



Universidade Estadual de Campinas

Instituto de Química

Departamento de Química Orgânica



1150059493



IQ

T/UNICAMP B471p

**Prospecção de antibióticos e biocatalisadores
(haloperoxidasas e Baeyer-Villiger monoxigenases)
em microrganismos**

Beatriz Bicalho

Tese de Doutorado

Orientadora:

Prof^a. Dr^a. Anita Jocelyne Marsaioli

Campinas, SP – Brasil

2003

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE QUÍMICA
UNICAMP

Bicalho, Beatriz
B278p Prospecção de antibióticos e biocatalisadores
(haloperoxidasas e Baeyer-Villiger monoxigenases)
em microrganismos. / Beatriz Bicalho. -- Campinas,
SP: [s.n.], 2003.

Orientador: Anita Jocelyne Marsaioli.

Tese (Doutorado) – Universidade
Estadual de Campinas, Instituto de Química.

1. Antibióticos. 2. Biocatalisadores.
3. Microrganismos. I. Marsaioli, Anita Jocelyne.
II. Universidade Estadual de Campinas. III. Título.

UNIDADE	ILK
Nº CHAMADA	
	7111111
	3500
V	EX
TOMBO BC/	59493
PROC.	16.117.04
C	<input type="checkbox"/>
D	<input checked="" type="checkbox"/>
PREÇO	11,000
DATA	18.9.09
Nº CPD	

Agradecimentos

Gostraria de agradecer ao Instituto de Química da Universidade Estadual de Campinas, à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo e à Prof^a Anita Jocelyne Marsaioli, por terem proporcionado a infraestrutura, o financiamento e a orientação científica fundamentais à execução deste trabalho.

Sou imensamente grata ao Dr. Gelson José Andrade da Conceição, pela cessão de materiais (indandióis padrão e indeno adsorvido XAD-7) utilizados para investigação por haloperoxidasas, aos professores do Departamento de Química Orgânica, Carlos Roque Duarte Correia, Lúcia Baptistella, Cláudio Herrera Braga e seus respectivos orientandos Marcelo Valle e Antonio Baptista, Nelson Henriques e Valdirene Teixeira, pela cessão de diferentes cetonas utilizadas para investigação por Baeyer-Villiger monoxigenases e à colega Lu Shi Chen, pela generosa síntese e cessão de substâncias fundamentais à execução do projeto de triagem de alto desempenho.

O Prof. Jean Louis Reymond e seu aluno Johann Grognux foram generosos com seus tempos e pacientes na supervisão dos experimentos de triagem de alto desempenho e tenho com eles uma dívida de gratidão pela recepção na Universidade de Bern.

Entre os muitos outros que influenciaram a realização deste trabalho, quero agradecer ao acessor científico por oferecer sugestões e objeções proveitosas.

Ao meu querido Alberto e à minha mãe Nilza Helena, os quais contribuíram de diversos modos para realização deste trabalho, sou eternamente grata pelo estímulo, paciência e compreensão.

Curriculum vitae

1. DADOS PESSOAIS

Nome: **Beatriz Bicalho**

Filiação: Ruy Bicalho e Nilza Helena Romano Bicalho
Nascimento: 08/11/1971, São Paulo/SP – Brasil
RG: 18.132.286-9/SSP-SP
CPF: 16315757839

Endereço para contato: Av. Romeu Tórtima, 514/apto. 02
Cidade Universitária – Barão Geraldo
Campinas (SP)
13084-520
Tel.: (19) 3289-1769

E-mail: beatrizbicalho@yahoo.com

2. FORMAÇÃO ACADÊMICA

1999 – 2003 **Doutorado em Química Orgânica**
Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, Brasil.

Área de concentração: análise de metabólitos secundários de origem microbiana e estudo de biotransformações de xenobióticos
Tese: Bioprospecção de antibióticos e biocatalisadores (haloperoxidases e Baeyer-Villiger monoxigenases) em microrganismos.

Orientador: Profa. Dra. Anita Jocelyne Marsaioli.

Financiamento: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP.

1996 - 1999 **Mestrado em Química Orgânica**
Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil.

Área de concentração: análise de metabólitos secundários de origem vegetal voláteis

Tese: Caracterização de compostos voláteis relacionados ao aroma do pedúnculo floral do cajueiro *Anacardium occidentale* L.

Orientador: Profa. Dra. Cláudia de Moraes Rezende.

Financiamento: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq.

1991 - 1995 **Graduação em Farmácia-Bioquímica**
Universidade de São Paulo (campus Ribeirão Preto), São Paulo, Brasil.

Área de concentração: análises clínicas

Iniciação científica (1992 – 1995): Estudo químico e antimicrobiano de *Zanthoxylum naranjillo* (Rutaceae).

Orientadores: Prof. Dr. Jairo Kenupp Bastos e Profa. Dra. Izabel Yoko Ito

Financiamento: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP.

3. PRODUÇÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Artigos completos publicados em periódicos

- 1 BICALHO, B.; PEREIRA, A.S.; AQUINO NETO, F.R.; PINTO, A.C.; REZENDE, C.M. Application of high-temperature gas chromatography-mass spectrometry to the investigation of glycosidically bond components related to cashew apple (*Anacardium occidentale* L. var *nanum*) volatiles. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, p. 1167-1174, 2000.
- 2 BICALHO, B.; REZENDE, C.M. Volatile compounds of cashew apple (*Anacardium occidentale* L.) **Zeitschrift Für Naturforschung C**, v. 56, p. 35-39, 2001.
- 3 PEREIRA, A.S.; BICALHO, B.; AQUINO NETO, F.R. Comparison of propolis from *Apis mellifera* and *Tetragonisca angustula*. **Apidologie**, v. 34, p. 291-298, 2003.
- 4 BICALHO, B.; GONÇALVES, R.A.C.; ZIBORDI, A.P.M.; MANFIO, G.P.; MARSAIOLI, A.J. Antimicrobial compounds of fungi vectored by *Clusia* spp. (Clusiaceae) pollinating bees. **Zeitschrift Für Naturforschung C**, v. 58, p. 746-751, 2003.
- 5 BICALHO, B.; CHEN, L.S.; GROGNUM, J.; REYMOND, J.-L.; MARSAIOLI, A.J. Whole cell high throughput screening for epoxide-hydrolases and Baeyer-Villiger monooxygenases. (Submetido à publicação).

RESUMO

O presente trabalho foi organizado em 3 partes. A primeira delas compreende a investigação por compostos antimicrobianos em extratos de metabólitos secundários de 15 fungos filamentosos isolados de abelhas (*Trigona* sp.). A aplicação dos ensaios de bioautografia e concentração inibitória mínima (CIM) à monitorização da atividade biológica resultou no isolamento de 4 substâncias conhecidas, sendo 2 quinonas isoméricas (coclioquinona A e isococlioquinona A) de *Drechslera dematioidea* CCT 5631 e 2 dodecalactonas análogas (curvularina e E-desidrocurvularina) de *Curvularia eragrostidis* CCT 5634 e de *Curvularia pallescens* CCT 5654, as quais, em geral, apresentaram valores de CIM altos, relativamente a antibióticos padrão (cloranfenicol, ciclopiroxolamina).

A segunda parte do trabalho trata da investigação por haloperoxidases (HPOs) e por Baeyer-Villiger monoxigenases (BVMOs) em diferentes microrganismos. A atividade de HPO não foi detectada nos experimentos realizados, os quais foram realizados com o indeno como substrato. Em contrapartida, utilizando cicloexanonas, BVMOs foram detectadas em *Geotrichum candidum* CCT 1205, *Rhodotorula glutinis* CCT 2182 e *Rhodotorula minuta* CCT 1751, ainda que nas reações com estes últimos os percentuais de conversão do substrato tenham sido baixos ($\leq 10\%$) relativamente a *G. candidum* CCT 1205 (60 – 90%). O monitoramento de reações de biotransformação simultâneas (mais de 1 substrato por microrganismo) foi introduzido com sucesso nesta etapa do trabalho, representando uma primeira ação de otimização do processo de triagem de biocatalisadores em microrganismos.

A terceira e última parte do trabalho focalizou a implementação de triagens para biocatalisadores baseadas em fluorescência. Os experimentos realizados proporcionaram detecções inéditas de BVMO em *Trichosporon cutaneum* CCT 1903 e de epóxido hidrolases em *Pichia stipitis* CCT 2617, *T. cutaneum* CCT 1903 e em *Agrobacterium tumefaciens* CCT 6515.

ABSTRACT

The present research work has been organized in 3 parts. The first of them regards the search for antimicrobial compounds among the secondary metabolites of 15 filamentous fungi isolated from bees (*Trigona* sp.). Bioactivity-guided compound isolation by bioautography and minimum inhibitory concentration (MIC) assays afforded 4 known substances, namely 2 isomeric quinones, cocchlioquinone A and isococchlioquinone A, from *Drechslera dematioidea* CCT 5631 and 2 analogous dodecalactones, curvularin and *E*-dehydrocurvularin, from *Curvularia eragrostidis* CCT 5634 and *Curvularia pallescens* CCT 5654, which in general presented high MIC values compared to standard compounds (chloranphenicol, cyclopiroxolamine).

The second part refers to the search for haloperoxidases (HPOs) and Baeyer-Villiger monooxygenases (BVMOs) in microorganism whole cells. Unfortunately, no HPO activity was detected in the reactions with indene as substrate. On the other hand, in the reactions with cyclohexanones BVMOs were detected in *Geotrichum candidum* CCT 1205, *Rhodotorula glutinis* CCT 2182 and *Rhodotorula minuta* CCT 1751, although the porcentual conversions provided by the latter were reasonably low ($\leq 10\%$) compared to *G. candidum* CCT 1205 (60 – 90%). Simultaneous monitoring several biotransformation reactions (more than 1 substrate for a microorganism) was successfully introduced in this section as a first step towards screening process optimization.

The third and last part of the present work concerns microtiter plate reactions aimed at detecting BVMOs by high throughput screening based on fluorescence. The experiments performed for establishing assay conditions provided the first detection of a BVMO in *Trichosporon cutaneum* CCT 1903. Additionally, experiments performed in parallel provided the first detection of epoxide hydrolases in *Pichia stipitis* CCT 2617, *T. cutaneum* CCT 1903 and in *Agrobacterium tumefaciens* CCT 6515.

ABREVIações E SÍMBOLOS

BVMO	Baeyer-Villiger Monoxigenase
c	Conversão
CBMAI	Coleção Brasileira de Microrganismos Ambientais e Industriais
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
CCT	Coleção de Culturas Tropical
CGAR	Cromatografia Gasosa de Alta Resolução
CGAR-EM	Cromatografia Gasosa de Alta Resolução acoplada à Espectrometria de Massas
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
COSY	Espectro de RMN bidimensional de correlação H,H
d	Dubleto
dd	Duplo dubleto
DEPT	Incremento sem distorção por transferência de polarização
ee	Excesso Enantimérico
EH	Epóxido hidrolase
EM	Espectro de massas
eV	Elétron volt
HPO	Haloperoxidase
HSQC	Espectro de RMN bidimensional de correlação C,H a uma ligação – Detecção inversa
m/z	Razão massa/carga
M ⁺	Íon molecular
MHz	Mega Hertz
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio
R _f	Fator de retenção
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
s	Singleto

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1. Leitura do teste de difusão em ágar do tipo disco-placa (Kirby-Bauer). A presença de compostos antimicrobianos é registrada pela medida do diâmetro dos halos de inibição formados ao redor dos discos.	5
Figura 1.2. Colocação de CCD em placa de Petri para realização de bioautografia	7
Figura 1.3. Diluições em série para determinação de CIM	7
Figura 1.5. Bioautografia com <i>S. aureus</i> CCT 4295 dos extratos em AcOEt das culturas, em farelo de milho, de (A) <i>Aspergillus</i> sp. CBMAI 0207, <i>A. niger</i> CCT 5559, <i>Trichoderma</i> sp. CCT 5551, Fungo CCT 5553 e <i>Cladosporium</i> sp. CBMAI 0210, (B) <i>D. dematioidea</i> CCT 5631, <i>D. halodes</i> CCT 5636, <i>Penicillium</i> sp. CBMAI 0209, <i>Penicillium</i> sp. CBMAI 0208 e <i>Nodulisporium</i> sp. CCT 5652 e (C) <i>C. eragrostidis</i> CCT 5634, <i>C. pallescens</i> CCT 5654, <i>C. lunata</i> CCT 5628, <i>Curvularia</i> sp. CCT 5629 e Fungo CCT 5630.	15
Figura 1.6. CIM contra <i>S. aureus</i> CCT 1495 das frações antimicrobianas selecionadas por bioautografia.....	16
Figura 1.7. Atribuição dos sinais de RMN de ^1H de 1.5	19
Figura 1.8. Atribuição dos sinais de RMN de ^{13}C de 1.5	19
Figura 1.9. Atribuição dos sinais de RMN de ^1H de 1.6	21
Figura 1.10. Atribuição dos sinais de RMN de ^{13}C de 1.6	21
Figura 1.13. Atribuição dos sinais de RMN de ^1H de 1.8	26
Figura 1.14. Atribuição dos sinais de RMN de ^{13}C de 1.8	26
Figura 2.1. Componentes do grupo prostético heme.....	34
Figura 2.2. Modelo de sítio ativo da cloroperoxidase de <i>C. fumago</i>	35
Figura 2.3. Mecanismo de reação de halogenação catalisada por heme-haloperoxidasas baseado na cloração da monoclorodimedona (2.5).....	36
Figura 2.4. Complexos de vanádio (V^{+5}) característicos do sítio ativo da V-Cl-HPO de <i>C. inaequalis</i> (A) em sua forma nativa e (B) após reação com H_2O_2	37
Figura 2.5. Mecanismo da reação de halogenação catalisada por V-Cl-HPO	38

Figura 2.6. Mecanismo da reação de halogenação catalisada por HPO independente de cofator	39
Figura 2.7. Etapas reacionais da síntese do <i>trans</i> -1 <i>S</i> ,2 <i>S</i> -bromoindanol pelo extrato enzimático de <i>C. protuberata</i>	41
Figura 2.8. Possíveis bromoidrinas derivadas do indeno.	46
Figura 2.9. Mecanismo de adição de ácido hipohaloso (HOX, X = Cl, Br) a olefina para formação de haloidrina.	47
Figura 2.10. Possíveis derivados de biotransformação do indeno.	49
Figura 2.12. Espectros de massas representativos do (A) produto de biotransformação caracterizado como hidroxindanona e da (B) 2-hidroxi-1-indanona localizada por consulta à espectroteca Wiley275.	50
Figura 2.13. Concentração de indeno (2.6) livre no meio reacional após adição de 2.6 adsorvido em resina.	54
Figura 2.14. Grupos prostéticos (FAD; FMN) e coenzimas (NADPH; NADH) de BVMOs.	58
Figura 2.15. Seletividade relativa ao substrato característica de cicloexanona monoxigenases (CHMO), ciclopentanona monoxigenase (CPMO) e 4-hidróxiacetofenona monoxigenases (HAPMO)	59
Figura 2.16. Mecanismo da reação de Baeyer-Villiger	60
Figura 2.17. Representação esquemática dos intermediários enantioméricos das reações de Baeyer-Villiger	61
Figura 2.18. Representação esquemática da oxidação das faces <i>re</i> e <i>si</i> da flavina por O ₂ . R = ribosil adenosina difosfato	61
Figura 2.19. Possíveis produtos de oxidação ou redução de 2.20	65
Figura 2.20. Possíveis produtos de oxidação ou redução de 2.21	66
Figura 2.22. Reação de Baeyer-Villiger catalisada por <i>A. niger</i> CCT 5559, <i>Curvularia</i> sp. CCT 5629, <i>C. pallescens</i> CCT 5654 e <i>Trichoderma</i> sp. CCT 5551.....	71
Figura 2.23. Substâncias não-tradicionalmente utilizados como sondas para detecção de Baeyer-Villiger monoxigenases.	72

Figura 3.1. Representação esquemática do ensaio fluorogênico de Reymond para detecção de enzimas hidrolíticas	76
Figura 3.2. Representação esquemática do ensaio fluorogênico para detecção de BVMOs.	77
Figura 3.3. Estabilidade de 3.9 nas condições do ensaio de Reymond (3.9 100 μ M, HLADH 50 μ g.mL ⁻¹ , NAD ⁺ 1 mM, BSA 2 mg.mL ⁻¹ , solução tampão borato 20 mM pH 8,8).....	82
Figura 3.4. Oxidação de 3.11 nas condições do ensaio de Reymond (3.11 100 μ M, HLADH 50 μ g.mL ⁻¹ , NAD ⁺ 1 mM, BSA 2 mg.mL ⁻¹ , solução tampão borato 20 mM pH 8,8).....	83
Figura 3.5. Oxidação de 3.5 nas condições do ensaio de Reymond (3.5 100 μ M, NaIO ₄ 1mM, BSA 2 mg.mL ⁻¹ , solução tampão borato 20 mM pH 8,8) na presença de células..	84
Figura 3.9. Cromatograma (CLAE) característico da ordem de eluição das substâncias padrão 3.8 – 3.11 em coluna Chromolith RP 18e (50–4,6 mm).....	90
Figura 5.2. Espectro de RMN de ¹³ C de 1.5	133
Figura 5.3. Espectro de RMN de ¹ H de 1.6	134
Figura 5.4. Espectro de RMN de ¹³ C de 1.6	134
Figura 5.5. Espectro de RMN-2D de 1.5	135
Figura 5.6. Espectro de RMN-2D de 1.6	135
Figura 5.7. Espectro de RMN de ¹ H de 1.7	136
Figura 5.8. Espectro de RMN de ¹³ C de 1.7	136
Figura 5.9. Espectro de RMN de ¹ H de 1.8	137
Figura 5.10. Espectro de RMN de ¹³ C de 1.8	137
Figura 5.11. Espectro de RMN de ¹ H de 2.10/2.11	138
Figura 5.12. Espectro de RMN de ¹³ C de 2.10/2.11	138
Figura 5.13. Espectro de RMN de ¹ H de 2.12/2.13	139
Figura 5.14. Espectro de RMN de ¹³ C de 2.12/2.13	139
Figura 5.15. Espectro de RMN de ¹ H de 2.22/2.23	140

Figura 5.16. Espectro de RMN de ^{13}C de 2.22/2.23	140
Figura 5.17. Espectro de RMN de ^1H de 2.24/2.25	141
Figura 5.18. Espectro de RMN de ^{13}C de 2.24/2.25	141
Figura 5.19. Espectro de RMN de ^1H de 2.26-2.29	142
Figura 5.20. Espectro de RMN de ^{13}C de 2.26-2.29	142
Figura 5.21. Espectro de RMN de ^1H de 2.26/2.27	143
Figura 5.22. Espectro de RMN de ^{13}C de 2.26/2.27	143
Figura 5.23. Espectro de RMN de ^1H de 2.30/2.31	144
Figura 5.24. Espectro de RMN de ^{13}C de 2.30/2.31	144
Figura 5.25. Espectro de RMN de ^1H de 3.9	145
Figura 5.26. Espectro de RMN de ^{13}C de 3.9	145
Figura 5.27. Espectro de RMN de ^1H de 3.10*	146
Figura 5.28. Espectro de RMN de ^{13}C de 3.10*	146

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1.1. Fungos filamentos isolados de abelhas <i>Trigona</i> sp.	12
Tabela 1.2. Extratos brutos em AcOEt de culturas de <i>Curvularia</i> em diferentes meios.	13
Tabela 1.3. Massa (mg) de extrato em AcOEt de culturas em farelo de milho (10g, 14 dias, 29°C) de fungos filamentosos isolados de abelhas <i>Trigona</i> sp.	13
Tabela 1.4. CIM das frações antimicrobianas selecionas por bioautografia.	17
Tabela 1.5. CIM das substâncias isoladas da fração antimicrobiana do extrato em AcOEt da cultura de <i>D. dematioidea</i> CCT 5631.	22
Tabela 1.6. CIM das substâncias isoladas da fração antimicrobiana dos extratos em AcOEt das culturas de <i>C. eragrostidis</i> CCT 5634 e <i>C. pallescens</i> CCT 5654.	27
Tabela 1.7. Atividade antimicrobiana contra <i>Mycobacterium tuberculosis</i> e <i>Tripanossoma cruzi</i> de 1.5 – 1.7.	28
Tabela 2.1. Biotransformação de 2.6 por células em repouso, na presença de Br ⁻ , após 18 h.	48
Tabela 2.2. Adição contínua de indeno (2.6) em aerossol ao meio reacional.	52
Tabela 2.3. Produtos de biotransformação de indeno (2.6) adsorvido em resina (XAD-7).	54
Tabela 2.4. Biotransformação de 2-metil-cicloexanona (2.20) e 4-metil-cicloexanona (2.21) por células em crescimento.	69
Tabela 2.5. Oxidação de 2-metil-cicloexanona (2.20) e 4-metil-cicloexanona (2.21) por células em crescimento.	70
Tabela 3.1. Biotransformação de 3.9 em solução tampão borato pH 8,8.	90
Tabela 3.2. Biotransformação de 3.9 em solução tampão fosfato pH 6,5.	90

ÍNDICE GERAL

Introdução.....	1
Capítulo 1	3
Prospecção de compostos antimicrobianos	3
1.1. Ensaio amplamente utilizados para triagem de compostos antimicrobianos ..	4
1.1.1. Disco - placa (Kirby-Bauer).....	4
1.1.2. Bioautografia.....	5
1.1.3. Concentração inibitória mínima (CIM)	6
1.2. Objetivo	9
1.3. Resultados e Discussão	11
1.3.1. Avaliações preliminares	11
1.3.2. Bioautografia: avaliação qualitativa do potencial antimicrobiano	14
1.3.3. CIM: avaliação quantitativa do potencial antimicrobiano	15
1.3.4. Substâncias antimicrobianas produzidas por <i>D. dematioidea</i>	17
1.3.4.1. Coclioquinona A (1.5)	18
1.3.4.2. Isococlioquinona A (1.6)	20
1.3.4.3. Atividade antimicrobiana de 1.5 e 1.6.....	22
1.3.5. Substâncias antimicrobianas produzidos por <i>Curvularia</i>	22
1.3.5.1. E-desidrocurvularina (1.7).....	23
1.3.5.2. Curvularina (1.8).....	25
1.3.5.3. Atividade antimicrobiana de 1.7 e 1.8.....	27
1.4. Conclusão parcial 1	29
Capítulo 2	31
Prospecção de biocatalisadores	31
2.1. Contexto geral	31
2.2. Haloperoxidases.....	33
2.2.1. Mecanismos de reação.....	34
2.2.2. Haloidrinas enantiomericamente enriquecidas	40

2.2.3. Objetivos.....	43
2.2.4. Resultados e discussão.....	45
2.2.4.1. Reação com 2.6 em aerossol.....	51
2.2.4.2. Reação com 2.6 adsorvido em resina.....	52
2.2.5. Conclusão parcial 2.....	55
2.3. Baeyer-Villiger monoxigenases.....	57
2.3.1. Mecanismo de reação.....	60
2.3.2. Objetivos.....	63
2.3.3. Resultados e discussão.....	65
2.3.3.1. Reações com cicloexanonas.....	65
2.3.3.2. Reações com outros substratos.....	71
2.3.4. Conclusão parcial 3.....	73
Capítulo 3.....	75
Triagem de alto desempenho.....	75
3.1. Objetivos.....	79
3.2. Resultados e discussão.....	81
3.2.1. Avaliações preliminares.....	81
3.2.1.1. Validação dos reagentes.....	81
3.2.1.2. Concentração do biocatalisador.....	84
3.2.2. Triagem para epóxido-hidrolases.....	85
3.2.3. Triagem para Baeyer-Villiger monoxigenases.....	87
3.3. Conclusão parcial 4.....	91
4. Conclusão geral.....	93
5. Experimental.....	95
5.1. Considerações gerais.....	95
5.2. Prospecção de compostos antimicrobianos.....	99
5.2.1. Preparação de extratos.....	101
5.2.1.1. Culturas em extrato de malte.....	101
5.2.1.2. Culturas em milho ou arroz.....	101
5.2.2. Avaliação da atividade antimicrobiana.....	102

5.2.2.1. Bioautografia.....	102
5.2.2.2. Concentração inibitória mínima (CIM)	102
5.2.3. Isolamento de substâncias antimicrobianas de <i>D. dematioidea</i>	103
5.2.3.1. Coclioquinona A (1.5)	103
5.2.3.2. Isococlioquinona A (1.6)	104
5.2.4. Isolamento de substâncias antimicrobianas de <i>Curvularia</i>.....	106
5.2.4.1. E-desidrocurvularina (1.7) e curvularina (1.8).....	106
5.3. Prospecção de biocatalisadores: haloperoxidases.....	109
5.3.1. Síntese de haloidrinas padrão	111
5.3.1.1. <i>trans</i> -2-bromo-1-indanol (2.10/2.11)	111
5.3.1.2. <i>cis</i> -2-bromo-1-indanol (2.10/2.11).....	112
5.3.2. Microrganismos	113
5.3.2.1. Fungos filamentosos.....	113
5.3.2.2. Actinomicetos	113
5.3.2.3. Archeas.....	113
5.3.3. Reações de biotransformação.....	113
5.3.3.1. Procedimento usual	113
5.3.3.2. Substrato em aerossol.....	114
5.3.3.3. Substrato adsorvido em resina	114
5.4. Prospecção de biocatalisadores: Baeyer-Villiger monoxigenases.....	115
5.4.1. Síntese de substâncias padrão	117
5.4.1.1. 7-metil- ϵ -caprolactona (2.22-23)	117
5.4.1.2. 5-metil- ϵ -caprolactona (2.24-25)	118
5.4.1.3. 2-metil-ciclohexanol (2.26-27, 2.28-29)	118
5.4.1.4. 4-metil-ciclohexanol (2.30-31).....	119
5.4.5. Cultivo de microrganismos.....	120
5.4.5.1. Archeas.....	120
5.4.5.2. Bactérias.....	120
5.4.5.3. Leveduras.....	120
5.4.5.4. Fungos filamentosos.....	120

5.4.6. Reações de biotransformação simultâneas	120
5.5. Triagem de alto desempenho	121
5.5.1. Síntese de substâncias padrão	123
5.5.1.1. 4-oxo-pentil-7'-umbeliferil éter (3.9)	123
5.5.1.2. 3-acetoxi-propil-7'-umbeliferil éter (3.10)	126
5.5.2. Microrganismos	128
5.5.3. Avaliações preliminares	129
5.5.3.1. Estabilidade de 3.9 nas condições do ensaio	129
5.5.3.2. Oxidação de 3.11 por HLADH/NAD+	130
5.5.3.3. Concentração do biocatalisador	130
5.5.4. Triagem para epóxido-hidrolases	130
5.5.5. Triagem para Baeyer-Villiger-monoxigenases	131
5.5.6. Acompanhamento das reações	131
5.5.6.1. Medidas de fluorescência	131
5.5.6.2. Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)	131
6. Referências Bibliográficas	147

Introdução

Dentre as diversas estratégias modernas de investigação de novos fármacos, o planejamento racional, baseado em mecanismo de ação, constitui a abordagem mais objetiva. Não obstante, devido à diversidade molecular dos produtos naturais, estes seguem sendo amplamente investigados como a principal fonte de substâncias com potencial de aplicação terapêutica.

No contexto mundial, o Brasil é um país de vocação agrícola, privilegiado em biodiversidade e dotado de enorme potencial para desenvolvimento de biotecnologias. Atualmente, os microrganismos provenientes de habitats pouco explorados são os alvos mais visados das investigações por novas substâncias úteis, principalmente em se tratando de compostos bioativos (e.g., antibióticos; antineoplásicos) ou de enzimas aptas à transformação de xenobióticos.^{1,2} A descoberta de tais substâncias está certamente vinculada à realização sistemática de ensaios *in vitro*, os quais vêm sendo constantemente otimizados por meio do desenvolvimento de técnicas de triagem de alto desempenho baseadas nos mais variados recursos de instrumentação analítica.

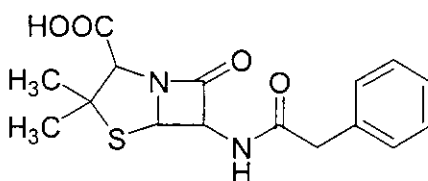
O presente trabalho é dedicado ao estudo químico de microrganismos e nele são abordados dois temas centrais: o isolamento de produtos naturais com atividade antimicrobiana e a investigação de biocatalisadores úteis à síntese orgânica. Dois conjuntos de microrganismos foram abordados, um deles composto por fungos filamentosos isolados de abelhas (*Trigona* sp.), o outro por fungos, leveduras e bactérias de origens diversas. A proposta inicial consistiu em investigar a produção de composto antimicrobiano pelos fungos isolados de abelhas (*Trigona* sp.) e a atividade de haloperoxidases e de Baeyer-Villiger monoxigenases dentre os demais microrganismos. Dentro deste último tópico, foi averiguado a implementação de um ensaio de alto desempenho para triagem de biocatalisadores baseada em detecção de fluorescência. De modo a facilitar a leitura, foram organizados três capítulos: **1. Prospecção de compostos antimicrobianos, 2. Prospecção de haloperoxidases**

e Baeyer-Villiger monoxigenases e 3. Implementação de triagem de alto desempenho.

Capítulo 1

Prospecção de compostos antimicrobianos

Ao descobrir a penicilina (1.1) no caldo de cultura de *Penicillium notatum*, Alexander Fleming iniciava, em 1929, uma verdadeira revolução no combate às doenças infecciosas,³ estimulando várias outras investigações por produtos naturais com atividade antimicrobiana. Incontáveis substâncias foram descobertas e com o passar do tempo os antibióticos começaram a representar a classe mais numerosa de metabólitos secundários de origem microbiana dotada de potencial farmacológico.⁴



Penicilina G (1.1)

Atualmente, os compostos antimicrobianos são classificados em antibacterianos, antifúngicos, antiprotozoários, antielmínticos ou antivirais. No sentido estrito, a denominação *antibiótico* é dada aos antimicrobianos de origem natural e a denominação *quimioterápico* aos antimicrobianos de origem artificial (sintética).⁵ Entretanto, na prática diária, os termos *antibiótico* e *quimioterápico* são amplamente utilizados como sinônimos, sem consideração ao critério da origem.

Lamentavelmente, acompanhando o desenvolvimento das defesas quimioterapêuticas do homem contra os microrganismos, estes últimos também desenvolveram defesas contra os agentes quimioterápicos, com conseqüente aparecimento de *resistência*. Este fato não é surpreendente, porquanto reflete o princípio evolutivo de adaptação e seleção dos mais aptos à propagação da

espécie.⁶ Principalmente devido à exposição excessiva e ao mal uso dos antibióticos (e.g., automedicação, tratamento interrompido, superdosagens, associações incorretas), linhagens de microrganismos resistentes têm emergido mundialmente, notoriamente em ambientes hospitalares.^{7,8} Isto tem merecido a atenção de organismos de saúde pública competentes e incentivado o fomento de políticas para investigação por novos antimicrobianos.^{9,10} Em consideração a este fato, vários fungos filamentosos, os quais por meio de testes de difusão em ágar (disco-placa, onde disco = amostra cilíndrica da cultura do fungo) demonstraram potencial para produção de compostos antimicrobianos¹¹ foram submetidos a estudo no presente trabalho. Estes fungos constituem um conjunto de 15 espécies isoladas de abelhas (*Trigona* sp.) envolvidas com a polinização de plantas do gênero *Clusia*, dentre os quais predominam, em número, representantes dos gêneros *Curvularia* e *Drechslera*, considerados patogênicos a gramíneas e tubérculos.^{12,13,14} O isolamento de compostos antimicrobianos de extratos de produtos naturais pode ser monitorado por meio de diferentes ensaios microbiológicos, dentre os quais os mais clássicos são descritos a seguir.

1.1. Ensaios amplamente utilizados para triagem de compostos antimicrobianos

1.1.1. Disco - placa (Kirby-Bauer)¹⁵

O teste de disco – placa é baseado no princípio da difusão em ágar. É um método essencialmente qualitativo, aplicado à avaliação do potencial de atividade antimicrobiana de misturas (no âmbito da investigação por novos compostos ativos) ou substâncias puras (no âmbito da clínica). Um pequeno disco de papelão contendo uma quantidade conhecida da amostra a ser testada é aplicado sobre a superfície de um meio de cultura inoculado com um microrganismo cuja sensibilidade aos compostos testados será o indicador da presença de antimicrobianos. A partir dos discos, um gradiente de concentração decrescente é formado por difusão da amostra no meio. O microrganismo semeado cresce até encontrar um limiar de

concentração da amostra incompatível com o seu desenvolvimento, o qual é caracterizado pela formação de um halo de ausência de crescimento microbiano (halo de inibição) ao redor do disco (Figura 1.1). O diâmetro do halo é proporcional à quantidade de amostra aplicada nos discos e ao coeficiente de difusão das substâncias no meio de cultura utilizado. O teste é bastante simples e prático, sendo possível testar várias amostras simultaneamente e em uma única placa de Petri.

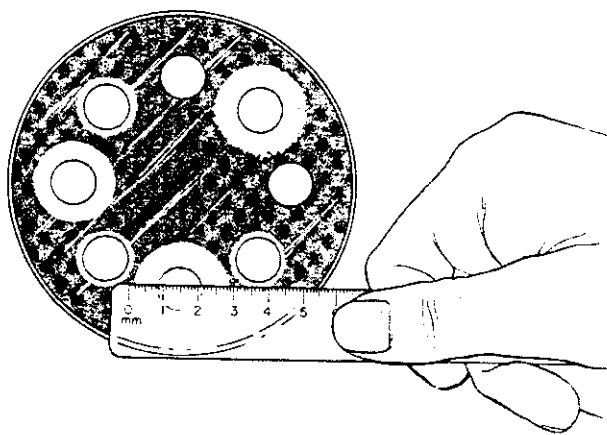


Figura 1.1. Leitura do teste de difusão em ágar do tipo disco-placa (Kirby-Bauer). A presença de compostos antimicrobianos é registrada pela medida do diâmetro dos halos de inibição formados ao redor dos discos.

1.1.2. Bioautografia¹⁶

A bioautografia também é um método qualitativo aplicado à detecção de compostos antimicrobianos em misturas de composição desconhecida. A amostra a ser testada é aplicada em silicagel, alumina, papel ou qualquer outro suporte adequado à cromatografia em camada delgada (CCD). Após separação dos componentes da amostra aplicada com uma fase móvel de escolha, uma fina camada de meio de cultura é aplicada sobre a placa, proporcionando o cultivo de um microrganismo sobre os componentes da amostra (Figura 1.2). A presença de um composto antimicrobiano é visualizada pela formação de zonas de inibição do

crescimento do microrganismo cultivado. O princípio do teste é o da difusão em ágar (disco-placa), entretanto, na bioautografia, os compostos inibidores do crescimento microbiano são identificados por medidas de R_f . Isto torna a bioautografia uma ferramenta de valor no sentido do monitoramento do processo de isolamento de produtos naturais bioativos. Possivelmente, a única desvantagem em relação ao teste de disco-placa é o fato de que as zonas de inibição do crescimento microbiano são formadas sobre um fundo opaco, a placa cromatográfica, o que na prática dificulta a leitura do resultado, principalmente quando bactérias são utilizadas no ensaio. Não obstante, o inconveniente é facilmente superado por meio de revelação química das placas com corantes indicadores de microrganismos vivos. Sais de tetrazólio como TTC (cloreto de 2,3,5-trifenil-2H-tetrazólio) e MTT (1.2) são amplamente utilizados para este fim, pois formam espécies altamente coloridas, conhecidas como formazanas (1.3), ao serem reduzidos por componentes da cadeia transportadora de elétrons da mitocôndria.¹⁷

1.1.3. Concentração inibitória mínima (CIM)¹⁸

A CIM é um ensaio quantitativo aplicado à avaliação da potência da atividade antimicrobiana de misturas ou substâncias puras. Testa o comportamento dos microrganismos frente a concentrações crescentes dos compostos antimicrobianos em meio de cultura líquido (Figura 1.3). A menor concentração capaz de inibir a multiplicação dos microrganismos é denominada a CIM.

A utilização estratégica de bioensaios como bioautografia e CIM para rastreamento de compostos antimicrobianos em misturas complexas (e.g., extratos orgânicos brutos de produtos naturais) constitui uma abordagem amplamente consagrada,^{19,20,21,22,23} ainda que bastante preliminar no sentido de não fornecer informações sobre o mecanismo de ação dos compostos testados. Entretanto, dado o custo relativamente baixo se comparado a ensaios mais específicos como, por exemplo, a inibição de enzimas isoladas, a bioautografia e a CIM, quando utilizadas em conjunto, são insuperáveis no contexto de triagem.

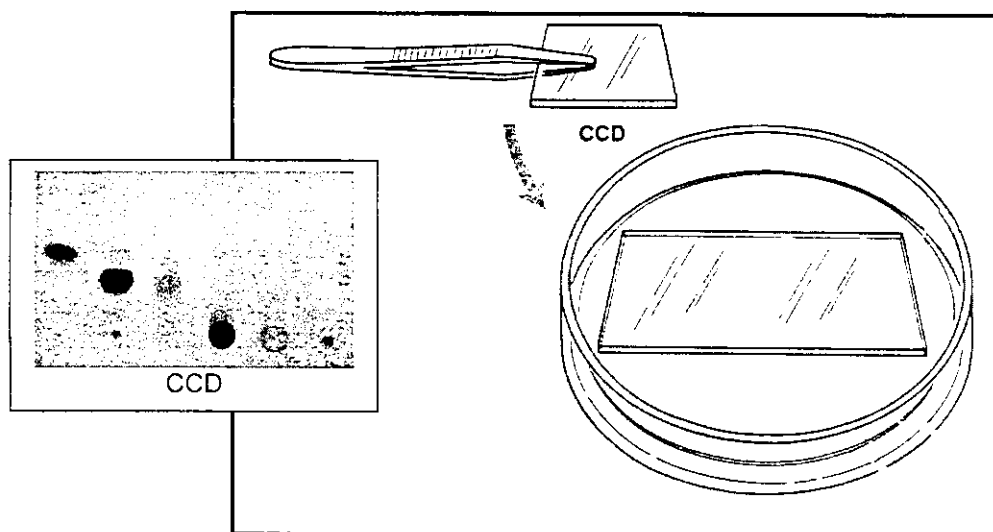


Figura 1.2. Colocação de CCD em placa de Petri para realização de bioautografia

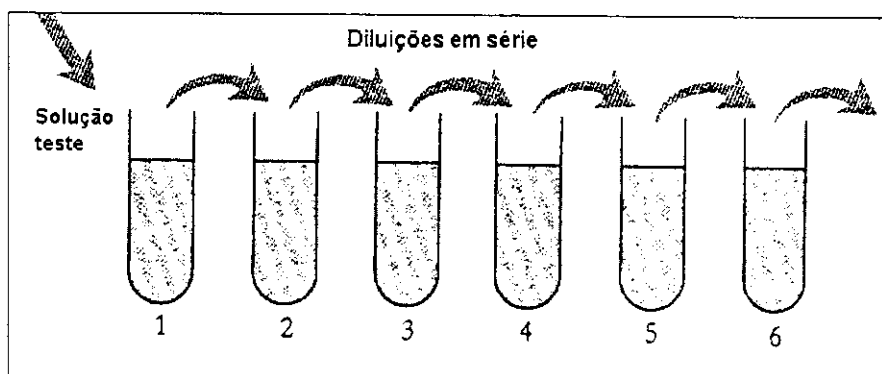
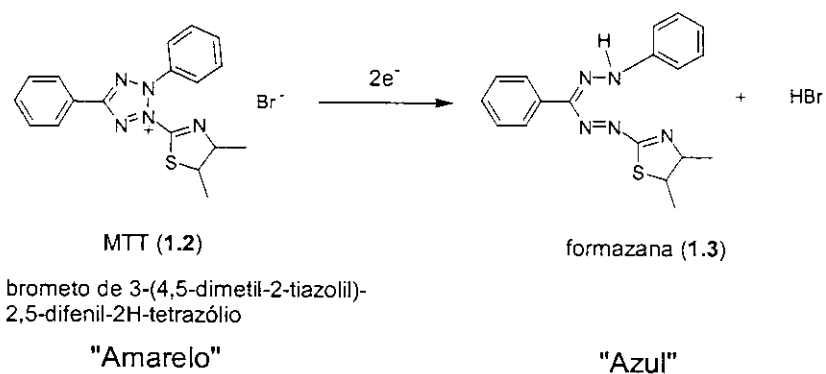


Figura 1.3. Diluições em série para determinação de CIM

1.2. Objetivo

Esta parte do presente trabalho teve por objetivo realizar uma triagem para compostos antimicrobianos para investigar e selecionar, visando isolamento e identificação química, os metabólitos secundários de 15 diferentes linhagens de fungos filamentosos (isolados de abelhas *Trigona* sp.) quimicamente desconhecidas.

1.3. Resultados e Discussão

1.3.1. Avaliações preliminares

O sucesso do isolamento de produtos naturais a partir da purificação de extratos brutos depende, em grande parte, da quantidade de extrato bruto disponível como material de partida. Com isto em mente, o método de incubação dos fungos isolados de abelhas (*Trigona* sp.) foi investigado visando a conveniência de diferentes meios de cultura para produção de metabólitos secundários. Inicialmente, 2 dos 15 fungos filamentosos estudados (Tabela 1.1), sendo eles *Curvularia eragrostidis* CCT 5634 e *Curvularia pallescens* CCT 5654, foram cultivados em extrato de malte, em pequena escala (100 mL, 29°C, 14 dias), por terem se destacado das demais espécies pela inibição de *Staphylococcus aureus* no ensaio de difusão em ágar do tipo disco-placa (onde disco = amostra cilíndrica da cultura fúngica).¹¹ A seguir, amostras dos extratos em AcOEt de ambas culturas foram submetidos a bioautografia contra *Staphylococcus aureus* CCT 4295, *Escherichia coli* CCT 5050, *Candida albicans* CCT 0776 e *Aspegillus niger* CCT 1435. Compostos anticobianos de mesmo R_f (CCD, Hex-AcOEt 1:1) foram detectados somente por *S. aureus* CCT 4295 em ambos extratos testados (Figura 1.4). Isto mostrou que o método de cultivo estava adequado à produção de compostos bioativos mas, por outro lado, as massas de extratos brutos disponíveis (30 - 20 mg) eram insuficientes para estudos conclusivos. Com o objetivo de aumentar a escala de trabalho, pequenas variações na composição de elementos-traço (metais) do meio base (extrato de malte) ou alterações do regime de incubação, de agitação para estático, foram realizadas mas não proporcionaram a modificação da situação. Por outro lado, a substituição do meio de cultura líquido por sólidos ricos em amido (farelo de milho ou arroz) favoreceram significativamente o crescimento dos fungos, proporcionando um aumento em massa de extrato em AcOEt das culturas de aproximadamente 20 vezes, dependendo do tempo de incubação (Tabela 1.2, farelo de milho, 14 dias). Naturalmente isto seria irrelevante caso a biossíntese dos compostos antimicrobianos fosse, por algum motivo, interrompida. Felizmente este

não foi o caso pois o resultado dos ensaios bioautográficos foram reproduzidos. Baseado nesta experiência, o farelo de milho foi adotado para realização das demais culturas cujos extratos em AcOEt são apresentados na Tabela 1.3.

Tabela 1.1. Fungos filamentosos isolados de abelhas *Trigona* sp.

Entrada	Microrganismo	Coleção ^a
1	<i>Aspergillus</i> sp.	CBMAI 0207
2	<i>Aspergillus niger</i>	CCT 5559
3	<i>Cladosporium</i> sp.	CBMAI 0210
4	<i>Curvularia</i> sp.	CCT 5629
5	<i>Curvularia eragrostidis</i>	CCT 5634
6	<i>Curvularia lunata</i>	CCT 5628
7	<i>Curvularia pallescens</i>	CCT 5654
8	<i>Drechslera dematioidea</i>	CCT 5631
9	<i>Drechslera halodes</i>	CCT 5636
10	Fungo	CCT 5630
11	Fungo	CCT 5553
12	<i>Nodulisporium</i> sp.	CCT 5552
13	<i>Penicillium</i> sp.	CBMAI 0208
14	<i>Penicillium</i> sp.	CBMAI 0209
15	<i>Trichoderma</i> sp.	CCT 5551

^aCBMAI: Coleção Brasileira de Microrganismos Ambientais e Industriais (CPQBA/Unicamp, Campinas, SP. <http://www.cpqba.unicamp.br>). CCT: Coleção de Culturas Tropical (Fundação de Pesquisas André Tosello, Campinas, SP. <http://www.cct.org.br>)

Figura 1.4. Bioautografia dos extratos em AcOEt das culturas em extrato de malte de (A) *C. eragrostidis* CCT 5634 e (B) de *C. pallescens* CCT 5654 com *S. aureus* CCT 4295. CCD, Hex-AcOEt (1:1). Revelador: MTT 0,1%.

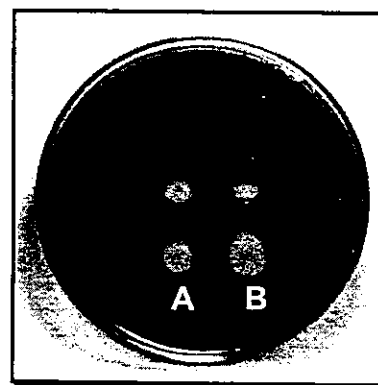


Tabela 1.2. Extratos brutos em AcOEt de culturas de *Curvularia* em diferentes meios.

Microrganismo	t (dias) ^a	Meios de cultura		
		Malte ^b	Milho ^c	Arroz ^c
		Extrato (mg)		
<i>C. eragrostidis</i> CCT 5634	14	30	620	600
	28	-	1442	-
<i>C. pallescens</i> CCT 5654	14	30	485	150
	28	-	1559	-

^aTempo de incubação a 29°C. ^b100 mL de extrato de malte a 2% em água destilada. ^c100 g de farelo de milho ou arroz polido. -: não avaliado.

Tabela 1.3. Massa (mg) de extrato em AcOEt de culturas em farelo de milho (10g, 14 dias, 29°C) de fungos filamentosos isolados de abelhas *Trigona* sp.

Microrganismo	Extrato (mg)	Microrganismo	Extrato (mg)
<i>Aspergillus</i> sp. CBMAI 0207	43	Fungo CCT 5630	31
<i>Aspergillus niger</i> CCT 5559	57	Fungo CCT 5553	16
<i>Cladosporium</i> sp. CBMAI 0210	22	<i>Penicillium</i> sp. CBMAI 0208	11
<i>Curvularia</i> sp. CCT 5629	49	<i>Penicillium</i> sp. CBMAI 0209	19
<i>Curvularia lunata</i> CCT 5628	103	<i>Nodulisporium</i> sp. CCT 5552	27
<i>Drechslera dematioidea</i> CCT 5631	108	<i>Trichoderma</i> sp. CCT 5551	75
<i>Drechslera halodes</i> CCT 5636	75	Controle ^a	09

^aExtrato em AcOEt do meio de cultura sem inóculo

1.3.2. Bioautografia: avaliação qualitativa do potencial antimicrobiano

Alíquotas (180 µg) dos extratos em AcOEt das culturas fúngicas foram submetidas a bioautografia contra microrganismos representativos de fungo (*A. niger* CCT 1435), bacilo (*Bacillus subtilis* CCT 0089), levedura (*C. albicans* CCT 0776), bactéria Gram-negativa (*E. coli* CCT 5050) e bactéria Gram-positiva (*S. aureus* CCT 4295). A detecção de compostos antimicrobianos foi realizada somente por bactérias Gram-positivas (*S. aureus* CCT 4295, *B. subtilis* CCT 0089) e nos extratos de *Cladosporium* sp. CBMAI 0210, *Curvularia* sp. CCT 5629, *C. eragrostidis* CCT 5634, *C. lunata* CCT 5628, *C. pallescens* CCT 5654, *D. dematioidea* CCT 5631, *Penicillium* sp. CBMAI 0208, *Penicillium* sp. CBMAI 0209 e fungo CCT 5553 (Figura 1.5). Amostras dos compostos bioativos foram obtidas por CCDP e analisadas por CGAR-EM. Os respectivos cromatogramas de íons totais apresentaram misturas de complexidade variada, sendo as frações bioativas dos extratos dos fungos CCT 5553, *Penicillium* sp. CBMAI 0208 e *Penicillium* sp. CBMAI 0209 ricas em monossacarídeos e ácidos graxos saturados; a fração bioativa do extrato de *Cladosporium* sp. CBMAI 0210 rica em substâncias com padrão de fragmentação no EM característico de ácidos graxos de cadeia longa funcionalizada e a fração bioativa do extrato de *D. dematioidea* CCT 5631, rica em uma mistura de substâncias isoméricas com padrão de fragmentação no EM característico de esqueletos triterpênicos. As frações bioativas de polaridade intermediária ($R_f = 0,3$; Figura 1.5) dos extratos dos fungos *Curvularia* sp. CCT 5629, *C. eragrostidis* CCT 5634, *C. pallescens* CCT 5654 e *C. lunata* CCT 5628 apresentaram-se constituídas por uma de natureza cristalina e caracterizado pelos íons de m/z (derivado sililado) 434 (M^+ , 6%), 419 (64), 321 (100) e 73 (28), e as frações bioativas polares ($R_f = 0,0 - 0,1$; Figura 1.5) destes mesmos extratos apresentaram-se ricas em monossacarídeos e dissacarídeos, também presentes no extrato controle do meio de cultura. Dentre os constituintes minoritários, no entanto, foi detectado uma substância com padrão de fragmentação no EM análogo ao constituinte das frações

de média polaridade, embora diferindo deste último em 18 u.m.a.: íons de m/z (derivado siliado) 524 (M^+ , 3%), 419 (16), 339 (46), 321(40), 323 (52), 73 (100). O investimento de esforços para purificação destas frações selecionadas foi ponderado a partir dos respectivos valores de CIM, conforme descrito no item 1.3.3.

