **5a**

Figura III.10- Espectro de RMN de ^1H do composto **5b** (200 MHz, CDCl_3)

Figura III.11- Espectro de RMN de ^{13}C do composto **5b** (50 MHz, CDCl_3)

Figura III.12- Espectro de IV do composto **5b**

Figura III.13- Espectro de RMN de ^1H do composto **6a** (200 MHz, CDCl_3)

Figura III.14- Espectro de RMN de ^{13}C do composto **6a** (50 MHz, CDCl_3)

Figura III.15- Espectro de IV do composto **6a**

Figura III.16- Espectro de RMN de ^1H do composto **6b** (200 MHz, CDCl_3)

Figura III.17- Espectro de RMN de ^{13}C do composto **6b** (50 MHz, CDCl_3)

Figura III.18- Espectro de IV do composto **6b**

Figura III.19- Espectro de RMN de ^1H do composto **7a** (200 MHz, CDCl_3)

Figura III.20- Espectro de RMN de ^{13}C do composto **7a** (50 MHz, CDCl_3)

Figura III.21- Espectro de IV do composto **7a**

Figura III.22- Espectro de RMN de ^1H do composto **7b** (200 MHz, CDCl_3)

Figura III.23- Espectro de RMN de ^{13}C do composto **7b** (50 MHz, CDCl_3)

Figura III.24- Espectro de IV do composto **7b**

Figura III.25- Espectro de RMN de ^1H do composto **8a** (200 MHz, CDCl_3)

Figura III.26- Espectro de RMN de ^{13}C do composto **8a** (50 MHz, CDCl_3)

Figura III.27- Espectro de IV do composto **8a**

Figura III.28- Espectro de RMN de ^1H do composto **8b** (200 MHz, CDCl_3)

Figura III.29- Espectro de RMN de ^{13}C do composto **8b** (50 MHz, CDCl_3)

Figura III.30- Espectro de IV do composto **8b**

Figura III.31- Espectro de RMN de ^1H do composto **9a** (200 MHz, CDCl_3)

Figura III.32- Espectro de RMN de ^{13}C do composto **9a** (50 MHz, CDCl_3)

Figura III.33- Espectro de IV do composto **9a**

Figura III.34- Espectro de RMN de ^1H do composto **9b** (200 MHz, CDCl_3)

Figura III.35- Espectro de RMN de ^{13}C do composto **9b** (50 MHz, CDCl_3)

Figura III.36- Espectro de IV do composto **9b**

Figura III.37 - Espectro de RMN de ^1H do composto **10a** (300 MHz, CDCl_3) **Figura III.38** - Espectro de RMN de ^{13}C do composto **10a** (75 MHz, CDCl_3)

Figura III.39 - Espectro de RMN de ^{13}C - DEPT 135° do composto **10a** (75 MHz, CDCl_3)

Figura III.40- Espectro de IV do composto **10a**

Figura III.41 - Espectro de HSQC do composto **10a** (300 e 75 MHz, CDCl_3)

BR09 gHSQC.005.001.2rr.esp

BR09 gHSQC.005.001.2rr.esp

BR09 gHSQC.005.001.2rr.esp

Figura III.42- Espectro de HMBC do composto **10a** (300 e 75 MHz, CDCl_3)

BR09 gHMBC.006.001.2rr.esp

Figura III.43 - Espectro de massas do composto **10a** (IE, 70 eV)

Figura III.44 - Espectro de RMN de ^1H do composto **10b** (400 MHz, CDCl_3)

Figura III.45 - Espectro de RMN de ^{13}C do composto **10b** (100 MHz, CDCl_3)

Figura III.46 - Espectro de RMN de ^{13}C - DEPT 135° do composto **10b** (100 MHz, CDCl_3)

Figura III.47- Espectro de IV do composto **10b**

Figura III.48 - Espectro de HSQC do composto **10b** (400 e 100 MHz, CDCl_3)

Figura III.49 - Espectro de HMBC do composto **10b (400 e 100 MHz, CDCl₃)** **Figura III.50 - Espectro de massas do composto **10b** (IE, 70 eV)**

Figura III.51 - Espectro de RMN de ^1H do composto **11a** (300 MHz, CDCl_3)

Figura III.52 - Espectro de RMN de ^{13}C do composto **11a** (75 MHz, CDCl_3)

Figura III.53 - Espectro de RMN de ^{13}C - DEPT 135° do composto **11a** (75 MHz, CDCl_3)

Figura III.54- Espectro de IV do composto **11a**

Figura III.55- Espectro de HSQC do composto **11a** (300 e 75 MHz, CDCl₃)

SCLA 1 HSQC.esp

Figura III.56 - Espectro de massas do composto **11a** (IE, 70 eV)

Figura III.57- Espectro de HMBC do composto **11a** (300 e 75 MHz, CDCl_3)

Figura III.58 - Espectro de RMN de ^1H do composto **11b** (300 MHz, CDCl_3)

Figura III.59 - Espectro de RMN de ^{13}C do composto **11b** (75 MHz, CDCl_3)

Figura III.60- Espectro de RMN de ^{13}C - DEPT 135° do composto **11b** (75 MHz, CDCl_3)

Figura III.61- Espectro de IV do composto **11b**

Figura III.62 - Espectro de HSQC do composto **11b** (300 e 75 MHz, CDCl_3) **Figura III.63**- Espectro de massas do composto **11b** (IE, 70 eV)

Figura III.64- Espectro de HMBC do composto **11b** (300 e 75 MHz, CDCl_3)

SCLA 2 HMBC.esp

SCLA 2 HMBC.esp

Figura III.65 - Espectro de RMN de ^1H do composto **12a** (300 MHz, CDCl_3)

Figura III.66 - Espectro de RMN de ^{13}C do composto **12a** (75 MHz, CDCl_3)

Figura III.67- Espectro de RMN de ^{13}C - DEPT 135° do composto **12a** (75 MHz, CDCl_3)

Figura III.68- Espectro de IV do composto **12a**

Figura III.69- Espectro de HSQC do composto **12a** (300 e 75 MHz, CDCl₃)

SCDE HSQC.esp

Figura III.70- Espectro de HMBC do composto **12a** (300 e 75 MHz, CDCl_3)

SCDE BR61 P1.006.001.2rr.esp

Figura III.71- Espectro de massas do composto **12a** (IE, 70 eV)