Universidade Estadual de Campinas
UNICAMP
Instituto de Química
Departamento de Química Orgânica
Tese de Doutorado
Muitidiorreações e suas aplicações para as sinteses
de compostos enantiomericamente puros
Lucimar Pinheiro
Orientadora
Profa. Dra. Anita J. Marsaioli
Campinas/SP
Junho/2006

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE QUÍMICA DA UNICAMP

P655m	Pinheiro, Lucimar. Multibiorreações e suas aplicações para as sínteses de compostos enantiomericamente puros / Lucimar Pinheiro Campinas, SP: [s.n], 2006.
	Orientadora: Anita Jocelyne Marsaioli.
	Tese - Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Química.
	 Biocatálise. 2. Monooxigenases. 3. Seletividade. Microrganismos. I. Marsaioli, Anita Jocelyne. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Química. III. Título.

Título em inglês: Multibioreactions applied to the syntheses of enantiomerically pure compounds

Palavras-chaves em inglês: Biocatalysis, Monooxygenases, Selectivity, Microorganisms

Área de concentração: Química Orgânica

Titulação: Doutor em Ciências

Banca examinadora: Profa. Dra. Anita Jocelyne Marsaioli (orientadora), Prof. Dr. José Augusto R. Rodrigues, Profa. Dra. Ljubica Tasic, Profa. Dra. Maria da Graça Nascimento, Profa. Dra. Valéria de Oliveira. Suplentes: Prof. Dr. Paulo José Moran, Prof. Dr. Ronaldo Aloise Pilli, Prof. Dr. Henrique C. Trevisan

Data de defesa: 05/06/2006

Aos meus pais, Selma e José Antônio

> À minha irmã, Rosimar

Aos meus irmãos, Luciano, Adriano e Cristiano

E ao Renato, com muito amor!

Agradecimentos

À Profa. Anita pela orientação, incentivo, ótimos conselhos, liberdade e confiança durante todos esses anos.

Aos professores do IQ, em especial aos professores Ronaldo A. Pilli, Roberto Hittner Neto, Ljubica Tasic e Luzia Koike pelas sugestões no Exame de Área. Novamente ao Prof. Pilli pelo aprendizado na disciplina de Sínteses Orgânicas. Ao Prof. Carlos Roque pela oportunidade de participação no programa de estágio docente. À Profa. Anita pelo aprendizado durante a disciplina de Introdução à RMN de Carbono-13, e também a Profa. Carol Collins pelas correções e sugestões de artigos e resumos.

Aos amigos e colegas do grupo: Suzan, Ísis, Marizinha, Luiz Antônio, Adriana Flach, Mirele, Marcela, Beatriz, André Porto, Georgiana, Armando, Cabeça, Adriana Pianaro, Luciana, Simone, Milena, Júlia, Diego. Especialmente a Chen e Fernando pelas sugestões e correções do Exame Geral e ao Serginho por estar sempre disposto a ajudar no laboratório.

Aos amigos e colegas de outros grupos de pesquisa: Ana Lúcia, Lurdinha, Mary Ângela, Marinaldo, Regina, Odair, Edeilza, Alex, Carlos, André, Pilar.

À D. Maria, técnica do nosso laboratório, pelos inúmeros serviços prestados e acima de tudo, por ter me adotado como sua "filhinha". Obrigada D. Maria!

Aos professores Aderbal, Eva e Paulo Imamura, pelo convívio ao longo desses anos.

Aos funcionários do IQ, pelos serviços prestados e em especial ao Toninho (BIQ), Marcos, Sr. Fontana e Claúdio (vidraria), Iveraldo (desenho), Bel, Rodrigo, Elias e André (CPG), Paula, Judite e Samuel (xerox), Paula, Sônia e Sônia (RMN), Ricardo (HPLC), Claudia (rotação óptica), Pimpim (gases), Valdir (computação).

À Capes que me concedeu a bolsa durante o trabalho de pesquisa, e a Faepex pelo auxílio-ponte.

À Deuma pela força espiritual, conselhos e pela amizade.

Ao Sr. José Mariano e D. Terezinha, pelo carinho com que sempre me receberam em sua casa, e que hoje eu considero como parte da minha família.

Aos amigos José Ricardo, Patrícia, Antenor e Cássia pelos momentos de descontração.

Aos meus queridos pais: José Antônio e Selma, por serem durante toda a vida, minha base de apoio. Pai, obrigada pelo seu carinho! E a você mãe, agradeço pelos conselhos sábios nos momentos que mais precisei, muito obrigada por me incentivar sempre e nunca me deixar desanimar.

À minha irmã Rosimar. Muito obrigada pelo apoio, incentivo, confiança e carinho! Independente de ser única, não poderia existir no mundo irmã melhor que você.

Aos meus irmãos Luciano, Adriano e Cristiano, que cada um do seu jeito também souberam me dar apoio e carinho. Adoro vocês!

Às minhas grandes "amigas-irmãs": Leila, Tatiana e Règine Don Don, pelos momentos de alegria, pelo apoio e incentivo nos momentos difíceis.

E finalmente, agradeço a você Renato. Esta tese é nossa! Compartilhamos muitos momentos, bons e ruins, durante o desenvolver desse trabalho de doutorado. E mesmo quando você esteve longe, soube estar próximo, me apoiando sempre. Obrigada pela compreensão, pelos conselhos, pela valiosíssima correção do Exame de Área e da Tese, e obrigada, pela paciência para explicar os meus "portantos". Agradeço ainda por possibilitar a redação da tese com conforto material e espiritual. Amo você!

Curriculum Vitae

LUCIMAR PINHEIRO

Formação acadêmica

2002-2006	Doutorado em Ciências.
	Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Química (IQ/Unicamp).
	<i>Título:</i> Multibiorreações e suas aplicações para as sínteses de compostos enantiomericamente puros.
	Orientadora: Profa. Dra. Anita Jocelyne Marsaioli.
	<i>Bolsista da:</i> Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, CAPES.
1999 - 2001	Mestrado em Química Aplicada.
	Universidade Estadual de Maringá, Departamento de Química (DQ/UEM).
	Título: Estudo fitoquímico e avaliação da atividade antibacteriana e
	moluscicida da espécie vegetal Kielmeyera variabilis Mart. ("Clusiaceae").
	Orientador: Prof. Dr. Diógenes Aparicio Garcia Cortez.
	<i>Bolsista da:</i> Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, CAPES.
1992 - 1996	Graduação em Farmácia Industrial.
	Universidade Estadual de Maringá, UEM.