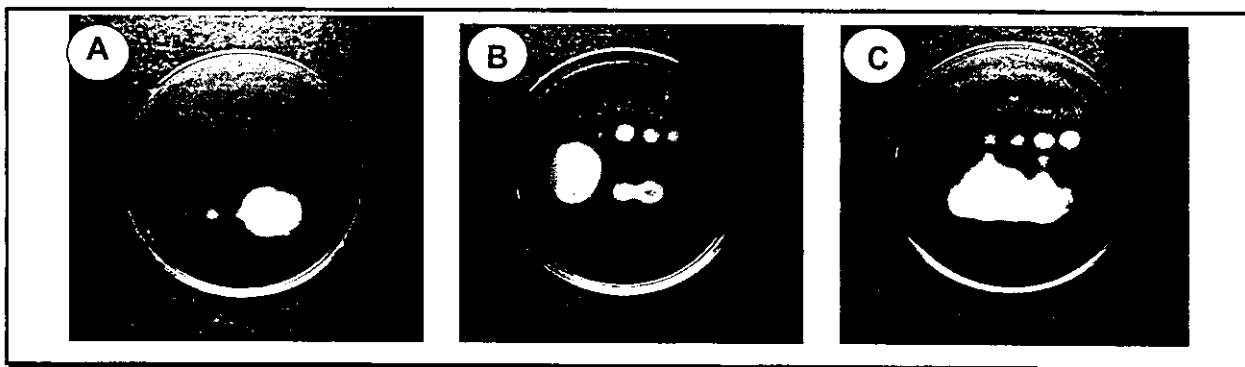


Figura 1.5. Bioautografia com *S. aureus* CCT 4295 dos extratos em AcOEt das culturas, em farelo de milho, de (A) *Aspergillus* sp. CBMAI 0207, *A. niger* CCT 5559, *Trichoderma* sp. CCT 5551, Fungo CCT 5553 e *Cladosporium* sp. CBMAI 0210, (B) *D. dematioidea* CCT 5631, *D. halodes* CCT 5636, *Penicillium* sp. CBMAI 0209, *Penicillium* sp. CBMAI 0208 e *Nodulisporium* sp. CCT 5652 e (C) *C. eragrostidis* CCT 5634, *C. pallescens* CCT 5654, *C. lunata* CCT 5628, *Curvularia* sp. CCT 5629 e Fungo CCT 5630. CCD, Hex-AcOEt (7:3). Revelador: MTT 0,1%.

1.3.3. CIM: avaliação quantitativa do potencial antimicrobiano

Independentemente do grau de pureza, todas as amostras selecionadas por bioautografia foram preparadas à mesma concentração, diluídas duplamente em série e submetidas à avaliação de CIM frente a bactérias Gram-positivas.

A Tabela 1.4 mostra que, relativamente ao controle (cloranfenicol), os valores de CIM das amostras testadas foram em geral altos, à exceção da fração bioativa do extrato de *D. dematioidea* CCT 5631, a qual por isto foi prioritariamente selecionada para identificação química (Figura 1.6). Adicionalmente, as frações de média

polaridade (ver Figura 1.5, $R_f = 0,3$) dos extratos de *Curvularia* sp. CCT 5629, *C. eragrostidis* CCT 5634, *C. pallescens* CCT 5654 e *C. lunata* CCT 5628, foram relativamente mais potentes do que as demais frações (Tabela 1.4) e por este motivo também foram destinadas ao estudo químico.

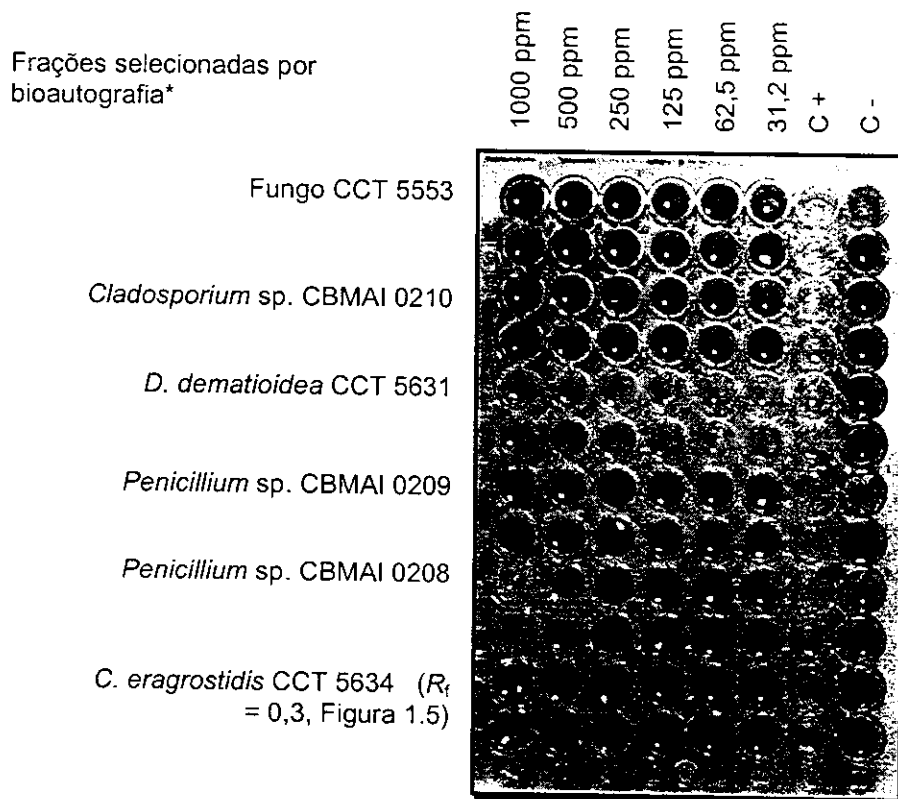


Figura 1.6. CIM contra *S. aureus* CCT 1495 das frações antimicrobianas selecionadas por bioautografia. C+: inóculo frente a cloranfenicol (20 ppm). C-: apenas inóculo. *Amostras testadas em duplicatas.

Tabela 1.4. CIM das frações antimicrobianas selecionadas por bioautografia.

Frações ^a	CIM ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	
	<i>S. aureus</i> CCT 4295	<i>B. subtilis</i> CCT 0089
<i>Cladosporium</i> sp. CBMAI 0210	>1000	>1000
<i>Curvularia</i> sp. CCT 5629 (I) ^b	>1000	250
<i>Curvularia</i> sp. CCT 5629 (II) ^c	250	125
<i>C. eragrostidis</i> CCT 5634 (I)	>1000	125
<i>C. eragrostidis</i> CCT 5634 (II)	125	62
<i>C. lunata</i> CCT 5628 (I)	>1000	250
<i>C. lunata</i> CCT 5628 (II)	125	62
<i>C. pallescens</i> CCT 5654 (I)	>1000	250
<i>C. pallescens</i> CCT 5654 (II)	125	62
<i>D. dematioidea</i> CCT 5631	<31	<31
Fungo CCT 5553	>1000	500
<i>Penicillium</i> sp. CBMAI 0208	250	125
<i>Penicillium</i> sp. CBMAI 0209	>1000	>1000
Cloranfenicol	<20	<20

^aAmostras obtidas por CCDP dos compostos bioativos dos extratos em AcOEt selecionados por bioautografia. ^b(I): $R_f = 0,0 - 0,1$, CCD/Hex-AcOEt (7:3) ou (1:1). ^c(II) $R_f = 0,35$, CCD/Hex-AcOEt (7:3) ou $R_f = 0,5$, CCD/Hex-AcOEt (1:1).

1.3.4. Substâncias antimicrobianas produzidas por *D. dematioidea*

O extrato bruto de AcOEt da cultura de *D. dematioidea* CCT 5631 foi fracionado (gradiente Hex-AcOEt) por cromatografia em coluna de silicagel (230 – 400 mesh). As substâncias de interesse coeluíram em uma única fração de aspecto oleoso e pigmentação amarelo ouro. A purificação desta mistura por CCDP (silicagel - AgNO_3 5%, Benzeno - AcOEt 9:1) resultou no isolamento da substância **1.5** (cristais amarelos, $0,4 \text{ mg.g}^{-1}$ de extrato em AcOEt da cultura). Adicionalmente, sua acetilação (Ac_2O /piridina) seguida de cromatografia em coluna de silicagel (230 –

400 mesh, gradiente Hex-AcOEt) resultou no isolamento da substância **1.6** (óleo amarelo, 0,5 mg.g⁻¹ de extrato em AcOEt da cultura).

1.3.4.1. Coclioquinona A (1.5)

O espectro de RMN de ¹H (300,068 MHz, CDCl₃, δ_{TMS} = 0,00 ppm) de **1.5** apresentou sinais coerentes com (Figura 1.7) a presença de 1 hidrogênio desprotegido (s, δ 10,78), característico de álcoois alílicos que formam ligações de hidrogênio intramolecularmente com carbonilas, de 1 hidrogênio de um sistema π trissubstituído e pertencente a um ciclo (s, δ 6,54), de 2 hidrogênios carbinólicos ligados a carbonos terciários (dd, δ 5,02, J = 7,1, 5,4 e dd δ 4,94, J = 10,0, 1,1), de 5 metilas ligadas a carbonos quaternários (s, δ 1,99; 1,33; 1,19; 1,17; 1,02), 1 delas correspondendo à metila de um acetil (s, δ 1,99) e 2 outras a metilas angulares (s, δ 1,33; 1,02); adicionalmente, o espectro apresentou sinais coerentes com a presença de 2 metilas ligadas a carbonos terciários (d, δ 1,15, J = 6,9; d, δ 0,90, J = 6,9), 1 metila ligada a carbono secundário (t, δ 0,89, J = 6,4) e vários hidrogênios metilênicos e metínicos (m, δ 2,20 - 1,20). O espectro de RMN de ¹³C (75,425 MHz, CDCl₃, δ_{CDCl₃} = 77,0 ppm) apresentou 30 sinais (Figura 1.8), os quais, de acordo com o espectro de RMN de ¹³C (DEPT 90°/135°) corresponderam a 9/C, 8/CH, 5/CH₂ e 8/CH₃. Dentre eles, 5 carbonos quaternários (δ 188,5; 181,4; 151,4; 148,3; 118,8) e um carbono terciário (δ 133,6) foram atribuídos a um núcleo quinônico trissubstituído. Um sexto carbono quaternário foi atribuído a uma carbonila de éster (δ 170,4), concordando com a prévia indicação de um acetil fornecida pelo espectro de RMN de ¹H (s, δ 1,99). Dois carbonos terciários a δ 85,0 e δ 83,7 e 1 carbono quaternário a δ 83,1 sugeriram a presença de heterociclos. O espectro de massas de **1.5** apresentou íon molecular de m/z 532 (M⁺, 14,5%).

A análise comparativa dos dados espectrais obtidos com os dados existentes na literatura proporcionou a identificação de **1.5** como coclioquinona A,²⁴ um metabólito produzido por algumas espécies de fungos fitopatogênicos (e.g.,

Cochliobolus spp., *Bipolaris* spp.) e isolado pela primeira vez, em 1938, da cultura de *Helminthosporium leersii*.²⁵ De acordo com a rotação específica observada, $[\alpha]_D^{25} + 71^\circ$ (c 1.0, EtOH), a substância isolada pertence à mesma série enantiomérica daqueles previamente descritos na literatura ($[\alpha]_D^{24} + 140^\circ$, c 0.1, EtOH).²⁴

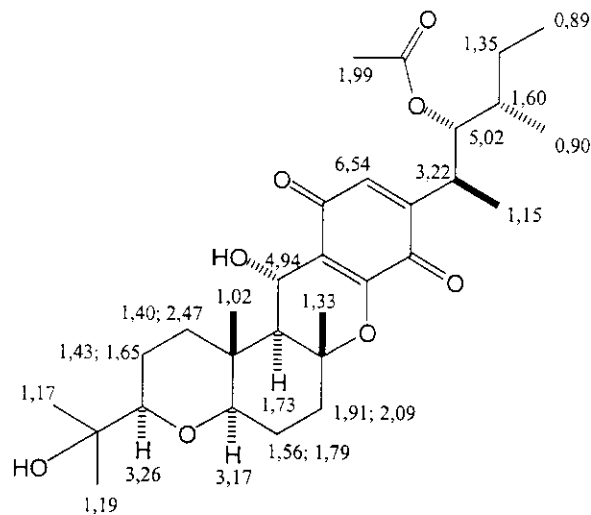


Figura 1.7. Atribuição dos sinais de RMN de ^1H (300,068 MHz, CDCl_3 , δ_{TMS} 0,00 ppm) de **1.5**

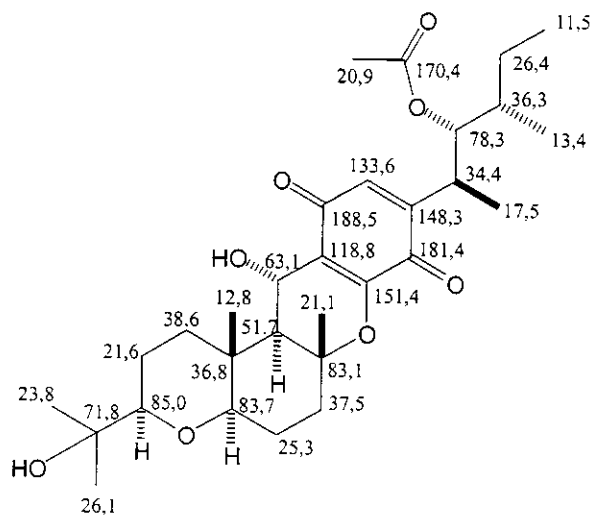


Figura 1.8. Atribuição dos sinais de RMN de ^{13}C (75,425 MHz, CDCl_3 , δ_{CDCl_3} 77,0 ppm) de **1.5**

A substância **1.5** tem por característica uma origem biossintética mista, na qual um farnesil é introduzido em um precursor aromático derivado da acetogenina para formar a base de construção do esqueleto terpênico.²⁶ A sua produção por *Drechslera sacchari* já era conhecida²⁷ mas por *D. dematioidea* foi revelada a partir do presente trabalho.²⁸

1.3.4.2. Isococlioquinona A (1.6)

O espectro de RMN de ^1H (300,068 MHz, CDCl_3 , $\delta_{\text{TMS}} = 0,00$ ppm) de **1.6** (Figura 1.9) apresentou o mesmo padrão de sinais apresentado pela coclioquinona A (**1.5**). Entretanto, relativamente a **1.5**, o espectro de RMN de ^1H de **1.6** não apresentou o hidrogênio desprotegido em δ 10,78, apresentou um hidrogênio carbinólico a menos e duas metilas de acetil a mais. O espectro de RMN de ^{13}C (75,425 MHz, CDCl_3 , $\delta_{\text{CDCl}_3} = 77,0$ ppm) de **1.6** (Figura 1.10) apresentou 34 sinais, 12/C, 7/CH, 5/ CH_2 e 10/ CH_3 , os quais relativamente a **1.5**, indicaram a substituição de um CH carbinólico (**1.5**: δ 63,1) por uma cetona (**1.6**: δ 190,2) e a presença de dois grupos acetil adicionais (δ 169,5; 168,0; 21,1; 20,6). Este conjunto de dados indicou a presença de um núcleo hidroquinônico em **1.6** e os espectros de RMN 2D (COSY, HSQC, HMBC) corroboraram a estrutura proposta. A comparação dos dados espectrais obtidos com os dados existentes na literatura²⁴ proporcionou a identificação de **1.6** como isococlioquinona A (derivado diacetilado). Esta substância constitui um isômero da coclioquinona A, o qual foi isolado pela primeira vez de uma linhagem fitopatogênica de *Bipolaris bicolor*.²⁴ A produção de **1.6** por *D. dematioidea*, no entanto, foi comunicada apenas recentemente.²⁹ De acordo com a atividade óptica observada, $[\alpha]_{\text{D}}^{25} + 51^\circ$ (c 1.0, EtOH), **1.6** pertence à mesma série enantiomérica da isococlioquinona A conhecida ($[\alpha]_{\text{D}}^{24} + 65^\circ$, c 0.1, EtOH).²⁴ O espectro de massas de **1.6** não apresentou o M^+ ; o íon de maior m/z detectado foi o de m/z 601 (1,5%), correspondente a $\text{M}^+ - \cdot\text{CH}_3$.

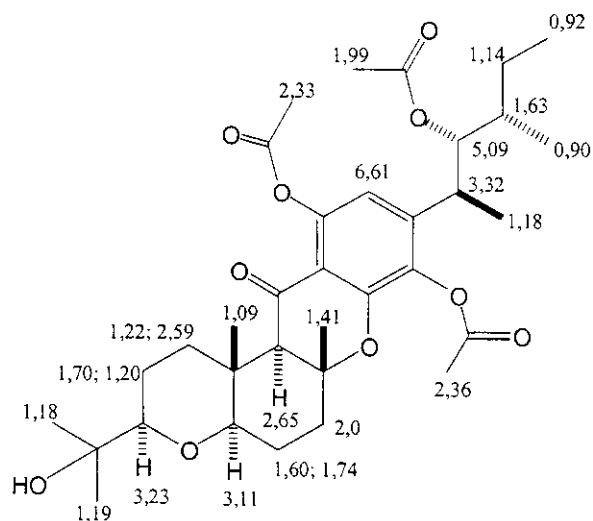


Figura 1.9. Atribuição dos sinais de RMN de ^1H (300,068 MHz, CDCl_3 , δ_{TMS} 0,00 ppm) de **1.6**

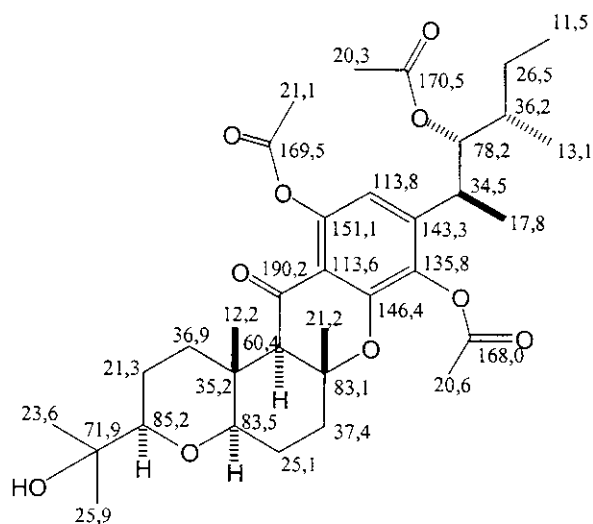


Figura 1.10. Atribuição dos sinais de RMN de ^{13}C (75,425 MHz, CDCl_3 , δ_{CDCl_3} 77,0 ppm) de **1.6**

1.3.4.3. Atividade antimicrobiana de 1.5 e 1.6

A CIM das substâncias isoladas foi avaliada (Tabela 1.5). A atividade biológica da amostra original (ver Tabela 1.4) foi mantida em **1.5** mas perdida em **1.6**. Como é sabido que a isococlioquinona A apresenta atividade antimicrobiana contra bactérias Gram-positivas,²⁹ a ausência de atividade antimicrobiana em **1.6** foi atribuída à acetilação do grupo hidroquinônico. Isto salienta a relevância da unidade estrutural em questão mas não permite inferir o mecanismo de ação exercido. Vale mencionar, no entanto, que em antibióticos antraciclínicos a formação de radicais livres pela quinona é apontada como a principal causa de ação citotóxica.³⁰

Tabela 1.5. CIM das substâncias isoladas da fração antimicrobiana do extrato em AcOEt da cultura de *D. dematioidea* CCT 5631.

Substância	CIM ($\mu\text{mol.L}^{-1}$)		
	<i>S. aureus</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>A. niger</i>
	CCT 4295	CCT 0089	CCT 1405
Coclioquinona A	28	28	470
Isococlioquinona A (derivado diacetilado)	>1623	>1623	>1623
Cloranfenicol ^a	12	12	-
Ciclopiroxolamina ^b	-	-	<41

^aAntibacteriano padrão. ^bAntifúngico padrão.

1.3.5. Substâncias antimicrobianas produzidos por *Curvularia*

A realização de análises por CGAR-EM das amostras das frações bioativas polares ($R_f = 0,0 - 0,1$, CCD, Hex-AcOEt 7:3) e de média polaridade ($R_f = 0,35$,

CCD, Hex-AcOEt 7:3) dos extratos das culturas de *Curvularia* sp. CCT 5629, *C. eragrostidis* CCT 5634, *C. pallescens* CCT 5654 e *C. lunata* CCT 5628 mostrou que todas frações polares e todas frações de média polaridade eram quimicamente semelhantes. Entretanto, conforme ponderado anteriormente com base nos valores de CIM (item 1.3.3), somente as frações de média polaridade foram selecionadas para continuidade do estudo.

Visando o isolamento da substância bioativa, os extratos brutos mais abundantes em massa, sendo eles os das culturas de *C. eragrostidis* CCT 5634 e de *C. pallescens* CCT 5654, foram submetidos a purificação. O fracionamento (gradiente Hex-AcOEt) desse material por cromatografia em coluna de silicagel (230 – 400 mesh) proporcionou o isolamento de 2 substâncias de média polaridade [$R_f = 0,5$ (1.7) e $R_f = 0,4$ (1.8), CCD, Hex-AcOEt 1:1] de ambos extratos. A avaliação de ambas substâncias por bioautografia apresentou 1.7 como a substância dotada de atividade antimicrobiana.

1.3.5.1. E-desidrocurvularina (1.7)

O espectro de RMN de ^1H (499,882 MHz, CDCl_3 , $\delta_{\text{TMS}} = 0,00$ ppm) de 1.7 (Figura 1.11) apresentou dubletos desprotegidos (δ 6,25 e 6,22; $J = 2,3$) típicos de hidrogênios aromáticos *meta*-acoplados, um duplo duplo dubleto (δ 6,61, $J = 15,4$; 8,8; 3,8) e um duplo dubleto (δ 6,65, $J = 15,4$; 1,2) característicos de hidrogênios olefínicos α -carbonílicos, um multiplete correspondente a um hidrogênio carbinólico (δ 4,87), dois dubletos relativamente desprotegidos, compondo um sistema de spins AB (δ 3,51, $J = 17,8$ e δ 4,03, $J = 17,8$), uma sequência de hidrogênios (δ 2,48-1,65) correspondendo a 3 metilenos típicos de ciclos e um dubleto correspondendo a uma metila ligada a um carbono terciário (δ 1,25). O espectro de RMN de ^{13}C (125,695 MHz, CDCl_3 , $\delta_{\text{CDCl}_3} = 77,0$ ppm) de 1.7 (Figura 1.12) apresentou 16 sinais, os quais de acordo com o espectro de RMN de ^{13}C (DEPT 90°/135°) eram devidos a 6/C, 5/CH, 4/CH₂ e 1/CH₃. Os espectros de RMN mostraram-se coerentes, sendo os

sinais de ^{13}C atribuídos a uma cetona (δ 196,2), a uma carbonila de éster ou lactona (δ 172,1), a um anel benzênico tetrassubstituído (δ 166,3; 161,3; 137,5; 114,2; 113,8; 103,3) com 2 posições possivelmente ligadas a oxigênio (δ 166,3; 161,3), a uma

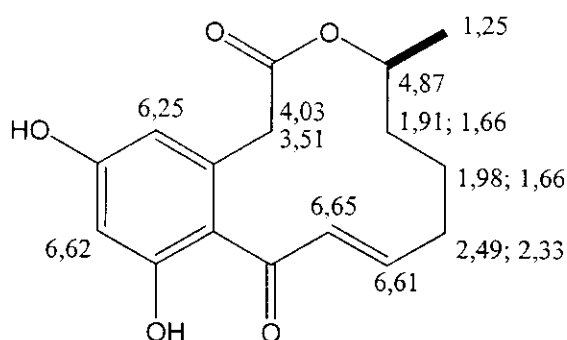


Figura 1.11. Atribuição dos sinais de RMN de ^1H (499,882 MHz, CDCl_3 , δ_{TMS} 0,00 ppm) de 1.7

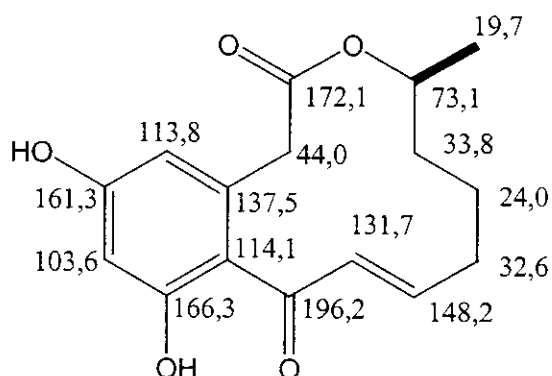


Figura 1.12. Atribuição dos sinais de RMN de ^{13}C (125,695 MHz, CDCl_3 , δ_{CDCl_3} 77,0 ppm) de 1.7

olefina α -carbonílica (δ 148,2; 131,4) formando um sistema α,β -insaturado, a um carbinol (δ 73,1), metilenos (δ 44,0; 33,8; 24,0) e uma metila (δ 19,7). O espectro de massas apresentou o M^+ de m/z 290 (100%). A realização de análises de RMN de 2D (COSY, HSQC) e a comparação dos dados espectrais obtidos com a literatura³¹ proporcionaram a identificação de **1.7** como *E*-desidrocurvularina, a qual foi inicialmente isolada de *Curvularia* sp.³² e posteriormente de outros fitopatógenos dos gêneros *Alternaria* e *Penicillium*. De acordo com a atividade óptica, $[\alpha]_D^{20} - 64,9^\circ$ (c 1,0, MeOH), **1.7** pertence à mesma série enantiomérica do produto natural conhecido ($[\alpha]_D^{20} - 65,9^\circ$, c 1,8, EtOH)³¹ cuja configuração absoluta do único carbono assimétrico presente foi determinada como *S* por meio de comparação com o $[\alpha]_D$ de seu análogo saturado, curvularina, sintetizado a partir de um intermediário enantiomericamente puro.³³

1.3.5.2. Curvularina (1.8)

Os espectros de RMN de ^1H (300,068 MHz, CD_3OD , $\delta_{\text{CD}_3\text{OD}} = 3,3$ ppm) e de RMN de ^{13}C (125,696 MHz, CD_3OD , $\delta_{\text{CD}_3\text{OD}} = 49$ ppm) de **1.8** (Figuras 1.13 e 1.14) apresentaram várias semelhanças com os espectros de RMN de **1.7**. Entretanto, no espectro de RMN de ^1H de **1.8**, os hidrogênios olefínicos típicos da cetona α,β -insaturada de **1.7** foram substituídos por dois duplos duplos dubletos (δ 3,20 e 2,73, $J = 2,9; 8,5; 15,5$) correspondentes a 2 hidrogênios fortemente acoplados, típicos de hidrogênios metilênicos diásterotópicos. Adicionalmente, a integração de multipletos abaixo de 2,5 ppm indicou 4 metilenos para **1.8** contra 3 de **1.7**. Estes sinais indicaram **1.8** como um análogo dihidrogenado de **1.7**. Corroborando esta interpretação, o espectro de RMN de ^{13}C de **1.8** também apresentou 16 carbonos e o espectro de RMN de ^{13}C (DEPT 90°/135°) mostrou 2 metilenos (δ 43,3 e 22,8) em substituição aos metinos da dupla α,β -insaturada de **1.7** (δ 148,2 e 131,4). O espectro de massas apresentou M^+ de m/z 292 (38%), compatível com a dihidrogenação de **1.7**, e a atividade óptica observada, $[\alpha]_D^{20} - 44,9^\circ$ (c 1,0, MeOH),

indicou a mesma série enantiomérica que **1.7**. A comparação dos dados espectrais obtidos com os dados existentes na literatura confirmaram a identificação de **1.8** como o análogo diidrogenado de **1.7**, (*S*)-curvularina. Esta substância também foi inicialmente isolada de *Curvularia* sp.³⁴ e posteriormente verificada como um metabólito comum a fungos dos gêneros *Alternaria* e *Penicillium*.

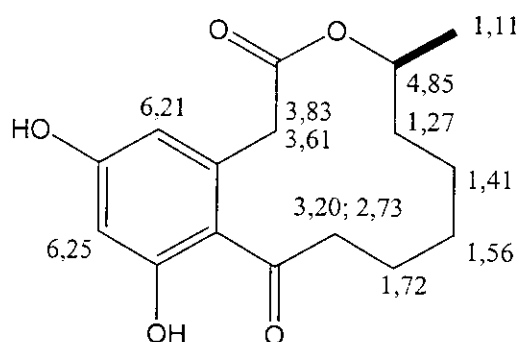


Figura 1.13. Atribuição dos sinais de RMN de ¹H (300,068 MHz, CD₃OD, δ_{CD₃OD} 3,3 ppm) de **1.8**

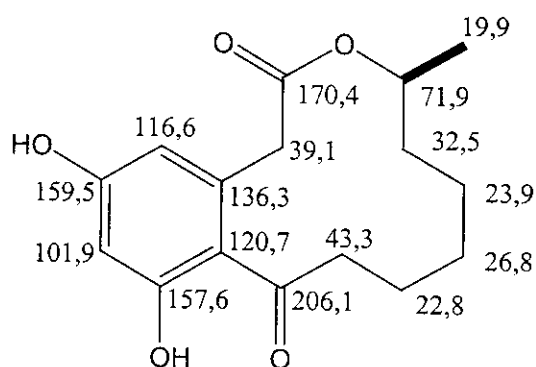


Figura 1.14. Atribuição dos sinais de RMN de ¹³C (125,696 MHz, CD₃OD, δ_{CD₃OD} 49 ppm) de **1.8**

1.3.5.3. Atividade antimicrobiana de 1.7 e 1.8

A avaliação da CIM das substâncias isoladas (Tabela 1.6) mostrou a manutenção do potencial antimicrobiano anteriormente observado (Tabela 1.4). Uma vez que 1.7 e 1.8 pertencem à mesma série enantiomérica, a diferença estrutural entre as substâncias, especificamente relacionada à cetona α,β -insaturada, salientou o grupo funcional fundamental à atividade biológica. Embora o fato não permita inferências precisas sobre o mecanismo de ação, é possível sugerir, baseado em Rodríguez,³⁵ que a atividade biológica resultou da inibição de algum processo bioquímico por meio de ataque nucleofílico a 1.7, do tipo adição de Michael.

Tabela 1.6. CIM das substâncias isoladas da fração antimicrobiana dos extratos em AcOEt das culturas de *C. eragrostidis* CCT 5634 e *C. pallescens* CCT 5654.

Substância	CIM (mmol.L ⁻¹)		
	<i>S. aureus</i> CCT 4295	<i>B. subtilis</i> CCT 0089	<i>A. niger</i> CCT 1405
Desidrocurvularina	1724	862	>3448
Curvularina	>3424	>3424	>3424
Cloranfenicol ^a	12	12	-
Ciclopiroxolamina ^b	-	-	≤ 41

^aAntibacteriano padrão. ^bAntifúngico padrão.

As lactonas 1.7 e 1.8 são derivados policetídeos, os quais, de acordo com estudos biossintéticos de incorporação de intermediários ¹³C-marcados,³⁶ estão relacionados por meio da redução de 1.7, o qual primeiro é secretado no meio e

depois reduzido. O entendimento da função ecológica deste processo ainda não é completo mas, no presente, está sendo relacionado ao fato de que **1.7**, mas não **1.8**, é capaz de suprimir esporulação (e.g., *Alternaria tomato*)³⁷ e assim proporcionar alguma vantagem competitiva ao organismo produtor.

Finalmente, visando ampliar a avaliação da atividade biológica, amostras das substâncias isoladas foram submetidas a ensaios contra *Mycobacterium tuberculosis* e *Tripanossoma cruzi* (Tabela 1.7), por meio de colaboração com grupos de pesquisa do Dr. Célio Lopes, da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP, e do Dr. Sérgio Albuquerque, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – USP.

Tabela 1.7. Atividade antimicrobiana contra *Mycobacterium tuberculosis* e *Tripanossoma cruzi* de **1.5** – **1.7**.

Substância	^a <i>M. tuberculosis</i>	^b <i>T. cruzi</i> cepa Y
	<i>H37Rv</i> CIM ($\mu\text{mol.L}^{-1}$)	(forma tripomastigota) IC ₅₀ ($\mu\text{mol.L}^{-1}$)
Desidrocurvularina	40	1334
Curvularina	642	4900
Coclioquinona A	250	-
Rifampicina ^c	$\leq 0,04$	-
Estreptomicina ^c	$\leq 0,09$	-
Etambutol ^c	14	-
Violeta Genciana	-	600

^aEnsaios realizados sob a supervisão da Dra. Ana Olívia de Souza, da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP. ^bEnsaios realizados sob a supervisão do Dr. Sérgio Albuquerque, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – USP. ^cAntibióticos padrão.

1.4. Conclusão parcial 1

O objetivo proposto foi alcançado. Os diferentes fungos filamentosos isolados de abelhas *Trigona* sp. foram estrategicamente avaliados quanto à produção de antibióticos por meio de critérios (bioautografia e CIM) amplamente consagrados no meio científico. O trabalho resultou no isolamento de 4 substâncias conhecidas (**coclioquinona A**, **isococlioquinona A**, **curvularina** e **E-desidrocurvularina**), passíveis de serem monitoradas em função da atividade contra bactérias Gram-positivas. Entretanto, relativamente aos antibióticos padrão utilizados, as substâncias isoladas apresentaram valores de CIM altos. Vale salientar, no entanto, que as substâncias **coclioquinona A** e **E-desidrocurvularina** foram bem mais ativas do que as demais, sendo esta última, principalmente, no que diz respeito à atividade contra *M. tuberculosis*.

A incubação dos fungos em meios de cultura sólidos, ricos em amido e triglicerídeos (milho, arroz) foi mais adequado à obtenção de metabólitos secundários em pequena escala do que o cultivo em solução de extrato de malte, mais comumente utilizada. O fato de os meios sólidos mencionados serem relativamente ricos em nutrientes não impediu a biossíntese dos metabólitos secundários com atividade antimicrobiana, ao menos no caso das substâncias isoladas (**coclioquinona A**, **isococlioquinona A**, **curvularina** e **E-desidrocurvularina**). Vale salientar, no entanto, que a investigação foi limitada aos extratos em AcOEt das culturas e que a produção de substâncias antimicrobianas de caráter hidrofílico pelos fungos estudados ainda não pode ser desconsiderada.

Capítulo 2

Prospecção de biocatalisadores

A produção industrial de fármacos nos moldes atuais, por exemplo, envolve a geração de um montante enorme de rejeitos poluentes, dado a utilização estequiométrica de inúmeros reagentes tóxicos (e.g., halogênios, oxidantes cromados), catalisadores que não podem ser reciclados e um volume considerável de solventes orgânicos voláteis e carcinogênicos. Dentre as áreas mais problemáticas em termos de metodologias sintéticas, merecem destaque ³⁸as oxidações seletivas, as halogenações, as reações catalisadas por metais e as reduções. Tendo isto em vista, ainda que os desafios sejam inúmeros, é preciso perseverar na procura da “síntese ideal” cujas características compreendem o aproveitamento máximo dos reagentes (eficiência), a utilização de matéria-prima renovável e a compatibilidade com o meio ambiente. Felizmente, mudanças graduais nesse sentido vêm sendo implementadas com o desenvolvimento de tecnologias, dentre as quais merece destaque a utilização de microrganismos ou enzimas como catalisadores. O principal atrativo deste tipo de abordagem está no fato dos biocatalisadores atuarem em condições brandas (meio aquoso, temperatura ambiente), serem estereo- e regioespecíficos e assim proporcionarem maior aproveitamento do material de partida e menor geração sub-produtos.

2.1. Contexto geral

Inicialmente, a elucidação de rotas metabólicas era a principal força motriz da maioria dos estudos de catálise enzimática. Entretanto, notoriamente a partir da década de 1980, o principal estímulo ao desenvolvimento da área passou a ser a demanda por fármacos enantiomericamente puros.^{39,40,41} Ante esta perspectiva, os

estudos de biocatálise passaram a focalizar em grande parte a investigação de enzimas/microrganismos quanto ao potencial de transformação de substâncias xenobióticas (não naturais). Contudo, é muito comum que a biotransformação de tais substâncias não seja possível por falta de adequação ao sítio ativo enzimático e isto torna as triagens para detecção de enzimas aptas a catalisar reações úteis uma necessidade constante; sendo uma das maneiras mais bem sucedidas de encontrá-las, a avaliação do maior número possível de microrganismos frente a substratos variados.⁴²

As reações com enzimas independentes de cofator (e.g., hidrolases: proteases, esterases, lipases) constituem sistemas operacionais simples, passíveis de aplicação em qualquer laboratório padrão.⁴³ Em contrapartida, as reações com enzimas dependentes de cofator (e.g., oxidoredutases) são relativamente mais complexas (*in vitro*, com enzimas isoladas, é necessário mimetizar a regeneração do cofator) e ainda constituem sistemas economicamente dispendiosos e não raro inviáveis à aplicação em escala preparativa.⁴⁴ Principalmente por estes motivos, as reações enzimáticas dependentes de cofator são comumente realizadas com células inteiras.

As reações de biotransformação utilizando células microbianas (livres ou imobilizadas) são conduzidas basicamente de duas maneiras: (i) com células em crescimento ou (ii) com células em repouso. Na primeira modalidade, o substrato a ser biotransformado é adicionado ao meio de cultura do microrganismo numa determinada fase do crescimento e portanto sua biotransformação concorre com a de nutrientes necessários à manutenção da multiplicação celular. Na segunda modalidade, as células microbianas cultivadas por um determinado período de tempo são transferidas do meio de crescimento para um meio reacional isento de nutrientes (e.g., solução tampão), ao qual é finalmente adicionado o substrato para biotransformação. Ambas modalidades são amplamente utilizadas. As reações com células em crescimento proporcionam economia de tempo dado a praticidade; e as reações com células em repouso proporcionam a minimização de analitos e conseqüente maior facilidade de purificação dos produtos de interesse.

Dentre as várias reações enzimáticas passíveis de exploração, foram priorizadas no presente as reações de halogenação de alcenos e de oxidação α -carbonílica do tipo Baeyer-Villiger. Ambas enzimas envolvidas nestas transformações pertencem às **oxidoreduases**, mais especificamente aos subgrupos das **peroxidases** e das **oxigenases** e são denominadas, respectivamente, **haloperoxidasas** e **monoxigenases**.⁴⁵

2.2. Haloperoxidasas

As haloperoxidasas (HPO) são enzimas as quais por meio de reação com peróxidos (e.g., H_2O_2) catalisam a oxidação de haletos (X^- , $X = Cl, Br, I$) a ácidos hipohalosos (HOX; Equação 2.1) e estes, por meio de reação com substratos suscetíveis a ataque eletrofílico (A), dão origem a substâncias halogenadas (AX) ou halidroxilados (AXOH), dado o meio reacional aquoso (Equação 2.2).



Dependendo do haleto mais eletronegativo que conseguem oxidar, estas enzimas são classificadas como cloroperoxidasas (Cl-HPO), bromoperoxidasas (Br-HPO) ou iodoperoxidasas (I-HPO) (e.g, bromoperoxidasas oxidam ambos brometo e iodeto).⁴⁶ Adicionalmente, dependendo dos componentes do sítio ativo, são classificadas como HPO dependentes de ferro (Fe^{+3}) (e.g., Cl-HPO do fungo *Caldariomyces fumago*),⁴⁷ HPO dependentes de vanádio (V^{+5}) (e.g., Br-HPO da alga marinha *Ascophyllum nodosum*)⁴⁸ e HPO independentes de cofator para desempenho da ação catalítica (e.g., Cl-HPO da bactéria *Pseudomonas pyrrocinia*).^{49,50}

2.2.1. Mecanismos de reação

Os mecanismos pelos quais as reações de halogenação catalisadas por HPO ocorrem não são plenamente conhecidos. Surpreendentemente, tais reações não são enantiosseletivas e geralmente comportam-se à semelhança de halogenações promovidas por ácidos hipohalosos (HOX , $\text{X} = \text{Cl}^+$, Br^+ , I^+).^{51,52,53,54,55,56}

A reatividade das HPO dependentes de Fe^{+3} é atribuída ao grupo prostéticoⁱ heme (protoporfirina IX + Fe^{+3} , Figura 2.1) que se encontra fortemente ligado à enzima por meio de interações hidrofóbicas, pontes de hidrogênio e coordenação do Fe^{+3} com um resíduo de cisteína.⁵⁷

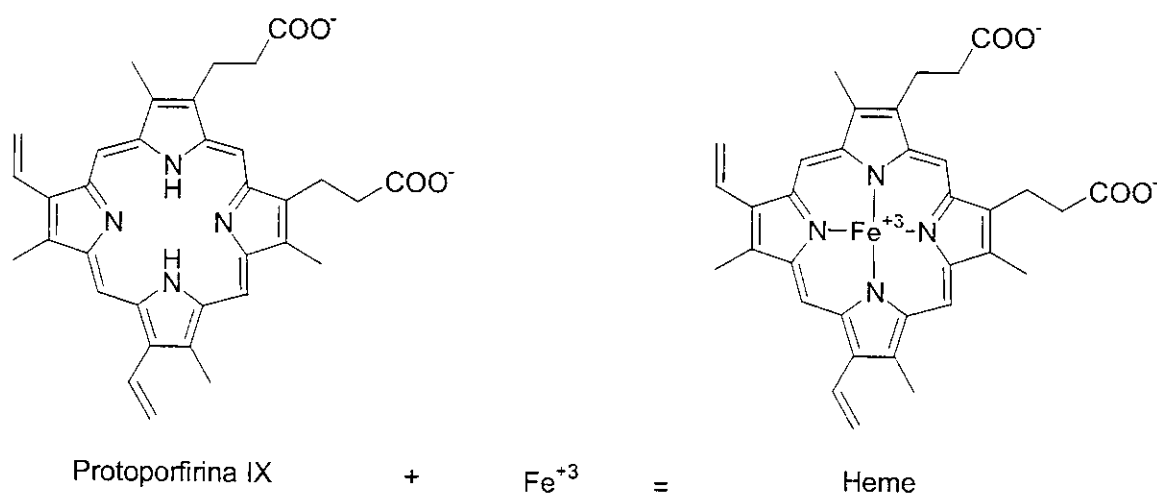


Figura 2.1. Componentes do grupo prostético heme.

No tocante ao ciclo catalítico, é bem conhecida a formação de um intermediário eletrofílico, denominado Composto I, contendo Fe^{+4} e o anel porfirínico como um cátion radical.⁵⁸ Estudos realizados com modelos de sítio ativo (*C. fumago*) demonstraram a formação de adutos de protoporfirinato IX de Fe^{+3} com ^-OCl e HOCl

ⁱ Um grupo prostético é uma molécula orgânica essencial ao desempenho catalítico da enzima e que a esta se encontra fortemente associado, seja por meio da formação de complexos estáveis ou ligação covalente.

(Figura 2.2) e, mais significativamente, a necessidade de protonação do aduto de OCl^- para ocorrência da reação de halogenação.^{58,58} Assim, considerando o posicionamento estratégico dos aminoácidos Glu¹⁸³, His¹⁰⁵ e Asp¹⁰⁶, no sítio ativo, Wagenknecht e col.⁵⁸ sugeriram um mecanismo de reação (Figura 2.3) onde o H_2O_2 reage inicialmente oxidando o protoporfirinato IX de Fe^{+3} (**2.1**) ao Composto I (**2.2**), o qual, na presença de halogenetos (e.g., Cl^-), é reduzido ao aduto **2.3** cuja protonação por aminoácidos do sítio ativo (*vide supra*) resulta no aduto **2.4**, o qual representa a espécie halogenante ativa. A ocorrência da reação de halogenação retorna o protoporfirinato IX de Fe^{+3} ao estado fundamental, finalizando o ciclo catalítico.

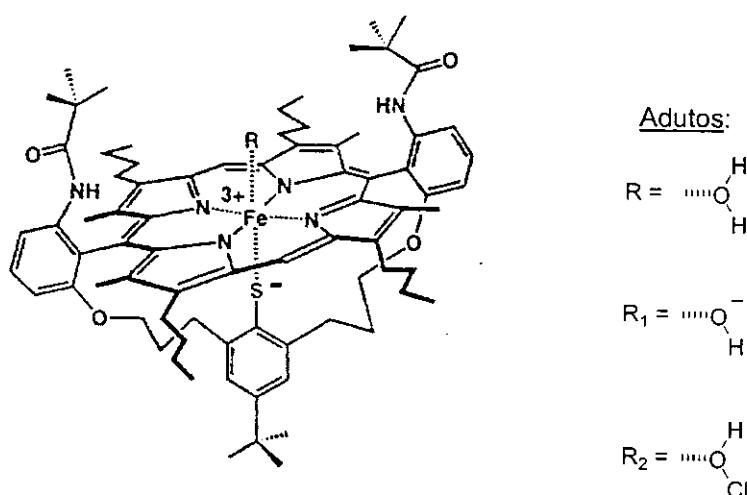


Figura 2.2. Modelo de sítio ativo da cloroperoxidase de *C. fumago* (Ref. 58).

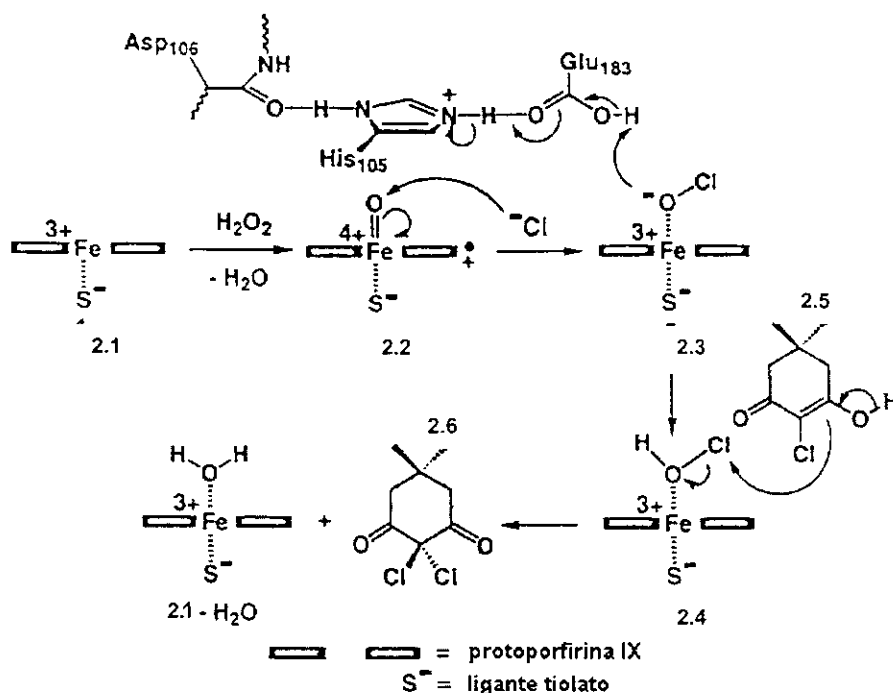


Figura 2.3. Mecanismo de reação de halogenação catalisada por heme-haloperoxidasas baseado na cloração da monoclorodimedona (2.5). O próton essencial à efetivação da halogenação é fornecido pelos resíduos dos aminoácidos Glu¹⁸³, His¹⁰⁵ e Asp¹⁰⁶, do sítio ativo (Ref. 58).

No âmbito das HPO dependentes de vanádio (V-HPO), a V-Cl-HPO de *Curvularia inaequalis* (fungo filamentoso terrestre) é a enzima mais utilizada como modelo em abordagens mecanísticas.^{59,60} No sítio ativo desta enzima em sua forma nativa, o V⁺⁵ é encontrado no centro de um complexo trigonal-bipiramidal, ligado a 3 oxigênios não peptídicos em posições equatoriais, e a um grupo hidroxila e a um resíduo de histidina (His⁴⁹⁶) em posições axiais (Figura 2.4A). Várias pontes de hidrogênio entre os átomos de oxigênio do plano equatorial e aminoácidos positivamente carregados estabilizam a coordenação do vanadato (VO₄⁺³) à enzima. Adicionalmente, a hidroxila axial forma ponte de hidrogênio com a His⁴⁰⁴, a qual representa um resíduo relevante no contexto da catálise, às vezes mencionado como histidina ácido-base.⁶¹ Espectros de raio-X também revelam que ao reagir com

H_2O_2 a geometria do complexo assume a forma tetragonal-piramidal (Figura 2.4B). Ambos oxigênios do peróxido, um terceiro átomo de oxigênio e o nitrogênio da His⁴⁹⁶ formam um plano basal de coordenação ao vanádio e um quarto átomo de oxigênio, presente como um ligante oxo, forma o plano axial do sistema, do qual a His⁴⁰⁴ já não mais participa por meio de ponte de hidrogênio.⁶² Todos os resíduos de aminoácidos diretamente envolvidos na ligação do vanadato (VO_4^{+3}) à Cl-HPO de *C. inaequalis* são conservados nas Br-HPO das algas *Ascophyllum nodosum*⁶² e *Corallina* spp.^{63,64}

Respeitando os dados cristalográficos mencionados acima, o mecanismo de reação proposto⁶³ parte do fato de que o sítio ativo da enzima, em sua forma nativa, contém a hidroxila axial do vanadato (VO_4^{+3}) em ponte de hidrogênio com a His⁴⁰⁴ (Figura 2.5A). Esta interação aumenta a nucleofilicidade do grupo hidroxila, de modo a promover a abstração de um próton de uma molécula de H_2O_2 presente no meio. A molécula de H_2O gerada pela protonação da hidroxila constitui um ligante fraco, facilmente deslocado da esfera de coordenação do vanádio. Em contrapartida, o

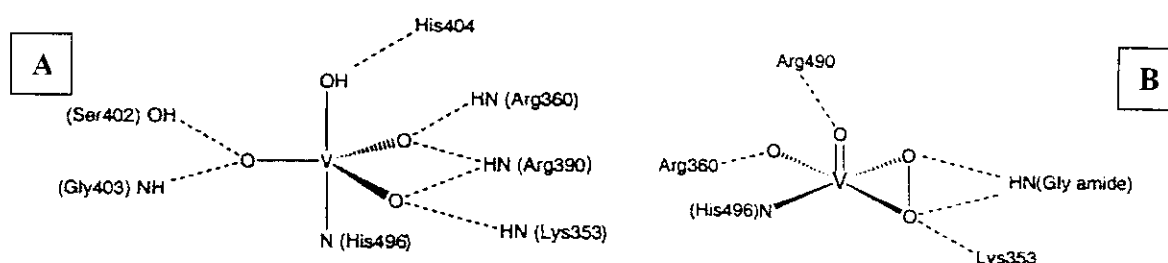


Figura 2.4. Complexos de vanádio (V^{+5}) característicos do sítio ativo da V-Cl-HPO de *C. inaequalis* (A) em sua forma nativa e (B) após reação com H_2O_2 (Ref. 62)

hidroperóxido ativado coordena-se ao vanádio, deslocando a H_2O (Figura 2.5B) e aumentando a nucleofilicidade dos demais oxigênios do complexo. Um destes oxigênios abstrai o próton remanescente no peróxido, formando um ligante OH^- (Figura 2.5C). Este último é deslocado pelo oxigênio negativamente carregado do

peróxido, formando o complexo tetragonal-piramidal (Figura 2.5D) observado por meio das análises de difração de raios-X. Neste estágio, o peróxido ligado ao vanádio é um ótimo oxidante, capaz de aceitar 2 e⁻ de um haleto. Assim, por meio de ataque nucleofílico (Figura 2.5 E) o haleto rompe a ligação peróxido e promove a formação de um ligante O-Cl (Figura 2.5. D). Este, efetuando a desprotonação da H₂O, gera a espécie halogenante HOX e íon OH⁻, o qual substitui o ligante HOX, reciclando o catalisador (Figura 2.5.F).

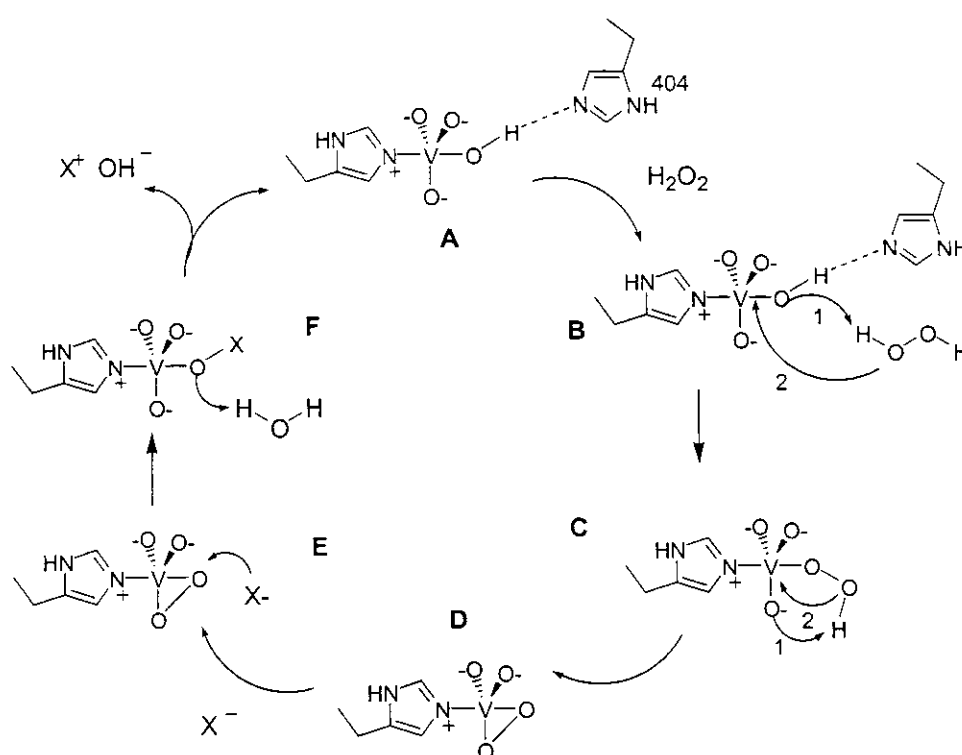


Figura 2.5. Mecanismo da reação de halogenação catalisada por V-Cl-HPO (Ref. 63).

A reatividade das demais enzimas halogenativas, ou seja, das HPO independentes de cofator, é atribuída, surpreendentemente, à tríade catalítica Ser-His-Asp, típica de enzimas hidrolíticas.⁶⁵ Adicionalmente, as HPO independentes de cofator apresentam três outras características diferenciais, tais como seqüência primária semelhante à de serina-hidrolases (dentre as quais encontram-se várias

lipases, esterases e serina-proteases), manifestação de atividade de esterases e dependência de íons acetato (e.g., solução tampão) para manifestação da atividade de HPO.^{50,66}

Considerando a reação de peroxidação de ácidos carboxílicos que algumas hidrolases (lipases) desempenham na presença de H_2O_2 , alguns autores sugeriram⁶⁷ que a formação de perácidos, na presença de H_2O_2 , seria o evento responsável pelas reações de halogenação desempenhadas pelas HPO independentes de cofator. Seguindo este raciocínio, outros autores⁶⁸ posteriormente demonstraram a halogenação da monoclorodimedona (**2.5**; ver Figura 2.3) por lipases variadas na presença de acetato, H_2O_2 e Br^- , confirmando por CLAE acoplada a detector eletroquímico, a formação de perácidos no meio reacional. A partir daí, as HPO independentes de cofator passaram a ser consideradas como a manifestação de uma particularidade das enzimas aptas a peridrólise de ácidos carboxílicos, as quais promoveriam a halogenação de acordo com o mecanismo ilustrado na Figura 2.6.⁶⁹

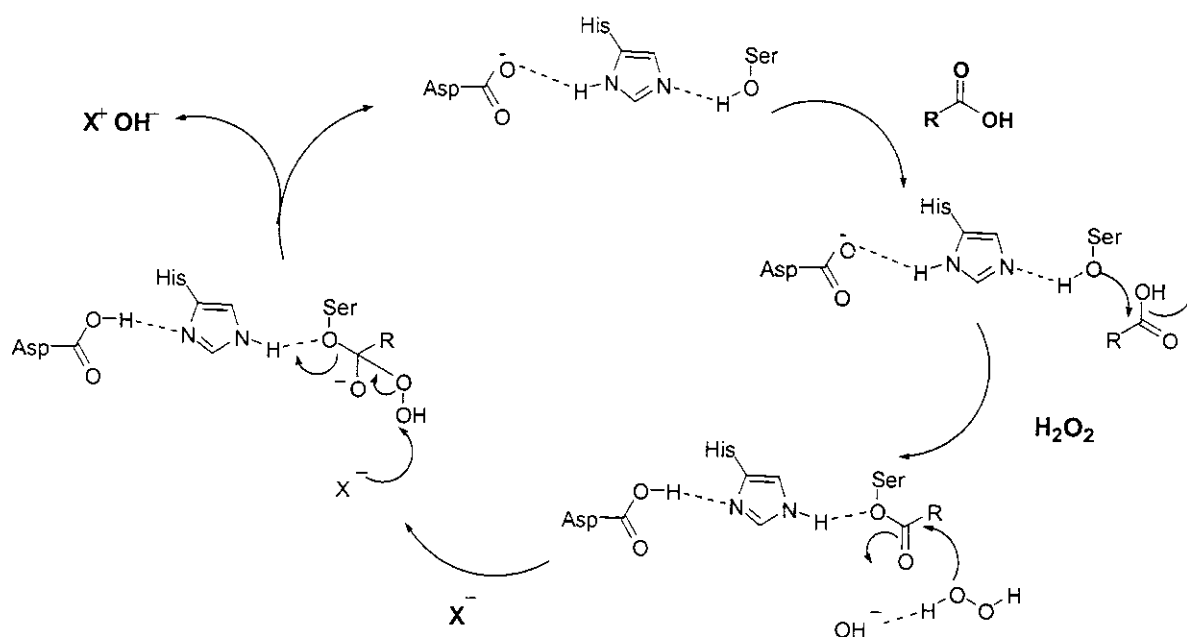


Figura 2.6. Mecanismo da reação de halogenação catalisada por HPO independente de cofator (Ref. 71).

2.2.2. Halodrinas enantiomericamente enriquecidas

Sendo ao mesmo tempo um álcool e um haleto de alquila, as halodrinas dispõem de dois grupos funcionais com reatividades distintas. Isto as torna intermediários sintéticos altamente versáteis e úteis à preparação de epóxidos, os quais, principalmente se de baixa massa molecular, não são satisfatoriamente produzidos por meio da reação de olefinas com perácidos.⁷⁰

Dado as haloperoxidasas catalisarem a formação de ligações carbono-halogênio, por meio da oxidação de haletos (X^-), em substratos variados (e.g., antraquinonas,⁷¹ esteróides,^{72,73,74} metil-derivados do estireno⁷⁵ e do ácido cinâmico,^{53,56} glicais⁷⁶ e ácidos barbitúricos^{54,55}), no âmbito da síntese orgânica estas enzimas representam alternativas sintéticas extremamente mais salubres às reações de halogenação comumente realizadas por meio de halogênios moleculares (X_2). Embora a falta de enantiosseletividade seja uma característica marcante das haloidroxilações catalisadas por HPO, isto é passível de ser remediado, por exemplo, por meio de simples resolução da halodrina formada. Neste caso, mesmo trabalhando com a perspectiva de um rendimento teórico máximo de 50%, a amenidade das reações enzimáticas é geralmente suficiente para justificar o investimento em um processo biocatalítico. Todavia, resoluções cinéticas também merecem menção e, sendo assim, os excessos enantioméricos podem ser consideráveis (> 90%).

O trabalho de Zhang e col.⁷⁷ constitui o único exemplo conhecido de obtenção de halodrinas enantiomericamente enriquecidas a partir de reação com HPO. Os autores investigaram a atividade de haloperoxidase em extratos enzimáticos de 400 linhagens de fungos filamentosos e encontraram, no extrato enzimático bruto de *Curvularia protuberata*, a capacidade de transformação do indeno (**2.6**, Figura 2.7) em *trans*-2*S*,1*S*-bromoindanol (**2.7**, 30%, ee 80%). Tais autores constataram, entretanto, que a enantiosseletividade da biotransformação era devido à presença adicional de desidrogenases específicas para conversão de **2.8** em **2.9**, no extrato enzimático estudado. Além de constituir um exemplo típico de resolução cinética, o

trabalho descrito salienta o carácter multi-informativo do estudo de misturas enzimáticas e o fato de que, apesar do tipo de conhecimento construído acerca do mecanismo de reação das HPO, a busca por enzimas diferentes, capazes de promover halogenações enantiosseletivas, ainda não foi completamente descartada.

No que diz respeito à presente abordagem, é importante salientar que o funcionamento de haloperoxidasas *in vivo* é pouquíssimo conhecido. O extenso levantamento bibliográfico realizado sobre o tema, em diferentes bancos de dados, não possibilitou a localização de referências sobre reações de halogenação com células inteiras.

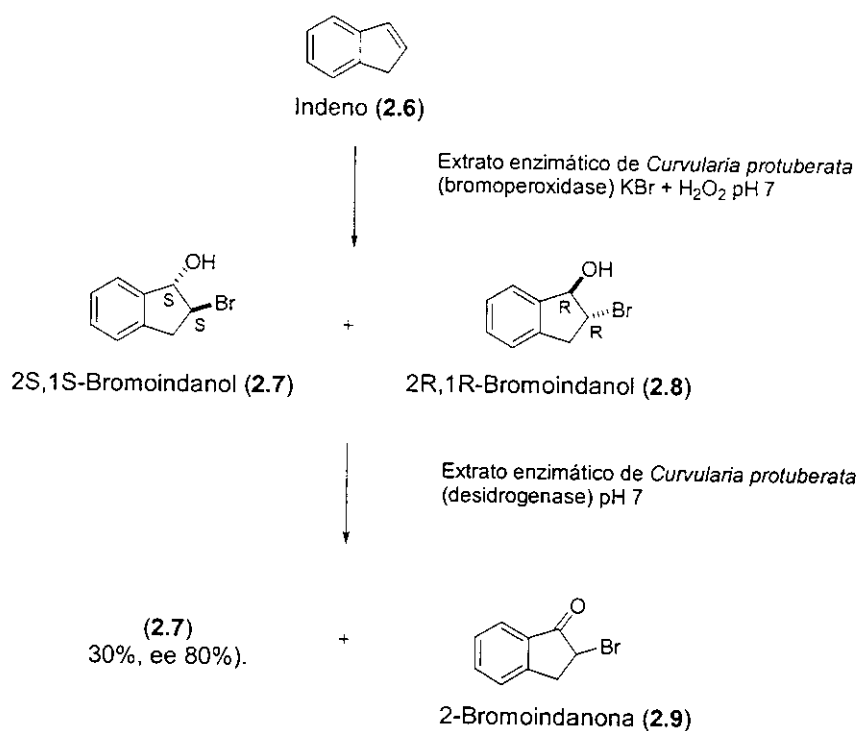


Figura 2.7. Etapas reacionais da síntese do *trans*-1S,2S-bromoindanol pelo extrato enzimático de *C. protuberata* (Ref. 79).

2.2.3. Objetivos

Esta etapa do presente trabalho teve por objetivo investigar a atividade enzimática de haloperoxidasas em diferentes microrganismos de coleções de culturas brasileiras.

2.2.4. Resultados e discussão

A atividade de haloperoxidasas de microrganismos foi investigada de acordo com Zhang e col.,⁷⁹ em condições de pH próximo ao neutro e utilizando o indeno (**2.6**) como substrato. Entretanto, devido à utilização de células inteiras ao invés de extratos enzimáticos, o H₂O₂ (ou equivalente) cuja adição é fundamental às reações com enzimas isoladas não foi acrescentado ao meio reacional dado sua presença natural nos sistemas biológicos.^{78,79}

Teoricamente, a bromação da olefina **2.6** em meio aquoso poderia gerar 8 bromoidrinas diferentes (4 pares diastereoisoméricos, Figura 2.8). No entanto, dado o paralelo entre os mecanismos das reações catalisadas por HPO e aquelas resultantes da adição de HOX a olefinas (Figura 2.9), os isômeros 2-bromo-1-indanol seriam os principais produtos de reação esperados devido à regioquímica do ataque nucleofílico da água ao íon halônio.⁸⁰ Ainda que os isômeros *trans*-2-bromo-1-indanol fossem mais esperados que os correspondentes *cis*, o monitoramento das reações foi inicialmente realizado a partir dos racematos padrão **2.10/2.11** e **2.12/2.13**, sintetizados conforme ilustrado nos Esquemas 2.1 e 2.2. As respectivas configurações relativas foram atribuídas de acordo com as constantes de acoplamento entre os hidrogênios 1 e 2 (³J_{H1,H2}), dadas pelos espectros de RMN de ¹H. Sob as mesmas condições de análise (RMN de ¹H 300,067 MHz, CDCl₃, δ_{TMS} = 0,0 ppm), ³J_{H1,H2} de **2.10-11** = 5,4 e ³J_{H1,H2} de **2.12-13** = 4,6. Sendo a magnitude de ³J proporcional ao ângulo diedro entre as ligações C-H sujeitas a acoplamento, ³J_{H1,H2} *trans* > ³J_{H1,H2} *cis*.⁸¹ Baseado nesta análise, **2.10-11** = isômeros *trans* e **2.12-13** = isômeros *cis*.

A biotransformação de **2.6** (0,5 mg.mL⁻¹) na presença de Br⁻ (KBr, 0,5 mg.mL⁻¹) foi avaliada após 24 h de incubação (28°C, 150 rpm) por meio da interrupção das reações com AcOEt e análise das fases orgânicas por CGAR-EM. Neste primeiro momento, dado a utilização de coluna cromatográfica com fase estacionária aquiral, somente régio e diásterosseletividade foram observadas. Os picos com pelo menos

0,1% da área do pico majoritário foram integrados, permitindo a comparação da abundância relativa dos compostos detectados. A Tabela 2.1 mostra que a conversão de **2.6** em **2.10-11** e **2.12-13** ocorreu como reação minoritária. Adicionalmente, nenhum outro pico cromatográfico apresentou espectro de massas coerente com bromidrininas, afastando a hipótese da formação dos regioisômeros não monitorados por padrão. Ambos *cis*- e *trans*-1,2-indandióis (**2.14**, **2.15**)ⁱⁱ foram os principais produtos formados. Neste caso, estudos anteriores⁸² permitem relacionar os dióis *cis* à conversão de **2.6** por dioxigenases e os dióis *trans*, embora indiretamente, à conversão **2.6** por monoxigenases, dado os produtos de reação destes últimos serem epóxidos lábeis em meio aquoso⁸³ (Figura 2.10). Substâncias como indenol (**2.16**) e 2-hidroxicindanona (**2.17**), as quais foram caracterizados por comparação dos respectivos espectros de massas com os espectros de espectrotecas padrão (HP-Wiley 275, NIST-AMDIS 32; Figuras 2.11 e 2.12), foram relativamente abundantes em alguns casos, merecendo destaque nas reações com *Curvularia* spp.

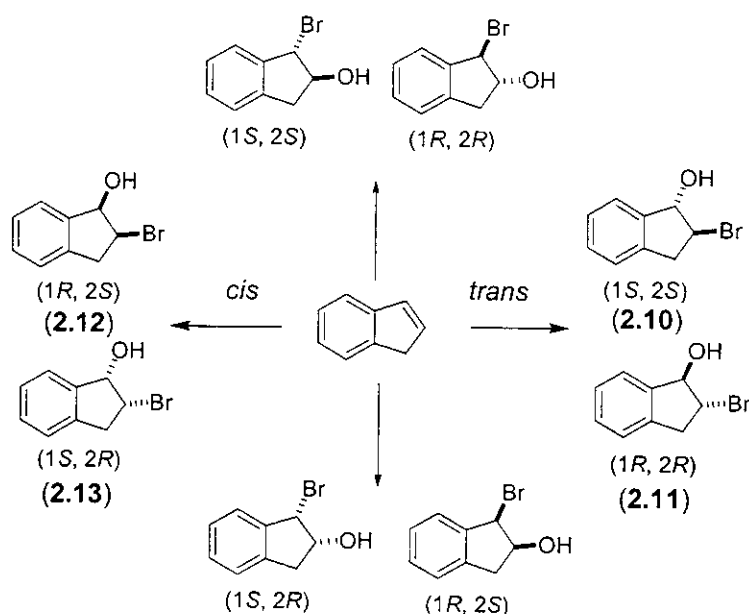


Figura 2.8. Possíveis bromidrininas derivadas do indeno.

ⁱⁱ Os derivados *cis*- e *trans*-1,2-indandióis (**2.14**, **2.15**) padrão foram gentilmente cedidos pelo Dr. Gelson José Andrade da Conceição, pós-doutorando do Depto. Química Orgânica, IQ/UNICAMP, sob supervisão do Prof. José Augusto R. Rodrigues.

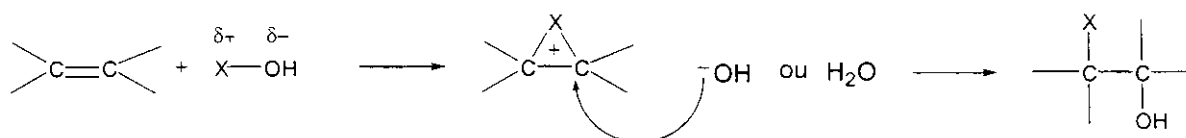
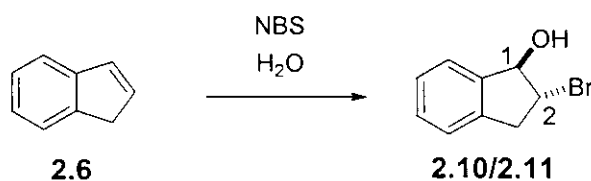


Figura 2.9. Mecanismo de adição de ácido hipohaloso (HOX, X = Cl, Br) a olefina para formação de halodrina. A abertura do intermediário cíclico (íon halônio) decorre do ataque antiperiplanar do nucleófilo, promovendo a formação estereoespecífica de produtos *anti* ou *trans* (Ref. 31).

Esquema 2.1



Esquema 2.2

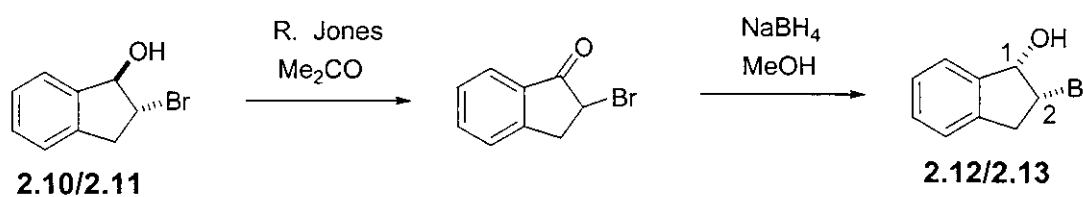

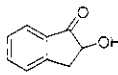
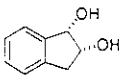
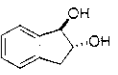
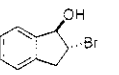
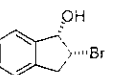


Tabela 2.1. Biotransformação de **2.6** por células em repouso, na presença de Br⁻, após 18 h.

Microrganismos ^a	Substâncias (%) ^b					
						
	2.16	2.17	2.14	2.15	2.10/11	2.12/13
Controle	<1	1	<1	<1	<1	<1
<i>Aspergillus niger</i> CCT 5559	1	<1	<1	5	<1	<1
<i>Aspergillus terreus</i> CCT 3220	<1	<1	1	10	2	2
Actinomiceto LS044	4	<1	<1	8	<1	1
Actinomiceto LS045	3	<1	1	7	1	1
<i>Curvularia eragrostidis</i> CCT 5634	13	9	20	13	2	<1
<i>Curvularia lunata</i> CCT 5628	14	12	6	5	1	<1
<i>Curvularia pallescens</i> CCT 5654	28	2	10	11	1	<1
<i>Curvularia</i> sp. CCT 5629	37	4	15	14	1	<1
<i>Drechslera dematioidea</i> CCT 5631	1	1	7	3	<1	<1
<i>Drechslera halodes</i> CCT 5636	17	11	16	10	2	1
Fungo CCT 5553	1	4	6	6	3	1
<i>Penicillium</i> sp. CBMAI 0208	2	2	10	8	2	1
<i>Penicillium</i> sp. CBMAI 0209	2	5	14	11	1	<1
<i>Fusarium oxysporum</i> CCT 4595	35	1	16	12	<1	<1
<i>Geotrichum candidum</i> CCT 1205	<1	1	<1	6	2	1
<i>Nodulisporium</i> sp. CCT 5552	1	<1	<1	20	2	1
<i>Trichoderma</i> sp. CCT 5551	3	13	8	8	1	<1

^aCélulas produzidas em 72 h, em extrato de malte (2%), a 28°C, sob agitação (150 rpm). Condições de reação: solução tampão Na₂HPO₄ – KH₂PO₄, 0,1 M, pH 6,5 (50 mL/frasco 125 mL), biomassa (~ 500 mg, peso úmido), indeno (0,5 mg.mL⁻¹), KBr (0,5 mg.mL⁻¹); 28°C, agitação (250 rpm). ^bÁrea porcentual relativa do cromatograma de íons totais, considerando a integração de picos com área igual a pelo menos 0,1% da área do pico majoritário. Colunas distribuídas de acordo com a ordem de eluição cromatográfica. Substâncias **2.10-2.13**, Figura 2.8. Substâncias **2.14-2.17**, Figura 2.10. As substâncias **2.16** e **2.17** foram caracterizadas por interpretação e comparação dos espectros com os dados de espectrotecas (HP-Wiley 275, NIST-AMDIS 32). As demais substâncias foram identificados por comparação com substâncias padrão.

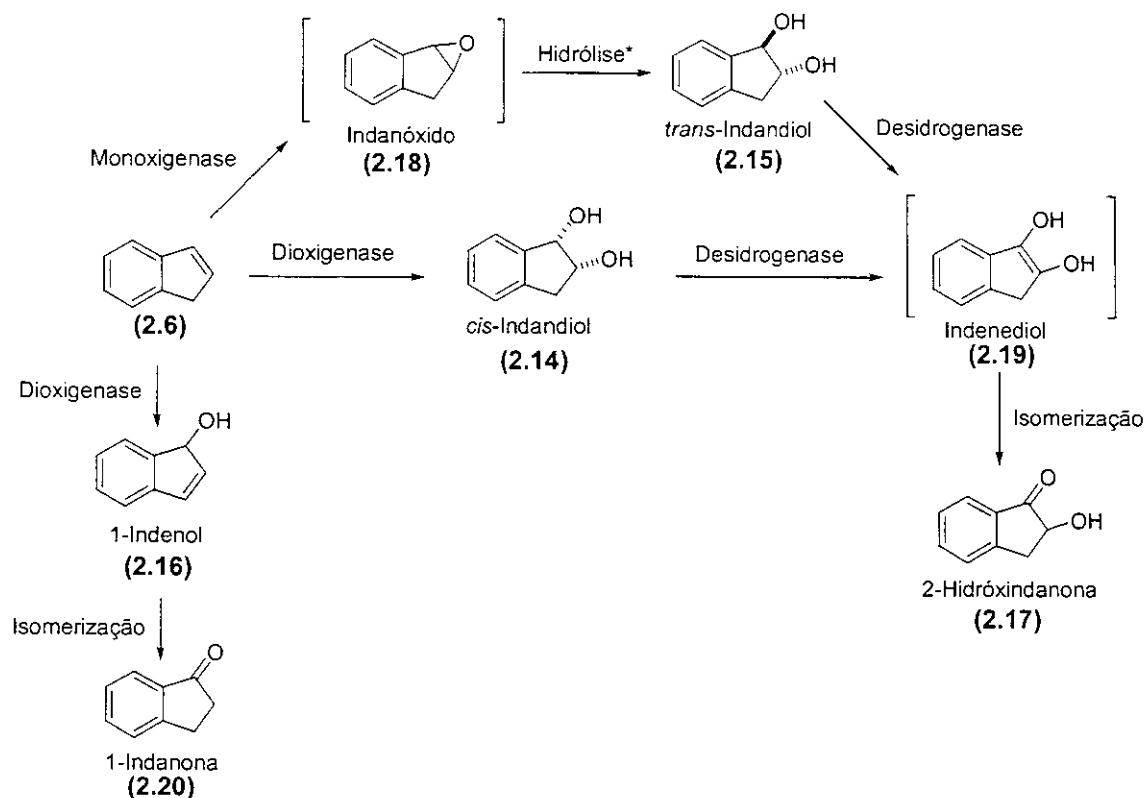


Figura 2.10. Possíveis derivados de biotransformação do indeno. *Em meio aquoso, a hidrólise enzimática de **2.18** concorre a hidrólise espontânea e por isto **2.15** é observado com baixo excesso enantiomérico (Ref. 34).

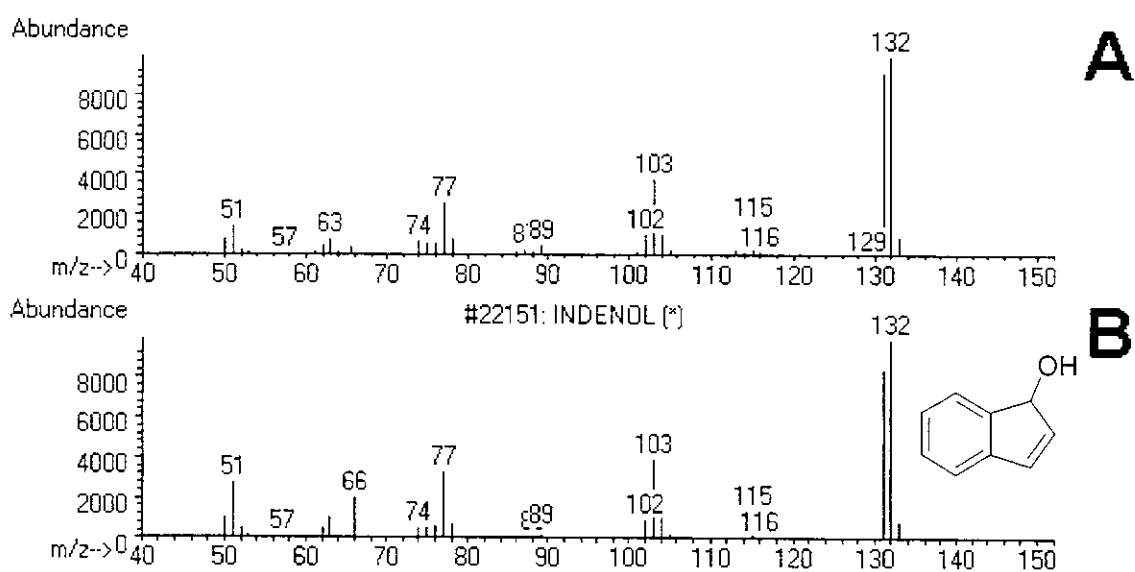


Figura 2.11. Espectros de massas representativos do (A) produto de biotransformação caracterizado como indenol e do (B) indenol localizado por consulta à espectroteca Wiley275.

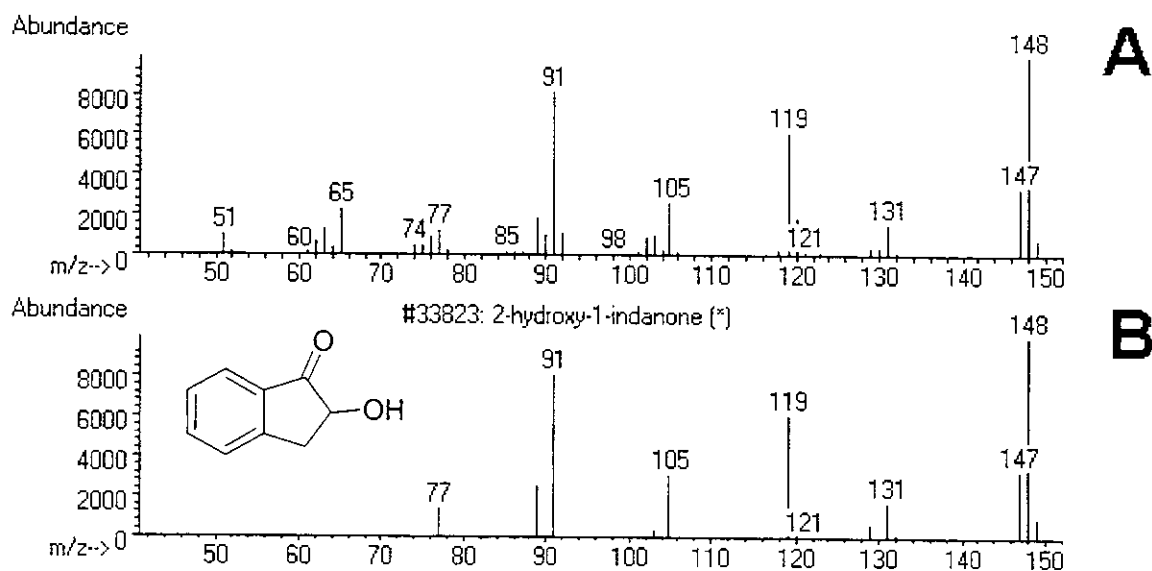


Figura 2.12. Espectros de massas representativos do (A) produto de biotransformação caracterizado como hidroxindanona e da (B) 2-hidroxi-1-indanona localizada por consulta à espectroteca Wiley275.

Sendo uma reação química, as biotransformações dependem, em boa parte, da disponibilidade do substrato no meio reacional e, neste sentido, devido aos resultados obtidos (Tabela 2.1) indicarem baixos valores de conversão, a hidrofobicidade de **2.6** passou a ser considerada como um fator limitante da reação de biotransformação pretendida, ainda que Zhang e col.⁷⁹ não tenham mencionado dificuldades dessa natureza. Na tentativa de ganhar conhecimento do problema, recursos como a adição ao meio reacional de **2.6** em aerossol (fluxo contínuo) ou adsorvido em resina (XAD-7)ⁱⁱⁱ foram utilizados em reações com alguns microrganismos.

2.2.4.1. Reação com 2.6 em aerossol

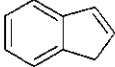
A administração de substratos sob a forma de aerossol é um recurso utilizado para biotransformação de compostos de baixo ponto de ebulição e potencialmente tóxicos.⁸⁴ Dentre os microrganismos previamente avaliados (Tabela 2.1), *C. eragrostidis* CCT 5634 foi submetido a um experimento inicial, dado o conhecimento prévio de HPO em *Curvularia* spp.^{60,78}

O fluxo de aerossol do substrato foi providenciado pelo borbulhamento de ar sintético ($0,2 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$) em um reservatório de **2.6** contendo o *headspace* conectado ao meio reacional. Baseado nos estudos de Barnett e col.,⁸⁵ os quais por quantificação de ácido ribonucleico mensageiro (ARNm) demonstraram que a expressão de Cl-HPO por *Curvularia inaequalis* é mais significativa em “culturas maduras” (7 - 9 dias de incubação), a adição contínua do aerossol de **2.6** à cultura de *C. eragrostidis* CCT 5634 foi iniciada ao 8º dia de incubação do microrganismo em crescimento. Periodicamente, alíquotas (500 μL) do meio reacional foram retiradas e analisadas (CGAR-EM). Contrastando os resultados anteriores de reações de 18 h (Tabela 2.1), nenhum derivado de **2.6** foi detectado. Em geral, a velocidade das reações enzimáticas é dependente da concentração do substrato.⁸⁶

ⁱⁱⁱ A adsorção de **2.6** em resina foi realizada pelo Dr. Gelson J. Andrade da Conceição, o qual desenvolve pesquisa, utilizando resinas, em biocatálise extrativa.

As estimativas de concentração realizadas (Tabela 2.2.), utilizando padronização interna (acetofenona 50 ppm, considerando fator de resposta = 1), mostraram que a concentração de **2.6** no meio reacional permaneceu próxima de $0,02 \text{ mg.mL}^{-1}$, ou seja, 10 vezes abaixo dos valores de concentração de substrato geralmente utilizados em biocatálise ($0,2 - 0,5 \text{ mg.mL}^{-1}$).^{87,88} Esforços não foram direcionados à otimização do experimento nem à repetição do mesmo com outros microrganismos.

Tabela 2.2. Adição contínua de indeno (**2.6**) em aerossol ao meio reacional.

	t (h) ^b	 (mg.mL^{-1}) ^c
<i>C. eragrostidis</i> (5634) ^a	6	0,008
	24	0,020
Controle	24	0,015

^aInóculo incubado em extrato de malte (2%), a 28°C , sob agitação (150 rpm), por 7 dias. Condições de reação: células em crescimento (50 mL/frasco 125 mL), **2.6** em aerossol arrastado com ar sintético ($0,2 \text{ L.min}^{-1}$), KBr ($0,5 \text{ mg.mL}^{-1}$); agitação magnética, 24 h. ^bTempo (horas) após início da adição contínua de **2.6**. ^cEstimada por padronização interna com acetofenona (50 ppm), considerando fator de resposta = 1.

2.2.4.2. Reação com **2.6** adsorvido em resina

As reações foram realizadas com células em crescimento, a partir da adição de **2.6** (100 mg) adsorvido em resina (XAD-7) na proporção de 1:10 (p/p) aos frascos de cultura, ao 8^o dia de incubação. Periodicamente, amostras ($500 \mu\text{L}$) do meio reacional foram analisadas (CGAR-EM), utilizando padronização interna

(acetofenona 20 ppm, considerando fator de resposta = 1) para quantificação dos compostos detectados.

Contrastando os resultados anteriores (Tabela 2.1), nenhum derivado de **2.6** foi detectado durante o período avaliado (12 dias). A utilização de padrão interno mostrou que a concentração de **2.6** livre (não adsorvido) nos meios reacionais foi baixa, relativamente aos valores de referência já mencionados (0,2 – 0,5 mg.mL⁻¹). Às 24 h de incubação, a concentração de **2.6** livre foi próxima a 0,04 mg.mL⁻¹ (Figura 2.13) e, no decorrer do tempo, possivelmente por perdas para a atmosfera e/ou por solubilização em membranas celulares, a tendência da concentração de **2.6** livre foi decrescente, chegando próximo aos limites de detecção ao final do 12^o dia de incubação (Figura 2.13). Ao final deste período, as resinas foram separadas dos meios reacionais e de cada uma das partes foi obtido um extrato em AcOEt para realização de análises (CGAR-EM). Nos extratos em AcOEt dos meios reacionais, derivados oxigenados de **2.6** foram detectados mas nem sequer correspondendo a conversões de 0,5% do material de partida (Tabela 2.3). Nos extratos em AcOEt das resinas, somente **2.6** foi detectado.

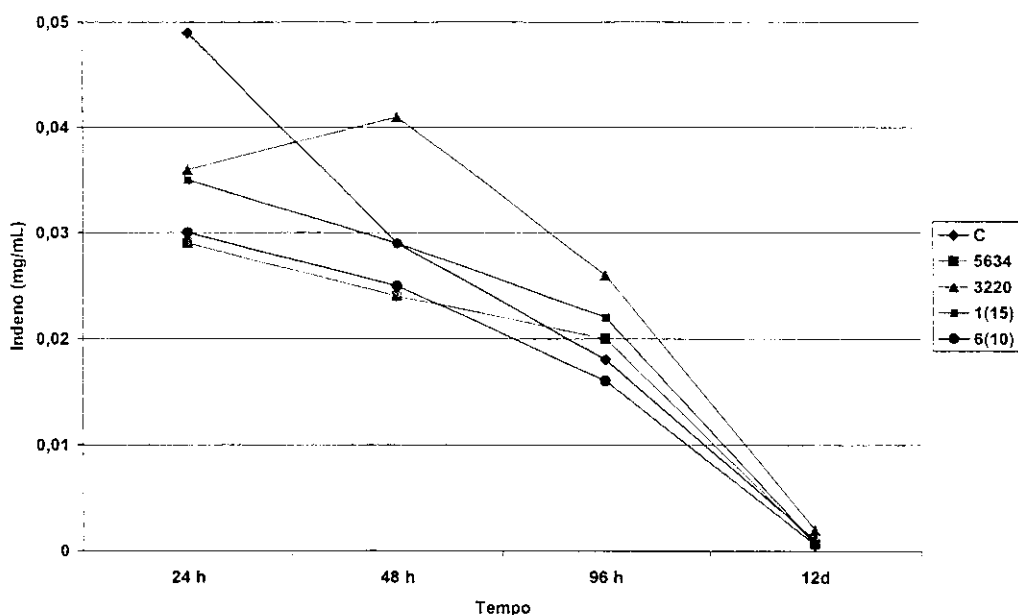








Figura 2.13. Concentração de indeno (**2.6**) livre no meio reacional após adição de **2.6** adsorvido em resina. Legenda: C: Controle (meio reacional sem inóculo), 5634: *Curvularia eragrostidis* CCT 5634, 3220: *Aspergillus terreus* CCT 3220, 1(15): Archea 1-15, 6(10): Archea 6-10.

Tabela 2.3. Produtos de biotransformação de indeno (**2.6**) adsorvido em resina (XAD-7).

Microrganismos ^a	Conversão (%) ^b					
						
	2.16	2.17	2.14	2.15	2.10/11	2.12/13
Controle ^c	-	-	-	-	-	-
<i>Curvularia eragrostidis</i> CCT 5634	0,03	<0,01	0,03	0,06	nd	nd
<i>Aspergillus terreus</i> CCT 3320	nd	nd	0,02	<0,01	nd	nd
Archea 1-15 ^c	-	-	-	-	-	-
Archea 6-10	nd	0,16	0,08	0,08	nd	nd

^aInóculos incubados em extrato de malte (2%, fungos) ou meio hipertônico (archeas), a 28°C, sob agitação (150 rpm), por 7 dias. Condições de reação: células em crescimento (100 mL/frasco 250 mL), **2.6** adsorvido em resina XAD-7 (100 mg, 1:10, p/p), KBr (0,5 mg.mL⁻¹); agitação (150 rpm), 7 dias. ^bRelativa à massa total de **2.6** adicionada ao meio (100 mg) e estimada por padronização interna com acetofenona (20 ppm), considerando fator de resposta = 1. nd: não detectado. ^cAmostras acidentalmente perdidas.

2.2.5. Conclusão parcial 2

A prospecção de HPO em diferentes microrganismos utilizando a biotransformação do indeno como referencial não foi bem sucedida, dado a não detecção de biocatalisadores para reações de halogenação. Os experimentos realizados sugerem que a hidrofobicidade e o baixo ponto de ebulição do indeno (181,6°C) atuem como fatores significativamente limitantes de sua utilização como substrato-sonda para detecção de atividade enzimática de células inteiras. Tendo isto em vista, a recondução da investigação com outros possíveis substratos merece ser considerada. Ainda assim, o presente trabalho apresentou uma proposta inédita no modo de investigação por biocatalisadores para reações de halogenação, no sentido de que todos os relatos atualmente disponíveis na literatura sobre as reações com HPO são referentes a experimentos realizados com enzimas isoladas ou extratos enzimáticos.

2.3. Baeyer-Villiger monoxigenases

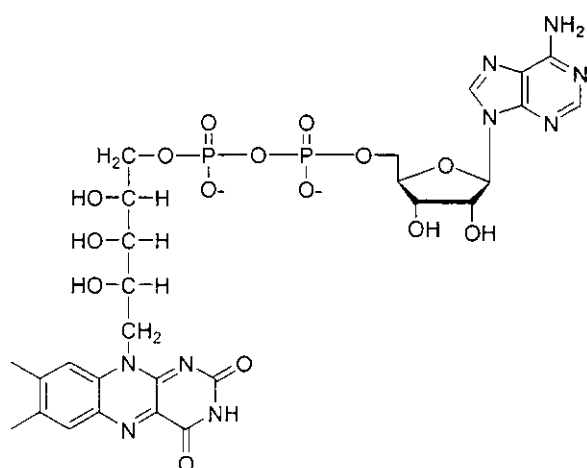
A oxidação de cetonas a ésteres ou lactonas por meio de perácidos há muito é conhecida como reação de Baeyer-Villiger e os ácidos meta-cloroperbenzóico, peroxitrifluoroacético, peroxibenzóico, peroxiacético e o peróxido de hidrogênio são os oxidantes mais utilizados para este tipo de transformação.

⁸⁹ Entretanto, tais oxidantes não são estereosseletivos e portanto não atendem à química fina no sentido da demanda por reações dissimétricas. Adicionalmente, o caráter explosivo dos perácidos é altamente indesejável às reações em larga escala e a utilização de reagentes halogenados tem sido cada vez mais criticada devido à poluição ambiental.

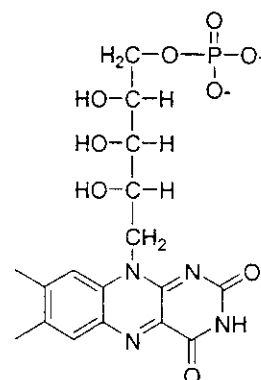
No campo das alternativas, o desenvolvimento de complexos metálicos quirais como catalisadores de reações de Baeyer-Villiger dissimétricas é visto com grande otimismo.^{90,91,92} Entretanto, no presente, as oxidações de Baeyer-Villiger catalisadas por enzimas constituem possibilidades bem mais interessantes (ees até > 98%), ainda que a eficiência das reações seja significativamente sensível à estrutura dos substratos.^{93,94}

As enzimas comumente denominadas “Baeyer-Villigerases”^{95,96} são monoxigenases dependentes de grupos prostéticos^{iv} como FAD (flavina adenina dinucleotídeo) ou FMN (flavina mononucleotídeo) e de coenzimas como NADPH (nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato) ou NADH (nicotinamida adenina dinucleotídeo, Figura 2.14). Estes últimos são quimicamente modificados ao participar das reações e precisam ser regenerados para dar continuidade ao ciclo catalítico. Embora isto seja perfeitamente possível de ser realizado *in vitro*^{97,98} a fim de atender as reações com enzimas isoladas, as coenzimas são reagentes de alto valor agregado e, por isto, as reações de biotransformação do tipo Baeyer-Villiger são frequentemente realizadas com células inteiras (em crescimento ou repouso).

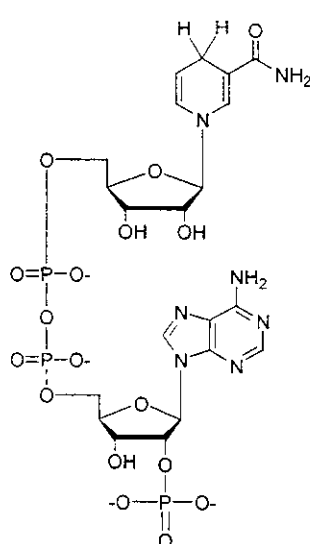
^{iv} definição: ver rodapé p. 34



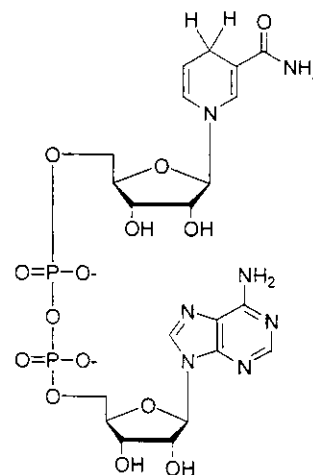
Flavina adenina dinucleotídeo (FAD),
forma oxidada



Flavina mononucleotídeo (FMN),
forma oxidada



Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH),
forma reduzida



Nicotinamida adenina dinucleotídeo (NADH),
forma reduzida

Figura 2.14. Grupos prostéticos (FAD; FMN) e coenzimas (NADPH; NADH) de BVMOs.

Os dados bioquímicos até então disponíveis possibilitaram a divisão das Baeyer-Villiger monoxigenases (BVMOs) em dois tipos enzimáticos predominantes:⁹⁹ BVMO tipo I, as quais contêm FAD como cofator, dependem de NADPH como fonte de elétrons e aparecem como monômeros, homodímeros ou homotetrâmeros e BVMO tipo II, que contêm FMN como cofator, utilizam NADH

como doador de elétrons e são constituídas de duas subunidades diferentes. Todas as BVMOs seqüenciadas até o presente constituem exemplos de enzimas do tipo I, as quais devido ao perfil de seletividade ao substrato foram classificadas como ciclohexanona monoxigenases (CHMO), ciclopentanona monoxigenase (CPMO), ciclododecanona monoxigenase, esteróide monoxigenase e 4-hidróxiacetofenona monoxigenase (HAPMO: Figura 2.15).¹⁰⁰ Havendo em toda regra uma exceção, há BVMOs cujas características bioquímicas não condizem com a classificação do tipo I ou tipo II. A CHMO de *Xanthobacter* sp. constitui um dos poucos exemplos destas enzimas, dado a dependência de FMN e NADPH.¹⁰³

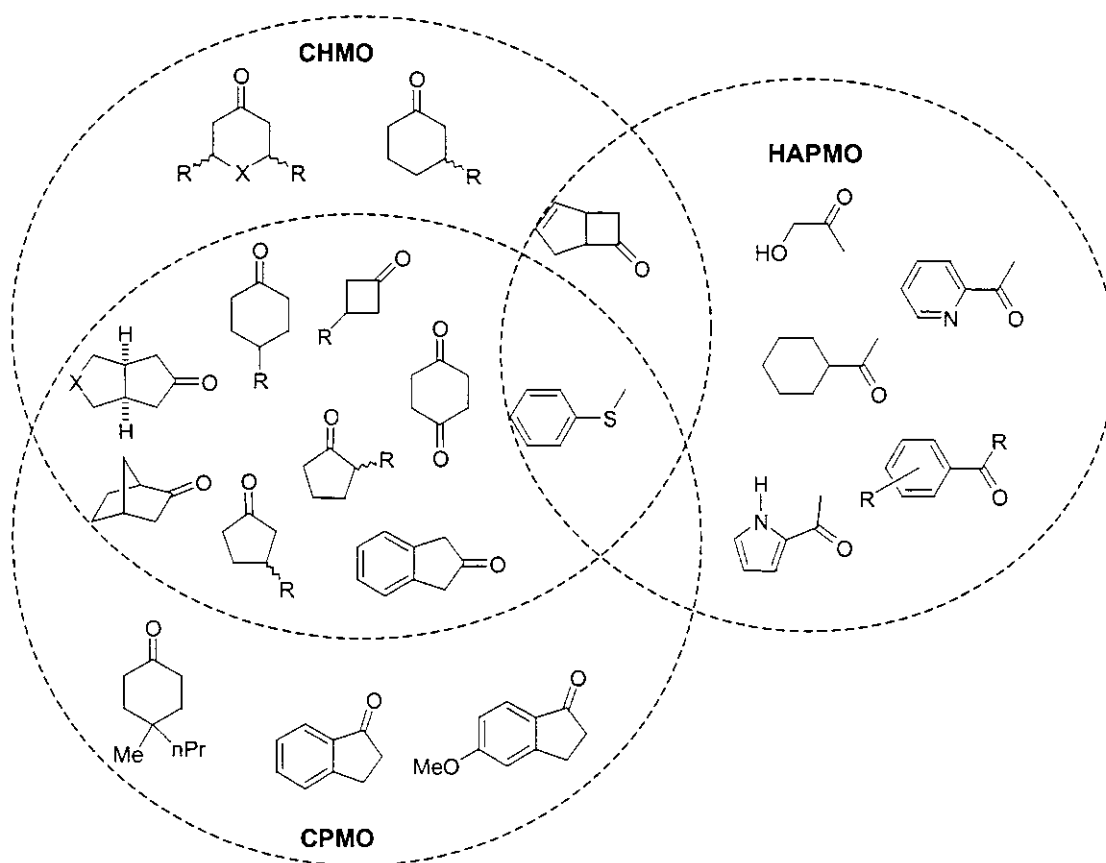


Figura 2.15. Seletividade relativa ao substrato característica de ciclohexanona monoxigenases (CHMO), ciclopentanona monoxigenase (CPMO) e 4-hidróxiacetofenona monoxigenases (HAPMO) (Ref. 103)

2.3.1. Mecanismo de reação

Em termos mecanísticos, as reações de Baeyer-Villiger nos sistemas abióticos procedem *via* adição nucleofílica de um hidroperóxido a uma cetona para formação de um hidroxiperóxido. Este último sofre um rearranjo, denominado rearranjo de Criegee (Figura 2.16), e gera um éster ou lactona, dependendo da cetona original. A estereoquímica do grupo migrante que participa do rearranjo de Criegee é constantemente mantida no produto final.^{93,94} Sendo isto aplicado aos sistemas biológicos, a enantiosseletividade demonstrada pelas BVMOs pode ser racionalizada a partir da formação de peróxidos com configurações distintas¹⁰⁰ (Figura 2.17) cuja formação depende da seletividade diasterofacial da forma oxidada do grupo prostético da enzima pelo substrato (Figura 2.18). Portanto, é a face do grupo prostético (flavina) disponível à adição do O₂ o que a princípio determina a enantiosseletividade destas enzimas.

Embora o mecanismo de reação apresentado seja amplamente aceito, a falta de dados cristalográficos dos sítios ativos das BVMOs mantém o modelo aberto a possíveis modificações. Independentemente deste fato, as investigações por BVMOs úteis em síntese orgânica seguem como um tema de destaque no cenário atual, justificando o fato de que a construção de um banco de dados sobre atividade enzimática de BVMOs de microrganismos brasileiros corresponde a um investimento em recursos biotecnológicos do país.

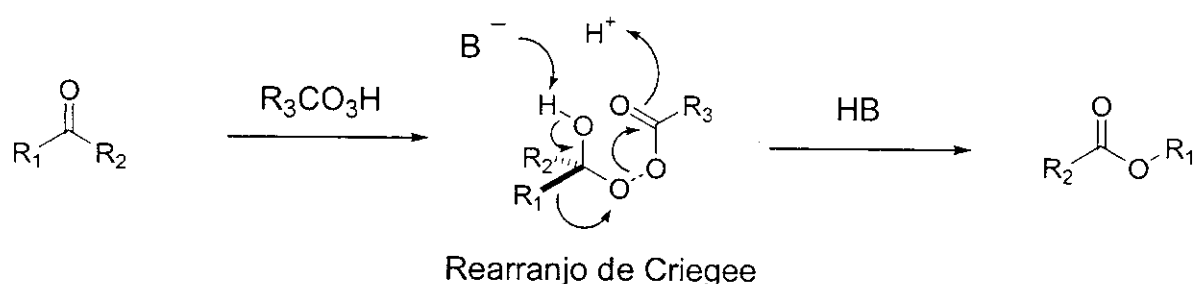


Figura 2.16. Mecanismo da reação de Baeyer-Villiger (Ref. 93).