Histórico profissional

Experiência profissional

3/2000 a 3/2001	Cargo: Orientação e Direção Técnico-Profissional Função: Regulamentação junto ao Ministério da Saúde para a liberação de importação de produtos/insumos farmacêuticos Local: Opus Trading America do Sul Ltda, OPUS, Maringá-PR.
8/2000 a 12/2000	Cargo: Professora do Departamento de Farmácia Disciplina ministrada: Farmacognosia Local: Universidade Paranaense, UNIPAR, Umuarama-PR.
3/1998 a 5/1998	Cargo: Professora colaboradora do Departamento de Farmácia e Farmacologia Disciplina ministrada: Química Farmacêutica Local: Universidade Estadual de Maringá, UEM, Maringá-PR.
7/1997 a 3/1999	Cargo: Responsável técnica Local: Farmácia de Manipulação, MANIFARMA, Maringá-PR.

Artigos publicados em periódicos (Completo)

- 1. Pinheiro, L.; Marsaioli, A.J. Microbial monooxygenases applied to fragrance compounds. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic.* Artigo submetido 2006.
- Gonçalves, R.A.C.; Cagnon, J.R.; Porto, A.L.M.; Pinheiro, L.; Manfio, G.P.; Marsaioli, A.J. Multibioreaction methodology for Baeyer-Villiger monooxygenase monitoring. *Food Technology and Biotechnology*, 2004, 42 (4), 355-361.
- Pinheiro, L.; Nakamura, C.V.; Dias, B.P; Ferreira, A.G.; Young, M.C.M; Cortez, D.A.G. Antibacterial xanthones from kielmeyera variabilis Mart. (Clusiaceae). *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 2003, 98 (4), 549-552.
- 4. Pinheiro, L.; Vidotti, G.J.; Young, M.C.M.; Ferreira, A.G.; Cortez, D.A.G. Phytochemical study and evaluation of the molluscicidal activity of Kielmeyera variabilis Mart. (Clusiaceae). *Química Nova*, **2003**, *26* (2), 157-160.

Artigos publicados em periódicos (Resumo)

- 1. Pinheiro, L.; Marsaioli, A. J. Avaliação da atividade enzimática e determinação do perfil de seletividade de microrganismos brasileiros. In: 29^a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, **2006**, Águas de Lindóia, MG. *Livro de resumos*, p.QO 099.
- Pinheiro, L.; Marsaioli, A. J. Estudo e caracterização de compostos enantiomericamente puros obtidos através de células íntegras de Trichosporum cutaneum CCT 1903. In: 29^a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2006, Águas de Lindóia, MG. *Livro de resumos*, p. QO098.
- Pinheiro, L.; Marsaioli, A. J. Monooxigenases aplicadas na biotransformação de compostos de fragrância. In: III Workshop de Biocatálise e II Encuentro Regional de Biocatálisis y Biotransformaciones, 2006, São Paulo, SP. *Livro de resumos*, p. P34.
- 4 Pinheiro, L.; Marsaioli, A. J. Microbial monooxygenases applied to fragrant compounds. In: 11th Brazilian Meeting on Organic Synthesis, **2005**, Canela, RS. *Livro de resumos*, p. 173.
- Pinheiro, L.; Marsaioli, A. J. Enzimatic Asymmetric Epoxidation and Hydroxylation. In: 7th International Symposium on Biocatalysis and Biotransformations – Biotrans'05 Delft / Holanda, 2005. *Livro de resumos*, p.217.
- Pinheiro, L.; Marsaioli, A. J. Oxidações de duplas ligações C=C utilizando células íntegras de Trichosporum cutaneum CCT 1903. In: 28ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2005, Poços de Caldas, MG. *Livro de resumos*, p QO140.
- Pinheiro, L.; Marsaioli, A. J. Multi bioreações e avaliação da atividade enzimática do Trichosporum cutaneum CCT 1903. In: 27a. Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2004, Salvador, *Livro de resumos*, p. QB088.
- 8. Pinheiro, L.; Marsaioli, A. J.Avaliação da atividade enzimática do Trichosporum cutaneum CCT 1903 através de triagem utilizando multi-substratos. In: II Workshop de Biocatálise, II BIOCAT, **2004**, Campinas, SP. *Livro de resumos*, p. R2.
- Marsaioli, A. J ; Chen, L. S; Pinheiro, L.; Costa, L. A. M.; Bicalho, B. Multi bioreaction screening, a tool to discover new enzymatic activities. In: 6th International Symposium on Biocatalysis and Biotransformation, 2003, Olomouc, Czech Republic. Chemicke Listy, 2003. v. 97. p. 474-475.
- Pinheiro, L.; Cortez, D.A.G.; Vidotti, G.J. Phytochemical investigation of the Kielmeyera variabilis Mart. In: 3rd. Congress of Pharmaceutical sciences, 2001, Águas de Lindóia. European Journal of Pharmaceutical Sciences. Amsterdam : Elsevier Science BV, PO BOX 211, 1000 AE Amsterdam, Netherlands, 2001. v. 13. p. S112-S112.
- 11. Pinheiro, L.; Cortez, D.A.G.; Nakamura, C.V.; Dias Filho, B.P; Ferreira, A.G. Avaliação

das atividades biológicas da espécie Kielmeyera variabilis Mart. (Guttiferae). In: 24^a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, **2001**, Poços de Caldas, MG. *Livro de resumos*, p. PN003.