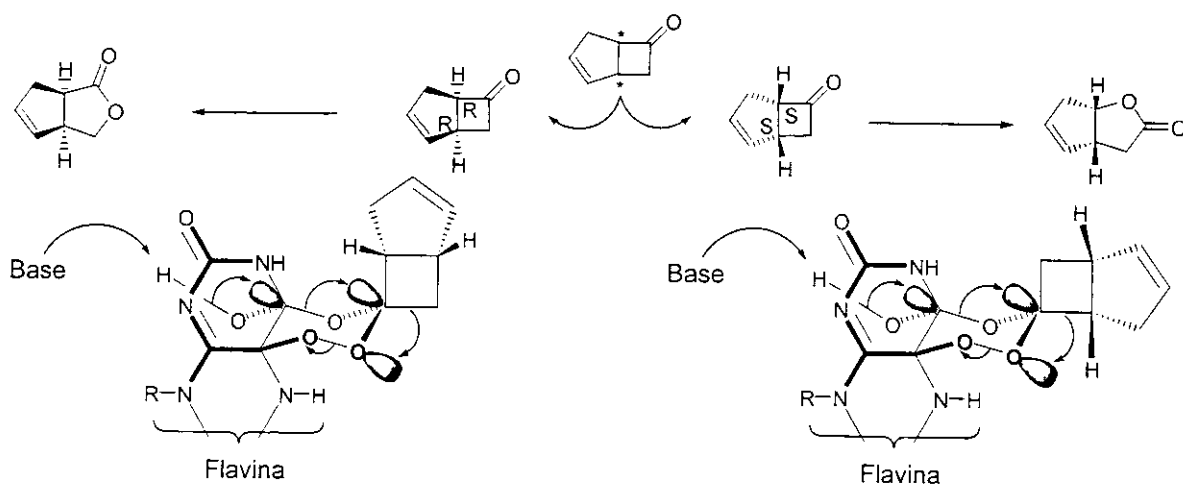


Figura 2.17. Representação esquemática dos intermediários enantioméricos das reações de Baeyer-Villiger (Ref. 100).

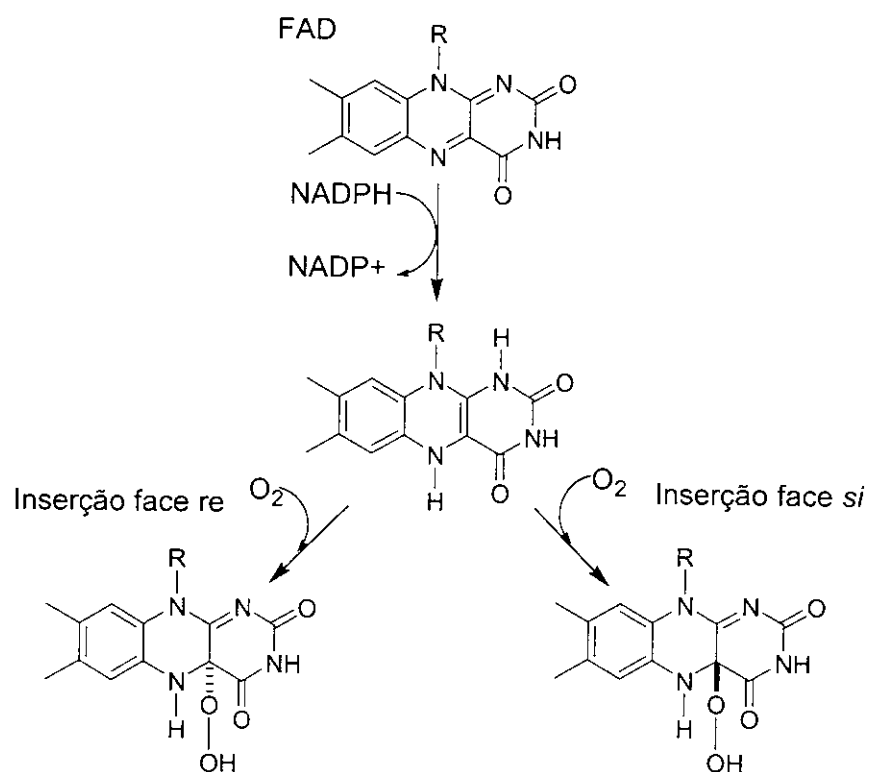


Figura 2.18. Representação esquemática da oxidação das faces *re* e *si* da flavina por O₂. R = ribosil adenosina difosfato (modificado da Ref. 100)

2.3.2. Objetivos

Esta etapa do presente trabalho teve como objetivo a investigação por BVMOs em diferentes microrganismos de coleções de culturas brasileiras.

2.3.3. Resultados e discussão

2.3.3.1. Reações com cicloexanonas

Os derivados de cicloexanonas são amplamente utilizados para estudo de reações de Baeyer-Villiger enzimática.⁹⁶ Por isto, no presente, as cetonas 2-metil-ciclohexanona (**2.20**) e 4-metil-ciclohexanona (**2.21**) foram utilizadas como substratos para sondagem de BVMOs. De acordo com o mecanismo da reação de Baeyer-Villiger, a inserção do oxigênio na posição α -carbonílica do substrato ocorre regioselectivamente, junto ao substituinte α -carbonílico (ou grupo migrante) que melhor estabilizar a formação de um carbocátion. Portanto, os racematos **2.22/2.23** (Figura 2.19) e **2.24/2.25** (Figura 2.20) foram sintetizados (Esquema 2.3) visando a obtenção de lactonas padrão para monitoramento cromatográfico (CGAR-FID) das reações de biotransformação. Os racematos correspondentes aos produtos de redução **2.26-2.29** e **2.30/2.31** (Figuras 2.19 e 2.20) também foram sintetizados (Esquema 2.4) e utilizados como substâncias padrão.

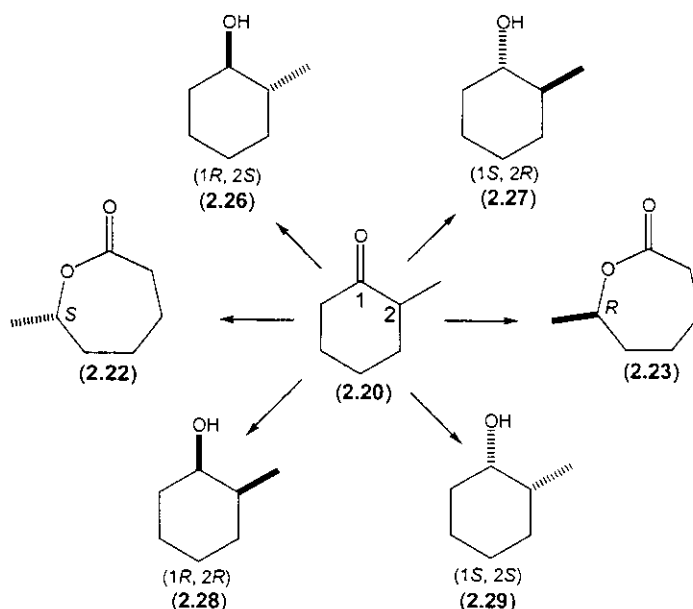


Figura 2.19. Possíveis produtos de oxidação ou redução de **2.20**

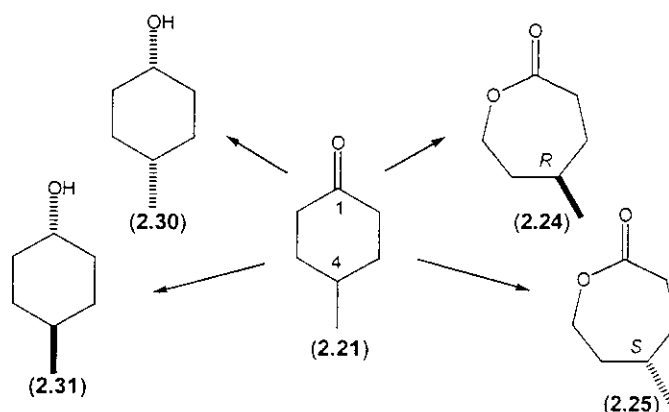
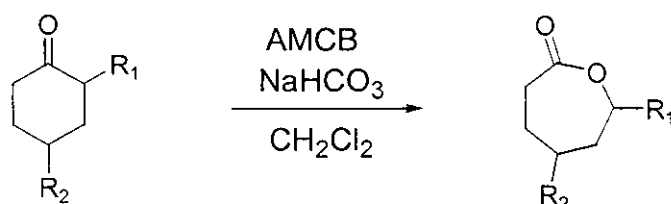


Figura 2.20. Possíveis produtos de oxidação ou redução de 2.21

Contrastando com a metodologia das reações de biotransformação tradicionais, onde um único substrato é submetido a um único microrganismo, as reações de biotransformação de 2.20 e 2.21 foram realizadas concomitantemente em um único pote, mantendo a regra de um único microrganismo. Relativamente ao método tradicional, as principais vantagens deste tipo de abordagem, em se tratando de triagens investigativas, são a economia de material (e.g., meio de cultura e células), de espaço (e.g., redução do número de frascos submetidos a incubação) e tempo (e.g., de montagem de experimento a análise de resultados), além da possibilidade de análises cinéticas verdadeiramente relativas.

A avaliação das conversões de 2.20-21 em produtos foi baseada em padronização interna (acetofenona 50 ppm). As configurações absolutas de 2.22/2.23 foram atribuídas de acordo com Fellous e col.,¹⁰¹ os quais demonstraram que os antípodos (S) de uma série de caprolactonas 7-alkil-substituídas (alkil = metil - octil) eluem primeiro que os complementares (R), em coluna cromatográfica de fase estacionária octakis-(2,6-di-O-pentil-3-O-butiril)- γ -ciclodextrina. As configurações absolutas de 2.24/2.25 foram atribuídas segundo a ordem de eluição cromatográfica determinada por Porto,¹⁰² o qual empregando a mesma coluna cromatográfica utilizada no presente trabalho [fase estacionária heptakis-(2,3-dimetil-6-pentil)- β -ciclodextrina], demonstrou que o antípoda (S) elui primeiro que o

correspondente (*R*). A estereoquímica absoluta dos produtos de redução não foi determinada (Figura 2.21). Os excessos enantioméricos (*ee*, %), determinados conforme a Equação 2.3.



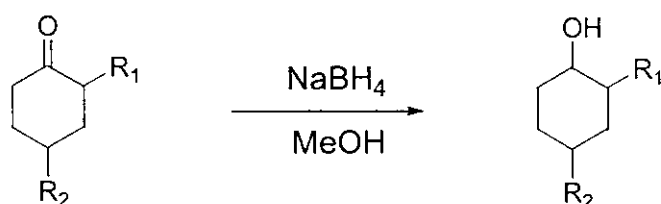
Esquema 2.3

2.20. $R_1 = \text{CH}_3, R_2 = \text{H}$

2.21. $R_1 = \text{H}, R_2 = \text{CH}_3$

2.22/2.23. $R_1 = \text{CH}_3, R_2 = \text{H}$

2.24/2.25. $R_1 = \text{H}, R_2 = \text{CH}_3$



Esquema 2.4

2.20. $R_1 = \text{CH}_3, R_2 = \text{H}$

2.21. $R_1 = \text{H}, R_2 = \text{CH}_3$

2.26-2.29. $R_1 = \text{CH}_3, R_2 = \text{H}$

2.30/2.31. $R_1 = \text{H}, R_2 = \text{CH}_3$

Equação 2.3

$$ee = \frac{\text{área (+)} - \text{área (-)}}{\text{área (+)} + \text{área (-)}} \times 100$$

onde *área* (+) corresponde à *área* cromatográfica do isômero dextrógero e *área* (-) à *área* cromatográfica do isômero levógero.

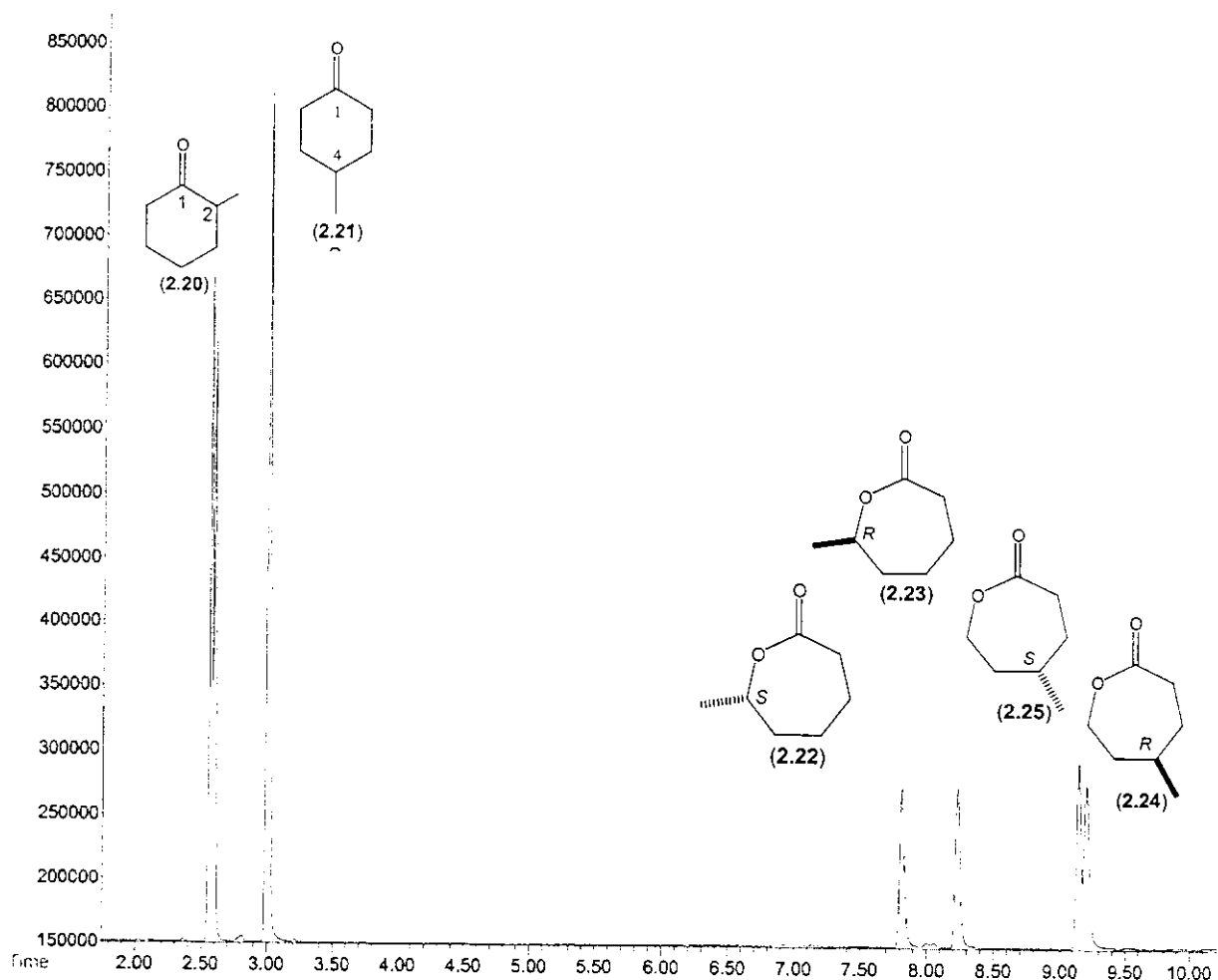






Figura 2.21. Cromatograma (CGAR-FID) característico da eluição das substâncias padrão 2.20, 2.21, 2.22-23 e 2.24-25 em coluna Hamburg heptakis-(2,3-dimetil-6-pentil)- β -ciclodextrina (25 m \times 0,25 mm; 0,25 μ m), aquecida de 80°C a 180°C, a 5°C.min⁻¹. Demais condições, ver Experimental.

Dentre os microrganismos testados, (*A. tumefaciens* CCT 6515, Archea 1-15, Archea 2-15, Archea 6-10, *C. eragrostidis* CCT 5634, *Emericella nidulans* CCT 3119, *G. candidum* CCT 1205, *Penicillium funiculosum* CCT 0490, *Pichia kluyveri* CCT 3365, *Pichia canadensis* CCT 2636, *Pseudomonas aeruginosa* CCT 1987, *Pseudomonas aeruginosa* CCT 2738, *Rhodotorula glutinis* CCT 2182, *Rhodotorula*

minuta CCT 1751, *Trichoderma* sp. CCT 5551 e *Trichosporon cutaneum* CCT 1903) apenas o fungo *G. candidum* CCT 1205 oxidou ambos **2.20** e **2.21** em lactonas, com conversões da ordem de 60% e 90%, respectivamente, ao final de 46 h de incubação (Tabela 2.4). As leveduras *R. glutinis* CCT 2182 e *R. minuta* CCT 1751 iniciaram a oxidação **2.20** mas não a evoluíram além de 10% do material de partida.

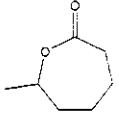
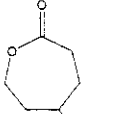
Tabela 2.4. Biotransformação de 2-metil-ciclohexanona (**2.20**) e 4-metil-ciclohexanona (**2.21**) por células em crescimento.

Microrganismo	t (h) ^a	c (%) ^b			
					
		2.22/23	2.26/29	2.24/25	2.30/31
<i>A. tumefaciens</i> CCT 6515	168	-	11	-	7
Archea 1-15	168	-	-	-	16
Archea 2-15	168	-	-	-	-
Archea 6-10	168	-	-	-	-
<i>C. eragrostidis</i> CCT 5634	168	-	45	-	59
<i>E. nidulans</i> CCT 3119	168	-	73	-	83
<i>G. candidum</i> CCT 1205	5	-	7	-	4
	22	12	12	5	8
	46	60	-	>90	-
<i>P. funiculosum</i> CCT 0490	168	-	60	-	>99
<i>P. kluyeri</i> CCT 3365	168	-	22	-	29
<i>P. stipitis</i> CCT 2617	168	-	59	-	95
<i>P. aeruginosa</i> CCT 1987	46	-	6	-	2
<i>P. aeruginosa</i> CCT 2738	168	-	4	-	9
<i>R. glutinis</i> CCT 2182	168	3	43	-	98
<i>R. minuta</i> CCT 1751	168	10	46	-	95
<i>Trichoderma</i> sp. CCT 5551	168	-	72	-	>99
<i>T. cutaneum</i> CCT 1903	168	-	45	-	43

^aTempo (horas) após adição de **2.20** e **2.21**. ^bConversão avaliada por CGAR-FID com base em padrão interno (acetofenona, fator de correção = 2) e relativa ao material de partida racêmico. -: não detectado.

A enantiosseletividade enzimática dos 3 microrganismos que manifestaram atividade de BVMO foi distinta (Tabela 2.5), sendo o antípoda **2.23** (*R*) preferencialmente fornecido por *G. candidum* CCT 1205 e o correspondente **2.22** (*S*), por *R. glutinis* CCT 2182 e *R. minuta* CCT 1751. Portanto, ainda que estes últimos tenham desempenhado reações de redução como o principal processo de biotransformação (Tabela 2.4), o potencial para reações de Baeyer-Villiger merece consideração devido ao indício de complementariedade enzimática.

Tabela 2.5. Oxidação de 2-metil-cicloexanona (**2.20**) e 4-metil-cicloexanona (**2.21**) por células em crescimento.

Microrganismo	t (h) ^a						
		c (%) ^b	ee (%) ^c	conf. ^d	c (%) ^b	ee (%) ^c	conf. ^e
<i>G. candidum</i>	22	12	40	<i>R</i>	5	>99	<i>R</i>
CCT 1205	46	60	19	<i>R</i>	>90	94	<i>R</i>
<i>R. glutinis</i>	22	3	>99	<i>S</i>	0		
CCT 2182	168	3	>99	<i>S</i>	0		
<i>R. minuta</i>	22	0			0		
CCT 1751	168	10	>99	<i>S</i>	0		

^aTempo (horas) após adição de **2.20** e **2.21**. ^bConversão estimada por CGAR-FID com base em padrão interno (acetofenona, fator de correção = 2) e relativa ao material de partida racêmico.

^cExcesso enantiomérico (ee) = Equação 2.3. Configurações absolutas atribuídas de acordo com

^dFellous *et al.*¹¹⁰ e ^ePorto.¹¹¹

Os excessos enantioméricos (ee, %) mostraram que *G. candidum* CCT 1205 foi significativamente menos enantiosseletivo na oxidação **2.20** do que na oxidação de **2.21** (Tabela 2.5), sendo este resultado compatível com a seletividade de outras CHMO descritas na literatura.¹⁰³

2.3.3.2. Reações com outros substratos

A aplicação de BVMOs à preparação de intermediários úteis em síntese orgânica além dos derivados de ciclohexanona, bicicloheptanona, cânfora e alguns outros tem sido pouco demonstrada,⁹⁸ sendo este fato amplamente reconhecido como um dos principais desafios desta linha de pesquisa. Neste contexto, a atividade de BVMO de microrganismos aptos à conversão de **2.36** em **2.37** (Figura 2.22)¹⁰⁴ foi avaliada frente a biotransformação das cetonas **2.32-2.35** (Figura 2.23). As reações foram monitoradas por CGAR-EM, utilizando lactonas e álcoois padrão correspondentes (Figura 2.24).

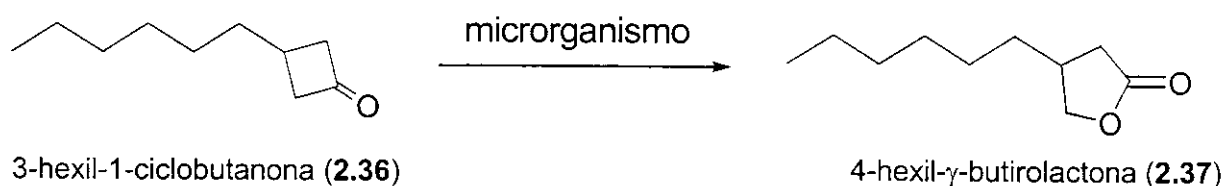


Figura 2.22. Reação de Baeyer-Villiger catalisada por *A. niger* CCT 5559, *Curvularia* sp. CCT 5629, *C. pallescens* CCT 5654 e *Trichoderma* sp. CCT 5551.

Em todas as reações realizadas, os produtos de oxidação desejados não foram detectados pelo método de análise utilizado. As cetonas **2.32** e **2.34** foram diastereosseletivamente reduzidas, **2.33** não foi biotransformado durante o período de reação observado (48 h) e a substância **2.35**, após longo período de reação (15 dias), foi convertida a um derivado hidroxilado somente por *Curvularia* sp. CCT 5629, dentre os demais microrganismos testados.

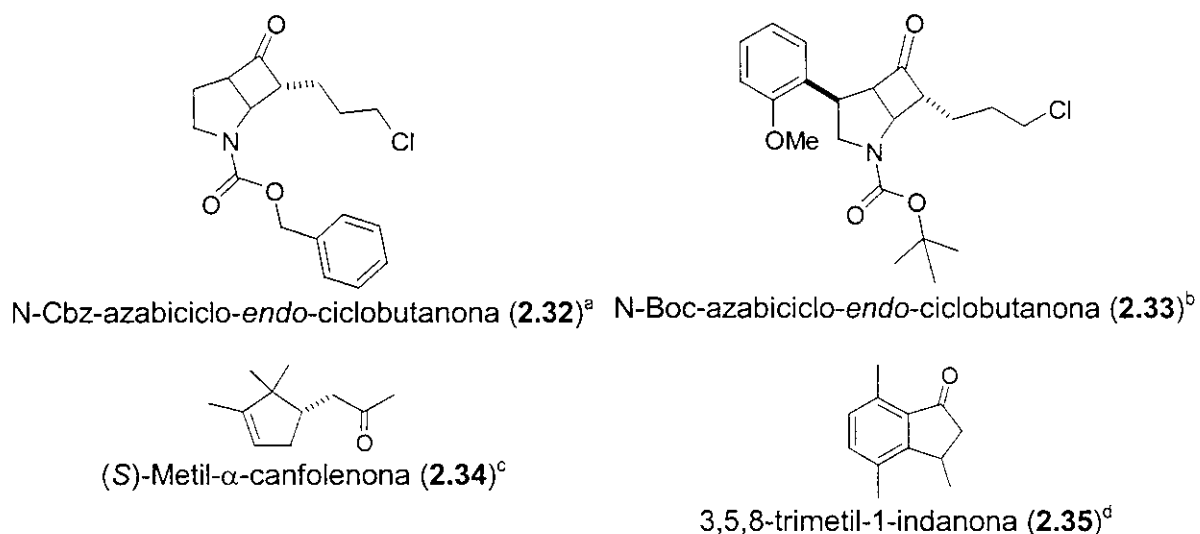


Figura 2.23. Substâncias não-tradicionalmente utilizados como sondas para detecção de Baeyer-Villiger monoxigenases. Materiais gentilmente cedidos e preparados no Depto. Química Orgânica, IQ/UNICAMP, pelos doutorandos ^aMarcelo Valle e ^bAntônio Batista (Prof. Carlos Roque Correia), ^cNelson Henriques (Profa. Lúcia Baptistella) e pela graduanda ^dValdirene S. Teixeira (Prof. Cláudio Herrera Braga).

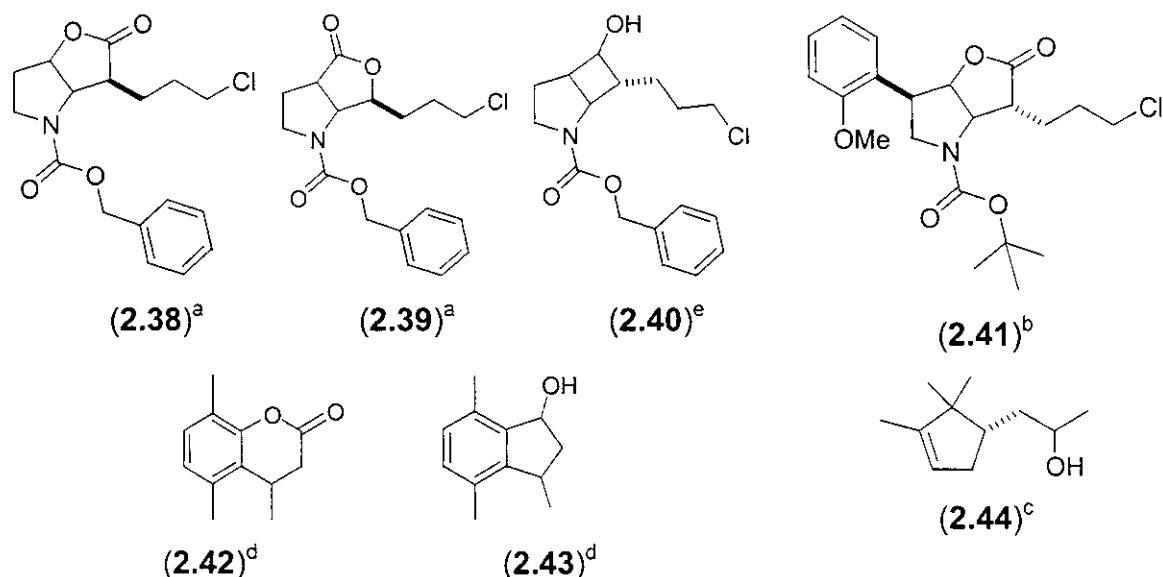


Figura 2.24. Substâncias padrão utilizadas para monitoramento das reações de biotransformação de **2.32-35**. ^{a-d}Materiais preparados no Depto. Química Orgânica, IQ/UNICAMP, conforme determinado acima (Figura 2.23), ^eà exceção do padrão **2.40**, o qual foi preparado pela presente autora a partir da redução de **2.32** com NaBH₄.

2.3.4. Conclusão parcial 3

A avaliação da atividade enzimática de microrganismos frente a mais de um substrato, simultaneamente, foi introduzida no presente trabalho como uma proposta de otimização dos procedimentos tradicionais de triagem para biocatalisadores.

Diferentes cetonas foram utilizadas para sondagem da atividade de BVMO em diferentes microrganismos. Entretanto, somente na presença de metil-cicloexanonas 3 microrganismos detentores de BVMO foram detectados: *G. candidum* CCT 1205, *R. glutinis* CCT 2182 e *R. minuta* CCT 1751, embora apenas 1 deles (*G. candidum* CCT 1205) tenha manifestado atividade expressiva nas condições experimentais utilizadas.

Capítulo 3

Triagem de alto desempenho

No decorrer do presente trabalho foi ponderado que o tempo empenhado na realização de triagens biocatalíticas deveria ser otimizado. Como é sabido (capítulo 2: Biocatalisadores), a seleção de um biocatalisador de origem microbiana depende de um trabalho sistemático de exposição do maior número possível de microrganismos a substratos funcionalizados e posterior avaliação das modificações estruturais realizadas. Qualquer ensaio utilizado para tal fim é baseado em algum método capaz de medir a conversão do substrato em produtos. Neste sentido, recursos como a cromatografia gasosa de alta resolução (CGAR) e a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) são amplamente utilizados como ferramentas analíticas, porém os mesmos não são viáveis, em termos de custos, à aplicação para triagens de grande porte envolvendo centenas de amostras diárias. Tendo isto em vista, Reymond e col. desenvolveram ensaios fluorogênicos passíveis de aumentar o desempenho das triagens para biocatalisadores úteis em síntese orgânica, tais como aldolases, acilases, fosfatases, lipases/esterases e epóxido-hidrolases.^{105,106,107,108,109} Conforme ilustrado na Figura 3.1, o ensaio de Reymond associa a formação de produtos (resultado de uma catálise enzimática) com a liberação de sinal fluorescente. O método envolve substratos fluorogênicos (**3.1–3.4**) os quais, após reação com o biocatalisador, geram produtos (**3.5–3.6**) cuja oxidação por álcool desidrogenase (ADH) ou NaIO_4 geram um precursor ariloxi-carbonílico (**3.7**) de um composto fluorescente (umbeliferona, **3.8**). Nesta última etapa, as propriedades catalíticas da albumina de soro bovino (BSA) são exploradas no sentido da catálise de uma reação de β -eliminação. A detecção de fluorescência confere alta sensibilidade ao ensaio e por isto permite a miniaturização de seu formato.

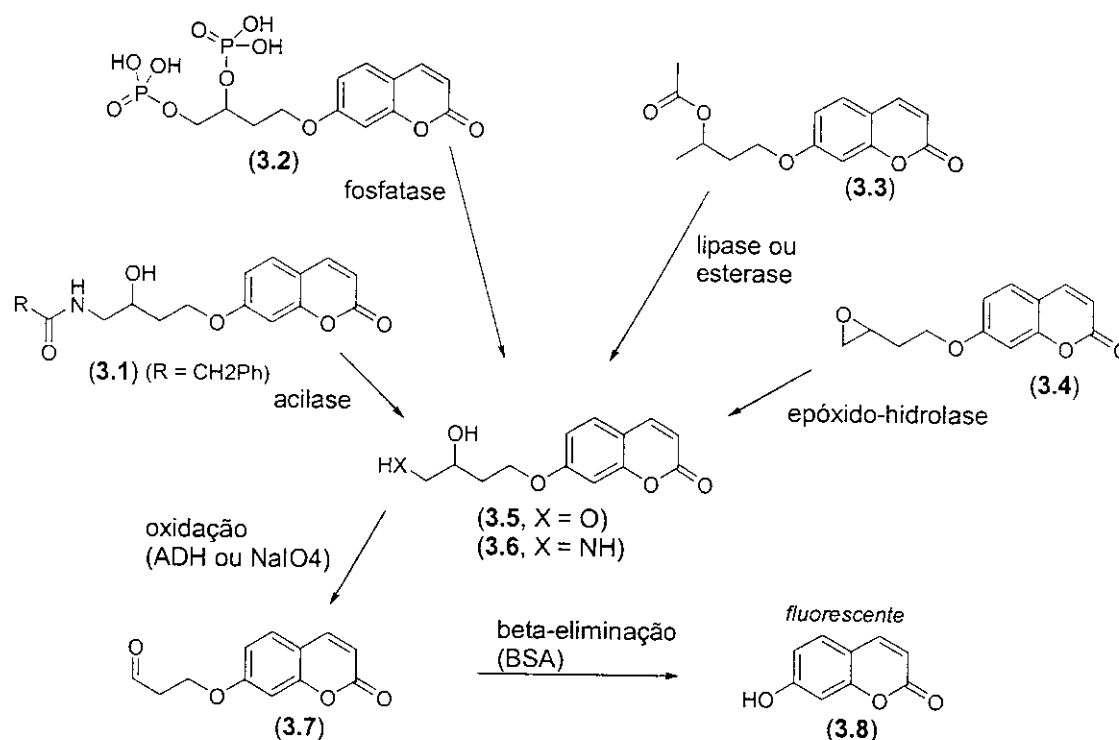


Figura 3.1. Representação esquemática do ensaio fluorogênico de Raymond para detecção de enzimas hidrolíticas (Ref. 112).

Dentro dos parâmetros convencionais, as triagens para biocatalisadores microbianos são normalmente realizadas em frascos de 125 mL com 50 mL de meio reacional contendo o substrato a ser testado à concentração de 0,2 – 0,5 mg.mL⁻¹,^{88,89} o que corresponde a 1mM para substâncias apresentando massa molecular (MM) entre 200 e 500 u.m.a. Isto significa que para cada microrganismo testado (sem duplicata) são necessários de 10 a 25 mg de substrato. Em contra partida, as triagens para biocatalisadores baseadas em detecção de fluorescência são normalmente realizadas em microplacas de 96 poços (ou mais, e.g., 384 poços com 0,1 - 0,2 mL de meio reacional contendo o substrato a 0,1 mM).^{110,111} Considerando substratos de MM 200 – 500 u.m.a., isto significa que para cada microrganismo testado (sem duplicata) são necessários de 0,004 a 0,01 mg de material. Portanto, relativamente ao método tradicional, a triagem baseada em fluorescência permite reduzir em 2500 vezes a quantidade de substrato necessária à avaliação de biocatalisadores,

justificando assim a atribuição do termo *triagem de alto desempenho* (“high-throughput screening”). A aplicação deste tipo de ensaio como ferramenta de rotina possibilita, a princípio, a rápida construção de um banco de dados sobre o potencial enzimático de qualquer conjunto de microrganismos. As coleções de microrganismos brasileiros (*e.g.*, CCT - Coleção de Culturas Tropical, CBMAI – Coleção Brasileira de Microrganismos de Ambiente e Indústria) merecem ser avaliadas neste sentido, por ser este um ponto de partida de empreitadas biotecnológicas; e a possibilidade de fazê-lo a custo relativamente baixo, é certamente o que torna os ensaios fluorogênicos altamente atraentes.

Embora o ensaio de Reymond seja aplicado com sucesso à avaliação de enzimas isoladas ou parcialmente purificadas, sua aplicação a células inteiras permanece inexplorada. Havendo interesse no desenvolvimento deste aspecto, a substância **3.9** foi sintetizada visando a detecção de Baeyer-Villiger-monoxigenases (BVMOs), como preconizado por Alphand e col. (Figura 3.2).¹¹² Esta iniciativa abriu portas a uma colaboração, a qual proporcionou a realização de parte da presente etapa do trabalho na Universidade de Bern (Suíça), sob supervisão do Prof. Dr. Jean-Louis Reymond.

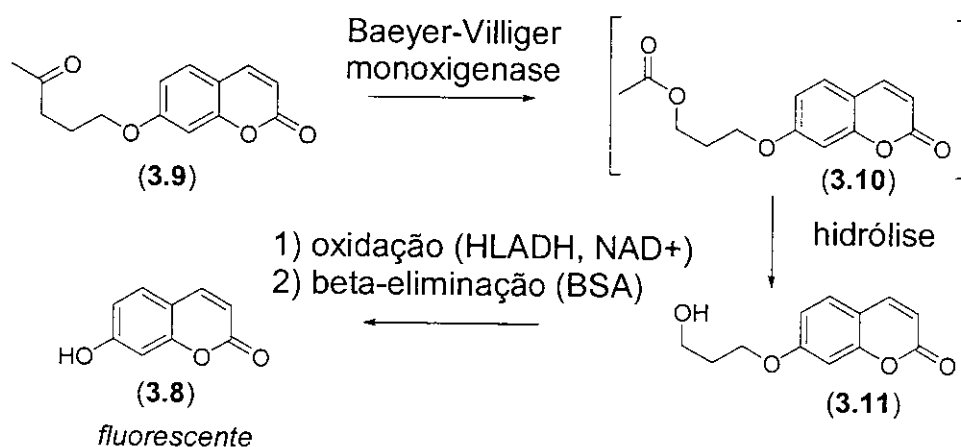


Figura 3.2. Representação esquemática do ensaio fluorogênico para detecção de BVMOs. *De acordo com Alphand e col.,¹²¹ a conversão de **3.10** a **3.11**, na presença de células microbianas, ocorre rapidamente por meio de hidrólise enzimática.

3.1. Objetivos

Esta etapa final do presente trabalho teve por objetivo a implementação de um ensaio de triagem de alto desempenho para prospecção de biocatalisadores em microrganismos.

3.2. Resultados e discussão

As triagens denominadas "de alto desempenho" têm por finalidade oferecer mais informação em menos tempo. Os procedimentos adotados no presente foram baseados nos ensaios fluorogênicos de Reymond,¹¹²⁻¹¹⁶ os quais têm por característica a utilização de substratos derivados de umbeliferona (**3.8**), enzimas purificadas e a realização de reações em solução tampão borato pH 8,8, dado a fluorescência decorrer da base conjugada de **3.8**.

Dado a ausência de detalhamento experimental¹²¹ sobre a aplicação de **3.9** como sonda para detecção de BVMOs, o andamento da adaptação do ensaio de Reymond a microrganismos foi monitorado por meio da adaptação, em paralelo, do ensaio para triagem de enzimas hidrolíticas, dado a disponibilidade da parte experimental destes últimos na literatura.¹¹²⁻¹¹⁶ Os tipos de substrato escolhidos para realização desta espécie de controle positivo foram os epóxidos.

3.2.1. Avaliações preliminares

3.2.1.1. Validação dos reagentes

A estabilidade de epóxidos nas condições reacionais do ensaio de Reymond é conhecida.¹¹³ Por outro lado, a estabilidade de **3.9** em tais condições teve de ser avaliada.

Realizando um experimento típico da triagem de alto desempenho de Reymond, os sinais de fluorescência provenientes de **3.9** em solução tampão borato (20 mM pH 8,8) contendo BSA (2 mg.mL⁻¹) foram monitorados ao longo do tempo, na ausência e na presença de álcool desidrogenase (HLADH/NAD⁺, ver Figura 3.2), sendo a variação de intensidade dos sinais de fluorescência interpretada como um indicador direto da estabilidade do substrato (**3.9**). Como ilustrado na Figura 3.3, a qual corresponde a uma leitura iniciada após 24 h de incubação das misturas reacionais, em todas situações testadas a intensidade dos sinais de fluorescência

variou em uma faixa de linearidade, indicando a ausência de reações não enzimáticas passíveis de proporcionar a liberação do fluoróforo **3.8**. A Figura 3.3 também revela a interação positiva entre os reagentes HLADH e NAD⁺, pois somente na ausência de HLADH o NAD⁺ foi capaz de interagir com **3.9**, ocasionando redução da intensidade dos sinais de fluorescência.

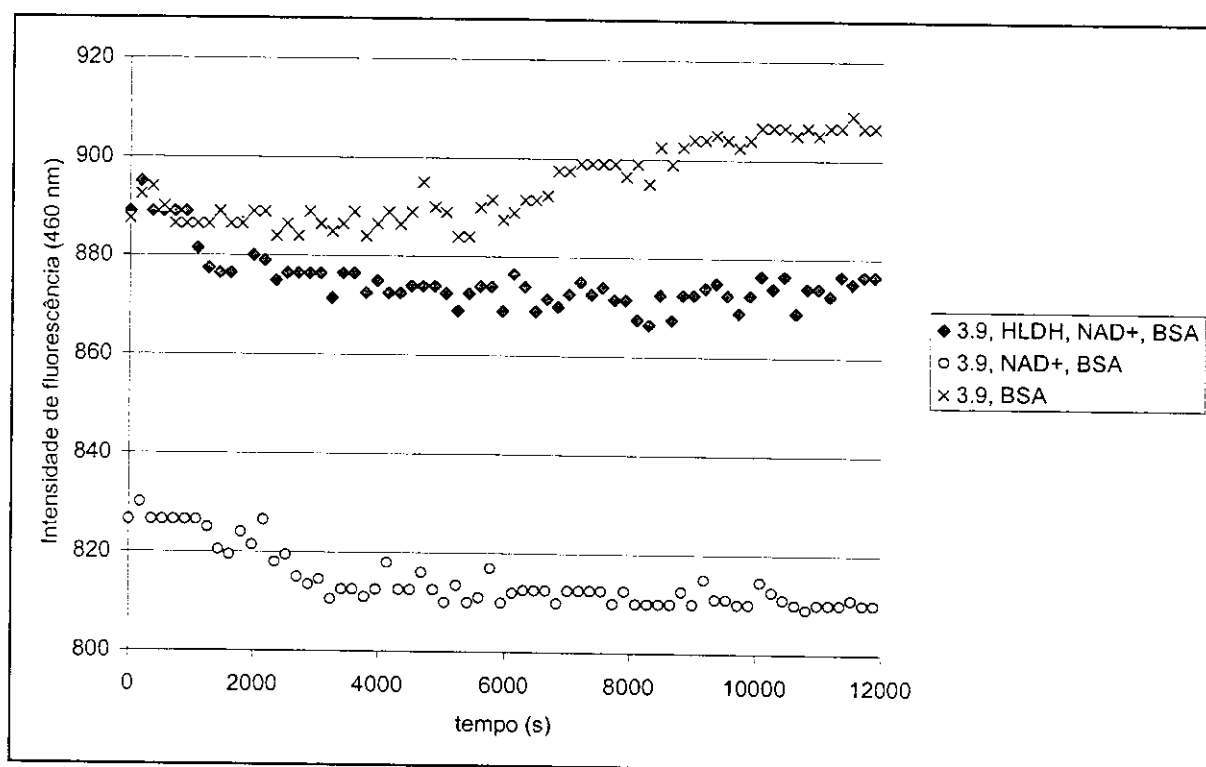


Figura 3.3. Estabilidade de **3.9** nas condições do ensaio de Raymond (**3.9** 100 μM , HLADH 50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, NAD⁺ 1 mM, BSA 2 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, solução tampão borato 20 mM pH 8,8). Curvas representativas da média de uma duplicata.

O segundo aspecto cuja avaliação também foi fundamental à aplicação de **3.9** aos propósitos do presente trabalho foi a etapa de oxidação de **3.11** por HLADH/NAD⁺. À semelhança do experimento anterior (Figura 3.3), isto foi realizado por meio da leitura dos sinais de fluorescência provenientes de **3.11** em solução

tampão borato pH 8,8 contendo BSA, na ausência e na presença de HLADH e NAD⁺. Como ilustrado na Figura 3.4, somente na presença da enzima HLADH a intensidade dos sinais de fluorescência das soluções contendo **3.11** aumentou significativamente no decorrer do tempo, demonstrando a liberação de **3.8** em consequência da oxidação de **3.11**. Assim, os experimentos até então realizados forneceram evidências favoráveis à utilização de **3.9** para o fim almejado.

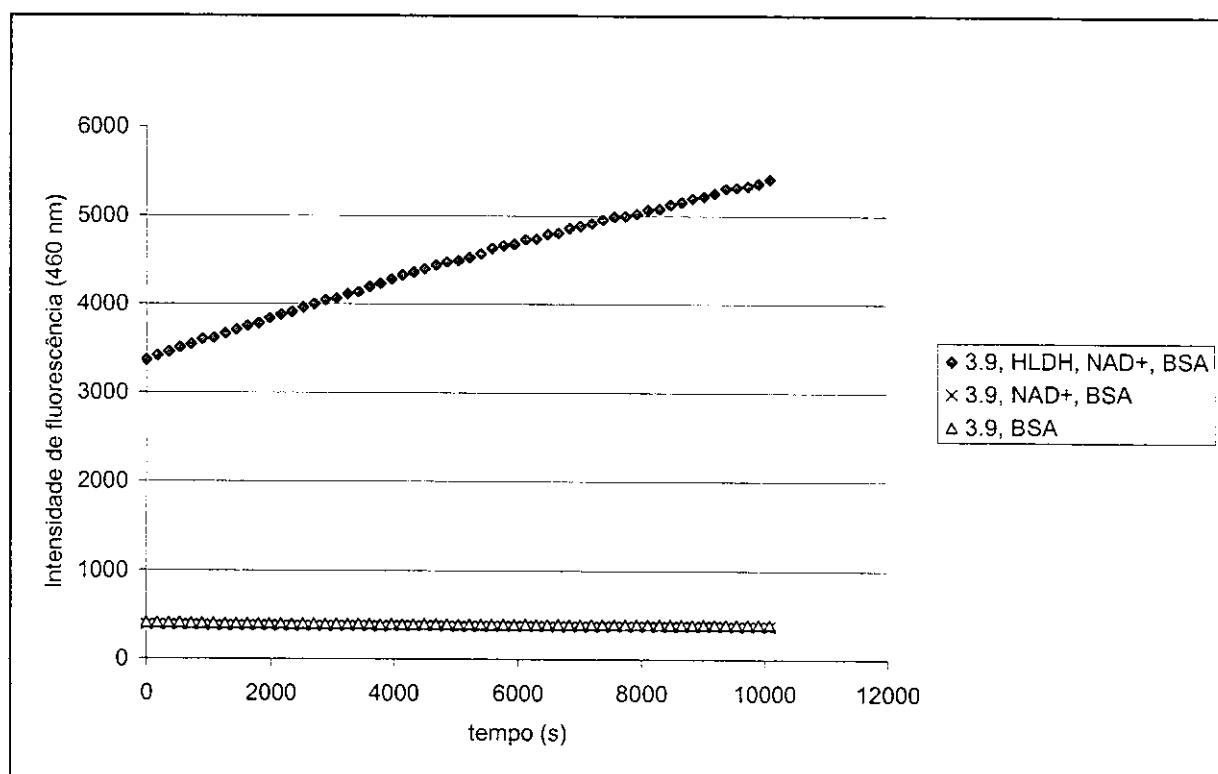


Figura 3.4. Oxidação de **3.11** nas condições do ensaio de Raymond (**3.11** 100 μM , HLADH 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, NAD⁺ 1 mM, BSA 2 mg.mL^{-1} , solução tampão borato 20 mM pH 8,8). Curvas representativas da média de uma duplicata.

3.2.1.2. Concentração do biocatalisador

A concentração adequada de células à realização do ensaio foi avaliada com base na reação de oxidação de **3.5** por NaIO_4 (ver Figura 3.1) na presença de *R. glutinis* CCT 2182. Como ilustrado na Figura 3.5, no decorrer da incubação, a intensidade dos sinais de fluorescência foi inversamente proporcional à concentração de células presente. Entretanto, na presença de células a $0,1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ a oxidação de **3.5** não foi prejudicada. Este valor de concentração encontrado é perfeitamente compatível com os parâmetros referenciais em biocatálise,^{117,118} dado a utilização do substrato a $100 \mu\text{M}$. Portanto, esta concentração de células e substrato foi mantida nas triagens doravante realizadas.

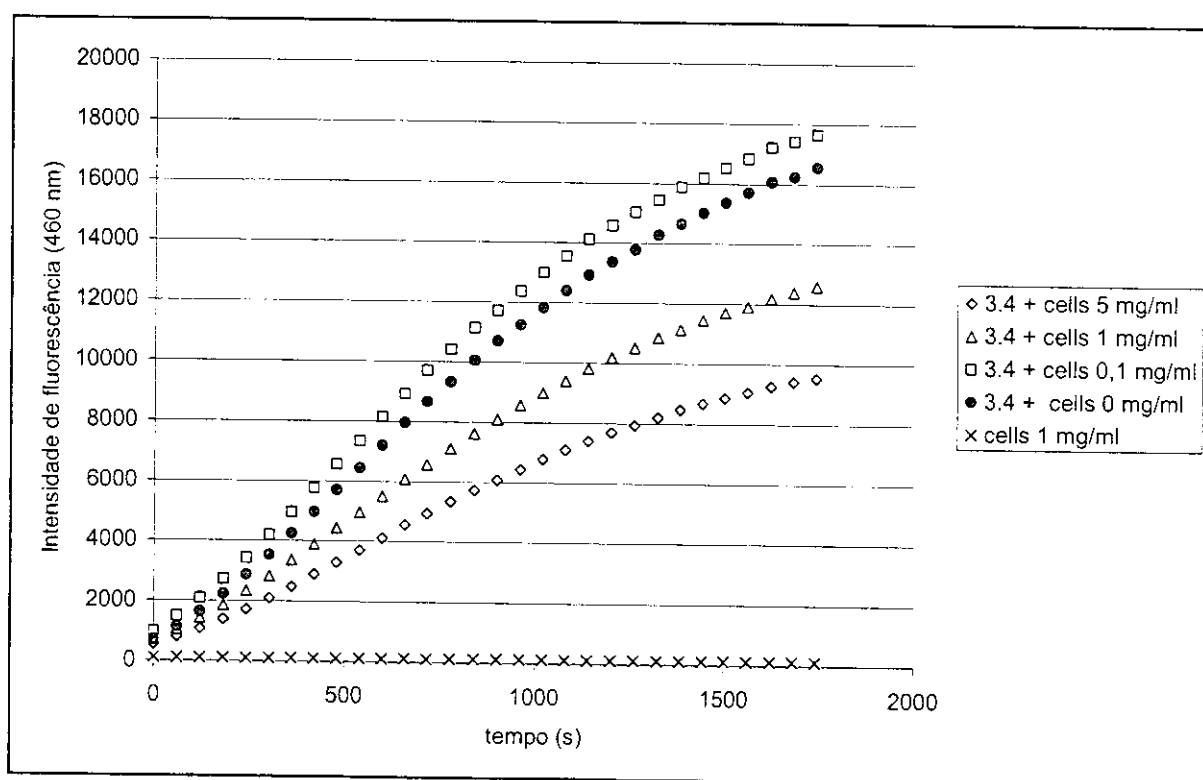


Figura 3.5. Oxidação de **3.5** nas condições do ensaio de Reymond (**3.5** $100 \mu\text{M}$, NaIO_4 1mM , BSA $2 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, solução tampão borato 20 mM pH $8,8$) na presença de células. Curvas representativas da média de uma duplicata.