Cursos

- Fundamentos Teóricos dos Métodos de Biologia Molecular Aplicados à Pesquisa e ao Diagnóstico Clínico.
 Local: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo (USP), SP. Período: 8 a 12 de dezembro de 2003 (20h/aula).
- Métodos Cromatográficos em Análise Quiral. Local: Departamento de Química da Universidade Federal de Santa Maria, RS. Período: 9 a 12 de dezembro de 2002 (30h/aula).
- Introdução a Práticas de Microbiologia. Local: Laboratório de Microbiologia do CPQBA – Unicamp, Campinas, SP. Período: 18 a 21 de março de 2002.
- Biocatálise em Química Orgânica. Local: Instituto de Química da Universidade de São Paulo, São Paulo, SP. Período: 18 a 22 de fevereiro de 2002.
- Fundamentals of cosmetic product development. Local: 3rd Congress of Pharmaceutical Sciences, Äguas de Lindóia, SP. Período: 8 a 11 de abril de 2001.
- Desenvolvimento de Produtos e Técnicas de Manipulação Farmacêutica e Cosmecêutica. Local: Universidade Estadual de Londrina, Londrina, PR. Período: 10 de abril a 04 de dezembro de 1999 (72 h/aula).
- Da pesquisa *in vitro* até o produto fitoterápico.
 Local: III Congresso de Farmácia e Análises Clínicas de Maringá, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR.
 Período: 13 e 14 de outubro de 1999.
- Fitoterapia e Emagrecimento. Local: Laboratório Herbarium – Curitiba, PR. Período: 10 e 11 de abril de 1999 (12h/aula).
- Manipulação Farmacêutica II. Local: Consulcom (Consultoria de Cosméticos) por: Antonio Celso Sampaio Local: Curitiba, PR. Período: 15 a 16 de novembro de 1997 (15 h/aula).
- Cultivo e Preservação de Microrganismos. Local: Fundação Tropical de Pesquisas e Tecnologia "André Tosello", Campinas, SP. Período: 14 a 17 de outubro de 1996 (32 h/aula).
- Boas Práticas e Controle de Qualidade Laboratorial. Local: Fundação Tropical de Pesquisas e Tecnologia "André Tosello", Campinas/SP. Período: 04 a 08 de novembro de 1996 (40 h/aula).
- Atualização em Farmácia Industrial (Formas Farmacêuticas de Liberação Modificada, Formas Farmacêuticas Modernas, Cápsulas: Inovações Tecnológicas, Aspectos Farmacocinéticos de Medicamentos de Liberação Prolongada). Local: Departamento de Farmácia e Farmacologia, Lepemc, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR. Período: 11 a 12 de julho de 1994 (16h/aula).
- Hematologia Clínica: Anomalias das séries branca e vermelha. Interpretação clínica do hemograma.
 Local: II Congresso de Farmácia e Análises Clínicas de Maringá, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR.

Período: 08 a 12 de outubro de 1993 (8h/aula).

Estágios

1. Programa de Estágio Docente na Atividade Supervisionada de Apoio a Docência

Local: Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas (Unicamp), Campinas, SP.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Roque Duarte Correia. Disciplina: Bioquímica Molecular. Período: 02 de agosto a 07 de dezembro de 2005 (135 h/aula).

2. Estágio de Docência I do Programa de Pós-Graduação em Química

Local: Departamento de Química, Universidade Estadual de Maringá (UEM), Maringá, PR. Orientador: Prof. Dr. Gentil José Vidotti.

Disciplinas: Química Orgânica I e Química Orgânica Experimental. Período: agosto a dezembro de 2000 (30 h/aula).

3. Estágio de Treinamento em Controle de Qualidade Microbiológico

Local: Fundação Tropical de Pesquisas e Tecnologia "André Tosello" e Serviços Industrias, Campinas, SP. Orientadora: Dra. Silvia Yuko Eguchi. Período: 19 de agosto a 29 de novembro de 1996 (600 h/aula). Principais atividades desenvolvidas: - Preservação e identificação de bactérias.

- Análise microbiológica de água, de antibióticos e de desinfetantes.

4. Estágio Supervisionado para Farmacêutico

Local: Farmácia Ensino da Universidade Estadual de Maringá (FEN-UEM) e Farmácia Pública (Farmácia Canção), Maringá, PR. Período: 06 de março a 01 de dezembro de 1995, (340 h/aula).

5. Projeto de Extensão: "Medicamentos Não-Estéreis: Produção, Ensino e Extensão.

Local: Laboratório de Ensino, Pesquisa e Extensão em Medicamentos e Cosméticos (LEPEMC), Maringá, PR.

Período: 28 de março a 15 de dezembro de 1995, (360 h/aula). Atividades desenvolvidas: - Estudo de métodos analíticos para controle de qualidade

microbiológico de antibióticos.

- Estudo e desenvolvimento do manual de boas práticas de fabricação e normas de qualidade no LEPEMC.

Resumo

MULTIBIORREAÇÕES E SUAS APLICAÇÕES PARA AS SÍNTESES DE COMPOSTOS ENANTIOMERICAMENTE PUROS

Palavras-chave: biocatálise, monooxigenases, microrganismos, seletividade

A utilização de enzimas para a transformação de compostos orgânicos é cada vez mais utilizada como alternativa à síntese clássica. As enzimas são utilizadas como biocatalisadores para as sínteses in vitro de compostos assimétricos uma vez que elas são intrinsicamente quirais e apresentam alta eficiência catalítica. Diante da biodiversidade de microrganismos existentes na natureza e da necessidade de descobrir novos biocatalisadores para as sínteses de blocos de construções quirais e de produtos químicos de alto valor agregado, esta tese teve como objetivos a avaliação enzimática de células microbianas íntegras, o isolamento e a identificação de compostos enantiomericamente puros obtidos através da ação enzimática de oxidorredutases. Inicialmente, a avaliação da presença de Baeyer-Villiger monooxigenases em 12 espécies de fungos através de biocatálise convencional levou a produção de (R)-(+)-5-metil- ε -caprolactona (1b), produzida pelos fungos Aspergillus oryzae CCT 0975 e Geotricum candidum CCT 1205 em excelentes conversões (ambas 98%) e excessos enantioméricos (96% e 91%), respectivamente. Na etapa seguinte foi desenvolvida uma metodologia alternativa a biocatálise convencional, denominada "multibiorreações", objetivando uma triagem mais rápida e eficiente. A metodologia foi aplicada na detecção de atividade de monooxigenase permitindo um aumento no conhecimento do perfil de seletividade dos substratos analisados. A ação enzimática das células íntegras de Trichosporum cutaneum CCT 1903 resultou na redução de metilcicloexanonas orto- e para-substituídas (1 e 6) e na oxidação da cis-jasmona (8). Posteriormente realizou-se o isolamento, identificação, determinação dos excessos enantioméricos, determinação das configurações relativas e absolutas dos produtos obtidos a partir da oxidação da cis-jasmona (8): (75,8R)-epoxijasmona, 12 (92% e.e.), 7,8-diidróxijasmona, 13 (53% e.e.) e (4S)-hidroxijasmona (86% e.e.). Nesta etapa, a determinação do perfil de seletividade de T. cutaneum CCT 1903 foi avaliado frente a 14

substratos contendo ligações duplas olefínicas (24-37). A atividade de monooxigenase foi verificada sobre os seguintes monoterpenos monocíclicos: (R)-(-)-carvona (25), α - e β iononas (26 e 27) e (R)-(+)-limoneno (32). As biotransformações destes compostos de fragrâncias levaram às sínteses de: (1S,2R,4R)-neoisodiidrocarveol (41), (6R)-isoprenil-(3R)-metil-2-oxo-oxepanona (42), ácido-(3R)-isopropenil-6-oxo-heptanóico (43), 2,3epóxi-(5R)-isopropenil-2-metilcicloexanol (44), 4-oxo-7,8-diidro- β -ionona (50), α -homociclogeraniol (51), limoneno-1,2-diol (54) e (+)-(4R)-p-1-menteno-8,9-diol (55), os quais foram identificados espectroscopicamente (RMN de ¹H e ¹³C, ¹H e ¹H gCOSY, ¹H e ¹³C HSQC, ¹H e ¹³C gHMBC). Finalmente, foi realizado um estudo das atividades enzimáticas para os fungos CCT 5632, Rhyzopus oryzae CCT 1022 e a levedura AMA 7, utilizando a metodologia de multibiorreações e reações de biotransformações convencionais (substratos 8, 25-27 e 32). Uma atividade oxidorredutase foi detectada em AMA7 e R. oryzae CCT 1022. A levedura AMA7 produziu a: 7,8-epoxijasmona (12), 7,8-diidroxijasmona (13), 4hidroxijasmona (14) e a diidrocarvona (45), enquanto que R. oryzae CCT 1022 produziu o composto 14 e o neoisodiidrocarveol (41). O fungo 5632 também apresentou atividade monooxigenase verificada a partir da formação da 4-oxo-7,8-diidro-β-ionona (50).

Abstract

MULTIBIOREACTIONS APPLIED TO THE SYNTHESES OF ENANTIOMERICALLY PURE COMPOUNDS

Keywords: biocatalysis, monooxygenases, microorganisms, selectivity

The utilization of enzymes for organic compound transformations is an alternative to classical syntheses. Enzymes are used as biocatalysts for the syntheses in vitro of asymmetric compounds because they are intrinsically chiral and result in high catalytic efficiency. In front of the biodiversity of existing microorganisms in Nature and of the necessity to discover new biocatalysts for the syntheses of blocks of chiral constructions and of chemical products with high added value, this thesis aimed at enzymatic evaluation of oxidoreductase from microbial whole cells and their application of the production of enantiomerically pure compounds. First of all, Baeyer-Villiger monooxygenase (BVMO) activity was monitored using traditional biocatalytic methods. Bioprospection in 14 fungi resulted in the detection of cyclohexanone BVMO in Aspergillus oryzae CCT 0975 and Geotrichium candidum CCT 1205. The lactone (R)-(+)-1b was obtained in high enantiomeric excesses (96% and 91%, respectively) and conversion (98%). Searching for rapid screening method, multibioreaction methodology was implemented and applied to the detection of monoxigenase activity, which increased \mathbf{n} times the amount of evaluated microorganisms per unit of time, where **n** is the number of added substrates. *Trichosporum* cutaneum CCT 1903 produced outstanding results, reducing the ortho- and para-substituted (1 and 6) methyl-cyclohexanones and oxidizing *cis*-jasmone (8). After isolation, identification and determination of the enantiomeric excess, the relative and absolute configuration of the *cis*-jasmone bioproducts were: (7S, 8R)-epoxyjasmone, **12** (*e.e.* 92%), 7,8-dihydroxyjasmone, 13 (e.e. 53%) and (4S)-hydroxyjasmone, 14 (e.e. 86%). The enantioselectivity and substrate specificity of alkene monooxygenase in T. cutaneum CCT 1903 was further investigated using 14 substrates (24-37), applying the multibioreaction approach. Monooxygenase activity was detected in (R)-(-)-carvone, α - and β -ionones and

(*R*)-(+)-limonene. Batch reactions of these fragrance compounds produced: (1*S*,2*R*,4*R*)neoisodihydrocarveol (41), (6*R*)-isoprenyl-(3*R*)-methyl-2-oxo-oxepanone (42), (3*R*)isopropenyl-6-oxoheptanoic acid (43), 2,3-epoxy-(5*R*)-isopropenyl-2-methylcyclohexenol (44), 4-oxo-7,8-dihydro-β-ionone (50), α-homo-cyclogeraniol (51), (*R*)-(+)-limonene-1,2– diol (54) and uroterpenol (55) as pure samples for spectroscopic identification (¹H and ¹³C NMR, ¹H and ¹H gCOSY, ¹H and ¹³C HSQC, ¹H and ¹³C gHMBC). Oxidoreductase activity was monitored using multibioreaction methodology and traditional biocatalytic methods with the fungi CCT 5632, *Rhyzopus oryzae* CCT 1022 and the yeast AMA 7 (substrates **8**, **25-27** and **32**). Thus AMA7 produced epoxyjasmone (12), 7,8dihydroxyjasmone (13), hydroxyjasmone (14) and dihydrocarvone (45), while that *R. oryzae* CCT 1022 produced **14** and neoisodihydrocarveol (41). The fungus 5632 also presented monooxygenase activity confirmed through formation from 4-oxo-7,8-dihydro-βionone (**50**).