3.2.2. Triagem para epóxido-hidrolases

A viabilidade da aplicação do ensaio de Raymond à triagem de microrganismos foi ponderada pelo andamento das reações utilizando substratos para epóxido-hidrolase (EH). Dentre o material utilizado para realização do estudo, os epóxidos **3.4** e **3.12** foram sintetizados e cedidos pela doutoranda Lu Shi Chen (Prof^a. Anita J. Marsaioli). O sucesso da adaptação do ensaio foi diretamente relacionado à detecção de EHs. Neste sentido, *R. glutinis* CCT 2182 foi propositalmente incluída na bateria de microrganismos testados devido ao conhecimento prévio deste seu tipo de atividade enzimática. Como ilustrado nas Figuras 3.6 e 3.7, o aumento da intensidade dos sinais de fluorescência indicando a

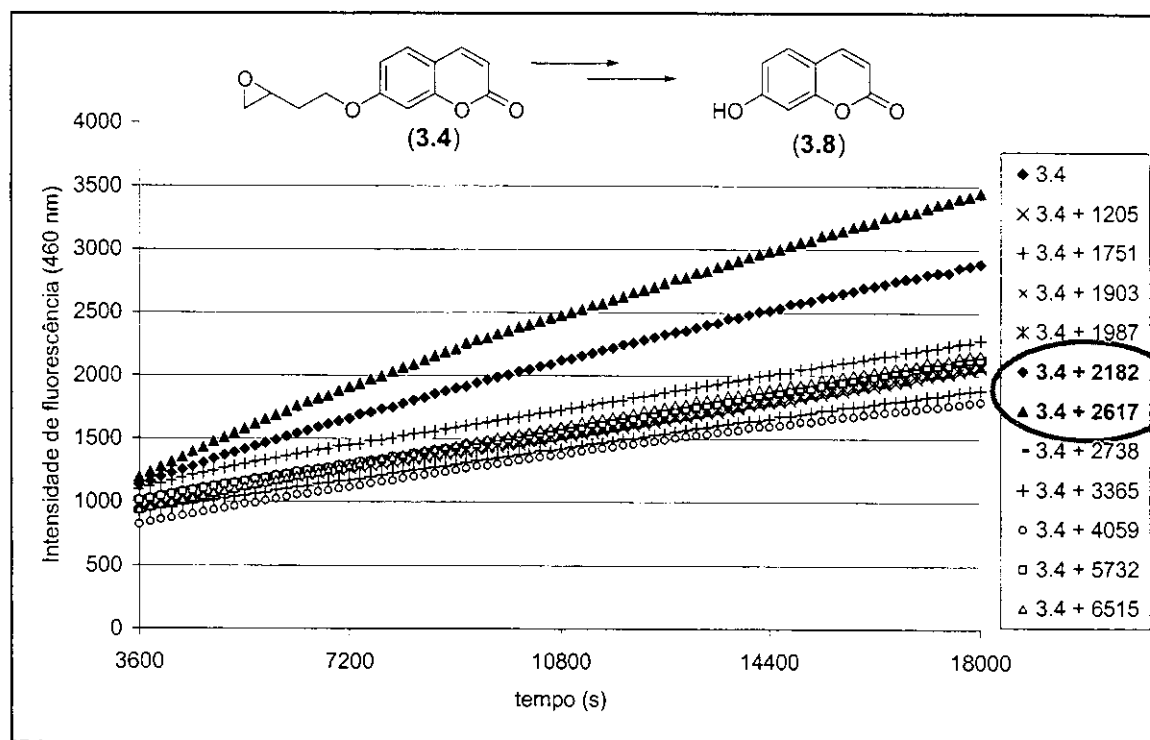
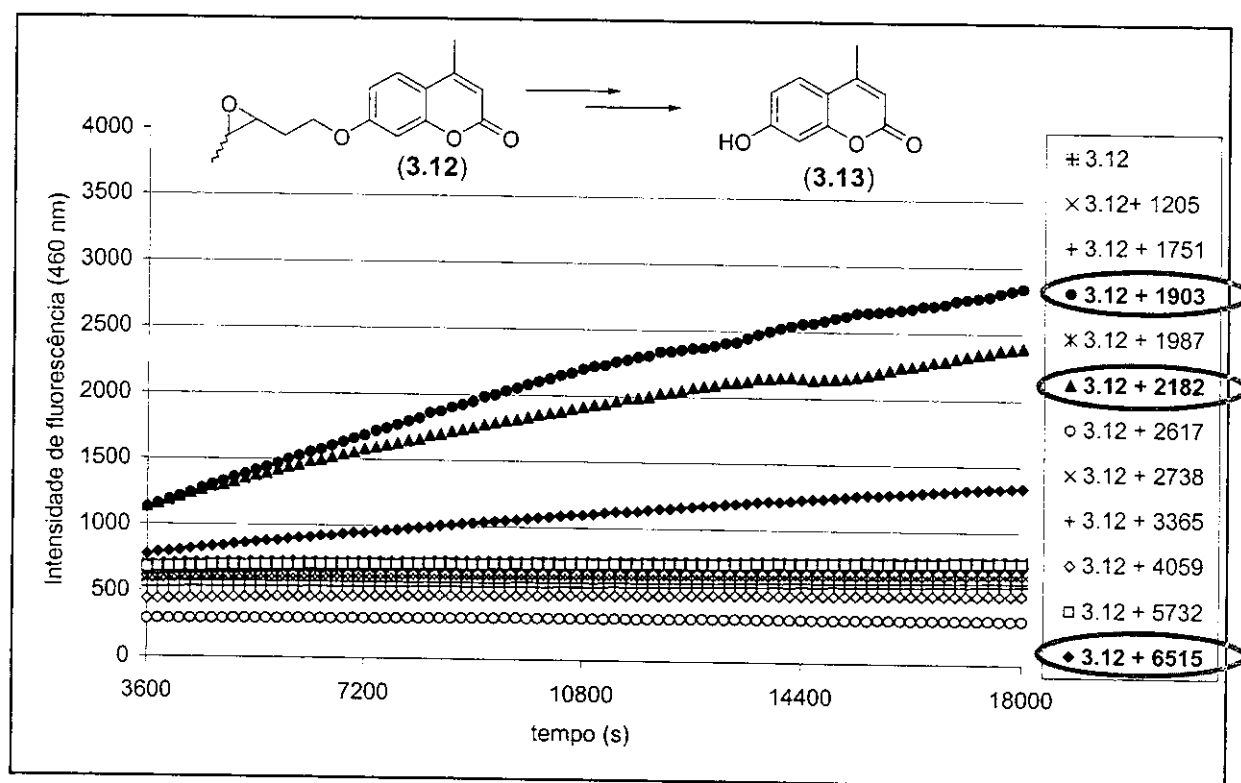


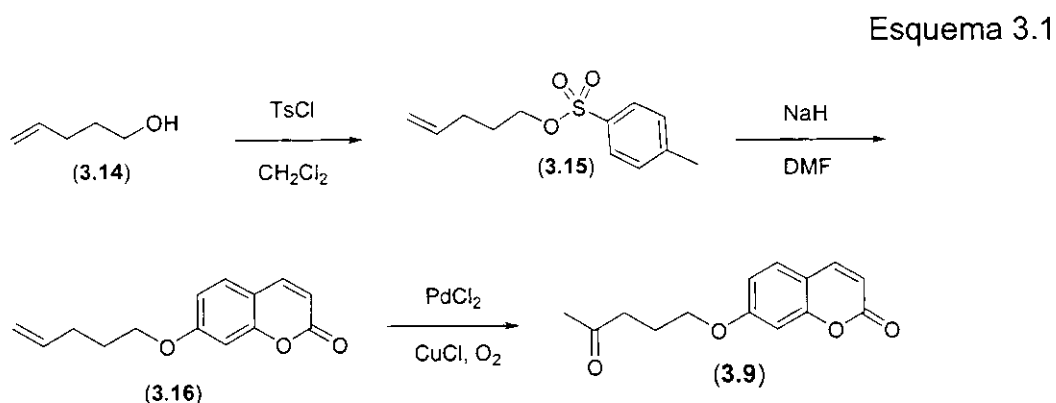
Figura 3.6. Aplicação de 3.4 à detecção de EHs em microrganismos sob as condições do ensaio Raymond (3.4 100 μ M, NaIO₄ 1 mM, BSA 2 mg.mL⁻¹, tampão borato 20 mM pH 8,8). Curvas representativas da média de uma duplicata. Legenda: *G. candidum* CCT 1205, *R. minuta* CCT 1751, *T. cutaneum* CCT 1903, *P. aeruginosa* CCT 1987, ***R. glutinis* CCT 2182**, ***P. stipitis* CCT 2617**, *P. aeruginosa* CCT 2738, *P. kluyeri* CCT 3365, *C. amalonaticus* CCT 4059, *S. rubidea* CCT 5732, *A. tumefaciens* CCT 6515.

liberação de **3.8** e **3.13**, respectivamente, foi registrado em decorrência da biotransformação de **3.4** por *R. glutinis* CCT 2182 e por *P. stipitis* CCT 2617 (Figuras 3.6) e em decorrência da biotransformação de **3.12** por *T. cutaneum* CCT 1903, *A. tumefaciens* CCT 6515 e, novamente, *R. glutinis* CCT 2182 (Figura 3.7). Além de demonstrar a viabilidade da aplicação do ensaio de Raymond a microrganismos e atilização acertada de *R. glutinis* CCT 2182 como referência, os resultados mostraram a existência de pelo menos 2 tipos de EHs dentre os microrganismos testados, sendo um deles seletivo para **3.4** e outro seletivo para **3.12**. No que diz respeito a *R. glutinis* CCT 2182, duas hipóteses são razoáveis: a existência dos dois tipos de EH no mesmo organismo ou a existência de um terceiro tipo enzimático menos seletivo.



3.2.3. Triagem para Baeyer-Villiger monoxigenases

Dentre os componentes necessários para a realização do ensaio, o substrato **3.9** foi sintetizado conforme ilustrado no Esquema 3.1. O éster **3.10** foi gentilmente sintetizado pela doutoranda Lu Shi Chen (Prof^a. Anita J. Marsaioli) e o álcool **3.11** foi gentilmente cedido pelo Prof. Jean-Louis Reymond (Universidade de Bern, Suíça).



De acordo com as expectativas, o sucesso da adaptação do ensaio foi diretamente relacionado à detecção de BVMOs. Neste sentido, o referencial introduzido no ensaio foi o fungo *G. candidum* CCT 1205, devido à demonstração de BVMO frente a cicloexanonas (Capítulo 2). Entretanto, sob as condições do ensaio de Reymond nenhum dos microrganismos testados demonstrou a atividade enzimática de forma significativa durante o período observado (48 h). Nas reações com *T. cutaneum* CCT 1903 e *S. rubidea* CCT 5732, um aumento muito discreto da intensidade dos sinais de fluorescência apenas sugeriram a ocorrência da reação (Figura 3.8).

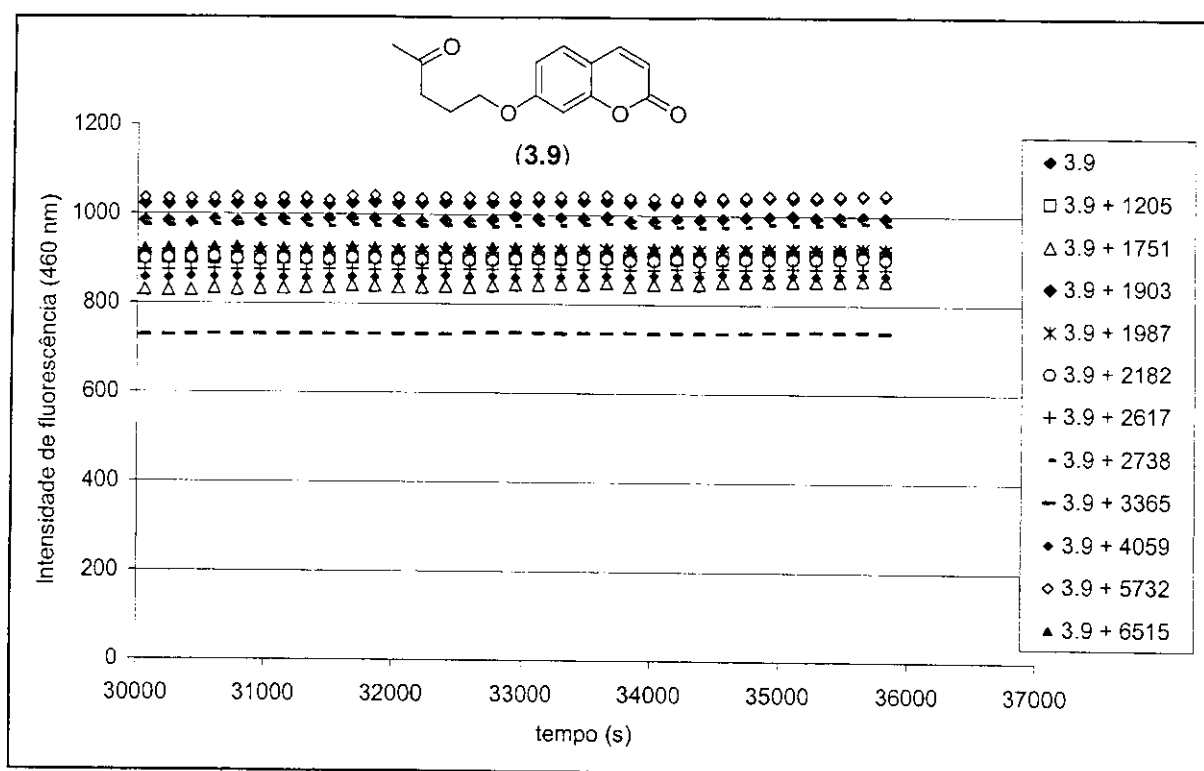


Figura 3.8. Aplicação de 3.9 à detecção de BVMOs em microrganismos sob as condições do ensaio de Raymond (3.9 100 μ M, HLADH 50 μ g.mL⁻¹, NAD⁺ 1 mM, BSA 2 mg.mL⁻¹, tampão borato 20 mM pH 8,8). Curvas representativas da média de uma duplicata. Legenda: *G. candidum* CCT 1205, *R. minuta* CCT 1751, *T. cutaneum* CCT 1903, *P. aeruginosa* CCT 1987, *R. glutinis* CCT 2182, *P. stipitis* CCT 2617, *P. aeruginosa* CCT 2738, *P. kluyeri* CCT 3365, *C. amalonaticus* CCT 4059, *S. rubidea* CCT 5732, *A. tumefaciens* CCT 6515.

Visando agregar informações sobre os sistemas, reações de biotransformação tradicionais (meio reacional 25 mL; substrato 0,3 mg.mL⁻¹, 150 rpm) foram montadas, na tentativa de verificar se o resultado obtido seria devido à baixa oxigenação das microplacas. Desta vez, somente 2 microrganismos foram utilizados, sendo eles *G. candidum* CCT 1205 e *T. cutaneum* CCT 1903. Neste experimento, as reações foram monitoradas por CLAE, tendo por referência a eluição das substâncias padrão sintetizadas (Figura 3.9). As reações foram acompanhadas por 6 dias (144 h) e a Tabela 3.1 mostra os resultados obtidos. A oxidação de Baeyer-Villiger não ocorreu de forma expressiva em nenhum dos casos,

a princípio descartando a hipótese de que o problema estaria na oxigenação no meio. A "dormência" de *G. candidum* CCT 1205 causava frustração.

Um segundo experimento foi montado com *G. candidum* CCT 1205 e *T. cutaneum* CCT 1903, desta vez modificando o pH do meio reacional de pH 8,8 (solução tampão borato) para pH 6,5 (solução tampão fosfato), reproduzindo a condição da triagem previamente realizada com cicloexanonas. As reações também foram montadas de acordo com o protocolo das reações de biotransformação tradicionais (meio reacional 25 mL; substrato 0,3 mg.mL⁻¹, 150 rpm) e também foram acompanhadas por CLAE, tendo por referência a eluição das substâncias padrão sintetizadas (Figura 3.9).

As áreas cromatográficas percentuais apresentadas nas Tabelas 3.1 e 3.2 mostram que a velocidade da reação de Baeyer-Villiger, avaliada pela concentração relativa de **3.11**, foi favorecida em condições de pH ligeiramente ácido (pH 6,5), notoriamente no caso de *T. cutaneum* CCT 1903, o qual, desde o experimento monitorado por fluorescência já havia demonstrado maior afinidade por **3.9** do que *G. candidum* CCT 1205. Nas reações com *T. cutaneum* CCT 1903, após 24 h em pH 8,8, somente 1% de **3.9** foi convertido a **3.11** (Tabela 3.1); em contrapartida, em pH 6,5, no mesmo período de tempo a conversão correspondeu a 12% (Tabela 3.2). Este comportamento foi mantido e após 72 h a conversão de **3.9** a **3.11** por *T. cutaneum* CCT 1903 em pH 8,8 e pH 6,5 correspondeu a 2% e 45%, respectivamente. No caso das reações com *G. candidum* CCT 1205, os dados apresentados nas Tabelas indicam ao menos duas interpretações viáveis: inadequação de **3.9** ao seu tipo de BVMO, a qual foi detectada frente a cicloexanonas, ou não expressão da BVMO quando da reativação do microrganismo para a realização das reações.

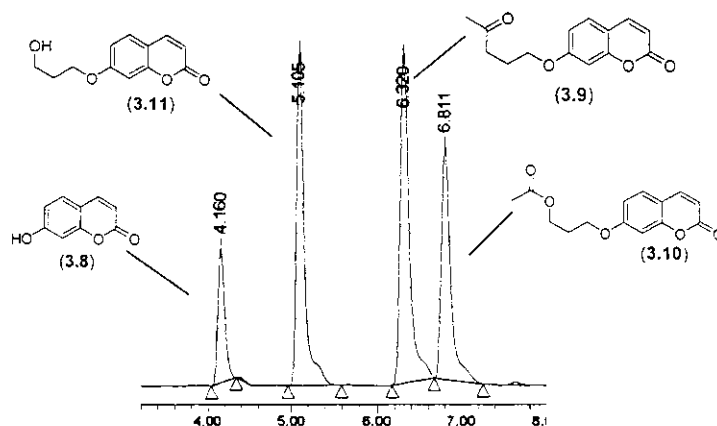


Figura 3.9. Cromatograma (CLAE) característico da ordem de eluição das substâncias padrão 3.8 – 3.11 em coluna Chromolith RP 18e (50–4,6 mm).

Tabela 3.1. Biotransformação de 3.9 em solução tampão borato pH 8,8.

t (h) ^c	<i>G. candidum</i> CCT 1205				<i>T. cutaneum</i> CCT 1903				<u>C</u> ^a			
	A % ^b				A %				A %			
	3.8	3.9	3.10	3.11	3.8	3.9	3.10	3.11	3.8	3.9	3.10	3.11
24	0,1	98,1	-	0,4	0,6	96,9	-	1,1	nd	nd	nd	nd
48	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
72	0,5	98,3	-	0,1	0,7	96,5	-	2,0	nd	nd	nd	nd
96	0,6	98,2	-	0,1	0,7	96,1	-	2,2	nd	nd	nd	nd
144	nd	nd	nd	nd	0,6	95,2	-	2,2	nd	nd	nd	nd

^aReação Controle (mistura reacional isenta do biocatalisador). ^bÁrea cromatográfica porcentual.

^cTempo de reação (horas). nd: não determinado. -: não detectado.

Tabela 3.2. Biotransformação de 3.9 em solução tampão fosfato pH 6,5

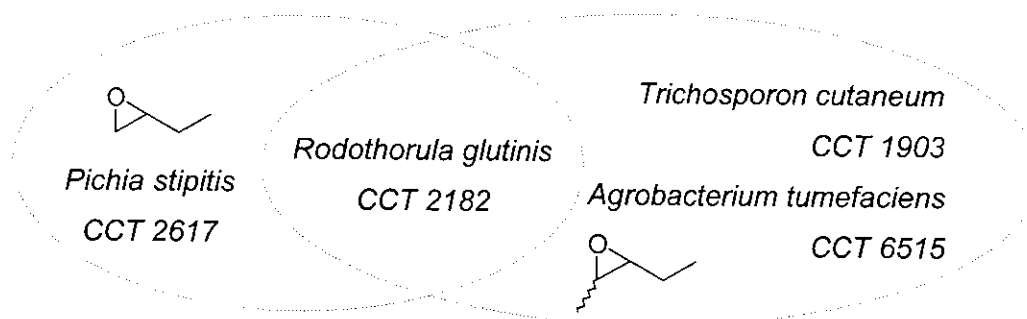
t (h) ^c	<i>G. candidum</i> CCT 1205				<i>T. cutaneum</i> CCT 1903				<u>C</u> ^a			
	A % ^b				A %				A %			
	3.8	3.9	3.10	3.11	3.8	3.9	3.10	3.11	3.8	3.9	3.10	3.11
24	0,6	97,6	-	1,3	0,6	86,5	-	12,3	0,6	99,2	-	-
48	0,6	96,1	-	2,8	0,9	70,4	-	27,7	0,6	99,2	-	-
72	nd	nd	nd	nd	1,8	52,4	-	45,0	0,6	99,2	-	-

^aReação Controle (mistura reacional isenta do biocatalisador). ^bÁrea cromatográfica porcentual.

^cTempo de reação (horas). nd: não determinado. -: não detectado.

3.3. Conclusão parcial 4

A triagem de alto desempenho de Raymond para EHs foi adaptada com sucesso às reações com microrganismos. Segundo a seletividade enzimática aos epóxidos (monossustituído/dissustituído) fluorogênicos utilizados como substrato nos ensaios, 3 conjuntos distintos de biocatalisadores foram selecionados, conforme ilustrado abaixo. Dentre as fontes de EH detectadas, somente *R. glutinis* é mencionada na literatura.



No que diz respeito à triagem para BVMOs, a condição original de pH do ensaio de Raymond (pH 8,8) não foi detectada como um fator limitante da atividade de BVMO frente ao tipo de substrato utilizado. No entanto, ainda que por meio de reações realizadas no formato tradicional, os estudos desenvolvidos no sentido de verificar as condições adequadas para implementação das reações em microplacas proporcionaram a detecção, em *Trichosporon cutaneum* CCT 1903, de uma BVMO distinta daquela detectada em *Geotrichum candidum* CCT 1205 frente a ciclohexanonas. A detecção de BVMOs no gênero *Trichosporon* corresponde atualmente a um fato inédito, a ser descrito na literatura.

4. Conclusão geral

A aplicação dos ensaios de bioautografia e CIM à monitorização de metabólitos secundários com atividade antimicrobiana proporcionou uma avaliação simples e objetiva do conteúdo dos extratos em AcOEt das culturas de 15 linhagens de fungos filamentosos pela primeira vez estudadas quimicamente. A abordagem realizada resultou no isolamento de coclioquinona A (**1.5**) e isococlioquinona A (**1.6**), do extrato em AcOEt da cultura de *D. dematioidea* CCT 5631, e *E*-desidrocurvularina (**1.7**) e curvularina (**1.8**), do extrato em AcOEt das culturas de *C. eragrostidis* CCT 5634 e de *C. pallescens* CCT 5654, além de serem detectados (CGAR-EM) nos extratos em AcOEt das culturas das demais *Curvularia* presentes dentre os fungos isolados de abelhas (*Trigona* sp). À exceção de **1.8**, o qual não foi detectado por meio dos ensaios antimicrobianos, as demais substâncias isoladas apresentaram potencial de atividade somente contra bactérias Gram-positivas (*S. aureus* e *B. subtilis*), sendo os seguintes os valores de CIM para *S. aureus*: 1495 (CIM_{*S. aureus*}, μmol.L⁻¹): CIM_{*S. aureus*} **1.5** > 28, CIM_{*S. aureus*} **1.6** > 1623, CIM_{*S. aureus*} **1.7** > 1724, CIM_{*S. aureus*} **1.8** > 3424. À exceção de **1.5**, o qual se destaca pela presença de um núcleo quinônico, as demais substâncias isoladas apresentaram valores de CIM altos, relativamente aos antibióticos padrão utilizados. Todas as substâncias isoladas foram encontradas descritas na literatura. Entretanto, a avaliação quantitativa das respectivas atividades antimicrobianas foram até então pouco exploradas, sendo isto, portanto, nesta área, a principal contribuição efetiva resultante do presente trabalho.

Os experimentos dedicados à investigação de HPO em microrganismos não proporcionaram a detecção da desejada atividade enzimática. A estratégia de utilização de um substrato hidrofóbico como o indeno, embora baseada na literatura, pode ter contribuído em muito para tal resultado, devido à tendência de solubilização em membranas celulares. Tendo isto em vista, a recondução da investigação com outros possíveis substratos merece ser considerada. Ainda assim, o presente trabalho apresentou uma proposta inédita no modo de investigação por

biocatalisadores para reações de halogenação, no sentido de que todos os relatos atualmente disponíveis na literatura sobre as reações com HPO são referentes a experimentos realizados com enzimas isoladas ou com extratos enzimáticos.

Ensaio iniciais de triagem para biocatalisadores utilizando mais de um substrato, simultaneamente, foram introduzidos durante a investigação de BVMOs, como uma proposta de otimização das reações de triagem tradicionais. Neste contexto, a utilização de substratos como metil-cicloexanonas proporcionou a detecção de BVMOs em *G. candidum* CCT 1205, *R. glutinis* CCT 2182 e *R. minuta* CCT 1751, embora somente em *G. candidum* a atividade tenha sido razoavelmente expressiva (c 60 – 90%; ee, 19 - 94%, *R*). Posteriormente, a visão de prospecção de biocatalisadores úteis à síntese orgânica foi amadurecida, evoluindo à triagens de alto desempenho. A adaptação das reações de biotransformação a microplacas possibilitou a implementação de ensaios com substratos fluorogênicos. Neste sentido, em um curto espaço de tempo (< 30 dias), o trabalho realizado proporcionou a detecção inédita de EHs e BVMOs em diferentes espécies microbianas, como *Agrobacterium tumefaciens*, *Pichia stipitis* e *Trichosporon cutaneum*. Os resultados obtidos abriram um grande leque de perspectivas para estudos futuros, relacionados tanto à otimização dos ensaios de alto desempenho quanto ao isolamento, caracterização química, clonagem e expressão das enzimas responsáveis pelas biotransformações observadas.

5. Experimental

Nas páginas seguintes, após *considerações gerais* (item 5.1), as três partes do presente trabalho são apresentadas separadamente a partir de um fluxograma que visa proporcionar ao leitor uma visão abrangente da abordagem experimental realizada. Assim, o primeiro destes fluxogramas resume as etapas de prospecção de antibióticos (Capítulo 1); o segundo e o terceiro fluxogramas resumem os procedimentos de prospecção de haloperoxidasas e de Baeyer-Villiger monoxigenases (Capítulo 2) e o quarto fluxograma, arrematando o presente trabalho, resume os experimentos realizados para implementação de triagem de alto desempenho para detecção de biocatalisadores em microrganismos (Capítulo 3). Em continuação o leitor encontrará em anexo os espectros de RMN representativos das substâncias isoladas ou sintetizadas.

5.1. Considerações gerais

- As abelhas *Trigona* sp. mencionadas no presente foram capturadas na Fazenda Santa Elisa, IAC, Campinas, pelo Dr. Volker Bittrich, do Instituto de Biologia, UNICAMP. O isolamento de fungos filamentosos do corpo destes insetos foi realizado pela Dr^a. Regina A. C. Golçalves, da Universidade Estadual de Maringá, PR. A identificação das linhagens isoladas foi realizada por Ana Paula M. Zibordi, na época vinculada à Fundação André Tosello, Campinas, SP. Amostras puras das 15 linhagens isoladas foram depositadas na Coleção de Culturas Tropical (CCT), da Fundação André Tosello, sob as seguintes inscrições: *Aspergillus* sp. CCT 5660, *Aspergillus niger* CCT 5559, *Curvularia* sp. CCT 5629, *Curvularia lunata* CCT 5628, *Curvularia eragrostidis* CCT 5634, *Curvularia pallescens* CCT 5654, *Drechslera dematioidea* CCT 5631, *Drechslera halodes* CCT 5636, *Nodulisporium* sp. CCT 5552, *Trichoderma* sp. CCT 5551, fungo CCT 5630, fungo CCT 5632, fungo CCT 5635, fungo CCT 5553 e fungo CCT 5661. Estes últimos foram posteriormente

caracterizados ao nível genérico, por Ana Paula M. Zibordi, e depositadas na Coleção Brasileira de Microrganismos Ambientais e Industriais (CBMAI), CPQBA, UNICAMP, sob as seguintes inscrições: *Penicillium* sp. CBMAI 0208 (fungo CCT 5632), *Penicillium* sp. CBMAI 0209 (fungo CCT 5635) e *Cladosporium* sp. (fungo CCT 5661). Os fungos CCT 5630 e CCT 5553 continuam a ser avaliados.

- As linhagens de actinomicetos (LS044 e LS045) utilizadas foram isoladas de solos contaminados com organoclorados, identificadas e gentilmente cedidas pelos Dr^{es}. Lara Sette e Gilson Paulo Manfio.

- As cepas de Archea (1-15, 2-15 e 6-10) utilizadas foram isoladas de salinas do Rio Grande do Norte e gentilmente cedidas pelo Dr. Sávio Farias, da Universidade Federal da Paraíba.

- Todos os demais microrganismos estudados foram adquiridos junto à Coleção de Culturas Tropical, Fundação André Tosello, Campinas, SP.

- Os meios de cultura utilizados para estocagem, ativação e crescimento das cepas microbianas foram preparados com H₂O destilada, segundo as instruções do fabricante (Merck, Darmstadt, Alemanha), sendo feito o acréscimo de 2% (p/v) de ágar para meios sólidos. Bactérias: extrato nutriente (8 g.L⁻¹), fungos: extrato de malte (20 g.L⁻¹), leveduras: extrato de levedura e malte: extrato de levedura (3 g.L⁻¹), extrato de malte (3 g.L⁻¹), peptona (5 g.L⁻¹), glicose (10 g.L⁻¹), actinomicetos: farelo de aveia (20 g.L⁻¹) e archeas (meio hipertônico): glicose (2 g.L⁻¹), peptona (2 g.L⁻¹), caseína hidrolisada (2 g.L⁻¹), amido (2 g.L⁻¹), K₂HPO₄ (1,2 g.L⁻¹), MgSO₄.7H₂O (0,2 g.L⁻¹), NaCl (100 g.L⁻¹). Todos os meios de cultura foram esterilizados em autoclave (121°C, 15 min).

- Em todos os experimentos, amostras Controle (isentas de inóculo) foram preparadas e analisadas segundo o protocolo de preparação e análise das amostras inoculadas.

- Os reagentes e solventes utilizados foram produtos analiticamente puros.

- As cromatografias em camada delgada (CCD) foram realizadas em sílicagel 60 F₂₅₄ em folhas de alumínio (Merck art. 1.05554, Darmstadt, Alemanha).

- Como reveladores cromatográficos foram utilizados a irradiação UV ($\lambda = 254$ e 365 nm) e a borrifação com de *p*-anisaldeído – ácido acético glacial – ácido sulfúrico concentrado (1:20:1, v/v/v), seguida de aquecimento.

- As cromatografias flash em coluna foram realizadas com silicagel 60 (230 - 400 mesh, Merck) e gradiente de eluição. As frações coletadas foram comparadas por CCD e agrupadas por perfil de semelhança.

- As análises por Cromatografia Gasosa de Alta Resolução (CGAR) acoplada à Espectrometria de Massas (EM) foram realizadas em cromatógrafo Agilent 6890 equipado com coluna capilar de sílica fundida HP-5 (30 m \times 0,25 mm; 0,25 μ m, 5% fenil-metilsilicone) e detetor de massas HP-5973 (ionização por impacto de elétrons de 70 eV). As condições gerais de análise comprederam velocidade do gás carreador (He): 38 cm.s⁻¹, injetor: 280°C, interface: 260°C e varredura de massas de 50 a 700 Da. As rampas de aquecimento variaram, sendo por isto relatadas junto aos respectivos experimentos.

- A discriminação de enantiômeros foi realizada por CGAR em cromatógrafo Agilent 6890 equipado com coluna capilar de sílica fundida Hamburg heptakis-(2,3-dimetil-6-pentil)- α -D-ciclodextrina (25 m \times 0,25 mm; 0,25 μ m) e detetor por ionização em chama. As condições gerais de análise comprederam velocidade do gás carreador (H₂): 50 cm.s⁻¹, injetor: 220°C e detector: 250°C. As rampas de aquecimento variaram, sendo por isto relatadas junto aos respectivos experimentos.

- Os excessos enantioméricos foram calculados após determinação das condições cromatográficas adequadas para a resolução dos enantiômeros de misturas racêmicas padrão. Resumidamente, o cálculo foi realizado da seguinte forma:

$$\frac{\text{área (+)} - \text{área (-)} \times 100}{\text{área (+)} + \text{área (-)}}$$

onde, *área (+)* corresponde à área cromatográfica do isômero dextrógero e *área (-)* à área cromatográfica do isômero levógero.

- Os espectros de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN de ^1H) foram adquiridos em espectrômetro Varian – INOVA 500 (11 Tesla) ou GEMINI (7 Tesla). Os deslocamentos químicos (δ) foram registrados em ppm, as constantes de acoplamento (J) foram medidas em Hertz (Hz) e os sinais foram caracterizados como: *s* (singleto), *sl* (singleto largo), *d* (dubleto), *dd* (duplo dubleto), *ddd* (duplo duplo dubleto), *q* (quintupleto) e *m* (multipleto).

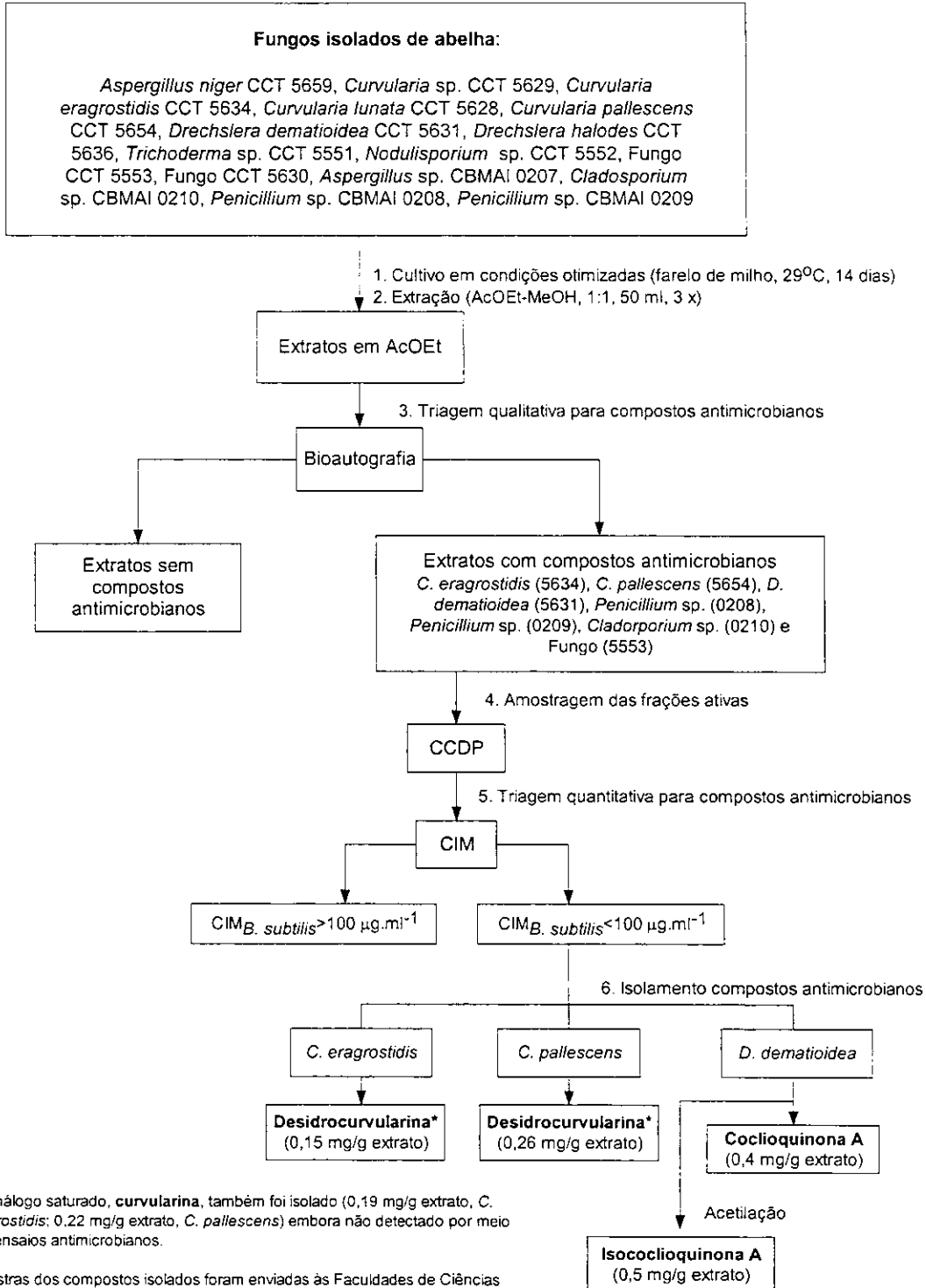
- Os espectros de Ressonância Magnética Nuclear de Carbono (RMN de ^{13}C) foram adquiridos em espectrômetro Varian – INOVA 500 (11 Tesla) ou GEMINI (7 Tesla). Os deslocamentos químicos (δ) foram registrados em ppm, sendo os sinais correspondentes a CH_3 , CH_2 , CH e C discriminados por experimentos de DEPT 135⁰ e DEPT 90⁰ (Distortionless Enhancement by Polarization Transfer).

- Experimentos utilizando as técnicas de RMN 2D COSY (homonuclear COrrrelation SpectroscopY) e HSQC (Heteronuclear Single Quantun Coherence) também foram realizados.

- No que diz respeito aos experimentos para implementação de triagem de alto desempenho baseada em fluorescência, à exceção dos meios de cultura, as demais soluções ou suspensões aquosas foram preparadas com H_2O MilliQ-deionizada. Os seguintes reagentes e substâncias padrão foram gentilmente cedidos pelo Dr. J.-L. Reymond: álcool desidrogenase de fígado de cavalo (HLADH, Fluka), NAD^+ (Fluka), 3-hidróxi-propil umbeliferil éter (**3.11**) e 3,4-diidroxi-butil umbeliferil éter (**3.5**). Os epóxidos padrão **3.4** e **3.12**, bem como o éster **3.10** foram sintetizados e cedidos pela doutoranda Lu Shi Chen (Depto. Química Orgânica, IQ/UNICAMP, Prof^a. Anita Jocelyne Marsaioli).

5.2. Prospecção de compostos antimicrobianos

Fluxograma 1. Procedimento experimental geral.



5.2.1. Preparação de extratos

5.2.1.1. Culturas em extrato de malte

Os fungos foram reativados em tubos de ensaio (18 × 180 mm) contendo 20 mL de extrato de malte-ágar (20 g.L⁻¹), a 29°C. Após 72 h, as culturas foram transferida para frascos de 500 mL contendo 100 mL de extrato de malte (20 g.L⁻¹), os quais foram incubados por 14 dias, a 29°C, sem agitação, no escuro. As culturas foram filtradas e os filtrados foram extraídos com AcOEt (1:0,5, v/v, 3 ×). As fases orgânicas foram combinadas, acrescidas de Na₂SO₄ anidro, filtradas e concentradas sob pressão reduzida, a 40-50°C .

5.2.1.2. Culturas em milho ou arroz

Os fungos foram reativados em extrato de malte-ágar como descrito previamente (item 1.5.2.1). Após 72 h, amostras de aproximadamente 1 cm² das respectivas culturas foram transferidas para frascos de 125 mL contendo 10 g de farelo de milho (Yoki[®]) ou 10 g de arroz polido (Tio João[®]), previamente autoclavados em 30 mL de H₂O destilada. As culturas foram incubadas a 29°C, no escuro, por 14 ou 28 dias. Quantidade suficiente de MeOH-AcOEt (1:1) para cobrir a biomassa desenvolvida foi adicionado às culturas. As partes foram misturadas e mantidas em repouso por 30 min. As misturas foram filtradas e os filtrados foram concentrados sob pressão reduzida até máxima evaporação dos solventes orgânicos. As soluções aquosas remanescentes foram extraídas com AcOEt (1:1, v/v, 3 ×). As fases orgânicas foram combinadas, acrescidas de Na₂SO₄ anidro, filtradas e concentradas sob pressão reduzida, a 40-50°C.

5.2.2. Avaliação da atividade antimicrobiana

5.2.2.1. Bioautografia

Com amostras dos extratos das culturas fúngicas foram preparadas soluções de concentração conhecida. Alíquotas destas soluções (180 µg) foram pontualmente aplicadas em placas de CCD (5 × 5 cm), as quais foram a seguir eluídas com Hex-AcOEt (7:3) ou Hex-AcOEt (1:1). Após completa evaporação do solvente, as placas cromatográficas foram transferidas para placas de Petri esterilizadas, sobre as quais foi vertido 20 mL de Müller Hinton-ágar (10 g.L⁻¹) acrescido em 1% (v/v) de inóculo (10⁸ células.mL⁻¹) do microrganismo indicador (*Aspergillus niger* CCT 1435, *Bacillus subtilis* CCT 0089, *Candida albicans* CCT 0776, *Escherichia coli* CCT 5050 e *Staphylococcus aureus* CCT 4295). Iniciada a solidificação do meio, as placas foram tampadas e incubadas a 29°C, por 24 h. Os *R_f*s dos compostos bioativos foram apresentados como manchas claras sobre um fundo azul escuro após a inundação das placas com 15 mL de ágar simples (10 g.L⁻¹) acrescido em 0,05% de brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio (MTT; Sigma).

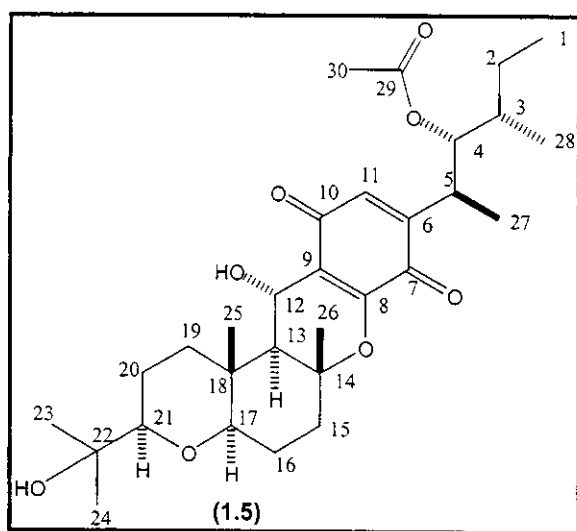
5.2.2.2. Concentração inibitória mínima (CIM)

As frações bioativas selecionadas por bioautografia (ou compostos posteriormente purificados) foram pesados em tubos de ensaio 10 × 150 mm esterilizado, acrescidos de 200 µL de DMSO e dispersados em 800 µL de H₂O destilada esterilizada. Com 100 µL destas soluções foram realizadas séries de 6 diluições duplas em microplacas esterilizadas. A seguir, 100 µL do meio de cultura (Müller Hinton-ágar, 10 g.L⁻¹), a ~45°C, acrescido em 1% (v/v) de inóculo ativado (10⁸ células/mL) do microrganismo indicador (*B. subtilis* CCT 0089; *S. aureus* CCT 4295) foi adicionado às soluções. Em cada série, a concentração das frações variou de 1.000 a 31,2 µg.mL⁻¹. Um controle negativo foi preparado com o meio de cultura, DMSO e inóculo. Um controle positivo foi preparado com o meio de cultura, DMSO,

inóculo e cloranfenicol ou ciclopiroxolamina. As placas foram incubadas a 29°C, por 24 h. Os resultados foram observados após adição de 50 µL de solução estéril de MTT 0,05% à superfície das microculturas. A menor concentração capaz de inibir o desenvolvimento dos microrganismos foi considerada a CIM dos compostos ou frações.

5.2.3. Isolamento de substâncias antimicrobianas de *D. dematioidea*

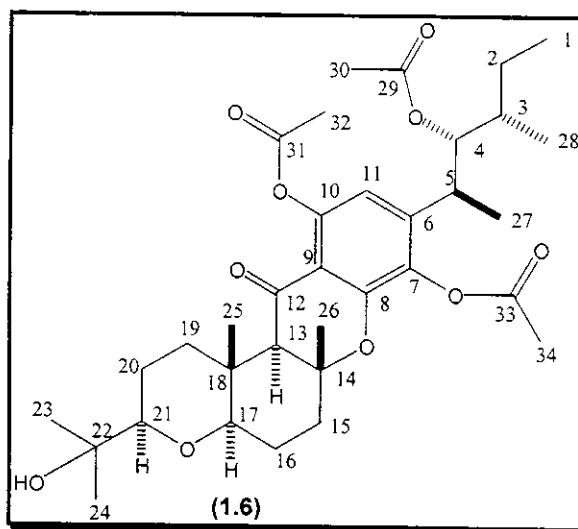
5.2.3.1. Coclioquinona A (1.5)



O extrato de AcOEt (650 mg) da cultura de *D. dematioidea* CCT 5631 em farelo milho foi fracionado por cromatografia em coluna (20 × 2,5 cm) de sílicagel 60 (230 – 400 mesh, 25 g) sob gradiente de eluição (Hex-AcOEt, 100–0%/0-100%). As substâncias antimicrobianas ($R_f = 0,4 - 0,5$, CCD/Hex-AcOEt 7:3) coeluíram em uma única fração (215 mg). Uma alíquota deste material (114 mg) foi submetida a CCDP-AgNO₃ (5%) (Benzeno-AcOEt 9:1, 3 x), proporcionando o isolamento de coclioquinona A (1.5): sólido amarelo (0,4 mg.g⁻¹ de extrato de AcOEt da cultura). $[\alpha]_D^{23} + 71^\circ$ (c 1,0 mg.mL⁻¹, EtOH), lit. $[\alpha]_D^{24} + 140^\circ$ (c 0,1, EtOH). **RMN de ¹H**

(300,068 MHz, CDCl_3 $\delta_{\text{TMS}} = 0,00$ ppm) δ 6,54 (s, 1 H, H-11), 5,02 (dd, 1 H, $J = 7,1$; 5,4, H-4), 4,94 (dd, 1 H, $J = 10,0$; 1,1, H-12), 3,78 (dd, 1 H, $J = 1,46$, OH-12), 3,26 (dd, 1 H, $J = 12,5$; 2,6, H-21), 3,30 – 3,14 (m, 1 H, H-5), 3,17 (dd, 1 H, $J = 12,3$; 4,2, H-17), 1,99 (s, 3 H, CH_3 -30), 1,33 (s, 3 H, CH_3 -26), 1,19 (s, 3 H, CH_3 -23), 1,17 (s, 3 H, CH_3 -24), 1,15 (d, 3 H, $J = 6,9$, CH_3 -27), 1,02 (s, 3 H, CH_3 -25), 0,89 (t, 3 H, $J = 6,4$, CH_3 -1). **RMN de ^{13}C** (75,425 MHz, CDCl_3 , $\delta_{\text{CDCl}_3} = 77,0$ ppm) δ 188,5 (C-10), 181,4 (C-7), 170,4 (C-29), 151,4 (C-81), 148,3 (C-6), 133,6 (C-11), 188,8 (C-9), 85,0 (C-21), 83,7 (C-17), 83,1 (C-14), 78,3 (C-4), 71,8 (C-22), 63,1 (C-12), 51,7 (C-13), 38,6 (C-19), 37,5 (C-15), 36,3 (C-3), 36,8 (C-18), 34,4 (C-5), 26,4 (C-2), 26,1 (C-24), 25,3 (C-16), 23,8 (C-23), 21,6 (C-20), 21,1 (C-26), 20,9 (C-30), 17,5 (C-27), 13,4 (C-28), 12,8 (C-25), 11,5 (C-1). **EMAR** m/z (%) 532 (M^+ , 61), 472 (56), 457 (100), 331 (48), 179 (29).

5.2.3.2. Isococlioquinona A (1.6)



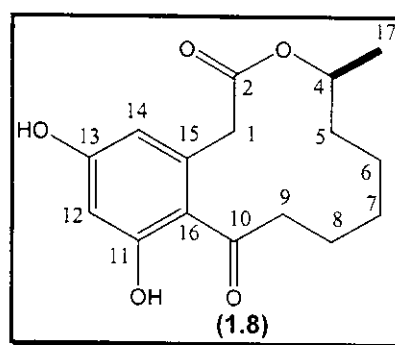
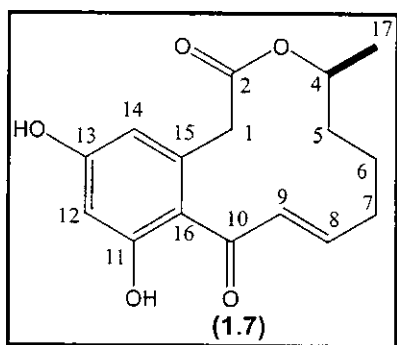
O extrato de AcOEt (500 mg) da cultura de *D. dematioidea* CCT 5631 em farelo milho foi fracionado por cromatografia em coluna (20 × 2,5 cm) de sílicagel 60 (230 – 400 mesh, 25 g) sob gradiente de eluição (Hex-AcOEt, 100–0%/0-100%). Os compostos bioativos coeluíram em uma única fração (164 mg). A uma alíquota

(129 mg) deste material foi adicionado 5 mL de anidrido acético destilado e 3 mL de piridina. A mistura foi mantida sob agitação à temperatura ambiente por 14 h. Ao meio reacional foi adicionado 10 mL de solução saturada de sulfato cuproso (CuSO_4) e AcOEt para extração (v/v, 3 x). As fases orgânicas foram reunidas, acrescidas de Na_2SO_4 , filtradas e concentradas em rotavapor até a obtenção de um extrato residual (86 mg). O fracionamento deste último por cromatografia flash em coluna (15 x 1,0 cm) de silicagel 60 (10 g) sob gradiente de eluição (Hex-AcOEt, 100–0%/0–100%) proporcionou o isolamento do derivado diacetilado da isococlioquinona A (**1.6**): óleo amarelo ($0,5 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ de extrato de AcOEt da cultura). $[\alpha]_{\text{D}}^{23} + 51^\circ$ (c 1,5 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, EtOH), lit. (produto natural não acetilado): $[\alpha]_{\text{D}}^{24} + 65^\circ$ (c 0,1, EtOH). **RMN de ^1H** (499,882 MHz, CDCl_3 , $\delta_{\text{TMS}} = 0,00$ ppm) δ 6,61 (s, 1 H, H-11), 5,09 (dd, 1 H, H-4), 3,32 (qtd, 1 H, $J = 7,4$, H-5), 3,23 (dd, 1 H, $J = 12,0$; 2,4, H-21), 3,11 (dd, 1 H, $J = 11,7$; 3,5, H-17), 2,65 (s, 1 H, H-13), 2,64 – 2,58 (m, 1 H, H-19a), 2,36 (s, 3 H, CH_3 -32), 2,33 (s, 3 H, CH_3 -34), 2,20 – 1,98 (m, 2 H, H-15), 1,99 (s, 3 H, CH_3 -30), 1,78 – 1,73 (m, 2 H, H-20), 1,68 – 1,74 (m, 1 H, H-16a), 1,68 – 1,62 (m, 1 H, H-3), 1,62 – 1,58 (m, 1 H, H-16b), 1,41 (s, 3 H, CH_3 -26), 1,24 - 1,22 (m, 1 H, H-19b), 1,19 (s, 3 H, CH_3 -23), 1,18 (s, 3 H, CH_3 -24), 1,18 (d, 3 H, $J = 7,0$; CH_3 -27), 1,16 – 1,12 (m, 2 H, H-2), 1,09 (s, 3 H, CH_3 -25), 0,92 (t, 3 H, $J = 7,4$; CH_3 -1), 0,90 (d, 3 H, $J = 6,7$; CH_3 -28). **RMN de ^{13}C** (125,695 MHz, CDCl_3 , $\delta_{\text{CDCl}_3} = 77,0$ ppm) δ 190,2 (C-12), 170,5 (C-29), 169,5 (C-31), 168,0 (C-33), 151,1 (C-10), 146,4 (C-8), 143,3 (C-6), 135,8 (C-7), 113,8 (C-11), 113,6 (C-9), 85,5 (C-21), 83,5 (C-17), 83,1 (C-14), 78,2 (C-4), 71,9 (C-22), 60,4 (C-13), 37,4 (C-15), 36,9 (C-19), 36,2 (C-3), 35,2 (C-18), 34,4 (C-5), 26,5 (C-2), 25,9 (C-24), 24,8 (C-16), 23,6 (C-23), 21,3 (C-20), 21,2 (C-26), 21,1 (C-32), 20,6 (C-30), 20,3 (C-34), 17,8 (C-27), 13,1 (C-28), 12,2 (C-25), 11,5 (C-1). **EM** (i.e. 70 eV, derivado acetilado) m/z (%) 616 (M^+ , 0), 601 (1), 574 (10), 532 (100), 472 (60), 457 (85), 179 (34).