Índice

Lista de Abreviaturas	xxiii	
Lista de Figuras	xxv	
Lista de Esquemas	xxviii	
Lista de Tabelas	xxx	
Capítulo I: Biotecnologia, Biotransformação e Biocatálise	1	
I.1. Introdução Geral	3	
I.2. Enzimas: Histórico e Atualidades	6	
I.3. Biotransformações através do uso de oxidorredutases	11	
I.3.1. Aplicações e propriedades	11	
I.3.2. Classificação das oxidorredutases	16	
Capítulo II: Objetivos	21	
Capítulo III: Baeyer-Villiger Monooxigenases	25	
III.1. Oxidação de Baeyer-Villiger química	27	
III.2. Oxidação de Baeyer-Villiger enzimática	29	
III.3. Resultados e Discussão	34	
III.3.1. Avaliação da presença de Baeyer-Villiger monooxigenases em	34	
fungos através de biocatálise convencional		Excluído: .
III.3.2. Conclusões	38	
Capítulo IV. Triagem mediante "Multibiorreações"	39	
IV.1. Resultados e Discussão	41	
IV.1.1. Princípio da metodologia de triagem denominada multibiorreações	41	
IV.1.2. Aplicação do método de triagem de multibiorreações visando à		
detecção de Baeyer-Villiger monooxigenases	43	
IV.1.3. Conclusões	47	

Capítulo V. Epoxidações de alcenos e Hidroxilações catalisadas por	49
Monooxigenases.	
V.1. Sínteses assimétricas de epóxidos	51
V.2. Catalisadores enzimáticos de reações de epoxidações de alcenos e	
hidroxilações	53
V.2.1. Monooxigenases contendo heme	53
V.2.2. Monooxigenases não-heme	55
V.3. Resultados e Discussão	60
V.3.1. Isolamento e identificação dos produtos obtidos a partir da oxidação	
da cis-jasmona (8) por células íntegras de T. cutaneum CCT 1903	60
V.3.1.1. Hidroxilação assimétrica da cis-jasmona	62
V.3.1.1.1. Determinação da configuração absoluta da 4-	
hidroxijasmona (14)	65
V.3.1.1.2. Determinação do excesso enantiomérico da 4-	
hidroxijasmona (14)	68
V.3.1.2. Epoxidação assimétrica da cis-jasmona	69
V.3.1.2.1. Determinação do excesso enantiomérico da 7,8-	
epoxijasmona (12)	70
V.3.1.2.2. Determinação da configuração absoluta da 7,8-	
epoxijasmona (12)	72
V.3.1.2.2.1. Formação dos ésteres de (S)-MTPA a partir da (\pm) -7-	
hidróxi-8-metoxijasmona [(±)-18a] e da 7-hidróxi-8-	
metoxijasmona (18a) obtida por biocatálise.	79
V.3.1.3. Diidroxilação da <i>cis</i> -jasmona	85
V.3.1.3.1. Determinação do excesso enantiomérico da 7,8-	
diidroxijasmona (13)	86
V.3.2. Determinação do perfil de seletividade de diferentes substratos	
contendo duplas ligações olefínicas	91
V.3.3. Conclusões	96

Capítulo VI. Biotransformações Oxidativas aplicadas a Terpenos e	
Compostos de Fragrâncias	97
VI.1. Biossíntese e Biotransformação de Terpenos	99
VI.2. Resultados e Discussão	102
VI.2.1. Biooxidações da (R) -(-)-carvona (25)	102
VI.2.1.1. Produto de biorredução da (R)-(-)-carvona: (1S,2R,4R)-	
neoisodiidrocarveol (41)	103
VI.2.1.2. Produtos de biooxidações da (R)-(-)-carvona: (6R)-isoprenil-	
(3 <i>R</i>)-metil-2-oxo-oxepanona (42), ácido-(3 <i>R</i>)-isopropenil-6-oxo-	
heptanóico (43) e 2,3-epóxi-(5R)-isopropenil-2-metilcicloexenol (44)	105
VI.2.2. Biooxidações das α - e β -iononas (26 e 27)	110
VI.2.3. Biooxidações do (R) -(+)-limoneno (32)	115
VI.2.4. Conclusões	119
Capítulo VII. Avaliação das Atividades Enzimáticas de <i>Rhyzopus oryzae</i>	121
VII 1. Desultados a Diagussão	122
VII 1 1 Avaliação de atividada anzimática a determinação do parfil da	123
solotividado da lovadura AMA 7	122
VII 1.2 Avaliação das atividades enzimáticas e determinação do perfil de	123
seletividade de <i>Rhyzonus oryzae</i> CCT 1022 e do fungo CCT 5632	126
VII 1.3 Conclusões	120
(11.1.9. Conclusions)	127
Capítulo VIII. Considerações Finais e Perspectivas	129
Capítulo IX. Parte experimental	133
IX.1. Instrumentação e condições	135
IX.2. Outros materiais e equipamentos utilizados para a realização das reações	
de biocatálise	137
IX.3. Procedimentos gerais adotados no laboratório de biocatálise	137

IX.4. Microrganismos utilizados nas reações de biocatálise	138
IX.5. Meios de cultura e soluções destinados a manutenção e reativação das	
linhagens em estudo	138
IX.6. Parte experimental referente aos compostos sintetizados	140
IX.6.1. Procedimento geral para a reação biocatalítica da 4-	
metilcicloexanona (1)	140
IX.6.2. Síntese da (±)-5-metil-ε-caprolactona (1a, 1b)	141
IX.6.3. Síntese da cicloalcanona substituída (7)	142
IX.6.3.1. Síntese do adipato de dimetila (10)	142
IX.6.3.2. Síntese da 2-carbometoxiciclopentanona (11)	142
IX.6.3.3. Síntese da 2-alil-2-carbometoxiciclopentanona (7)	143
IX.6.4. Procedimento para a reação biocatalítica utilizando o método de	
triagem de multibiorreações	144
IX.6.5. Biotransformação da cis-jasmona (8) utilizando células íntegras de	
T. cutaneum CCT 1903	144
IX.6.5.1. Síntese da 4-hidroxijasmona (4-hidróxi-3-metil-2-pent-2-enil-	
2-ciclopentanona) [14]	145
IX.6.5.1.1. Síntese do éster do (<i>R</i>)-MTPA (14a)	146
IX.6.5.1.2. Síntese do éster do (S)-MTPA (14b)	147
IX.6.5.2. Síntese da 7,8-epoxijasmona (2-(3-etil-oxiranilmetil)-3-metil-	
2-ciclopentanona) [12]	147
IX.6.5.2.1. Síntese da (±)-7,8-epoxijasmona [(±)-12]	148
IX.6.5.2.2. Síntese de (±)- 15a e (±)- 15b	149
IX.6.5.2.3. Síntese de (±)-16a e (±)-16b	149
IX.6.5.2.4. Derivatização da (±)-7,8-epoxijasmona com trimetil-	
orto-acetato e PPTS	150
IX.6.5.2.4.1. Síntese da (±)-7-hidróxi-8-metoxijasmona	
[(±) -18a]	150
IX.6.5.2.4.2. Sintese da (±)-7-metóxi-8-hidroxijasmona,	
[(±)- 18b]	151