5.2.4. Isolamento de substâncias antimicrobianas de *Curvularia*

5.2.4.1. E-desidrocurvularina (1.7) e curvularina (1.8)

Os extratos de AcOEt (500 mg) das culturas de *C. eragrostidis* CCT 5634 e de *C. pallescens* CCT 5654 em farelo de milho foram fracionados por cromatografia flash em coluna (40 × 2,5 cm) de sílicagel 60 (25 g) por gradiente de eluição (Hex-AcOEt, 100–0%/0-100%). As frações as quais sob luz UV₂₅₄ apresentaram constituintes escuros em torno de R_f = 0,5 (CCD/Hex-AcOEt 1:1) foram reunidas e purificadas por CCDP (Hex-AcOEt, 1:1, 2 ×) para fornecer as substâncias *E*-desidrocurvularina (1.7) e curvularina (1.8).



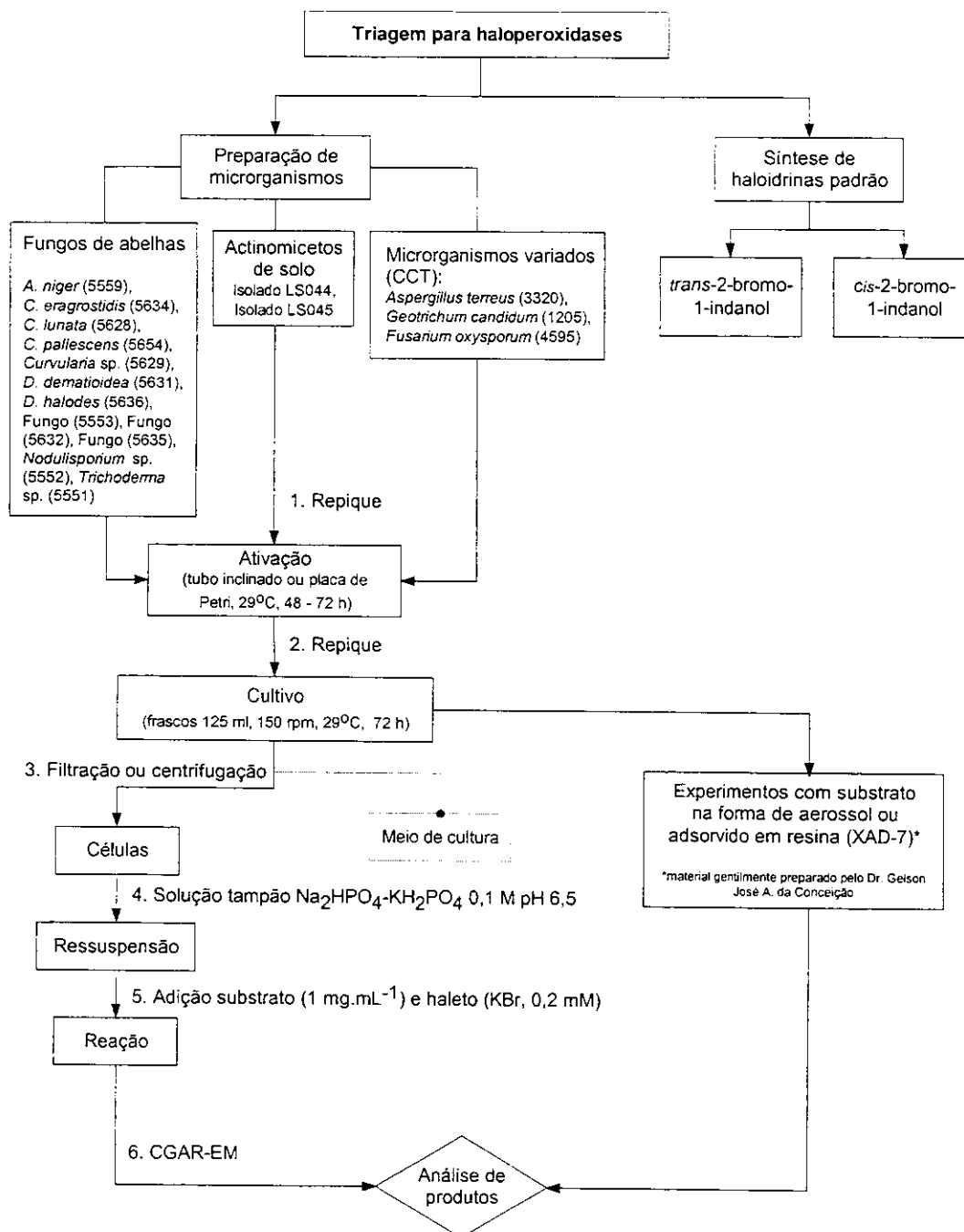
E-Desidrocurvularina (1.7): cristais incolores (*C. eragrostidis*: 0,15 mg.g⁻¹ de extrato de AcOEt da cultura, *C. pallescens*: 0,26 mg.g⁻¹ de extrato de AcOEt da cultura). $[\alpha]_D^{23} - 78^\circ$ (c 3,0, EtOH), lit.³¹ $[\alpha]_D^{20} - 66^\circ$ (c 1,8, EtOH). **CD** (MeOH) $\Delta\epsilon_{MAX} = -2,68$ (295 nm, c $1,7 \times 10^{-3}$ mol.L⁻¹). **RMN de ¹H** (499,882 MHz, CDCl₃, $\delta_{TMS} = 0,00$ ppm) δ : 12,38 (sl, 1 H, Ar-OH), 9,48 (sl, 1 H, Ar-OH), 6,76 (d, 1 H, $J = 15,4$, H-9), 6,55 (ddd, 1 H, $J = 15,4; 8,6; 4,9$, H-8), 6,34 (d, 1 H, $J = 2,5$, H-12), 6,29 (d, 1 H, $J = 2,5$, H-14), 4,91 – 4,84 (m, 1 H, H-4), 4,06 (d, 1 H, $J = 17,6$, H-1a), 3,59 (d, 1 H, $J = 17,6$, H-1b), 2,55 – 2,45 (m, 2 H, H-7), 2,40 – 2,30 (m, 2 H, H-7'), 2,05 - 1,95 (m, 1 H, H-6), 1,95 – 1,87 (m, 1 H, H-5), 1,85 – 1,70 (m, 1 H, H-6'), 1,70 – 1,60 (m, 1 H, H-5'), 1,25 (d, 3 H, $J = 6,6$, Me). **RMN de ¹³C** (125,695 MHz, CDCl₃, $\delta_{CDCl_3} = 77,0$ ppm) δ : 197,2 (C-10), 171,2 (C-2), 165,8 (C-13), 163,0 (C-13), 149,6 (C-8), 139,2 (C-15),

132,5 (C-9), 115,5 (C-16), 113,6 (C-12), 102,8 (C-14), 72,8 (C-4), 43,6 (C-1), 34,6 (C-5), 33,0 (C-7), 24,8 (C-6), 20,2 (C-17). **EM** (i.e. 70 eV, derivado sililado) m/z (%) 434 (M^+ , 6), 419 (64), 321 (100), 73 (28).

Curvularina (**1.8**): cristais incolores (*C. eragrostidis*: 0,19 mg.g⁻¹ de extrato de AcOEt da cultura; *C. pallescens*: 0,22 mg.g⁻¹ do extrato de AcOEt da cultura). $[\alpha]^{23}_D - 47^\circ$ (c 2,0 EtOH), lit.³⁸ $[\alpha]^{20}_D - 34^\circ$ (c 2,0, EtOH). **CD** (MeOH) $\Delta\epsilon_{MAX} = -3,77$ (326 nm, c $1,7 \times 10^{-3}$ mol.L⁻¹), lit.³⁸ $\Delta\epsilon_{MAX} = -2,77$ (326 nm)]. **RMN de ¹H** (300,068 MHz, CD₃OD, $\delta_{CD_3OD} = 3,3$ ppm) δ : 9,18 (sl, 1 H, Ar-OH), 8,77 (sl, 1 H, Ar-OH), 6,37 (d, 1 H, $J = 2,5$, H-12), 6,33 (d, 1 H, $J = 2,5$, H-14), 5,00 - 4,80 (m, 1 H, H-4), 3,77 (d, 1 H, $J = 15,4$, H-1a), 3,68 (d, 1 H, $J = 15,4$, H-1b), 3,08 (ddd, 1 H, $J = 2,9$; 8,5; 15,5, H-9), 2,74 (ddd, 1 H, $J = 2,9$; 9,5; 15,5 H-9'), 1,81-1,23 (m, 8 H, H-8, H-7, H-6, e H-5), 1,10 (d, 3 H, $J = 6,5$, Me). **RMN de ¹³C** (125,696 MHz, CD₃OD, $\delta_{CD_3OD} = 49$ ppm) δ : 206,1 (C-10), 170,4 (C-2), 159,5 (C-13), 157,6 (C-11), 136,3 (C-15), 120,7 (C-16), 111,6 (C-14), 101,9 (C-12), 71,9 (C-4), 43,3 (C-9), 39,1 (C-1), 32,2 (C-5), 26,8 (C-7), 23,9 (C-6), 22,8 (C-8), 19,9 (C-17). **EM** (i.e. 70 eV; derivado sililado) m/z (%) 436 (M^+ , 1), 421 (1), 339 (13), 323 (15), 295 (46), 73 (100).

5.3. Prospecção de biocatalisadores: haloperoxidases.

Fluxograma 2. Procedimento experimental geral.

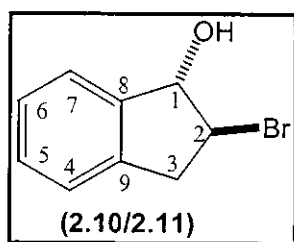


5.3.1. Síntese de halodrinas padrão

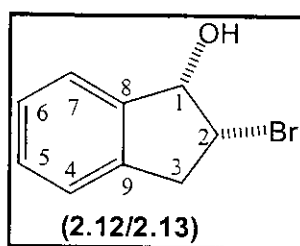
As reações foram realizadas com N-bromosuccinimida (NBS), de acordo com Guss e Rosenthal.

¹¹³ Adaptações foram introduzidas em relação à temperatura da reação.

5.3.1.1. *trans*-2-bromo-1-indanol (2.10/2.11)



A uma suspensão de NBS (1,6 g, 9 mmol) em H₂O destilada (30 mL), sob agitação, a 10°C, foram adicionados 2 mL de **2.6** (17 mmol). Ao final de 30 min, a reação foi interrompida por meio de extração com AcOEt (v/v, 3 x). As fases orgânicas foram combinadas, secas com Na₂SO₄ (anidro) e concentradas sob pressão reduzida. Posterior purificação por cromatografia flash em coluna de silicagel 60 e gradiente de eluição (Hex-AcOEt) forneceu **2.10/2.11** (sólido amarelo pálido, 0,6 mmol; 6%): **RMN de ¹H** (300,067 MHz, CDCl₃, δ_{TMS} = 0,00 ppm) δ 7,37 (t, 1 H, *J* = 4,2, H-5), 7,22 (d, 1 H, *J* = 4,2, H-7), 7,20 (d, 1 H, *J* = 4,2, H-4), 7,17 (t, 1 H, *J* = 4,2, H-6), 5,22 (d, 1 H, *J* = 5,4, H-1), 4,23 (ddd, 1 H, *J* = 7,3; 7,3; 5,8, H-2), 3,54 (dd, 1 H, *J* = 16,3; 7,3, H-3a), 3,16 (dd, 1 H, *J* = 16,3; 7,3, H-3b). **RMN de ¹³C** (75,45 MHz, CDCl₃, δ_{CDCl₃} = 77,0 ppm) δ 143,1 (C-9), 139,6 (C-8), 128,2 (CH), 127,1 (CH), 124,4 (CH), 124,2 (CH), 81,8 (C-1), 55,9 (C-2), 40,1 (C-3). **EM** (i.e. 70 eV) *m/z* (%) 214 (M⁺ + 2, 9), 212 (M⁺, 12), 133 (100), 115 (25), 103 (16), 77 (22). lit.¹¹⁴

5.3.1.2. *cis*-2-bromo-1-indanol (2.10/2.11)

A uma solução de **2.10/2.11** em acetona (8,6 mmol:20 mL) foi adicionado Reagente de Jones, recém preparado ($\text{CrO}_3 - \text{H}_2\text{SO}_4$ cc - H_2O , 2,6 g: 2,3 g: 10 mL), até observação de uma coloração marrom alaranjada persistente. A seguir, isopropanol foi adicionado lentamente a fim de eliminar o excesso de oxidante (é possível observar um sobrenadante incolor e um resíduo de tonalidade verde). O meio reacional foi neutralizado com NaHCO_3 , filtrado e concentrado sob pressão reduzida até máxima evaporação da acetona. A parte aquosa remanescente foi extraída com hexano (v/v, 3 x). As fases orgânicas foram combinadas, secas com Na_2SO_4 (anidro) e concentradas sob pressão reduzida (resíduo amarelo = 360 mg). A uma solução resfriada (0°C) do produto bruto em metanol (130 mg:2,0 mL) foi adicionado NaBH_4 (17 mg, 0,4 mmol). Após 2 h, o metanol foi evaporado, os componentes do meio reacional foram suspensos em AcOEt, filtrados e levado a secura em rotavapor. Posterior cromatografia flash em coluna de sílicagel sob eluição isocrática (CH_2Cl_2) forneceu **2.12/2.13** (sólido amarelo pálido, 75 mg, 0,35 mmol, 57%): **RMN de ^1H** (300,067 MHz, CDCl_3 , $\delta_{\text{TMS}} = 0,00$ ppm) δ 7,44 (d, 1 H, $J = 3,7$, H-7), 7,42 (d, 1 H, $J = 3,7$, H-4), 7,28 (t, 1 H, $J = 6,4$, H-5), 7,27 (t, 1 H, $J = 5,7$, H-6), 4,96 (d, 1 H, $J = 4,6$, H-1), (dt, 1 H, $J = 4,6; 4,6$; H-2), 3,41 (dd, 1 H, $J = 17; 4,9$, H-3a), 3,34 (dd, 1 H, $J = 17; 3,5$, H-3b). **RMN de ^{13}C** (75,45 MHz, CDCl_3 , $\delta_{\text{CDCl}_3} = 77,0$ ppm) δ 141,5 (C), 139,0 (C), 128,6 (CH), 127,3 (CH), 124,8 (CH), 124,5 (CH), 76,2 (CH-1), 60,7 (CH-2), 40,2 (CH₂-3). **EM** (i.e. 70 eV) m/z (%) 214 ($\text{M}^+ + 2$, 10), 212 (M^+ , 15), 133 (100), 115 (22), 103 (5), 77 (10). lit.¹¹⁵

5.3.2. Microrganismos

5.3.2.1. Fungos filamentosos

Os microrganismos foram incubados em extrato de malte-ágar, a 29°C, por 72 h. Cerca de 1 cm² das colônias desenvolvidas foram transferidos para frascos contendo extrato de malte, os quais foram incubados a 29°C, sob agitação (150 rpm), por 7 dias. Com exceção das culturas destinadas aos experimentos de biotransformação do indeno adsorvido em resina (XAD-7), as quais foram preparadas com 100 mL de meio (frascos de 250 mL), o volume de meio utilizados para as demais culturas foi 50 mL (frascos de 125 mL).

5.3.2.2. Actinomicetos

Os microrganismos foram incubados em placas de aveia (farelo de aveia 4 g.L⁻¹, agar 2 g.L⁻¹, H₂O), a 29°C, por 96-120 h. Cerca de 2 cm² das colônias desenvolvidas foram transferidos para frascos (125 mL) com extrato de levedura e malte (50 mL), os quais foram incubados a 29°C, 150 rpm, por 7 dias.

5.3.2.3. Archeas

Os microrganismos foram incubados em placas de meio hipertônico (ver item 2.2.6.1), a 29°C, por 72 h. Uma alçada das colônias desenvolvidas foi transferida para frascos (250 mL) com meio hipertônico (100 mL), os quais foram incubados a 29°C, a 150 rpm, por 7 dias.

5.3.3. Reações de biotransformação

5.3.3.1. Procedimento usual

As células obtidas por centrifugação (5000 x rcf, 18°C, 20 min) das culturas em meio líquido foram transferidas para frascos de 250 mL contendo 50 mL de

tampão fosfato de potássio 0,1 M pH 6,5. A estes foi adicionado KBr (0,2 mmol) e o substrato (0,2 mmol). Após incubação a 28°C, sob agitação (150 rpm), alíquotas de 500 µL foram periodicamente retiradas da mistura, extraídas com AcOEt (1:2, v/v), concentradas e analisadas.

5.3.3.2. Substrato em aerossol

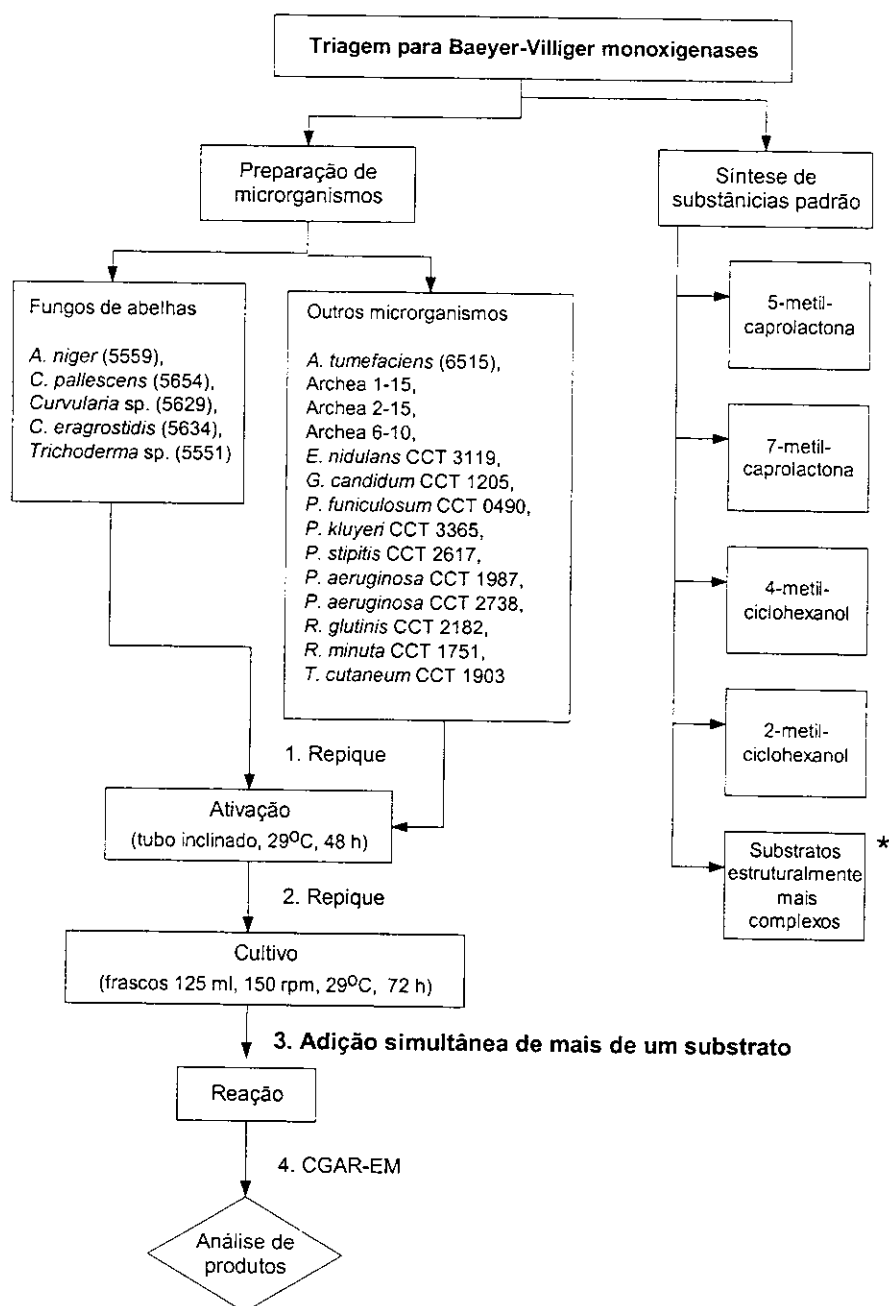
Os frascos de cultura foram colocados sobre placas de agitação magnética e aos mesmos foi adicionado KBr (25 mg). Um cilindro de ar sintético foi conectado à oliva de entrada de um dedo frio (à temperatura ambiente) contendo 2.6/H₂O (1:1, v/v) até o nível de contato com o ducto de entrada do fluxo de ar. O aerossol formado pelo borbulhamento deste último (0,2 L.min⁻¹) no substrato foi transferido aos frascos de cultura por meio da conexão, à oliva de saída do dedo frio, de uma cânula de silicone contendo uma pipeta Pasteur na extremidade relacionada à cultura. Alíquotas (500 µL) do meio reacional foram periodicamente retiradas, extraídas com 1,0 mL de uma solução de acetofenona em AcOEt (20 ppm) e analisadas por CGAR-EM.

5.3.3.3. Substrato adsorvido em resina

Às culturas foram adicionados KBr (25 mg) e 100 mg de indeno adsorvidos em 1,0 g de XAD-7 (preparado pelo Dr. Gelson J. A. da Conceição, pós-doutorando do Instituto de Química, Unicamp, sob supervisão do Prof. José Augusto Rosário Rodrigues). Os frascos foram incubados a 29°C, 150 rpm. Alíquotas (500 µL) do meio reacional foram periodicamente retiradas, extraídas com 1,0 mL de uma solução de acetofenona em AcOEt (20 ppm) e analisadas por CGAR-EM.

5.4. Prospecção de biocatalisadores: Baeyer-Villiger monoxigenases.

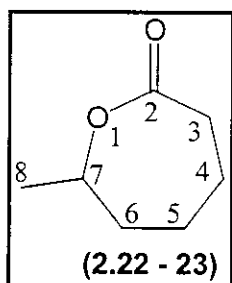
Fluxograma 3. Procedimento experimental geral.



*Materiais preparados no Departamento de Química Orgânica, IQ, UNICAMP, pelos doutorandos Marcelo Vaile (Prof. Carlos Roque Corrêa), Antonio Batista (Prof. Carlos Roque Corrêa), Nelson Henriques (Prof. Lúcia Baptistella), e pela graduanda Valdirene S. Teixeira (Prof. Cláudio Herrera).

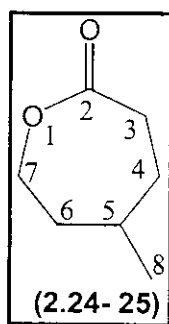
5.4.1. Síntese de substâncias padrão

5.4.1.1. 7-metil- ϵ -caprolactona (2.22-23)



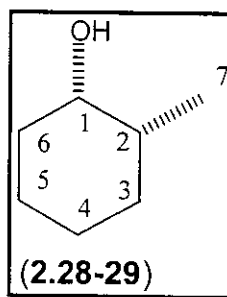
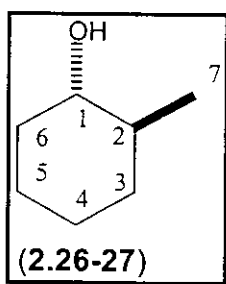
A uma solução resfriada (0°C) de 2-metil-cicloexanona (0,2 mL; 1,8 mmoles) em diclorometano (10 mL), sob agitação, foi adicionado NaHCO₃ (500 mg; 6,0 mmoles) e, após 5 min, ácido *meta*-cloroperbenzóico (500 mg; 3,0 mmoles). Após 12 h, a mistura reacional foi consecutivamente lavada com soluções saturadas de NaHCO₃ (20 mL, 2 x), NaHSO₃ (20 mL, 2 x) e com H₂O destilada (20 mL, 2 x). A fase orgânica foi seca com Na₂SO₄ (anidro) e concentrada sob pressão reduzida. Posterior purificação por cromatografia flash em coluna de sílicagel e eluição por gradiente (Hex-AcOEt, 9:1-1:1) forneceu **2.22-23** (óleo incolor, 0,16 mL, 1,4 mmoles, 80%): **RMN de ¹H** (300,067 MHz, CDCl₃, $\delta_{TMS} = 0,00$ ppm) δ 4,46 – 4,37 (m, 1 H, H-7), 2,63 – 2,57 (m, 2 H, H-3), 1,93 – 1,83 (m, 2 H, H-4_{eq}/6_{eq}), 1,64 – 1,50 (m, 1 H, H-4_{ax}/6_{ax}), 1,32 (3 H, d, $J = 6,48$, H-8). **RMN de ¹³C** (75,45 MHz, CDCl₃, $\delta_{TMS} = 0,00$ ppm) δ 175,3 (C-2), 76,6 (C-7), 36,2 (C-3), 34,9 (C-6), 28,2 (C-4), 22,9 (C-5), 22,5 (C-8). lit.¹¹⁶

5.4.1.2. 5-metil- ϵ -caprolactona (2.24-25)



A aplicação do procedimento experimental descrito no item 2.3.5.2.1. à oxidação da 4-metil-ciclohexanona forneceu **2.24-25** (óleo incolor, 70%): **RMN de ^1H** (300,067 MHz, CDCl_3 , $\delta_{\text{TMS}} = 0,00$ ppm) δ 4,28 (dd, 1 H, $J = 12,6$; 2,2, H-7_{eq}), 4,15 (dd, 1 H, $J = 12,6$; 10,6, H-7_{ax}), 2,72 – 2,56 (m, 2 H, H-3), 1,98-1,69 (m, 3 H, H-4/H-5), 1,56-1,26 (m, 2 H, H-6). **RMN de ^{13}C** (75,45 MHz, CDCl_3 , $\delta_{\text{CDCl}_3} = 77,0$ ppm) δ 175,8 (C-2), 68,1 (CH_2 -7), 37,3 (CH_2 -3), 35,3 (CH_2 -5), 33,2 (CH_2 -6), 30,8 (CH_2 -4), 22,2 (CH_3 -8).

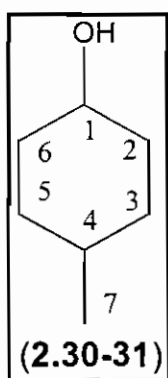
5.4.1.3. 2-metil-ciclohexanol (2.26-27, 2.28-29)



A uma solução resfriada (0°C) de 2-metil-ciclohexanona (500 mg; 4,5 mmoles) em metanol (10 mL) foi adicionado NaBH_4 (170 mg, 4,5 mmol). Após 2 h sob agitação, o metanol foi evaporado, os componentes do meio reacional foram suspensos em AcOEt , filtrados e concentrados sob pressão reduzida. Uma mistura (0,7 : 1,0) dos álcoois **2.26-27** e **2.28-29** foi obtida como um óleo incolor (350 mg,

~70%): **RMN de ^1H** (300,067 MHz, CDCl_3 , $\delta_{\text{TMS}} = 0,00$ ppm) δ 3,77 (ddd, 1 H, $J = 5,2$; 2,6; 2,6, H-1_{2.28-29}), 3,09 (ddd, 1 H, $J = 9,8$; 9,8; 4,3, H-1_{2.26-27}), 1,99 – 1,09 (m, 18 H, H-2-6_{2.26-29}), 1,00 (d, 3 H, $J = 6,6$, Me_{2.26-27}), 0,94 (d, 3 H, $J = 6,9$, Me_{2.28-29}). **RMN de ^{13}C** (75,45 MHz, CDCl_3 , $\delta_{\text{CDCl}_3} = 77,0$ ppm) δ 76,5 (C-1_{2.26-27}); 40,2 (C-2_{2.26-27}); 35,4 (C-6_{2.26-27}); 33,6 – 25,6 – 25,2 (CH_2 2.26-27); 18,5 (C-7_{2.26-27}); 71,1 (C-1_{2.28-29}); 35,8 (C-2_{2.28-29}); 32,5 (C-6_{2.28-29}); 28,7 – 24,5 – 20,6 (CH_2 2.28-29); 16,9 (C-7_{2.28-29}). lit.¹¹⁷

5.4.1.4. 4-metil-ciclohexanol (2.30-31)



A aplicação do procedimento experimental descrito no item 2.3.5.2.3. à redução da 4-metil-ciclohexanona forneceu **2.30-31** (óleo incolor, 127 mg; 1,1 mmoles, 25%): **RMN de ^1H** (300,067 MHz, CDCl_3 , $\delta_{\text{TMS}} = 0,00$ ppm) δ 3,52 (tt, 1 H, $J = 10,8$; 4,3, H-1), 1,98 – 1,88 (m, 2 H, H-2_{eq}/H-6_{eq}), 1,74 – 1,65 (m, 2 H, H-2_{ax}/H-6_{ax}), 1,40 – 1,18 (m, 3 H, H-4, H-3_{eq}/H-5_{eq}), 1,04 - 0,86 (m, 2 H, H-3_{ax}/H-5_{ax}), 0,87 (d, 3 H, $J = 6,59$, H-7). **RMN de ^{13}C** (75,45 MHz, CDCl_3 , $\delta_{\text{TMS}} = 77,0$ ppm) δ 70,9 (CH-1), 35,6 (CH_2 -2/6), 33,4 (CH_2 -3/5), 31,8 (CH-4), 21,9 (CH_3 -7).

5.4.5. Cultivo de microrganismos

5.4.5.1. Archeas

As archeas foram incubadas em meio hipertônico-ágar a 29°C, por 72 h. Uma alçada das colônias desenvolvidas foi transferida para frascos (150 mL) com meio hipertônico (50 mL), os quais foram incubados a 29°C, 150 rpm, por 72 h.

5.4.5.2. Bactérias

As bactérias foram incubadas em caldo nutriente-ágar a 29°C, 24 h. Uma alçada das colônias desenvolvidas foi transferida para frascos (150 mL) de caldo nutriente (50 mL), os quais foram incubados a 29°C, 150 rpm, por 72 h.

5.4.5.3. Leveduras

As leveduras foram inoculadas em extrato de levedura-malte e incubadas a 29°C, por 48 h. Uma alçada das colônias desenvolvidas foi transferida para frascos (150 mL) de extrato de levedura-malte (50 mL), os quais foram incubados a 29°C, 150 rpm, por 72 h.

5.4.5.4. Fungos filamentosos

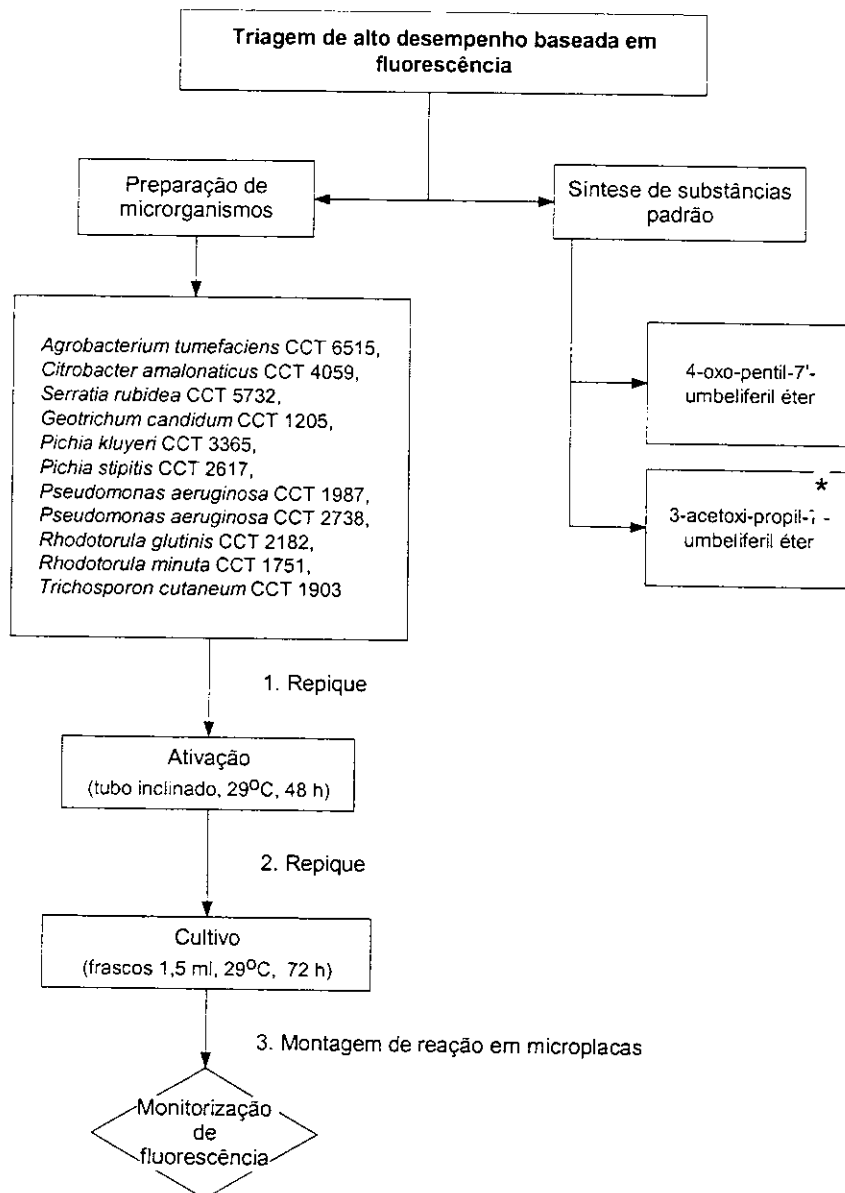
Os fungos foram incubados em extrato de malte-ágar a 29°C, por 72 h. Cerca de 2 cm² das colônias desenvolvidas foram transferidos para frascos (150 mL) com extrato de malte (50 mL), os quais foram incubados a 29°C, 150 rpm, por 72 h.

5.4.6. Reações de biotransformação simultâneas

As reações foram realizadas com células em crescimento a partir da adição simultânea de 2-metil-cicloexanona (**2.20**) e 4-metil-cicloexanona (**2.21**) (1:1, 1,2 mg.mL⁻¹) às culturas microbianas. Aliquotas (2 mL) do meio reacional foram periodicamente retiradas, extraídas com 10 mL de uma solução de acetofenona em AcOEt (50 ppm) e analisadas por CGAR-EM.

5.5. Triagem de alto desempenho

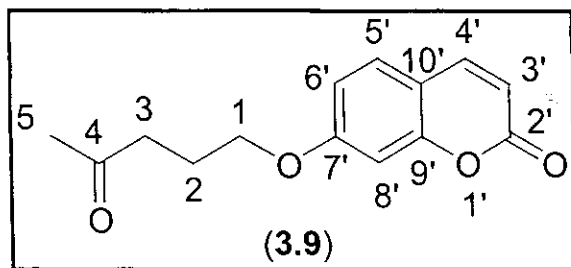
Fluxograma 4. Procedimento experimental geral.



*Substância preparada no Departamento de Química Orgânica, IQ, UNICAMP, pela doutoranda Lu Shi Chen (Profa. Anita Jocelyne Marsaioli).

5.5.1. Síntese de substâncias padrão

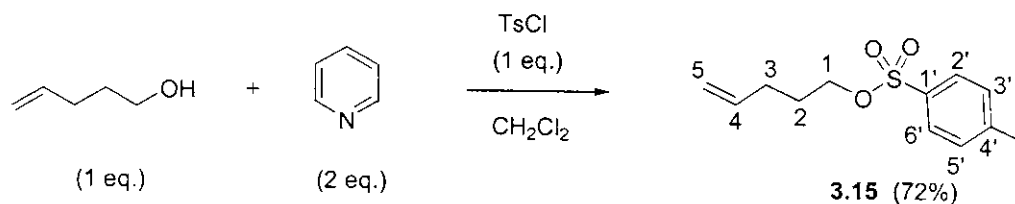
5.5.1.1. 4-oxo-pentil-7'-umbeliferil éter (3.9)



A substância **3.9** foi sintetizado em 3 etapas, respectivamente baseadas em Ren *et al.*,¹¹⁸ Klein e Reymond (1999)¹¹⁴ e Tsuji *et al.*¹¹⁹

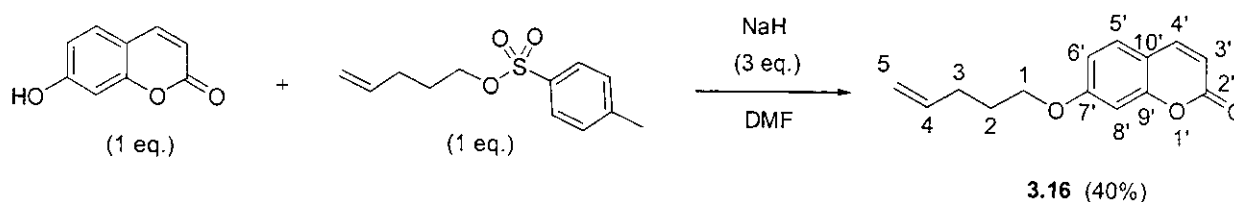
Inicialmente (Esquema 3.2), a uma solução de 4-penten-1-ol (430,6 mg, 5 mmol) em CH₂Cl₂ (5 mL), a 0°C, foi adicionado piridina (791 mg, 10 mmol) e cloreto de *p*-toluenosulfonila (1.045 mg, 5 mmol). A mistura reacional foi mantida em agitação à temperatura ambiente por 12 h, vertida em solução de HCl 5% (10 mL), e extraída com CH₂Cl₂ (3 × 10 mL). As fases orgânicas foram combinadas, secas com MgSO₄ e concentradas por evaporação do solvente. A cromatografia da mistura bruta em coluna (10 × 2,5 cm) de silicagel (230 – 400 mesh) com Hex, até eluição total do ácido meta-cloro-perbenzóico remanescente, seguido de Hex-AcOEt (8:2) forneceu 861,7 mg (3,6 mmol, 72%) do 1-tosilato de 4-pentenila (**3.15**) como um óleo incolor: **RMN de ¹H** (300,067 MHz, CDCl₃, δ_{TMS} = 0,00 ppm) δ 7,79 (d, 2 H, *J* = 8,4, H-2'/H-6'), 7,35 (d, 2 H, *J* = 8,1, H-3'/H-5'), 5,70 (ddt 1 H, *J* = 17,2, 9,9, 6,6, H-4), 4,04 (t, 2 H, *J* = 6,5, H-1), 2,46 (s, 3 H, Me), 2,09 (ddd 2 H, *J* = 14,4, 7,3, 1,1, H-3), 1,80 - 1,70 (m, 2 H, H-2). **RMN de ¹³C** (75,45 MHz, CDCl₃, δ_{CDCl3} = 77,0 ppm) δ 144,5 (C-4'), 141,5 (C-1'), 136,4 (CH-4), 129,6 (CH-3'/CH-5'), 115,7 (CH₂-5), 69,7 (CH₂-1), 29,4 (CH₂-3), 28,1 (CH₂-2), 21,6 (Me).

Esquema 3.2

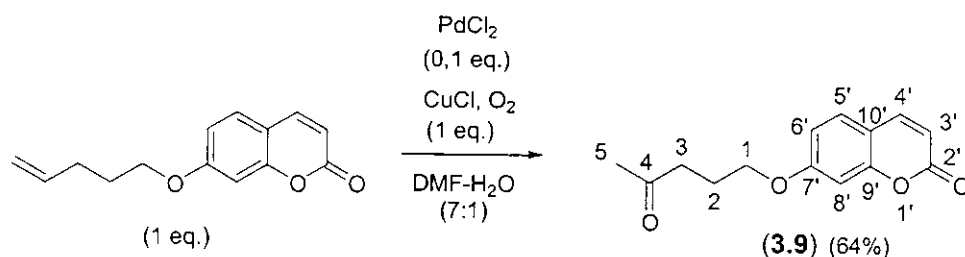


Posteriormente (Esquema 3.3), **3.15** (840 mg, 3,5 mmol) foi lentamente adicionado a uma mistura de umbeliferona (570 mg, 3,5 mmol) e NaH (400 mg de suspensão a 60% em óleo mineral, 10 mmol) em DMF (15 mL). A mistura reacional foi mantida em agitação à temperatura ambiente por 24 h, diluída com AcOEt e lavada sucessivamente com água e solução de NaOH 5%. A secagem da fase orgânica com MgSO₄, seguida da evaporação do solvente forneceu uma mistura bruta de coloração amarelo-pardo cuja purificação por cromatografia em coluna de sílicagel (10 × 2,5 cm) utilizando gradiente Hex-AcOEt forneceu 322 mg (1,4 mmol, 40%) do 4-pentenil-7'-ulbeliferil éter (**3.16**) como um sólido incolor. **RMN de ¹H** (300,067 MHz, CDCl₃, δ_{TMS} = 0,00 ppm) δ 7,62 (d, 1 H, *J* = 9,4, H-4'), 7,35 (d, 1 H, *J* = 8,5, H-5'), 6,82 (dd 1 H, *J* = 8,5, 2,2, H-6'), 6,78 (d, 1 H, 2,2, H-8'), 6,22 (d, 1 H, *J* = 9,4, H-3'), 5,84 (ddt, 2 H, *J* = 16,9, 10,3, 6,7, 6,7, H-4), 5,06 (dd 1 H, *J* = 17,0, 1,8, H-5a), 5,01 (dd 1 H, *J* = 10,3, 1,8, H-5b), 2,24 (dd, 2 H, *J* = 14,0, 7,0, H-3), 1,94 – 1,88 (m, 2 H, H-2). **RMN de ¹³C** (75,45 MHz, CDCl₃, δ_{CDCl₃} = 77,0 ppm) δ 162,1 (C-2'), 161,0 (C-7'), 155,6 (C-9'), 143,2 (CH-4'), 137,2 (CH-4), 128,5 (CH-5'), 115,4 (CH₂-5), 112,8 (CH-6'), 112,7 (CH-3'), 112,3 (C-10'), 101,2 (CH-8'), 67,7 (CH₂-1), 29,9 (CH₂-3), 28,1 (CH₂-2).

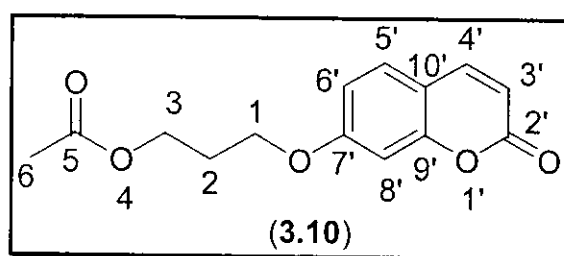
Esquema 3.3



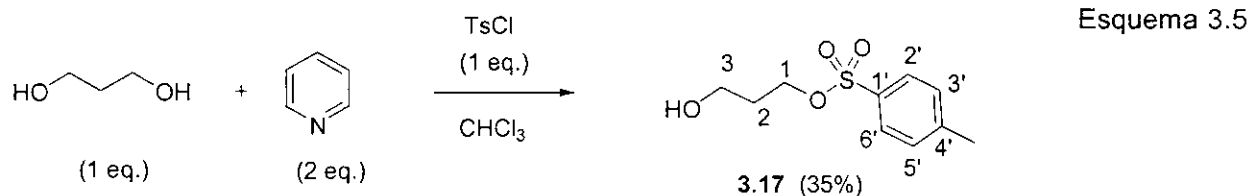
Finalmente (Esquema 3.4), O₂ foi borbulhado em uma mistura de cloreto de paládio (12,1 mg, 0,07 mmol) e cloreto cuproso (68,3 mg, 0,69 mmol), em DMF-H₂O (5 mL, 7:1). A mistura reacional foi mantida em agitação à temperatura ambiente até a solução inicialmente negra tornar-se gradualmente verde escura devido à absorção do O₂. A olefina **3.16** (160 mg, 0,69 mmol) foi adicionada lentamente e a mistura foi agitada vigorosamente sob um balão de O₂. Após 24 h, a mistura foi vertida em HCl 5% (10 mL) e extraída com AcOEt (3 × 25 mL). As fases orgânicas foram combinadas e sucessivamente lavadas com solução saturada de bicarbonato de sódio (50 mL) e solução saturada de cloreto de sódio (50 mL). Secagem da fase orgânica com MgSO₄ e posterior evaporação do solvente forneceu uma mistura bruta cuja purificação por cromatografia flash (Hex-AcOEt, 9:1) em coluna de sílicagel (10 × 1,5) forneceu 109,8 mg (0,44 mmol, 64%) do 4-oxo-pentil-7'-ulbeliferil éter (**3.9**) como um sólido incolor. **RMN de ¹H** (300,067 MHz, CDCl₃, δ_{TMS} = 0,00 ppm) δ 7,62 (d, 1 H, *J* = 9,5, H-4'), 7,35 (d, 1 H, *J* = 8,2, H-5'), 6,80 (dd, 1 H, *J* = 8,2; 2,5, H-6'), 6,76 (d, 1 H, *J* = 1,8, H-8'), 6,22 (d, 1 H, *J* = 9,5, H-3'), 4,02 (t, 2 H, *J* = 6,0, H-1), 2,66 (t, 2 H, *J* = 7,1, H-3), 2,17 (s, 3 H, H-5), 2,08 (2 H, *qt*, *J* = 6,6, H-2). **RMN de ¹³C** (75,45 MHz, CDCl₃, δ_{CDCl₃} = 77,0 ppm) δ 207,5 (C-4), 161,8 (C-7'), 160,9 (C-2'), 155,5 (C-9'), 143,2 (CH-4'), 128,6 (CH-5'), 112,9 (CH-6'), 112,5 (CH-3'), 112,4 (C-10'), 101,3 (CH-8'), 67,4 (CH₂-1), 39,6 (CH₂-3), 30,1 (CH₂-2), 23,0 (CH₃-5). **EM** (i.e. 70 eV) *m/z* (%) 246 (M⁺, 5), 162 (7), 134 (31), 85 (100), 43 (75).



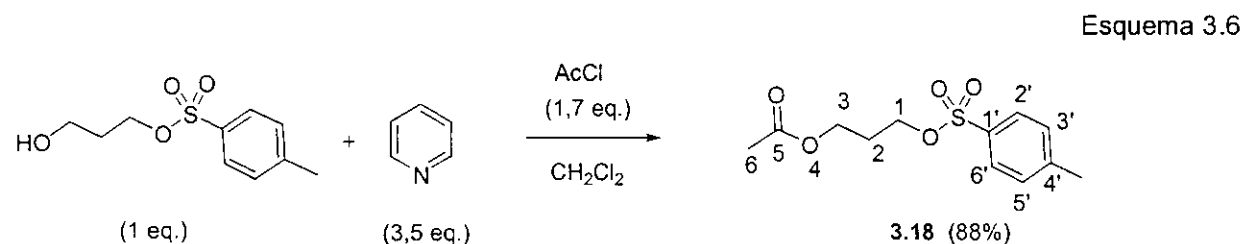
5.5.1.2. 3-acetoxi-propil-7'-umbeliferil éter (3.10)



Conforme descrito pela doutoranda Lu S. Chen, a substância **3.10** foi sintetizada em 3 etapas. Inicialmente (Esquema 3.5), a uma solução resfriada (0°C) de 1,3-propanodiol (1,14 g, 15 mmoles) em CHCl₃ (15 mL) foi adicionado piridina (2,4 mL, 30 mmoles). A seguir, cloreto de *p*-tolueno sulfonila (2,86 g, 15 mmoles) foi adicionado lentamente ao balão de reação sob agitação constante. Após 3 h, a mistura reacional foi extraída com CH₂Cl₂ (50 mL) e sucessivamente lavada com soluções de HCl 5% (10 mL), NaHCO₃ 5% (10 mL) e H₂O destilada (10 mL). A fase orgânica foi seca com Na₂SO₄ anidro e concentrada em rotavapor. Cromatografia flash em coluna de silicagel forneceu 1,21 g (5,3 mmoles, 35%) do 3-hidróxi-propil *p*-toluenosulfonil éter (**3.17**) como um óleo incolor. **RMN de ¹H** (300,067 MHz, CDCl₃, δ_{TMS} = 0,00 ppm) δ 7,79 (d, 2 H, *J* = 8,1, H-2'/H-6'), 7,35 (d, 2 H, *J* = 8,1, H-3'/H-5'), 4,17 (ddd, 2 H, *J* = 6,1, 6,1, 2,2, H-1), 3,71 – 3,67 (m, 2 H, H-3), 2,45 (s, 3 H, Me), 2,25 (sl, 1 H, OH), 1,93 – 1,83 (m, 2 H, H-2). **RMN de ¹³C** (75,45 MHz, CDCl₃, δ_{CDCl3} = 77,0 ppm) δ 144,7 (C-4'), 132,7 (C-1'), 129,7 (CH-3'/CH-5'), 127,7 (CH-2'/CH-6'), 67,5 (CH₂-3), 58,2 (CH₂-1), 31,7 (CH₂-2), 21,7 (Me).