IX.6.5.2.5. Derivatização do (\pm) -1,2-epoxidecano $[(\pm)$ -19] com	
trimetil-orto-acetato e PPTS	151
IX.6.5.2.5.1. Síntese do (±)-1-hidróxi-2-metoxidecano,	
[(±) -20a]	151
IX.6.5.2.5.2. Síntese do (±)-1-metóxi-2-hidroxidecano	
[(±)-20b]	152
IX.6.5.2.6. Derivatização da 7,8-epoxijasmona (12), obtida a partir	
da reação com T. cutaneum CCT 1903, com trimetil-orto-acetato e	
PPTS	152
IX.6.5.2.6.1. Síntese da 7-hidróxi-8-metoxijasmona (18a)	152
IX.6.5.2.6.2. Síntese da 7-metóxi-8-hidroxijasmona (18b)	152
IX.6.5.2.7. Sínteses dos ésteres de (S)-MTPA a partir da (\pm) -7-	
hidróxi-8-metoxijasmona [(±)-18a]	153
IX.6.5.2.7.1. Síntese do éster de (S)-Mosher da (7S)-hidróxi-	
(8 <i>S</i>)-metoxijasmona [(±)- 21a]	153
IX.6.5.2.7.2. Síntese do éster de (S)-Mosher da (7R)-hidróxi-	
(8 <i>R</i>)-metoxijasmona [(±)- 21b]	154
IX.6.5.2.8. Sínteses dos ésteres de (S)-MTPA a partir da 7-hidróxi-	
8-metoxijasmona obtida por biocatálise (18a)	154
IX.6.5.2.8.1. Síntese do éster de (S)-Mosher da (7S)-hidróxi-	
(8S)-metoxijasmona (21a)	155
IX.6.5.3. Síntese da 7,8-diidroxijasmona (2-(2,3-diidróxi-pentil)-3-	
metil-2-ciclopentanona) [13]	155
IX.6.5.3.1. Síntese da (\pm)-7,8-diidroxijasmona [(\pm)-13]	156
IX.6.5.3.2. Síntese de (±)- 22	156
IX.6.5.3.3. Síntese do (±)-acetonídeo (±)-23	157
IX.6.5.3.4. Síntese do acetonídeo 23	158
IX.6.6. Biotransformação da (R)-(-)-carvona utilizando células íntegras de	
T. cutaneum CCT 1903	158
IX.6.6.1. Síntese do $(1S,2R,4R)$ -neoisodiidrocarveol (41)	159

IX.6.6.2. Síntese da (6 <i>R</i>)-isoprenil-(3 <i>R</i>)-metil-2-oxo-oxepanona (42)	159
IX.6.6.3. Síntese do ácido-(3 <i>R</i>)-isopropenil-6-oxo-heptanóico (43)	160
IX.6.6.4. Síntese do 2,3-epóxi-(5R)-isopropenil-2-metilcicloexenol	
(44)	160
IX.6.6.4.1. Síntese do carveol (±)-48	161
IX.6.6.4.2. Síntese da (±)-2,3-epóxi-(5R)-isopropenil-2-metil-	
cicloexenol [(±)-44]	161
IX.6.7. Biotransformação das α - e β -iononas utilizando células íntegras de	
T. cutaneum CCT 1903	162
IX.6.7.1. Síntese da 4-oxo-7,8-diidro-β-ionona (50)	163
IX.6.7.2. Síntese do α -homo-ciclogeraniol (51)	163
IX.6.8. Biotransformação do (R)-(+)-limoneno utilizando células íntegras	
de T. cutaneum CCT 1903	164
IX.6.8.1. Síntese do limoneno-1,2-diol (54)	164
IX.6.8.2. Síntese do (+)-(4 <i>R</i>)- <i>p</i> -1-menteno-8,9-diol (55)	165

Capítulo X. Anexo

167

Lista de Abreviaturas

AMCPB	Ácido meta-cloroperbenzóico
AcOEt	Acetato de etila
BVMO	Baeyer-Villiger Monooxigenase
С	Conversão
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
ССТ	Coleção de Culturas Tropicais
CDCl ₃	Clorofórmio deuterado
CD ₃ OD	Metanol deuterado
СНМО	Cicloexanona monooxigenase
CG-EM	Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
COSY	"Correlated Spectroscopy"
Da	Daltons
DCC	1,3-dicicloexilcarbodiimida
DEPT	"Distortionless Enhancement by Polarization Transfer"
DIBALH	Hidreto de diisobutilalumínio
DMAP	4-dimetilaminopiridina
DNA	Ácido desoxirribonucléico
EC	"Enzyme nomenclature"
е.е.	Excesso enantiomérico
EM	Espectrometria de Massas
eV	Elétrons-volt
FAD	Flavina Adenina Dinucleotídeo
FID	"Flame Ionization Detector"
FMN	Flavina Mononucleotídeo
Hex	Hexano
HMBC	"Heteronuclear Multiple Bond Correlation"
HOAc	Ácido acético
HSQC	"Heteronuclear Single Quantum Correlation"
Hz	Hertz
HTS	"High Throughput Screening"

IE	Impacto eletrônico
Int. rel.	Intensidade relativa
IUBMB	"International Union of Biochemistry and Molecular Biology"
IV	Infravermelho
J	Constante de acoplamento escalar
M^{\bullet^+}	Íon molecular
MHz	Megahertz
M.M.	Massa Molecular
MnO_2	Dióxido de manganês
MTPA	Ácido α-metóxi-α-trifluorometil-α-fenilacético
m/z	Razão entre a massa do fragmento por carga e sua respectiva carga elétrica
NAD^+	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo
$NADP^+$	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo de Fosfato
NOE	"Nuclear Overhouser Effect"
PAMO	Fenilacetona monooxigenase
PPTS	p-tolueno sulfonato de piridínio
Re	Descritor para faces heterotópicas
RMN de ¹ H	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
RMN de ¹³ C	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono
RMN de 1D	Ressonância Magnética Nuclear Unidimensional
RMN de 2D	Ressonância Magnética Nuclear Bidimensional
rpm	Rotações por minuto
Si	Descritor para faces heterotópicas
TMS	Tetrametilsilano
THF	Tetraidrofurano
T _R	Tempo de retenção
UV	Ultravioleta
v/v	Relação de volume por volume
$\nu_{m{\acute{a}x}}$	Freqüência de máxima absorção
δ	Deslocamento químico

Lista de Figuras

Figura I.1:	Exemplos de produtos obtidos em larga escala por biocatálise				
Figura I.2:	Mecanismo enzimático "chave-e-fechadura" proposto por Fisher				
Figura 1.3:	Equação de Michaelis e Menten				
Figura I.4:	a) Ligação peptídica e b) Estrutura tridimensional da lisozima (primeira				
	enzima na qual a estrutura tridimensional foi definida por cristalografia				
	de raios X, em 1967)	8			
Figura I.5:	Diagrama mostrando o mecanismo de "encaixe induzido" proposto por				
	Koshland	9			
Figura I.6:	Classificação das enzimas	10			
Figura I.7:	Diagrama de energia de uma reação catalisada vs. não-catalisada.				
	(E=enzima, S=substrato, [ES]= complexo enzima-substrato,				
	P=produto)	12			
Figura I.8:	Centros redox ativos empregados na catálise enzimática das				
	oxidorredutases: flavina adenina dinucleotídeo (FAD), flavina				
	mononucleotídeo (FMN), nicotinamida adenina dinucleotídeo fostato				
	NADPH, nicotinamida adenina dinucleotídeo (NADH)	13			
Figura I.9:	Biotransformações competitivas utilizando células íntegras	14			
Figura I.10:	Biotransformações industriais realizadas com enzimas ou células				
	íntegras (baseadas em 134 processos)	15			
Figura I.11:	Sistema de reciclagem de cofator utilizando formato desidrogenase	16			
Figura I.12:	Classificação das oxidorredutases	17			
Figura I.13:	Reações de oxigenação enzimática catalisadas por oxidases	17			
Figura I.14:	Reações de oxigenação enzimática catalisadas por mono- e dioxigenases	18			
Figura I.15:	Reações típicas catalisadas pelas monooxigenases	19			
Figura III.1:	Requerimentos estéreo-eletrônicos para a migração do grupo alquila	28			
Figura III.2	Representação esquemática das principais características estruturais e				
	mudanças conformacionais que ocorrem nas etapas catalíticas das				
	reações de BVMO	32			
Figura III.3	Cromatograma obtido por CG-FID característico da eluição das				
	substâncias padrões (1a e 1b)	36			

Figura III.4	Mecanismo de Baeyer-Villiger monooxigenases (BVMO) dependentes	
	de flavina mediando a oxidação da 4-metilcicloexanona (1)	38
Figura IV.1:	Substratos analisados nas multibiorreações e os respectivos produtos	
	esperados	42
Figura IV.2:	Cromatograma de íons totais (CG-EM) das cicloalcanonas utilizadas	
	como substratos para avaliação da atividade enzimática do T. cutaneum	
	CCT 1903: Substratos 1, 5-8	43
Figura IV.3:	Cromatograma de íons totais (CG-EM) obtido após 2 h de reação com	
	T. cutaneum CCT 1903	45
Figura IV.4:	Cromatograma de íons totais (CG-EM) obtido após 12 h de reação com	
	T. cutaneum CCT 1903	46
Figura V.1:	Intermediários versáteis para as sínteses de compostos biologicamente	
	ativos	52
Figura V.2:	Estrutura química da protoporfirina	54
Figura V.3:	Produtos de epoxidação utilizando estireno monooxigenase de	
	Pseudomonas sp. VLB120	58
Figura V.4:	Monitoramento por CG-EM da ação do T. cutaneum CCT 1903 sobre a	
	<i>cis</i> -jasmona	60
Figura V.5:	Prostaglandinas E_2 , D_2 e $F_{2\alpha}$	63
Figura V.6:	Modelos conformacionais para ésteres do MTPA (a, b) e a influência	
	nas magnitudes no espectro de RMN de ¹ H e das medidas de $\Delta \delta^{SR}$ (c,	
	d). As setas indicam o efeito de proteção e desproteção causado pelo	
	sistema aromático	66
Figura V.7:	Modelos conformacionais para os ésteres do MTPA do composto 14 e	
	os deslocamentos químicos de 1H, que sofrem o efeito anisotrópico do	
	sistema aromático e as magnitudes das medidas de $\Delta \delta^{SR}$	67
Figura V.8:	Cromatograma de íons totais (CG-EM) do éster do (S)-MTPA-14b	68
Figura V.9:	Cromatogramas obtidos por CG-FID quiral da: a) (±)-7,8-	
	epoxijasmona [(±)-12], b) 7,8-epoxijasmona (12) obtida por biocatálise	71
Figura V.10:	Cromatograma de íons totais (CG-EM) obtido após redução da (±)-7,8-	
	epoxijasmona [(±)-12] com LiAlH ₄ e subseqüente oxidação alílica com	
	MnO ₂	73
Figura V.11:	Cromatogramas obtidos por CG-FID quiral do composto (\pm)-22	88

Figura V.12:	Cromatogramas obtidos por CG-FID quiral do: a) acetonídeo (±)-23 e			
	b) acetonídeo 23 obtido por biocatálise	90		
Figura V.13:	Deslocamentos químicos de RMN de ¹³ C para as metilas geminais dos			
	acetonídeos cis e trans	90		
Figura V.14:	Cromatograma de íons totais (CG-EM) da 6-metil-5-hepten-2-ona (24),			
	(<i>R</i>)-(-)-carvona (25), α- e β-iononas (26 e 27)	92		
Figura V.15:	Cromatograma de íons totais (CG-EM) do linalool (28), β-citronelol			
	(29), geraniol (30) e α -bisabolol (31)	92		
Figura V.16:	Cromatograma de íons totais (CG-EM) do (R)-(+)-limoneno (32), 1-			
	isopropenil-2,5-dimetóxi-4-metilbenzeno (33) e valenceno (34)	93		
Figura V.17:	Cromatograma de íons totais (CG-EM) do α - e β -pinenos (35 e 36) e			
	jinkoh-eremol (37)	93		
Figura V.18:	Ácido oleico (39) e sulfinato de alquila (40)	95		
Figura VI.1:	Tipos de biocatalisadores utilizados para produção de terpenos no			
	período entre 2006-1996	101		
Figura VI.2:	Regra de Prelog para a redução assimétrica de cetonas	104		
Figura VI.3:	α-ionona (26), β-ionona (27) e seu derivado, ácido abscísico (49)	110		
Figura VII.1:	Cromatograma de íons totais (CG-EM) dos substratos: 8, 25-27 e 32			
	utilizados para avaliação da atividade enzimática da AMA 7	124		
Figura VII.2:	Cromatograma de íons totais (CG-EM) obtido após 24 h de reação com			
	AMA 7. Substratos: 8, 25-27 e 32	124		