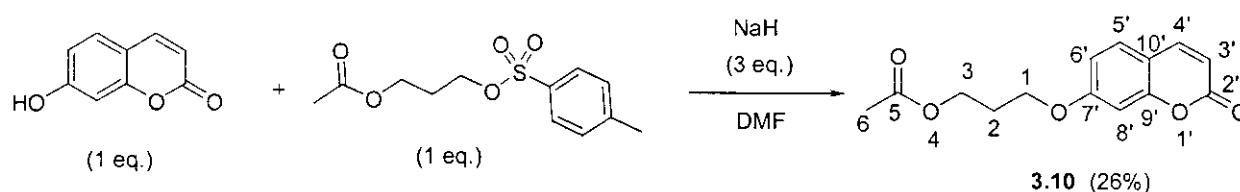
Posteriormente (Esquema 3.6), a uma solução resfriada (0°C) de **3.17** (1,15 g, 5 mmoles) e piridina (1,5 mL, 17,5 mmoles) em CH₂Cl₂ (6 mL), sob agitação, foi adicionado cloreto de acetila (0,69 g, 8,5 mmoles) lentamente. Após 30 min, éter etílico (25 mL) e AcOEt (50 mL) foram adicionados à mistura reacional. A seguir, a mistura foi sucessivamente lavada com soluções de NaHCO₃ saturada (10 mL, 2 ×), CuSO₄ (10 mL, 3 ×), H₂O destilada (10 mL) e NaCl saturada (10 mL). A fase orgânica foi seca com Na₂SO₄ anidro e concentrada em rotavapor. Cromatografia flash em coluna de silicagel forneceu 1,20 g (4,4 mmoles, 88%) do 3-acetoxi-propil-*p*-toluenosulfonil éter (**3.18**) como um sólido branco. **RMN de ¹H** (300,067 MHz, CDCl₃, δ_{TMS} = 0,00 ppm) δ 7,79 (d, 2 H, *J* = 8,1, H-2' e H-6'), 7,35 (d, 2 H, *J* = 8,1, H-3' e H-5'), 4,16 – 4,05 (m, 4 H, H-1 e H-3), 2,45 (s, 3 H, Me), 2,04 – 1,94 (m, 2 H, H-2), 1,97 (s, 3 H, H-6). **RMN de ¹³C** (75,45 MHz, CDCl₃, δ_{CDCl₃} = 77,0 ppm) δ 170,4 (C-5), 144,6 (C-4'), 132,7 (C-1'), 129,7 (C-3' e C-5'), 127,7 (C-2' e C-6'), 143,1 (CH-4'), 66,7 (CH₂-3), 60,1 (CH₂-1), 28,2 (CH₂-2), 21,7 (Me), 20,8 (CH₃-6).



Finalmente (Esquema 3.7), a uma suspensão refrigerada (0°C) de NaH (60% em parafina, 0,62 g, 12 mmoles) em DMF, sob agitação, foi adicionado lentamente

uma solução de umbeliferona (0,66 g, 4,1 mmoles) em DMF (24 mL). Após 30 min, uma solução de **3.18** (1,06 g, 3,9 mmoles) em DMF (10 mL) foi adicionada lentamente ao meio reacional e a temperatura foi elevada a 60°C. Após 48 h, o solvente (DMF) foi removido através de destilação à vácuo. A mistura reacional foi adicionado AcOEt (100 mL) e a suspensão obtida foi lavada com NaOH 5% (10 mL) e H₂O destilada (10 mL, 2 ×), sucessivamente. A fase orgânica foi seca com Na₂SO₄ anidro e concentrada em rotavapor. Cromatografia flash em coluna de silicagel forneceu 0,26 g (1,0 mmol, 26%) do 3-acetoxi-propil umbeliferil éter (**3.10**) como um sólido levemente amarelado. **RMN de ¹H** (300,067 MHz, CDCl₃, δ_{TMS} = 0,00 ppm) δ 7,64 (d, 1 H, J = 9,3, H-4'), 7,37 (d, 1 H, J = 8,4, H-5'), 6,84 (dd, 1 H, J = 8,4; 2,4, H-6'), 6,80 (d, 1 H, J = 2,4, H-8'), 6,25 (d, 1 H, J = 9,3, H-3'), 4,27 (t, 2 H, J = 6,2, H-3), 4,11 (t, 2 H, J = 6,2, H-1), 2,16 (qt, 2 H, J = 6,2, H-2), 2,07 (s, 3 H, H-6). **RMN de ¹³C** (75,45 MHz, CDCl₃, δ_{CDCl₃} = 77,0 ppm) δ 170,7 (C-5), 161,7 (C-7'), 160,9 (C-2'), 155,6 (C-9'), 143,2 (CH-4'), 128,6 (CH-5'), 113,0 (CH-3'), 112,7 (CH-6'), 112,5 (C-10'), 101,2 (CH-8'), 64,9 (CH₂-1), 60,9 (CH₂-3), 28,4 (CH₂-2), 21,0 (CH₃-6).

Esquema 3.7



5.5.2. Microrganismos

As leveduras (*Pichia kluyeri* CCT 3365, *Pichia stipitis* CCT 2617, *Rhodotorula glutinis* CCT 2182, *Rhodotorula minuta* CCT 1751 e *Trichosporon cutaneum* CCT 1903), bactérias (*Agrobacterium tumefaciens* CCT 6515, *Citrobacter amalonaticus* CCT 4059, *Pseudomonas aeruginosa* CCT 1987, *Pseudomonas aeruginosa* CCT 2738 e *Serratia rubidea* CCT 5732) e fungos (*Geotrichum candidum* CCT 1205)

foram cultivados por 72 h, a 25°C, em frascos *eppendorf* de 1,5 mL contendo ágar-YM (leveduras e fungo) e ágar-nutriente (bactérias).

As colônias desenvolvidas foram removidas com o auxílio de uma espátula e transferidas para um frasco estéril, onde foram pesadas (o peso obtido foi registrado como peso úmido). Previamente à realização dos ensaios, foi adicionado às células quantidade suficiente de solução tampão borato 20 mM pH 8,8 ou de solução tampão fosfato 20 mM pH 6,5 para preparação de suspensões à concentração de 0,2 mg.mL⁻¹.

5.5.3. Avaliações preliminares

Todos os experimentos foram montados em microplacas de polipropileno com 96 cavidades e o acompanhamento dos mesmos foi realizado por leitura de fluorescência (item 3.4.7.1.). O aumento dos sinais de fluorescência nos sistemas testados foi relacionado à liberação de **3.8** no meio reacional. Todos os ensaios foram realizados em duplicatas.

5.5.3.1. Estabilidade de **3.9** nas condições do ensaio

A estabilidade de **3.9** nas condições de pH da triagem de Reymond foi avaliada por meio da leitura dos sinais de fluorescência provenientes de uma mistura composta por 10 µL de uma solução de **3.9** a 2 mM em H₂O – MeCN (1:1) e 190 µL de solução tampão borato 20 mM pH 8.8. A estabilidade de **3.9** frente aos demais reagentes envolvidos na triagem de Reymond foi avaliada por meio da leitura dos sinais de fluorescência provenientes de uma mistura composta por 10 µL de uma solução de **3.9** a 2 mM em H₂O – MeCN (1:1) e 190 µL de solução tampão borato 20 mM pH 8.8 contendo BSA (2 mg/mL), HLADH (50 µg/mL) e NAD⁺ (1 mM).

5.5.3.2. Oxidação de 3.11 por HLADH/NAD⁺

A oxidação de 3.11 pela enzima HLADH, nas condições da triagem de Reymond, foi avaliada por meio da leitura dos sinais de fluorescência provenientes de uma mistura composta por 10 μL de uma solução de 3.11 a 2 mM em H_2O – MeCN (1:1) e 190 μL de solução tampão borato 20 mM pH 8.8 contendo BSA (2 mg/mL), HLADH (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e NAD^+ (1 mM). Reações controle foram realizadas à semelhança, retirando a HLADH da composição da solução descrita acima.

5.5.3.3. Concentração do biocatalisador

A concentração adequada de células microbianas para realização do ensaio foi determinada por meio da leitura dos sinais de fluorescência provenientes de misturas compostas por 10 μL de uma solução de 3.5 a 2 mM em H_2O – MeCN (1:1), 80 μL de solução tampão borato 20 mM pH 8,8 contendo BSA (4 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$), 10 μL de solução aquosa de NaIO_4 a 20 mM e 100 μL de diferentes concentrações de suspensões de *Rhodotorula glutinis* CCT 2182 (10 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, 2 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ e 0,2 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$). Reações controle foram realizadas à semelhança, porém substituindo a suspensão de células microbianas por solução tampão.

5.5.4. Triagem para epóxido-hidrolases

As reações foram realizadas em microplacas de polipropileno com 96 cavidades. A 10 μL das soluções dos substratos 3.4 e 3.12 a 2 mM (H_2O – MeCN, 1:1) foram adicionados 80 μL de uma solução de BSA a 40 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ em tampão borato 20 mM pH 8,8 e 100 μL das suspensões de células microbianas a 0,2 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ em solução tampão (borato 20 mM pH 8,8). Finalmente foram adicionados 10 μL de uma solução aquosa de NaIO_4 a 20 mM.

5.5.5. Triagem para Baeyer-Villiger-monoxigenases

As reações foram realizadas em microplacas de polipropileno com 96 cavidades. A 10 μL de uma solução do substrato **3.9** a 2 mM (H_2O – MeCN, 1:1) foram adicionados, sucessivamente, 90 μL de uma mistura de BSA (4 mg.mL^{-1}), HLADH (100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) e NAD^+ (2mM) em solução tampão borato 20 mM pH 8,8 e 100 μL das suspensões de células microbianas a 0,2 mg.mL^{-1} em solução tampão (borato 20 mM pH 8,8).

5.5.6. Acompanhamento das reações

5.5.6.1. Medidas de fluorescência

O acompanhamento das reações de biotransformação foi realizado por meio de um leitor de fluorescência (*Cytofluor-II*, Perseptive Biosystems) utilizando filtros de λ_{ex} 360 ± 20 nm e λ_{em} 460 ± 20 nm.

5.5.6.2. Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

Complementarmente, os produtos das reações de biotransformação foram analisados por CLAE (Shimadzu SCL-10AVP), em coluna Chromolith Speed Rod RP-18e 5.0 - 4.6 mm (Merck), utilizando gradiente de 100%A a 100%B (A = H_2O + 0,1% ácido trifluoroacético e B = 60% MeCN + 40%A), a 3 mL.min^{-1} . Os produtos derivados de umbeliferona foram seletivamente detectados a 320 nm.

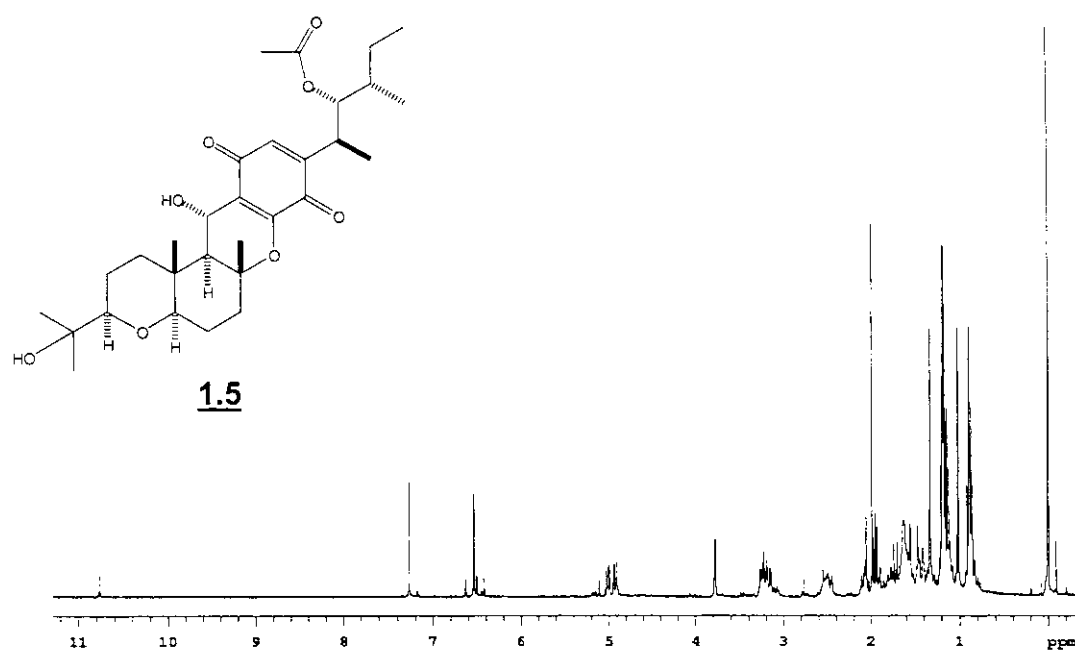


Figura 5.1. Espectro de RMN de ^1H (300,068 MHz, CDCl_3 , $\delta_{\text{TMS}} = 0,00$ ppm) de **1.5**

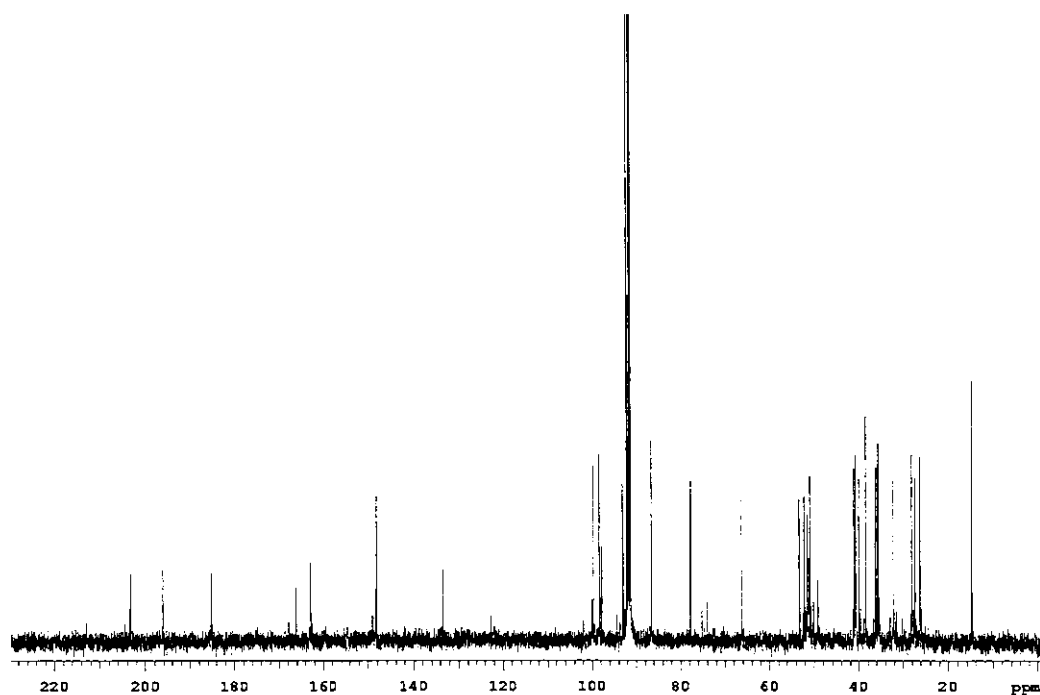


Figura 5.2. Espectro de RMN de ^{13}C (75,425 MHz, CDCl_3 , $\delta_{\text{CDCl}_3} = 77,0$ ppm) de **1.5**

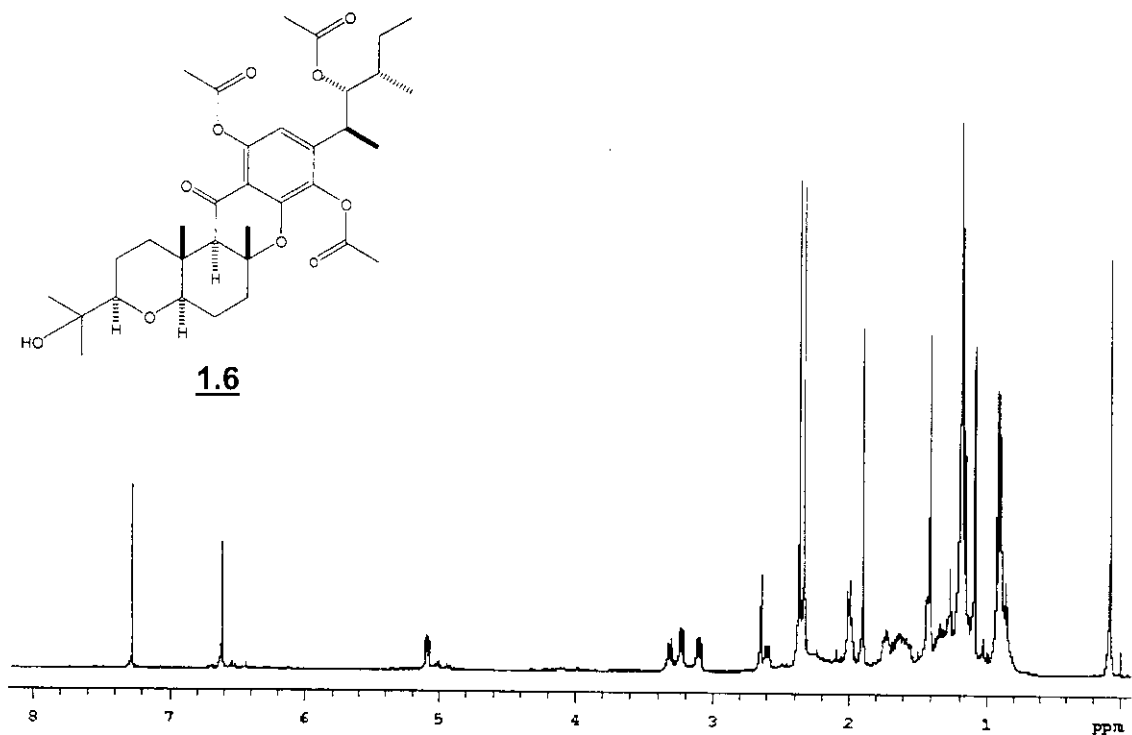


Figura 5.3. Espectro de RMN de ^1H (300,068 MHz, CDCl_3 , $\delta_{\text{TMS}} = 0,00$ ppm) de **1.6**

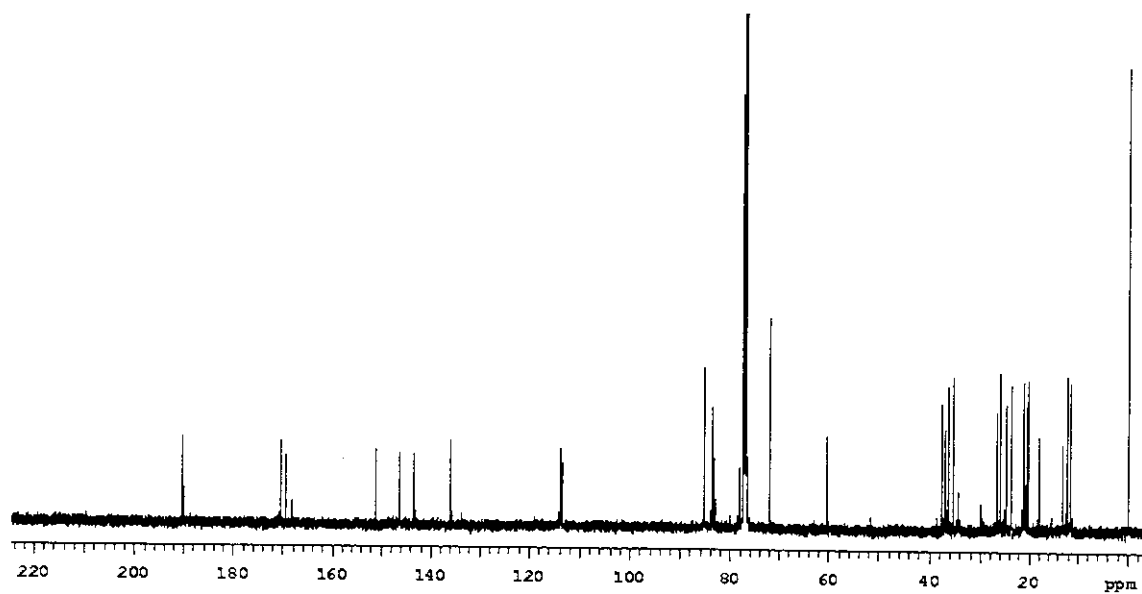


Figura 5.4. Espectro de RMN de ^{13}C (75,425 MHz, CDCl_3 , $\delta_{\text{CDCl}_3} = 77,0$ ppm) de **1.6**

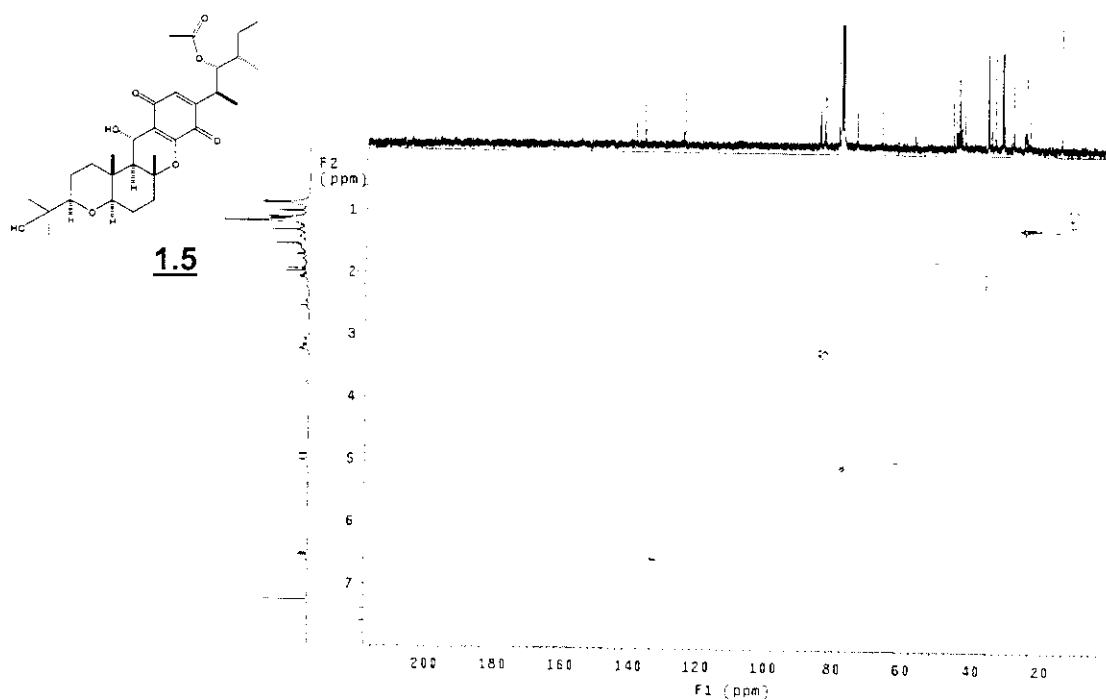


Figura 5.5. Espectro de RMN-2D (^1H , ^{13}C -HSQC, CDCl_3) de **1.5**

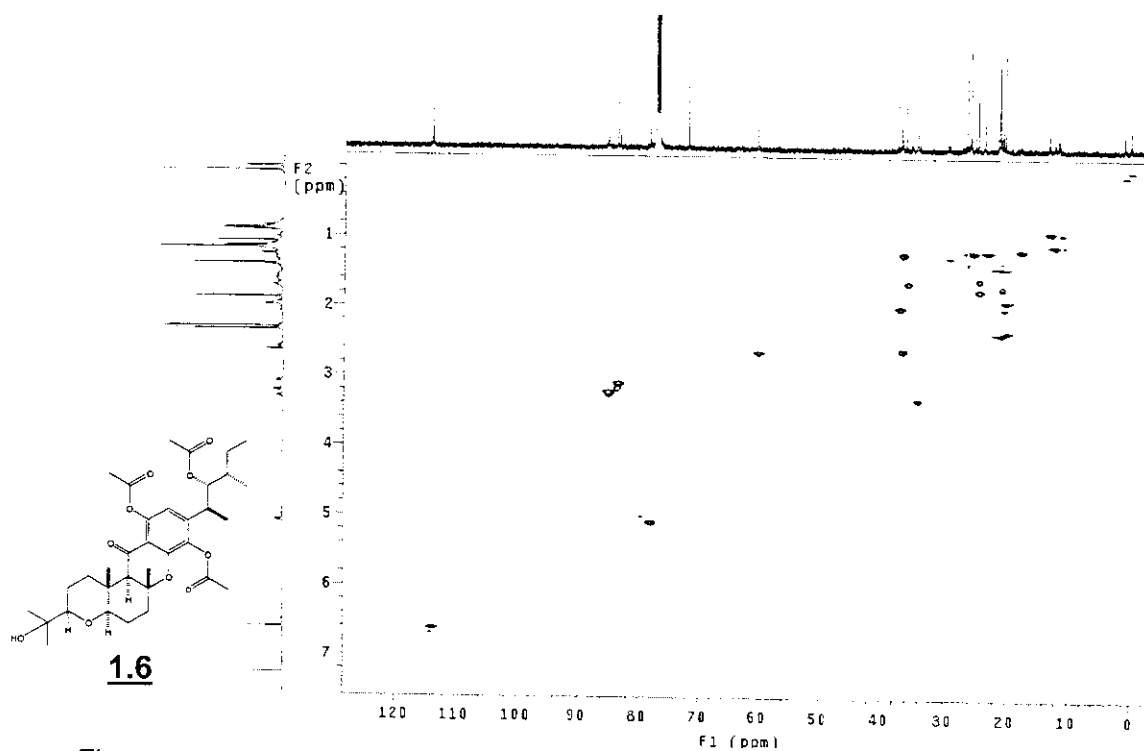
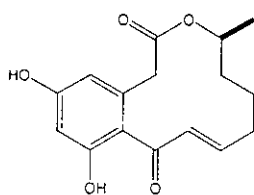
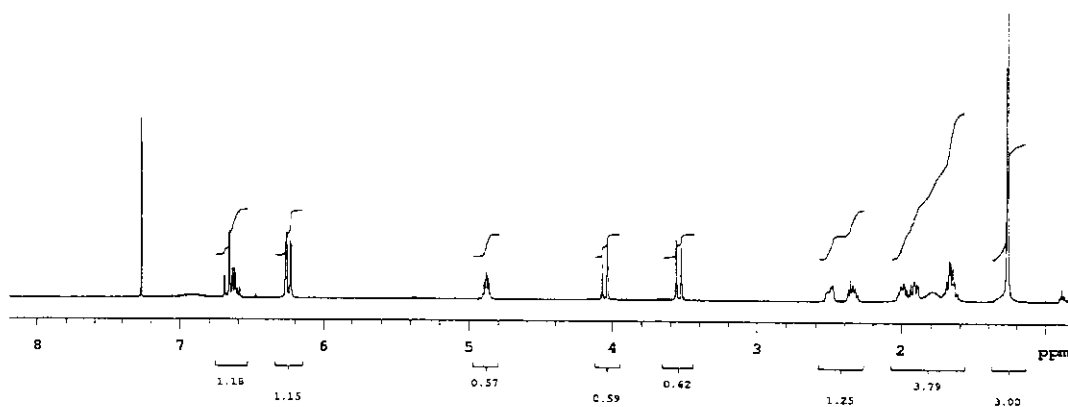
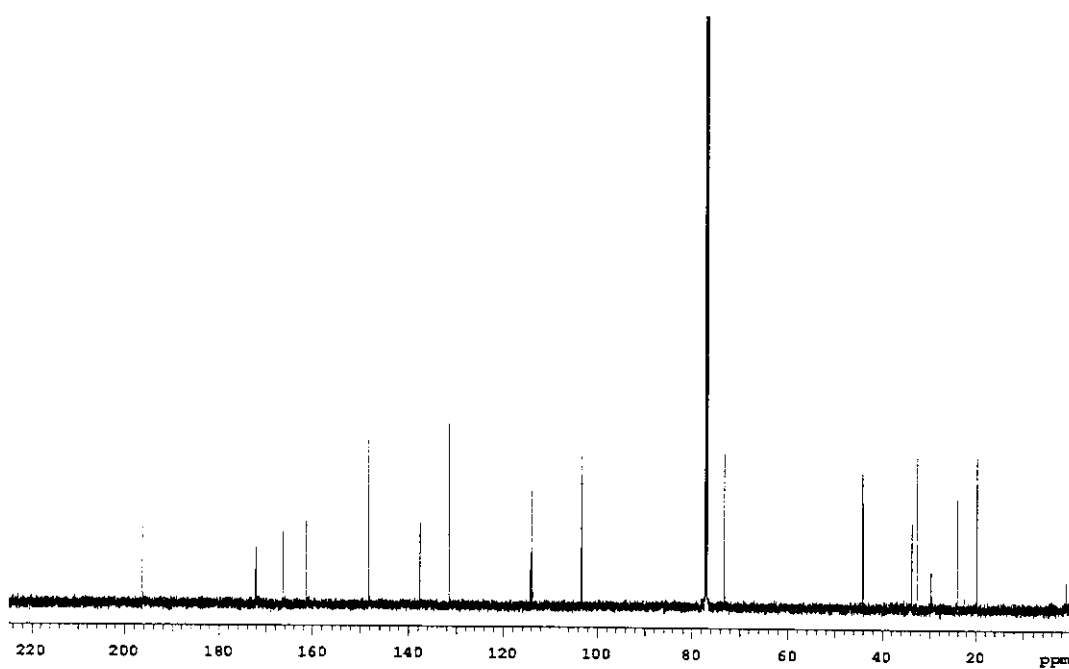


Figura 5.6. Espectro de RMN-2D (^1H , ^{13}C -HSQC, CDCl_3) de **1.6**

**1.7**Figura 5.7. Espectro de RMN de ¹H (499,882 MHz, CDCl₃, δ_{TMS} = 0,00 ppm) de 1.7Figura 5.8. Espectro de RMN de ¹³C (125,695 MHz, CDCl₃, δ_{CDCl₃} = 77,0 ppm) de 1.7

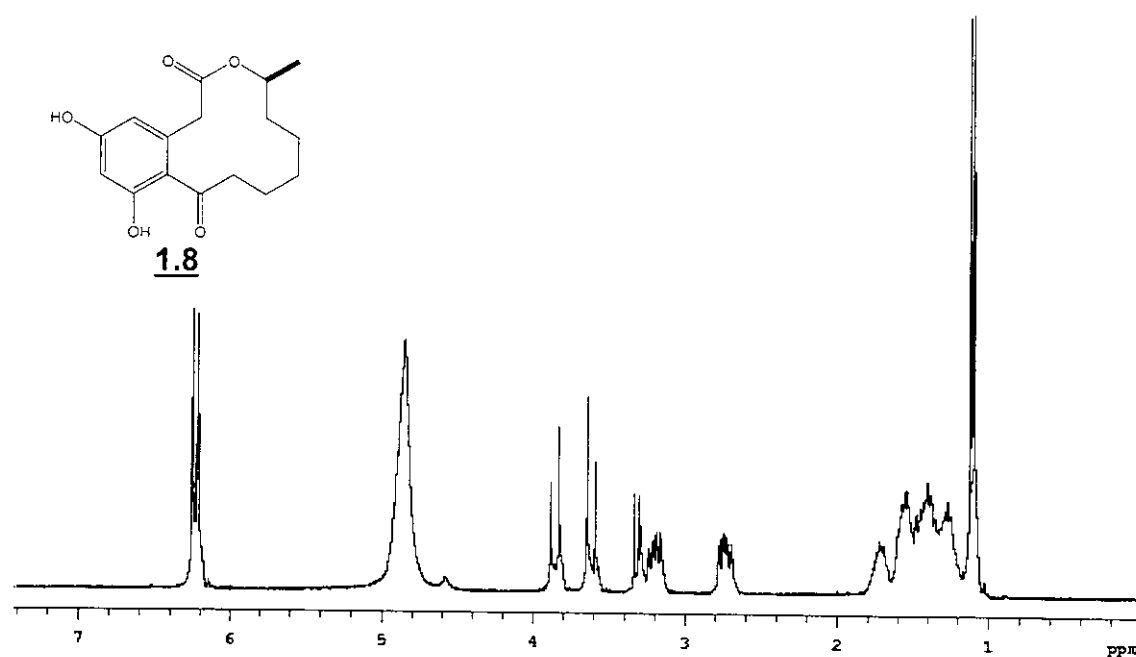


Figura 5.9. Espectro de RMN de ¹H (300,068 MHz, CD₃OD, $\delta_{\text{CD}_3\text{OD}} = 3,3$ ppm) de **1.8**

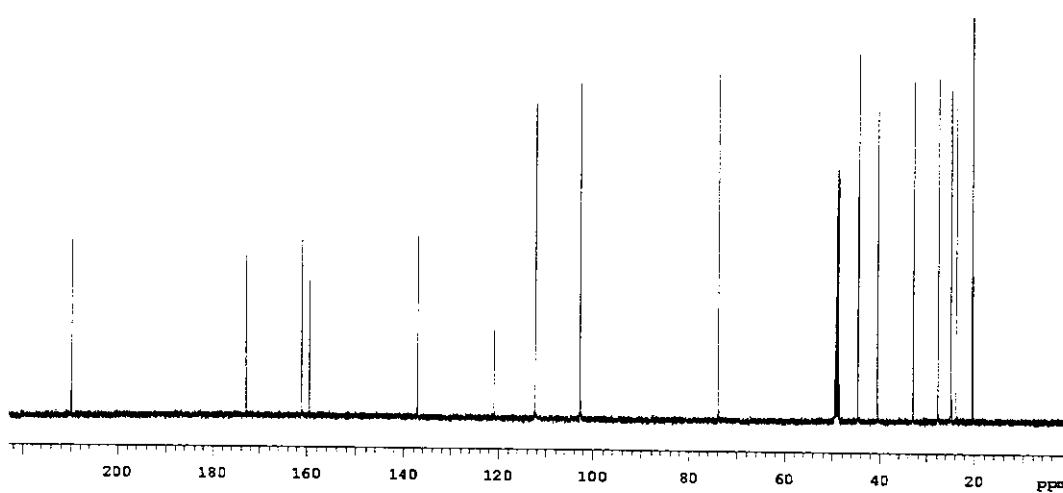


Figura 5.10. Espectro de RMN de ¹³C (125,696 MHz, CD₃OD, $\delta_{\text{CD}_3\text{OD}} = 49$ ppm) de **1.8**

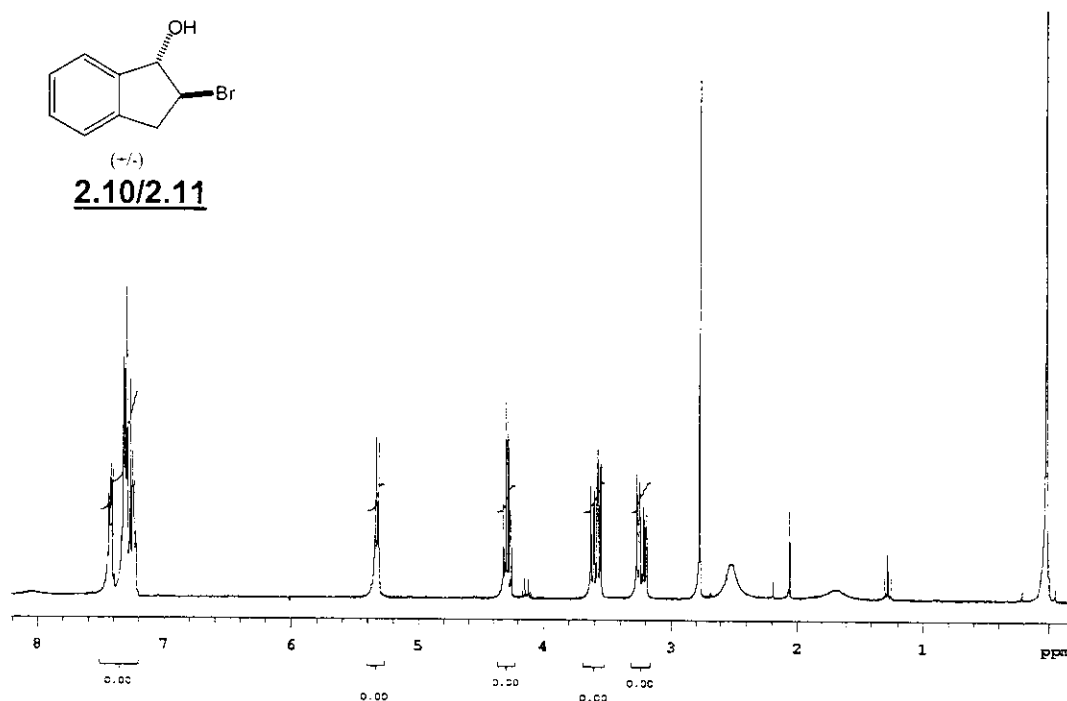


Figura 5.11. Espectro de RMN de ¹H (300,068 MHz, CDCl₃, δ_{TMS} = 0,00 ppm) de 2.10/2.11

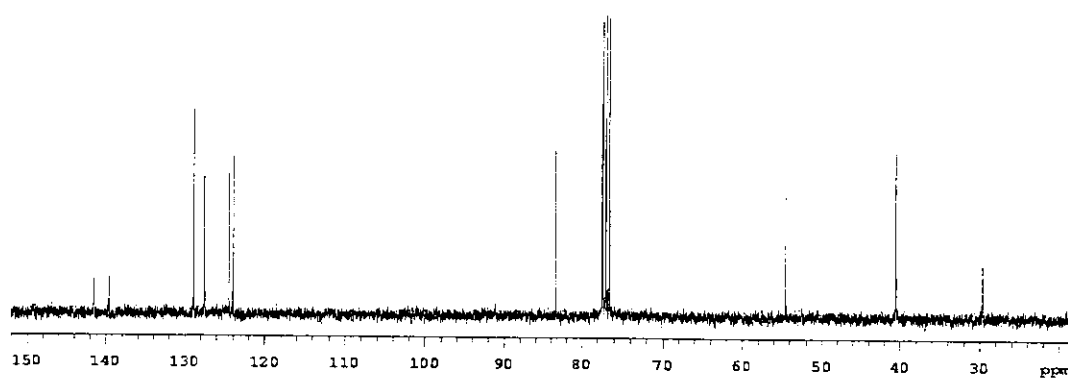


Figura 5.12. Espectro de RMN de ¹³C (125,696 MHz, CDCl₃, δ_{CDCl₃} = 77,0 ppm) de 2.10/2.11

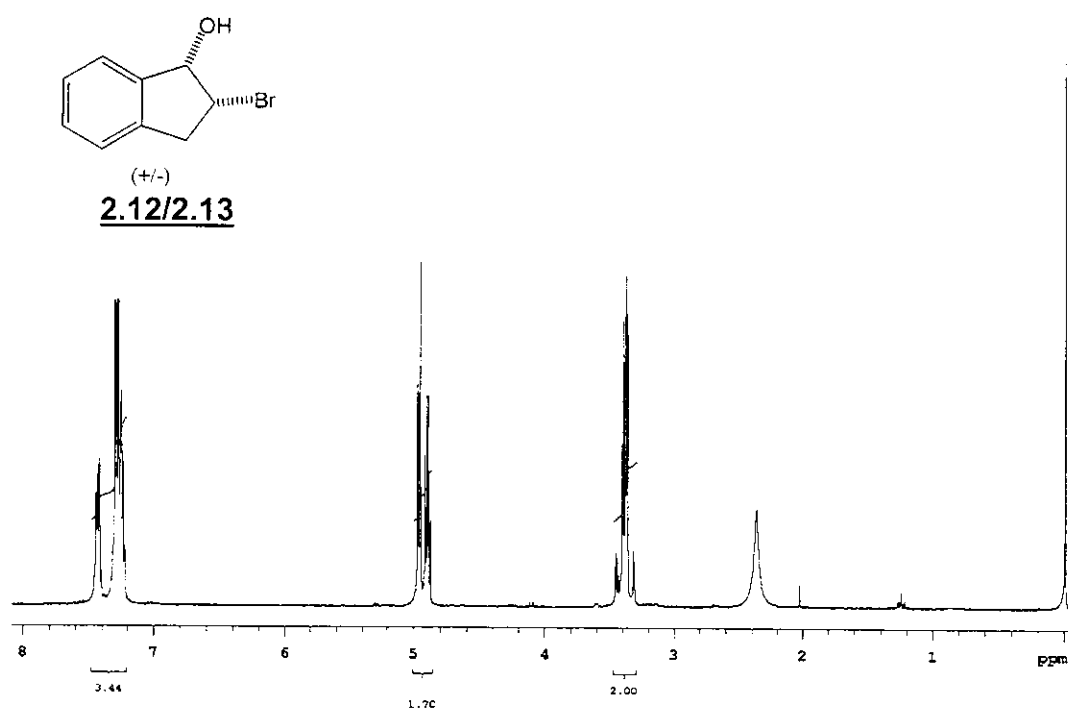


Figura 5.13. Espectro de RMN de ¹H (300,068 MHz, CDCl₃, δ_{TMS} = 0,00 ppm) de **2.12/2.13**

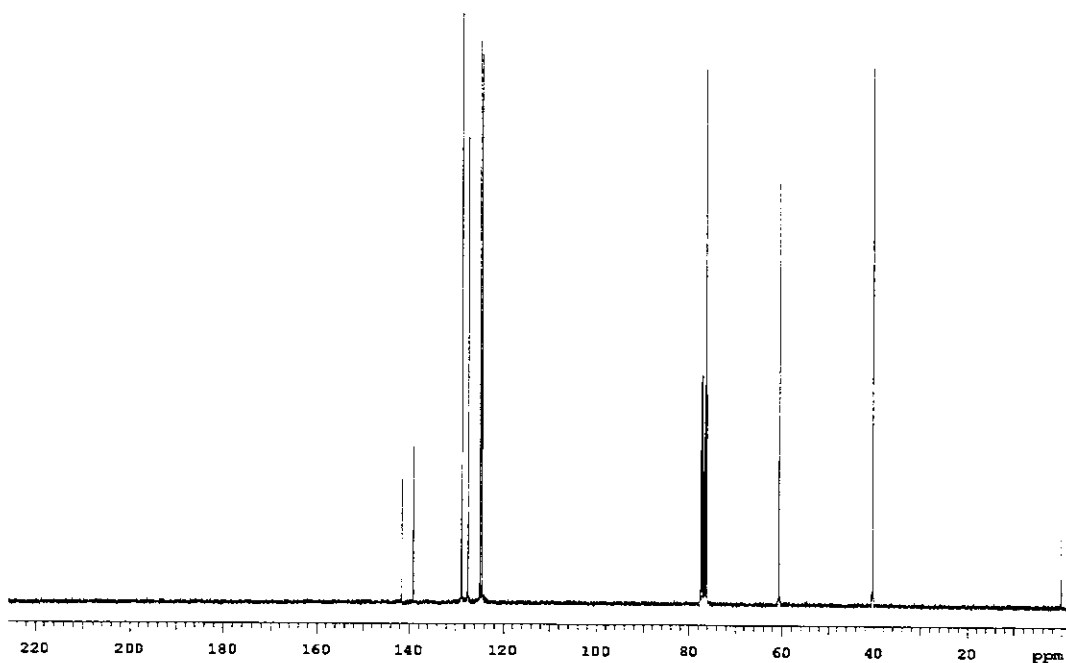


Figura 5.14. Espectro de RMN de ¹³C (125,696 MHz, CDCl₃, δ_{CDCl₃} = 77,0 ppm) de **2.12/2.13**

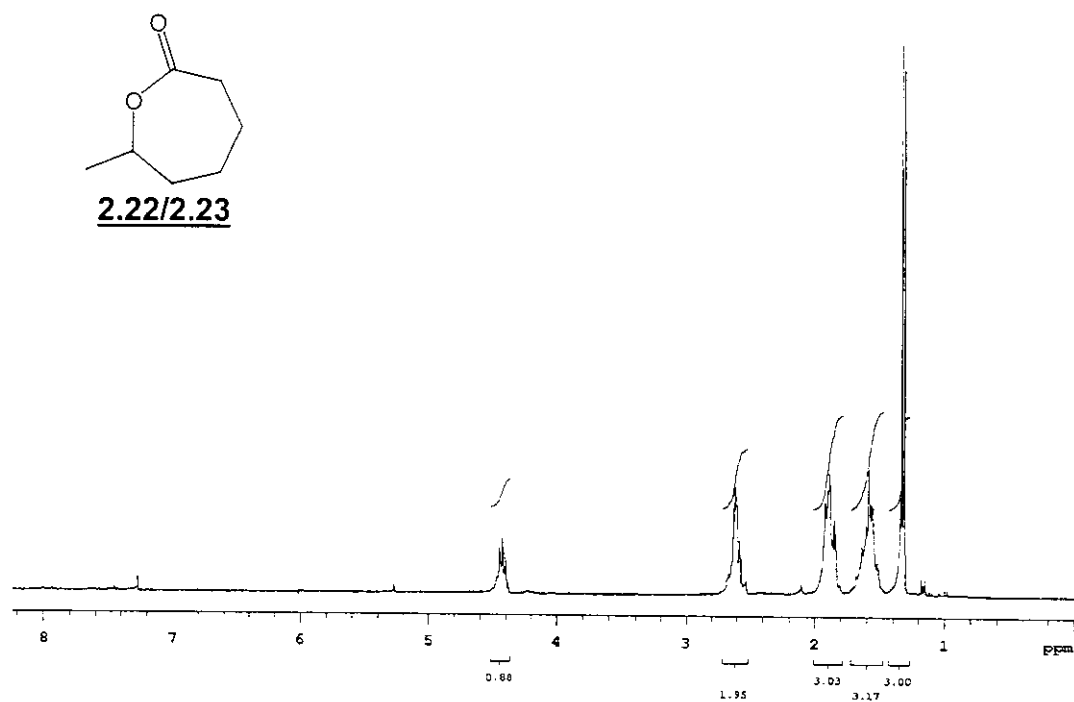


Figura 5.15. Espectro de RMN de ¹H (300,068 MHz, CDCl₃, δ_{TMS} = 0,00 ppm) de 2.22/2.23

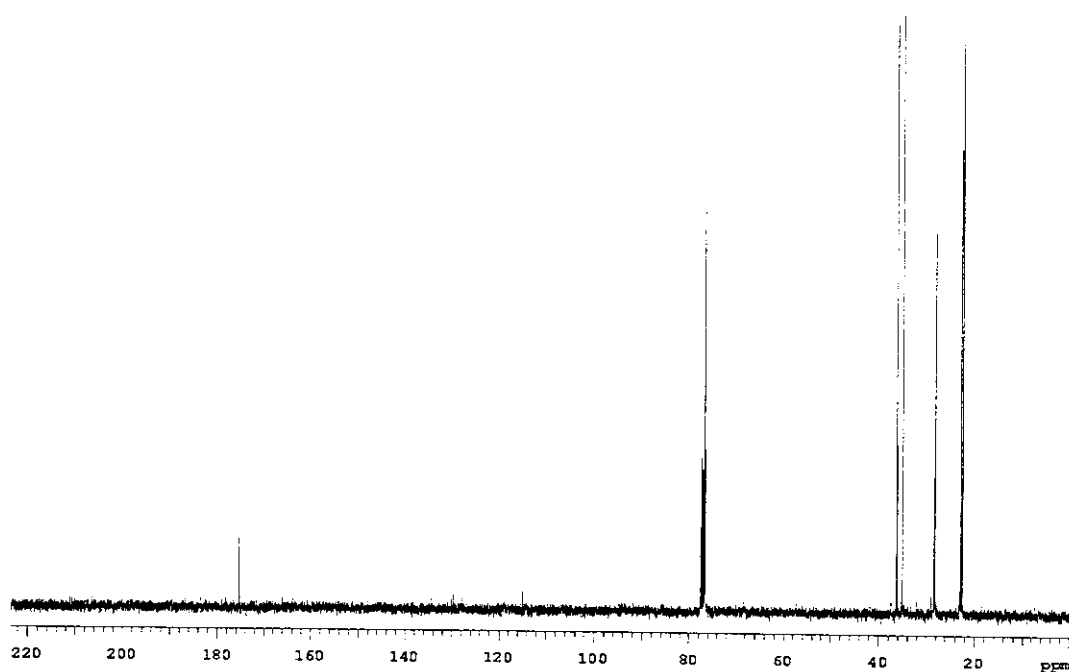


Figura 5.16. Espectro de RMN de ¹³C (125,696 MHz, CDCl₃, δ_{CDCl₃} = 77,0 ppm) de 2.22/2.23

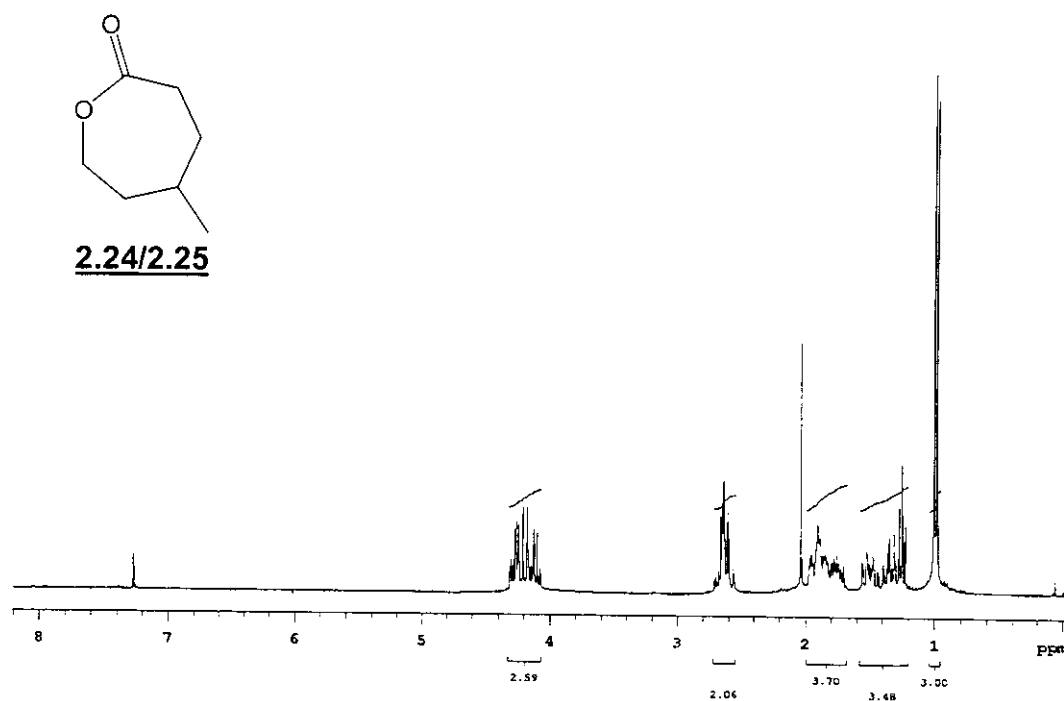


Figura 5.17. Espectro de RMN de ¹H (300,068 MHz, CDCl₃, δ_{TMS} = 0,00 ppm) de 2.24/2.25

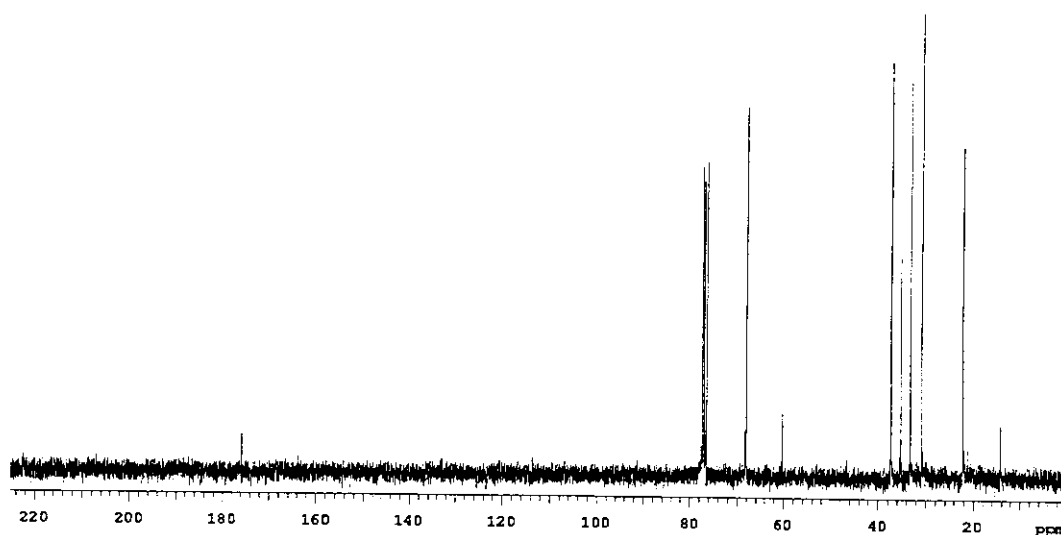


Figura 5.18. Espectro de RMN de ¹³C (125,696 MHz, CDCl₃, δ_{CDCl₃} = 77,0 ppm) de 2.24/2.25

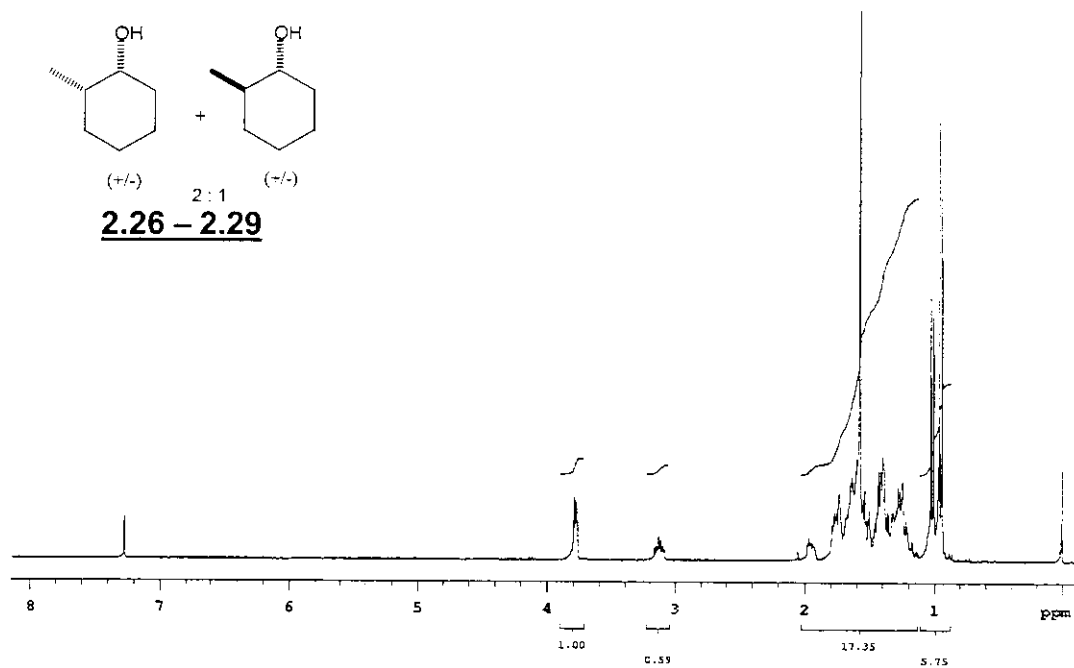


Figura 5.19. Espectro de RMN de ^1H (300,068 MHz, CDCl_3 , $\delta_{\text{TMS}} = 0,00$ ppm) de **2.26-2.29**

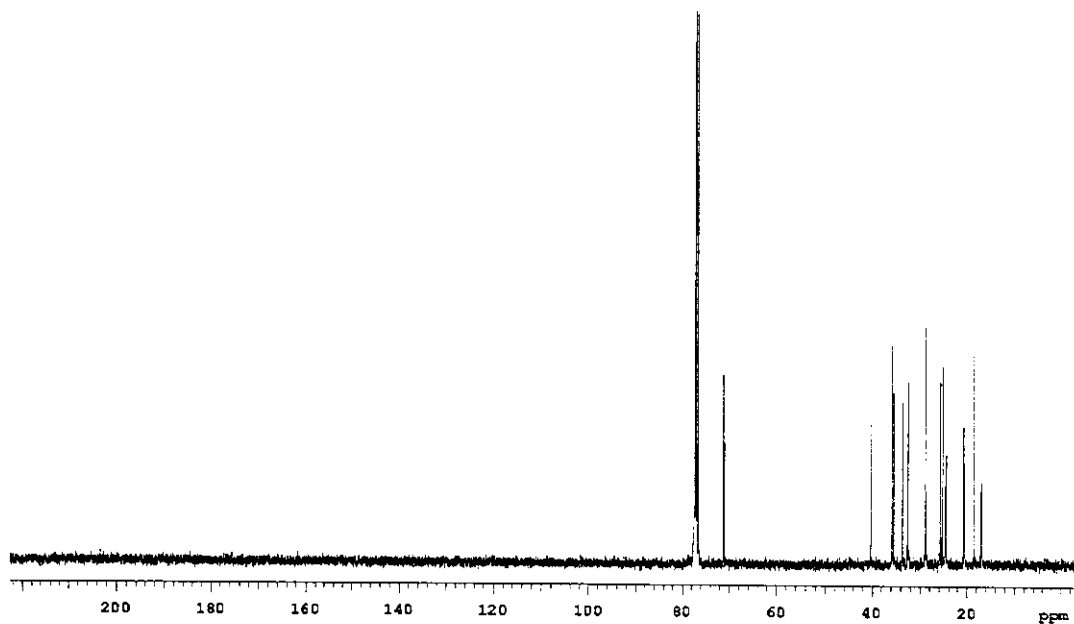


Figura 5.20. Espectro de RMN de ^{13}C (125,696 MHz, CDCl_3 , $\delta_{\text{CDCl}_3} = 77,0$ ppm) de **2.26-2.29**

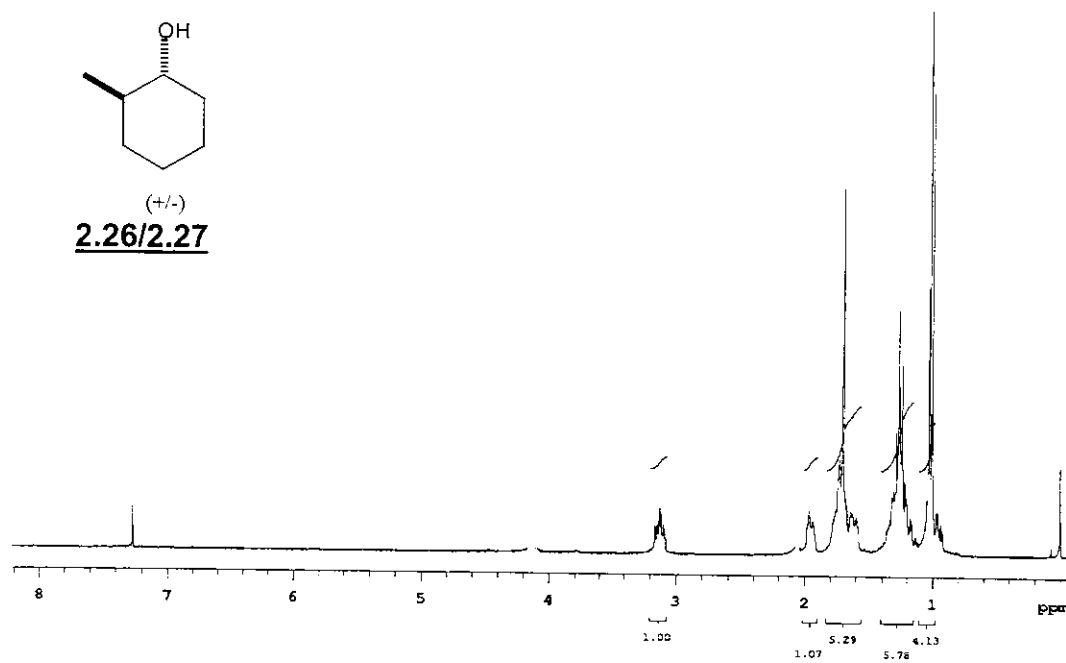


Figura 5.21. Espectro de RMN de ¹H (300,068 MHz, CDCl₃, δ_{TMS} = 0,00 ppm) de **2.26/2.27**

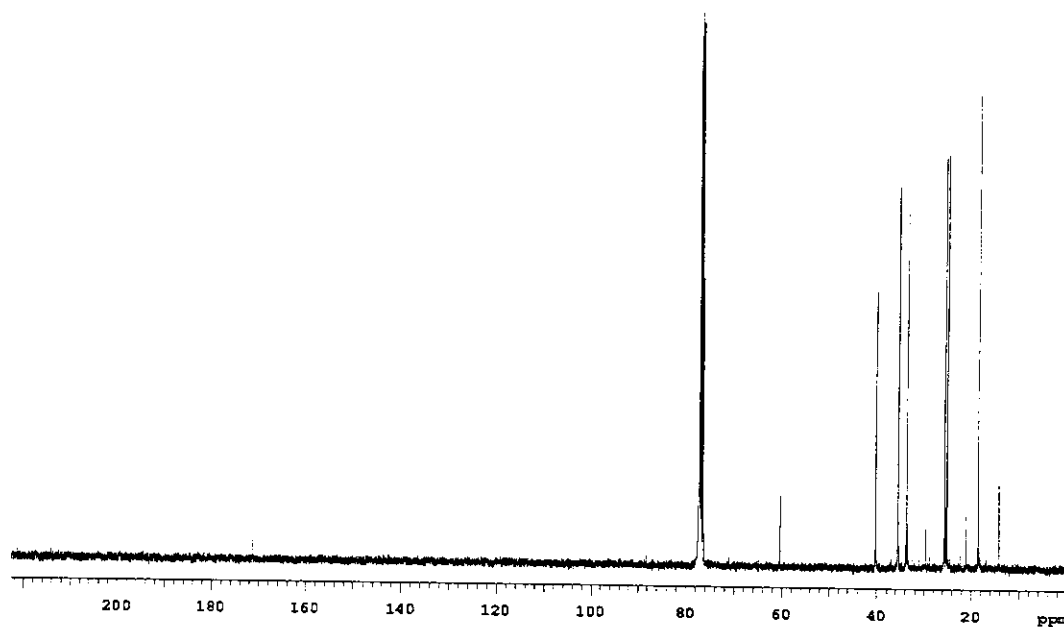


Figura 5.22. Espectro de RMN de ¹³C (125,696 MHz, CDCl₃, δ_{CDCl₃} = 77,0 ppm) de **2.26/2.27**

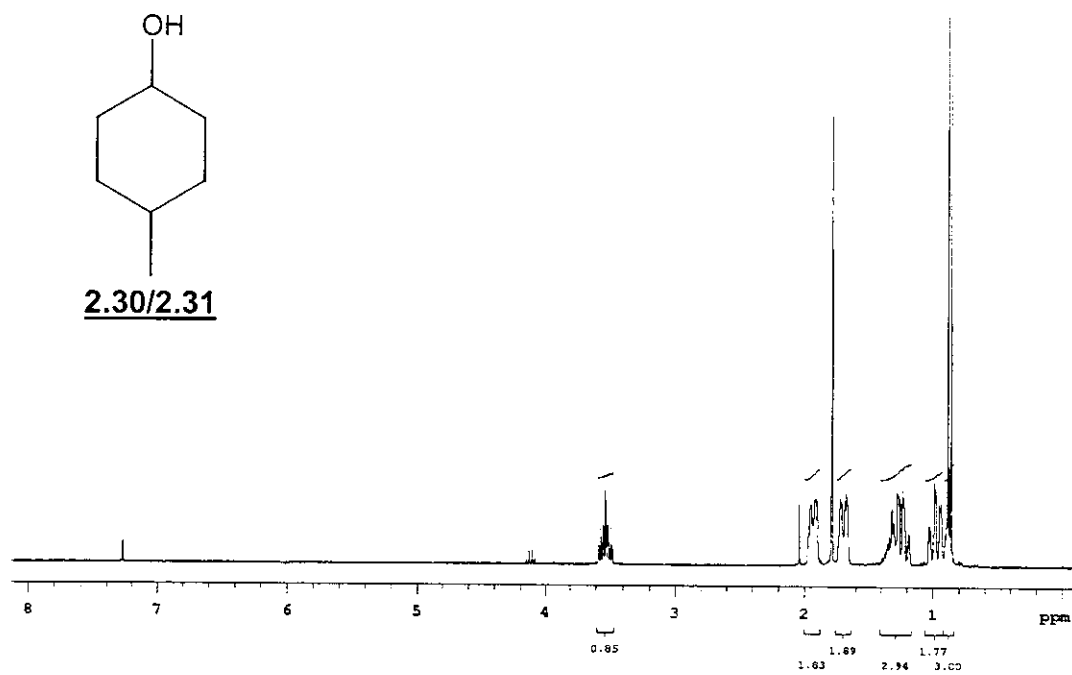


Figura 5.23. Espectro de RMN de ¹H (300,068 MHz, CDCl₃, $\delta_{\text{TMS}} = 0,00$ ppm) de 2.30/2.31

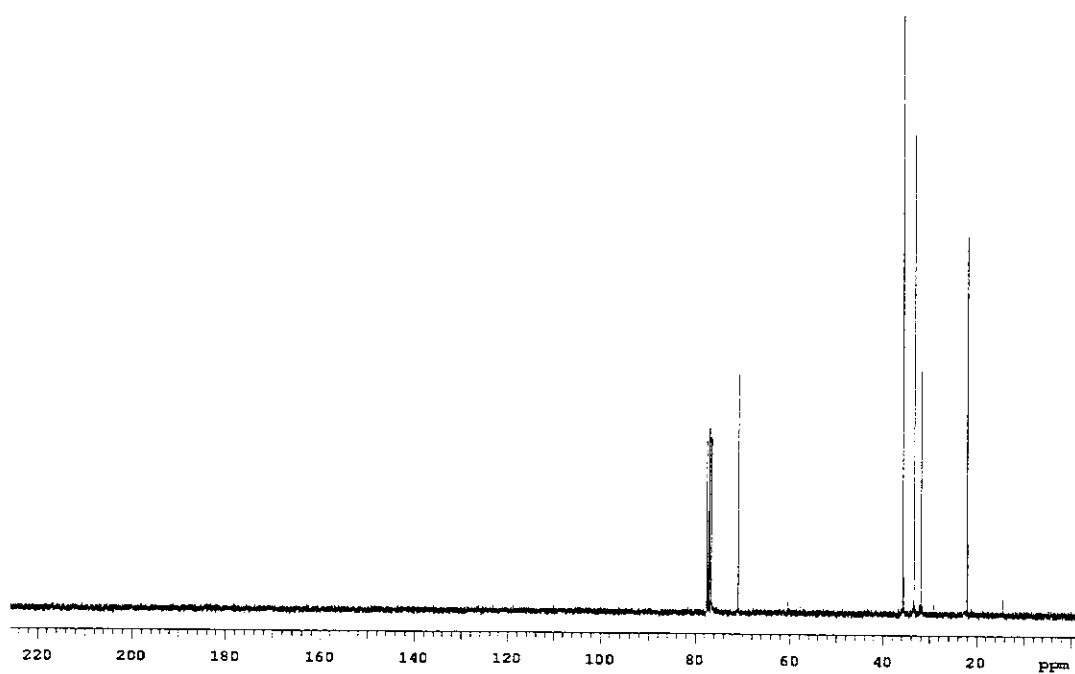


Figura 5.24. Espectro de RMN de ¹³C (125,696 MHz, CDCl₃, $\delta_{\text{CDCl}_3} = 77,0$ ppm) de 2.30/2.31

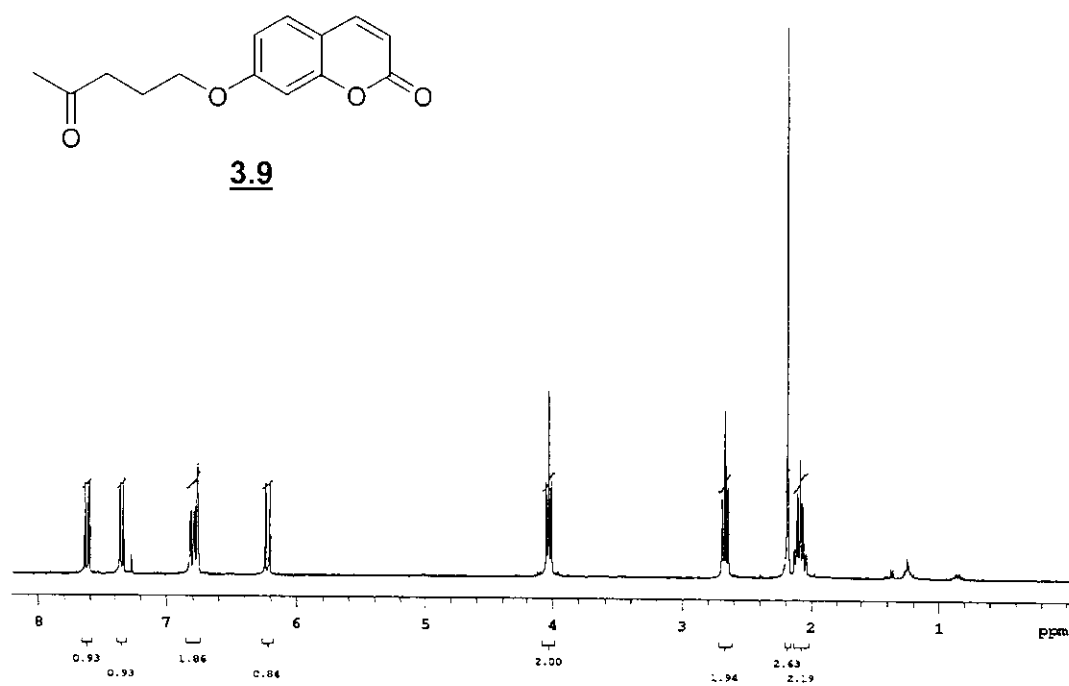


Figura 5.25. Espectro de RMN de ^1H (300,068 MHz, CDCl_3 , $\delta_{\text{TMS}} = 0,00$ ppm) de **3.9**

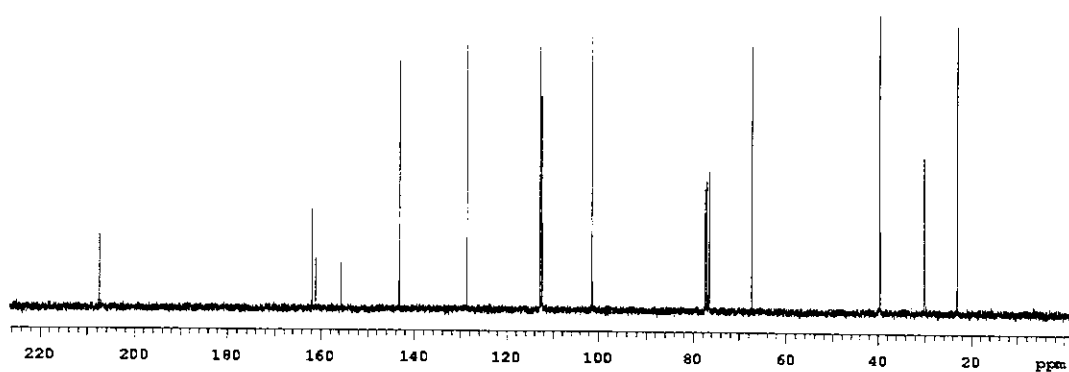


Figura 5.26. Espectro de RMN de ^{13}C (125,696 MHz, CDCl_3 , $\delta_{\text{CDCl}_3} = 77,0$ ppm) de **3.9**

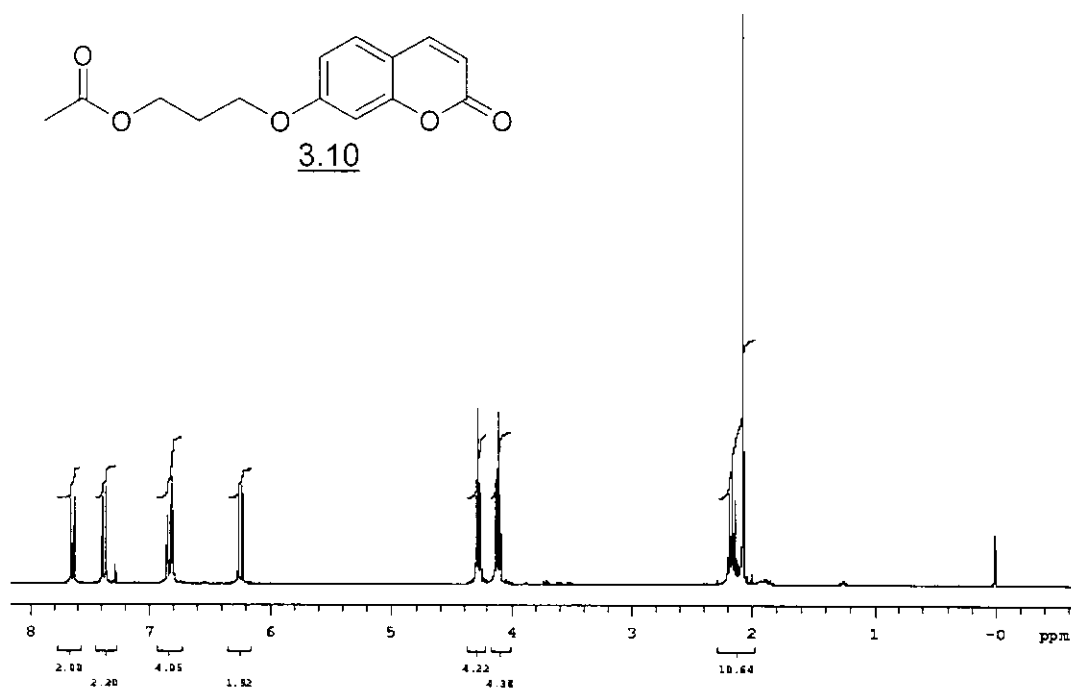


Figura 5.27. Espectro de RMN de ^1H (300,068 MHz, CDCl_3 , $\delta_{\text{TMS}} = 0,00$ ppm) de **3.10***

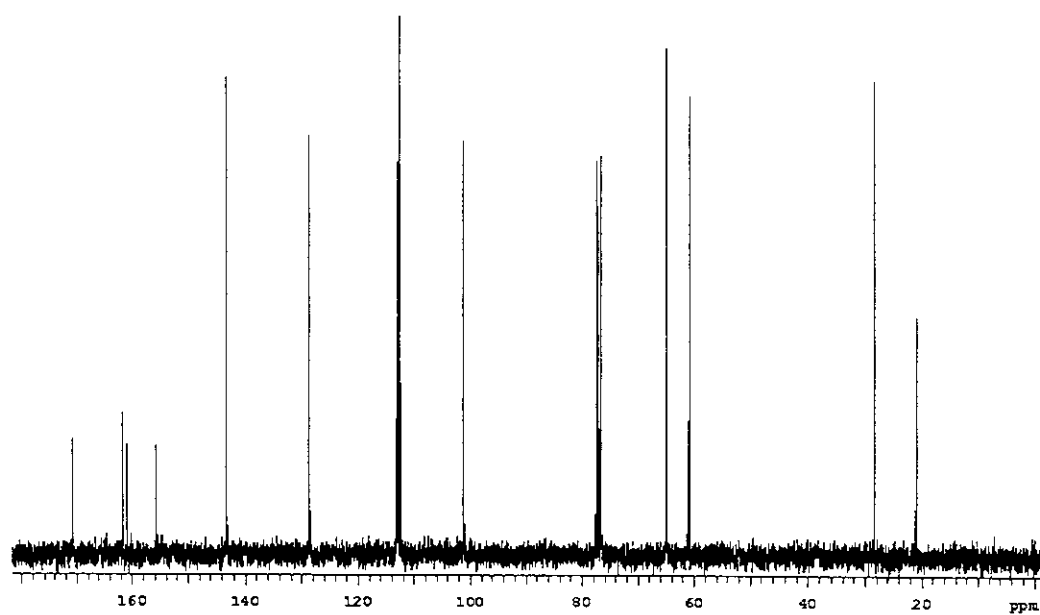


Figura 5.28. Espectro de RMN de ^{13}C (125,696 MHz, CDCl_3 , $\delta_{\text{CDCl}_3} = 77,0$ ppm) de **3.10***

*espectros cedidos pela doutoranda Lu Shi Chen

6. Refererências Bibliográficas

- ¹ Strobel, G. A. Rainforest endophytes and bioactive products. *Crit. Rev. Biotech.* **2002** (22), 315-333.
- ² Pfenning, L. In: Bicudo, C.E.M. and Menezes, N.A. *Biodiversity in Brazil*. São Paulo: CNPq, **1996**. 326 p
- ³ Lacaz, C.S. *Antibióticos*. São Paulo: Sarvier, **1969**. 609 p.
- ⁴ Carlilie, M.J. e Watkinson, S.C. *The fungi*. Londres: Academic Press. **1996**. 482 pp, p. 421.
- ⁵ Fuchs, F.D. e Wannmacher, L. *Farmacologia clínica*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, **1998**. cap. 25: Princípios gerais do uso de antimicrobianos.
- ⁶ Rang, H.P.; Dale, M.M. e Ritter, J.M. *Farmacologia*. 4ª. Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001. cap. 41: Princípios básicos de quimioterapia.
- ⁷ Guven, G.S. e Uzum, O. Principles of good use of antibiotics in hospitals. *J. Hosp. Infection.* **2003** (53), 91-96.
- ⁸ Lipsitch, M. The rise and fall of antimicrobial resistance. *Trends in Microbiol.* **2001** (9), 438-444.
- ⁹ Avorn, J.L.; Barrett, J.F.; Davey, P.G.; McEwen, S.A.; O'Brien, T.F e Levy, S.B. Antibiotic resistance: synthesis of recommendations by expert policy groups. Boston: WHO. **2001**. 155 p.
- ¹⁰ Henry, C.M. Antibiotic resistance. *C&EN* **2000**, 78 (10), 41-58.
- ¹¹ Gonçalves, R.A.C., Zibordi, A.P.M., Bittrich, V. e Marsaioli, A.J. Interação mutualística entre *Clusia* (plantas), *Trigona* (abelhas) e microrganismos. **1999**. 22ª SBQ.
- ¹² Michereff, S. J.; Silveira, N. S. da; Reis, A.; Mariano, R. L. R. Greenhouse screenig of *Trichoderma* isolates for control of curvularia leaf spot of yam. *Mycopathol.* **1995** (130), 103-108.
- ¹³ Jawhar M.; Sangwan R. e Arabi, M. Identification of *Drechslera Graminea* isolates by cultural characters and rapid analysis. *Cereal Res. Commun.* **2000** (28), 87-93.
- ¹⁴ Hodges, C. F.; Madsen, J. P. The competitive and synergistic interactions of *Drechslera sorokiniana* and *Curvularia geniculata* on leaf spot development on *Poa pratensis*. *Can. J. Bot.* **1978** (56), 1240-1247.
- ¹⁵ Bauer, A.W., Kirby, W.M.M., Sherris, J.C. e Turck, M. Antibiotic suscepibility testing by a standardized single disk method. *Am. J. Clin. Pathol.* **1965** (45), 493-496.

- ¹⁶ Betina, V. Bioautography in paper and thin-layer chromatography and its scope in the antibiotic field. *J. Chromatogr.* **1973** (78), 41-51.
- ¹⁷ Altman, F.P. *Tetrazolium salts and formazans*. Stuttgart: Gustav Fischer Verlag, **1976**. 56 p.
- ¹⁸ Cole, M.D. Key antifungal, antibacterial and anti-insect assays – a critical review. *Biochem. Syst. Ecol.* **1994** (22), 837-856.
- ¹⁹ Navickiene, H.M.D.; Alécio, A.C.; Kato, M.J.; Bolzani, V. da S.; Young, M.C.M.; Cavaleiro, A.J. e Funlan, M. Antifungal amides from *Piper hispidum* and *Piper tuberculatum*. *Phytochemistry* **2000** (55), 621-626.
- ²⁰ Ohsaki, A.; Takashima, J.; Chiba, N. e Kawamura, M. Microanalysis of a selective potent anti-*Helicobacter pylori* compound in a Brazilian medicinal plant, *Myroxylon peruiferum* and the activity of analogues. *Bioorg. Med. Chem. Let.* **1999** (9), 1109-1112.
- ²¹ Lokvam J. and Braddock J.F. Anti-bacterial function in the sexually dimorphic pollinator rewards of *Clusia grandiflora* (Clusiaceae). *Oecologia*, **1999** (119), 534-540.
- ²² Porto A.L.M., Machado S.M.F., de Oliveira C.M.A., Bittrich V., Amaral M.E., and Marsaioli, A.J. Polyisoprenylated benzophenones from *Clusia* floral resins. *Phytochemistry* **2000** (55), 755-768.
- ²³ Saxena, G.; Farmer, S.; Towers, G.H.N. e Hancock, R.E.W. Use of specific dyes in the detection of antimicrobial compounds from crude plant extracts using a thin layer chromatography agar overlay technique. *Phytochem. Anal.* **1995** (6), 125-129.
- ²⁴ Miyagawa, H.; Nagai, S.; Tsurushima, T.; Sato, M.; Ueno, T. Fukami, H. Phytotoxins produced by the plant pathogenic fungus *Bipolaris bicolor* EI-1. *Biosci. Biotech. Biochem.* **1994** (58), 1143-1145.
- ²⁵ Barrow, K.D. e Murphy, W.S. The structures of alboleersin and luteoleersin; the identity of luteoleersin with cochlioquinone A. *J. Chem. Soc., Perkin Trans 1* **1972**, 2837-2839.
- ²⁶ Canonica, L.; Beretta, M.G.; Colombo, L.; Gennari, C.; Ranzi, M. e Scolastico, C. Biosynthesis of cochlioquinones. *J. Chem. Soc., Perkin Trans 1* **1980**, 2686-2690.
- ²⁷ Ogawara, H.; Higashi, K.; Machida, T.; Takashima, J.; Chiba, N. e Mikawa, T. Inhibitors of diacylglycerol kinase from *Drechslera sacchari*. *J. Antibiotics* **1994** (47), 499-501.
- ²⁸ Bicalho, B.; Gonçalves, R.A.C.; Zibordi, A.P.M.; Manfio, G.P. e Marsaioli, A.J. Antimicrobial compounds of fungi vectored by *Clusia* spp (Clusiaceae) pollinating bees. *Z. Naturforsch. C.* **2003**, 58c, 746 – 751.

- ²⁹ Osterhage, C.; König, G.M.; Höller, U. e Wright, A.D. Rare sesquiterpenes from the algicolous fungus *Drechslera dematioidea*. *J. Nat. Prod.* **2002** (65), 306-313.
- ³⁰ Molinoff, P.B. e Ruddon, R.W. *Goodman & Gilman, As bases farmacológicas da terapêutica*. 9ª ed. Espanha: McGraw-Hill. **1996**. 1436 p.
- ³¹ Arai, K.; Rawlings, B. J.; Yoshizawa, Y.; Vederas, J. C. Biosyntheses of antibiotic A26771B by *Penicillium turbatum* and dehydrocurvularin by *Alternaria cinerariae*: comparison of stereochemistry of polyketide and fatty acid enoyl thiol ester reductases. *J. Am. Chem. Soc.* **1989** (111), 3391-3399.
- ³² Munro, H.D.; Musgrave, O.C. e Templeton, R. Curvularin. Part V. The compound $C_{16}H_{18}O_5$, $\alpha\beta$ -dehydrocurvularin. *J. Chem. Soc. (C)* **1967**, 947-948.
- ³³ Gerlach, H. 2-(Trimethylsilyl)äthylester als carboxylschutzgruppe; anwendung bei der synthese des (-)-(S)-curvularin. *Helv. Chim. Acta* **1977** (60), 3039-3044.
- ³⁴ Musgrave, O.C. Curvularin. Part I. Isolation and partial characterization of a metabolic product from a new species of *Curvularia*. *J. Chem. Soc.* **1956**, 4301-4305.
- ³⁵ Rodríguez, A.M.; Enriz, R.D.; Santagata, L.N.; Jáuregui, E.A.; Pestchanker, M.J. e Giordano, O.S. Structure-cytoprotective activity relationship of simple molecules containing an α,β -unsaturated carbonyl system. *J. Med. Chem.* **1997** (40), 1827-1934.
- ³⁶ Liu, Y. Li, Zhe e Vederas, J.C. Biosynthetic incorporation of advanced precursors into dehydrocurvularin, a polyketide phytotoxin from *Alternaria cinerariae*. *Tetrahedron* **1998** (54), 15937-15958.
- ³⁷ Hyeon, S.-B.; Ozaki, A.; Suzuki, A. e Tamura, S. Isolation of $\alpha\beta$ -dehydrocurvularin and β -hydroxycurvularin from *Alternaria tomato* as sporulation-suppressing factors. *Agr. Biol. Chem.* **1976**, (40), 1663-1664.
- ³⁸ Clark, J.H. Catalysis for green chemistry. *Pure Appl. Chem.* **2001** (73), 103-111.
- ³⁹ Koeller, K.M. e Wong, C. Enzymes for chemical synthesis. *Nature* **2002** (409), 232-240.
- ⁴⁰ Thayer, A.M. Biocatalysis. *C&En.* **2001** (May 21), 27-49.
- ⁴¹ McCoy, M. Catalyst makers look for growth. *C&EN* **2001** (May 21), 37-43.
- ⁴² Ogawa, J. e Shimizu, S. Microbial enzymes: new industrial applications from traditional screening methods. *Tibtech.* **1999** (17), 13-20.
- ⁴³ Roberts, S. Preparative biotransformations. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, **2000**, 611-633.

- ⁴⁴ Faber, K. *Biotransformations in organic chemistry: a textbook*. 4th Ed. Berlin: Springer-Verlag. **2000**.
- ⁴⁵ Poppe, L.; Novák, L. *Selective biocatalysis*. Darmstadt: VHC, **1992**. cap. 4: Oxidoreductases: preparative biocatalysis.
- ⁴⁶ Franssen, M.C.R. e van der Plas, H.C. Haloperoxidases: their properties and their use in organic synthesis. *Adv. App. Microbiol.* **1992** (37), 41-99.
- ⁴⁷ Morris, D.R. e Hager, L.P. Chloroperoxidase I. Isolation and properties of the crystalline glycoprotein. *J. Biol. Chem.* **1966** (241), 1763-1768.
- ⁴⁸ Vilter, H. Peroxidases from phaeophyceae: a vanadium (V)-dependent peroxidase from *Ascophyllum nodosum*. *Phytochemistry* **1984** (23), 1387-1390.
- ⁴⁹ Pelletier, I. e Altenbuchner, J. A bacterial esterase is homologous with non-haem haloperoxidases and displays brominating activity. *Microbiology* **1995** (141), 459-468.
- ⁵⁰ Wiesner, W.; van Pee, K. e Lingens, F. Detection of a new chloroperoxidase in *Pseudomonas pyrocinia*. *FEBS Lett.* **1986** (209), 321-324.
- ⁵¹ van Deurzen, M.P.J.; van Rantwijk, F. e Sheldon, R.A. Selective oxidations catalyzed by peroxidases. *Tetrahedron* **1997**, 13183-13219.
- ⁵² Coughlin, P.; Roberts, S.; Rush, C. e Willetts, A. Biotransformation of alkenes by haloperoxidases: regiospecific bromohydrin formation from cinnamyl substrates. *Biotechnol. Lett.* **1993** (15), 907-912.
- ⁵³ Franssen, M.C.R.; Jansma, J.D.; van der Plas, H.C.; de Boer, E. e Wever, R. Enzymatic bromination of barbituric acid and some of its derivatives. *Bioorg. Chem.* **1988** (16), 352-363.
- ⁵⁴ Franssen, M.C.R. e van der Plas, H.C. The chlorination of barbituric acid and some of its derivatives by chloroperoxidase. *Bioorg. Chem.* **1987** (15), 59-70.
- ⁵⁵ Yamada, H.; Itoh, N. e Izumi, Y. Chloroperoxidase-catalyzed halogenation of *trans*-cinnamic acid and its derivatives. *J. Biol. Chem.* **1985** (260), 11962-11969.
- ⁵⁶ Kollonitsch, J.; Marburg, S. e Perkins, L.M. Nature of the skeletal change in a metal-catalyzed diene rearrangement. *J. Am. Chem. Soc.* **1970** (92), 4489-4490.
- ⁵⁷ Wagenknecht, H.; Claude, C.; Woggon, W. New enzyme models of chloroperoxidase: improved stability and catalytic efficiency of iron porphyrinates containing a thiolato ligand. *Helv. Chim. Acta* **1998** (81), 1506-1520.

- ⁵⁸ Wagenknecht, H. e Woggon, W. New active-site analogues of chloroperoxidase – syntheses and catalytic reactions. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1997** (36), 390-392
- ⁵⁹ Messerschmidt, A. e Wever, R. X-ray structure of a vanadium-containing enzyme: chloroperoxidase from the fungus *Curvularia inaequalis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1996** (93), 392-396.
- ⁶⁰ Messerschmidt, A.; Prade, L. e Wever, R. Implications for the catalytic mechanism of the vanadium-containing enzyme chloroperoxidase from the fungus *Curvularia inaequalis* by X-ray structures of the native and peroxide form. *Biol. Chem.* **1997** (378), 309-315.
- ⁶¹ Butler, A. Vanadium haloperoxidases. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **1998** (2), 279-285.
- ⁶² Weyand, M.; Hecht, H.-J.; Kieß, M.; Liaud, M.-F.; Vilter, H. e Schomburg, D. X-ray structure determination of a vanadium-dependent haloperoxidase from *Ascophyllum nodosum* at 2.0 Å resolution. *J. Mol. Biol.* **1999** (293), 595-611.
- ⁶³ Littlechild, J. e Garcia-Rodriguez, E. Structural studies on the dodecameric vanadium bromoperoxidase from *Corallina* species. *Coord. Chem. Rev.* **2003** (237), 65-76.
- ⁶⁴ Isupov, M.N.; Dalby, A.R.; Brindley, A.A.; Izumi, Y.; Tanabe, T.; Murshudov, G.N. e Littlechild, J.A. Crystal structure of dodecameric vanadium-dependent bromoperoxidase from the red algae *Corallina officinalis*. *J. Mol. Biol.* **2000** (299), 1035-1049.
- ⁶⁵ Silverman, R.B. *The organic chemistry of enzyme-catalyzed reactions*. San Diego: Academic Press, **2000**. cap. 2: Group transfer reactions: hydrolysis, amination, phosphorylation.
- ⁶⁶ Pelletier, I.; Altenbuchner, J. e Mattes, R. A catalytic triad is required by the non-heme haloperoxidases to perform halogenation. *Biochim. Biophys. Acta.* **1995** (1250), 149-157.
- ⁶⁷ Picard, M.; Gross, J.; Lübbert, E.; Tölzer, S.; Krauss, S.; van Pée, K. e Berkessel, A. Metal-free bacterial haloperoxidases as unusual hydrolases: activation of H₂O₂ by the formation of peracetic acid. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1997** (36), 1196-1199.
- ⁶⁸ Kirk, O. e Conrad, L.S. Metal-free haloperoxidases: fact or artifact? *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999** (38), 977-979.
- ⁶⁹ Preobrazhenskaya, Y.V.; Voskoboev, A.I. e Burd, V.N. Phosphatase activity of non-heme chloroperoxidase from the bacterium *Serratia marcescens*. *FEBS Lett.* **2003** (536), 41-44.
- ⁷⁰ House, H.O. *Modern synthetic reactions*. New York: W.A. Benjamin. **1965**. p. 141, 309 pp.

- ⁷¹ Cohen, P.A. e Towers, G.H.N. Chlorination of anthraquinones by lichen and fungal enzymes. *Phytochemistry* **1997** (44), 271-274.
- ⁷² Levine, S.D.; Neidleman, S.L. e Oberc, M. An enzymatic route to α -bromo steroidal ketones. *Tetrahedron* **1968** (24), 2979-2984.
- ⁷³ Neidleman, S.L. e Levine, S.D. Enzymatic bromohydrin formation. *Tetrahedron Lett.* **1968**, 4057-4059.
- ⁷⁴ Neidleman, S.L.; Diassi, P.A.; Junta, B.; Palmere, R.M. e Pan, S.C. The enzymatic halogenation of steroids. *Tetrahedron Lett.* **1966**, 5337-5342.
- ⁷⁵ Aoun, S. e Baboulène, M. Regioselective bromohydroxylation of alkenes catalyzed by chloroperoxidase: advantages of the immobilization of enzyme on talc. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **1998** (4), 101-109.
- ⁷⁶ Liu, K.K.-C. e Wong, C. Enzymatic halohydrin of glycols. *J. Org. Chem.* **1992** (57), 3748-3750.
- ⁷⁷ Zhang, J.; Roberge, C.; Reddy, J.; Connors, N.; Chartrain, M.; Buckland, B. e Greasham, R. Bioconversion of indene to trans-2S,1S-bromoindanol and 1S,2R-indene oxide by a bromoperoxidase/dehydrogenase preparation from *Curvularia protuberata* MF5400. *Enzyme Microb. Technol.* **1999** (24), 86-95.
- ⁷⁸ Lourenço, L. B.; Felisbino, S. L. In: Carvalho, H. F.; Recco-Pimentel, S. M. *A célula 2001*. São Paulo: Manole, **2001**. p. 172-180.
- ⁷⁹ Ramasarma, T. H₂O₂ has a role in cellular regulation. *Indian J. Biochem. Bioph.* **1990** (27), 269-274.
- ⁸⁰ Allinger, N.L.; Cava, M.P.; de Jongh, D.C.; Johnson, C.R.; Lebel, N.A. e Stevens, C.L. *Química Orgânica*. Rio de Janeiro: Ed. Guanabara. **1978**. 961 p.
- ⁸¹ Silverstein, R.M.; Bassler, G.C. e Morrill, T.C. *Spectrometric identification of organic compounds*. 5th ed. John Wiley & Sons. **1991**. 419 p.
- ⁸² Chartrain, M.; Jackey, B.; Taylor, C.; Sandford, V.; Gbewonyo, K.; Lister, L.; Dimichele, L.; Hirsch, C.; Heimbuch, B.; Maxwell, C.; Pascoe, D.; Buckland, B. e Greasham, R. Bioconversion of indene to *cis* (1S,2R) indandiol and *trans* (1R,2R) indandiol by *Rhodococcus* species. *J. Ferm. Bioeng.* **1998** (86), 550-558.
- ⁸³ Manoj, K.M.; Lakner, F.J. e Hager, L.P. Epoxidation of indene by chloroperoxidase. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2000** (9), 107-111.

- ⁸⁴ Parvatiyar, M.G., Govind, R. e Bishop, D.F. Biodegradation of toluene in a membrane biofilter. *J. Membrane. Sci.* **1996** (119), 17-24.
- ⁸⁵ Barnett, P., Kruitbosch, D.L., Hemrika, W., Dekker, H.L. e Wever, R. The regulation of the vanadium chloroperoxidase from *Curvularia inaequalis*. *Biochim. Biophys. Acta.* **1997** (1352), 73-84.
- ⁸⁶ Karp, G. Enzyme kinetics. *In: Cell and molecular biology.* New York: John Wiley, **1999**. p.98-100.
- ⁸⁷ Azerad, R. *In: Faber, K. Biotransformations.* Berlin: Springer-Verlag. **2000**. 223 p.
- ⁸⁸ Alphand, V. e Furstoss, R. Microbiological transformations 44. Optimisation of a new Baeyer-Villiger activity: application to the stereospecific oxidation of 3-phenylcyclobutanone. *J. Mol. Cat. B: Enz.* **2000** (9), 209-217.
- ⁸⁹ Krow, G.R. *Organic reactions.* v. 43. John Wiley & Sons. **1993**.
- ⁹⁰ Bolm, C.; Beckmann, O. e Palazzi, C. Chiral aluminum complexes as catalysts in asymmetric Baeyer-Villiger reactions of cyclobutanones. *Can. J. Chem.* **2001** (79), 1593-1597.
- ⁹¹ Bolm, C.; Schlingloff, G. e Weickhardt, K. Optically active lactones from a Baeyer-Villiger-type metal-catalyzed oxidation with molecular oxygen. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1994** (33), 1848-1849.
- ⁹² Bolm, C.; Beckmann, O.; Kühn, T.; Palazzi, C.; Adam, W.; Rao, P.B. e Saha-Möller, C.R. Influence of hydroperoxides on the enantioselectivity of metal-catalyzed asymmetric Baeyer-Villiger oxidation and epoxidation with chiral ligands. *Tetrahedron: Asymmetry.* **2001** (12), 2241-2446.
- ⁹³ Roberts, S.M. e Wan, P.W.H. Enzyme-catalyzed Baeyer-Villiger oxidations. *J. Mol. Cat. B: Enz.* **1998** (4), 111-136.
- ⁹⁴ Walsh, C.T. e Chen, Y.C.J. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1988** (27), 333-343.
- ⁹⁵ Mihovilovic, M. D., Muller, B., Kayser, M. M., Stewart, J. D., Fröhlich, J., Stanetty, P., Spreitzer, H. Baeyer-Villiger oxidations of representative heterocyclic ketones by whole cells of engineered *Escherichia coli* expressing cyclohexanone monooxygenase. *J. Mol. Cat. B: Enz.* **2001** (11), 349-353.
- ⁹⁶ Kelly, D.R. A proposal for the origin of stereoselectivity in enzyme catalyzed Baeyer-Villiger reactions. *Tetrahedron: Asymmetry.* **1996** (7), 1149-1152.

- ⁹⁷ Rissom, S.; Schwarz-Linek, U.; Vogel, M.; Tishkov, V.I. e Kragl, U. Synthesis of chiral ϵ -lactones in a two-enzyme system of cyclohexanone mono-oxygenase and formate dehydrogenase with integrated bubble-free aeration. *Tetrahedron: Asymmetry*. **1997** (8), 2523-2526.
- ⁹⁸ Alphand, V.; Furstoss, R.; Pedragosa-Moreau, S.; Roberts, S.M. e Willetts, J. Comparison of microbiologically and enzymatically mediated Baeyer-Villiger oxidations: synthesis of optically active caprolactones. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*. **1996**, 1867-1872.
- ⁹⁹ Willetts, A. Structural studies and synthetic applications of Baeyer-Villiger monooxygenases. *Trends Biotechnol.* **1997** (15), 55-62.
- ¹⁰⁰ Kamerbeek, N.M., Janssen, D.B., van Berkel, W.J.H. and Fraaije, M.W. Baeyer-Villiger monooxygenases, na emerging family of flavin-dependent biocatalysts. *Adv. Synth. Catal.* **2003**, 345, 667-678.
- ¹⁰¹ Fellous, R.; Lizzani-Cuvelier, L.; Loiseau, M.A. e Sassy, E. Resolution of racemic ϵ -lactones. *Tetrahedron: Asymmetry*. **1994** (5), 343-346.
- ¹⁰² Porto, A.L.M. Tese de doutorado. Depto. Química Orgânica, Instituto de Química, Unicamp. **2002**.
- ¹⁰³ Stewart, J.D.; Reed, K.W. e Kayser, M. M. Designer yeast: a new reagent for enantioselective Baeyer-Villiger oxidations. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1*. **1996**, 755-757.
- ¹⁰⁴ Gonçalves, A. P. Tese de Doutorado. Depto. Química Orgânica, Instituto de Química, Unicamp. **2002**
- ¹⁰⁵ Wahler, D., Badalassi, F., Crotti, P. e Reymond, J.-L. Enzyme fingerprints by fluorogenic and chromogenic substrate arrays. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001** (40), 4457-4460.
- ¹⁰⁶ Badalassi, F., Wahler, D., Klein, G., Crotti, P. e Reymond, J.-L. A versatile periodate-coupled fluorogenic assay for hydrolytic enzymes. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000** (39), 4067-4070.
- ¹⁰⁷ Klein, G. e Reymond, J.-L. Enantioselective fluorogenic assay of acetate hydrolysis for detecting lipase catalytic antibodies. *Helv. Chim. Acta*. **1999** (82), 400-406.
- ¹⁰⁸ Leroy, E.; Bensei, N. e Reymond, J.-L. A low background high-throughput screening (HTS) fluorescence assay for lipases and esterases using acyloxymethylethers of umbelliferone. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2003** (13), 2105-2108.

- ¹⁰⁹ Dean, K.E.S., Klein, G.; Renaudet, O. e Reymond, J.-L. A green fluorescent chemosensor for amino acids provides a versatile high-throughput screening (HTS) assay for proteases. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2003** (13), 1653-1656.
- ¹¹⁰ Reetz, M.T. New methods for the high-throughput screening of enantioselective catalysts and biocatalysts. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002** (41), 1335-1338.
- ¹¹¹ Reymond, J.-L. New high-throughput screening assays for biocatalysis. *Chimia* **2001** (55), 1049-1052.
- ¹¹² Slegers, A., Simpson, H.D., Alphand, V., Furstoss, R. The first fluorogenic assay for detecting Baeyer-Villigerase activity. *Biotrans.* **2001**. p.381
- ¹¹³ Guss, C. O.; Rosenthal, R. Bromohydrins from olefins and N-bromosuccinimide in water. *J. Am. Chem. Soc.* **1955**, 2549.
- ¹¹⁴ Choi, O.K. e Cho, B.T. A convenient synthesis of (1*S*,2*R*)-1,2-indene oxide and trans-(1*S*,2*S*)-2-bromo-1-indanol via oxazaborolidine-catalyzed borane reduction. *Tetrahedron: Asymmetry.* **2001** (12), 903-907.
- ¹¹⁵ Aleu, J.; Fronza, G.; Fuganti, C.; Perozzo, V. e Serra, S. On the baker's yeast mediated transformation of α -bromoenones. Synthesis of (1*S*,2*R*)-2-bromoindan-1-ol and (2*S*,3*S*)-3-bromo-4-phenylbutan-2-ol. *Tetrahedron: Asymmetry.* **1998** (9), 1589-1596.
- ¹¹⁶ Fouque, E. e Rousseau, G. Enzymatic resolution of medium-ring lactones. Synthesis of (S)-(+)-phoracantholide I. *Synthesis* **1989**, 661-666.
- ¹¹⁷ Conti, R.M.de, Porto, A.L.M., Rodrigues, J.A.R., Moran, P.J.S., Manfio, G.P. e Marsaioli, A.J. Microbial reduction of cyclohexanones. *J. Mol. Catal. B: Enz.* **2001** (11), 233-236.
- ¹¹⁸ Ren, X.; Turos, E.; Lake, C.H. e Churchill, M.R. Regiochemical and stereochemical studies on halocyclization reactions of unsaturated sulfides. *J. Org. Chem.* **1995** (60), 6468-6483.
- ¹¹⁹ Tsuji, J.; Nagashima, H. e Nemoto, H. A general synthetic method for the preparation of methyl ketones from terminal olefins: 2-decanone. *Org. Synth.* **1984** (62), 9-11.