Lista de Esquemas

Esquema III.1:	Oxidação de Baeyer-Villiger por perácidos					
Esquema III.2:	Síntese da (±)-5-metil- ϵ -caprolactona (1a e 1b) obtida a partir da					
	oxidação de 1 por via química					
Esquema IV.1:	Síntese da cicloalcanona substituída 7					
Esquema V.1:	Ciclo catalítico das monooxigenases dependentes do citocromo P-450					
Esquema V.2:	Epoxidação estereosseletiva do cis-β-metilestireno, utilizando					
	citocromo P-450 _{CAM} de <i>P. putida</i>					
Esquema V.3:	Epoxidação enantiosseletiva de ligações duplas C-C com P.					
	oleovorans ATCC 29347	57				
Esquema V.4:	Epoxidação assimétrica de estireno com xileno monooxigenase de P.					
	<i>putida</i> mt-2	57				
Esquema V.5:	Produtos isolados a partir da atividade enzimática das células íntegras					
	de T. cutaneum CCT 1903 sobre a cis-jasmona (8): 7,8-epoxijasmona					
	(12), 7,8-diidroxijasmona (13), 4-hidroxijasmona (14).					
Esquema V.6:	Produção de álcoois sinteticamente úteis por hidroxilação enzimática					
Esquema V.7:	Biotranformações alílicas realizadas por: a) R. opacus PWD4 e b)					
	Streptomyces halstedii.					
Esquema V.8:	Síntese da (±)-7,8-epoxijasmona, $[(\pm)-12]$ e hidrólise					
Esquema V.9:	Redução da (±)-7,8-epoxijasmona [(±)-12] com LiAlH ₄ e oxidação					
	alílica, utilizando MnO ₂ .					
Esquema V.10:	Síntese da (±)-7-hidróxi-8-metoxijasmona [(±)-18a] e (±)-7-metóxi-					
	8-hidroxijasmona [(±)-18b]					
Esquema V.11:	Síntese do (±)-1-hidróxi-2-metoxidecano $[(\pm)-20a]$ e do (±)-1-					
	metóxi-2-hidroxidecano [(±)- 20b]	77				
Esquema V.12:	Síntese da 7-hidróxi-8-metoxijasmona (18a) e 7-metóxi-8-					
	hidroxijasmona (18b)					
Esquema V.13:	Modelos conformacionais para os ésteres do (S)-MTPA dos					
	compostos (±)-21a e (±)-21b	79				

Esquema V.14:	Modelos conformacionais para os ésteres do (S)-MTPA dos					
	compostos 21a e 21b	83				
Esquema V.15:	Atribuição da configuração absoluta para os compostos 12 e 18a	83				
Esquema V.16:	Acetilação da (±)-7,8-diidroxijasmona (13).					
Esquema V.17:	Síntese do acetonídeo (\pm) -23.					
Esquema VI.1:	Biossíntese de terpenos e unidade de isopreno (no canto inferior					
	esquerdo)	100				
Esquema VI.2:	Produtos obtidos a partir da biotransformação da (R)-(-)-carvona					
	(25): (1 <i>S</i> ,2 <i>R</i> ,4 <i>R</i>)-neoisodiidrocarveol (41), (6 <i>R</i>)-isoprenil-(3 <i>R</i>)-metil-					
	2-oxo-oxepanona (42), ácido-(3R)-isopropenil-6-oxo-heptanóico (43)					
	e 2,3-epóxi-(5R)-isopropenil-2-metilcicloexenol (44)	103				
Esquema VI.3:	Redução do sistema carbonílico α,β -insaturado da (R)-(-)-carvona					
	(25) por ataque estereosseletivo do hidrogênio, utilizando células					
	integras de T. cutaneum CCT 1903	104				
Esquema VI.4:	Oxidação de Baeyer-Villiger da (R)-(-)-carvona (25) com células					
	íntegras de T. cutaneum CCT 1903	106				
Esquema VI.5:	Mecanismo de degradação da (R)-(-)-carvona (25) e formação do					
	ácido-(3R)-isopropenil-6-oxo-heptanóico (43), catalisada por células					
	íntegras de T. cutaneum CCT 1903	108				
Esquema VI.6:	Síntese da 2,3-epóxi-(5 R)-isopropenil-2-metilcicloexenol, [(±)-44]	109				
Esquema VI.7:	Produtos obtidos a partir da biotransformação das α - e β -iononas (26					
	e 27): 4-oxo-7,8-diidro- β -ionona (50) e α -homo-ciclogeraniol (51)	111				
Esquema VI.8:	Mecanismo de ação proposto para a degradação da cadeia lateral α -					
	ionona (26)	114				
Esquema VI.9:	Formação de limoneno-1,2-diol (54) e uroterpenol (55) a partir da					
	biotransformação de (R) -(+)-limoneno (32)	115				
Esquema VI.10:	Síntese do bisabolol a partir do uroterpenol	118				
Esquema VII.1:	Síntese da 4-hidroxijasmona (14) utilizando células íntegras de R.					
	oryzae CCT 1022	126				
Esquema VII.2:	Síntese da 4-oxo-7,8-diidro-β-ionona (50) utilizando células íntegras					
	do fungo CCT 5632	127				

Lista de Tabelas

Tabela I.1:	Aplicações da biocatálise nas indústrias: farmacêutica, alimentícia e				
	química fina	5			
Tabela III.1:	Propriedades bioquímicas das BVMO do Tipo I				
Tabela III.2:	Oxidação microbiana da 4-metilcicloexanona (1) com células íntegras				
	de fungos	37			
Tabela V.1:	Epoxidação microbiana de alcenos	56			
Tabela V.2:	Epoxidação assimétrica de alcenos usando cloroperoxidase (CPO)				
Tabela V.3:	Dados espectroscópicos de RMN de ¹ H e de ¹³ C para a 4-				
	hidroxijasmona, (14)	64			
Tabela V.4:	Dados parciais de RMN de ¹ H para os ésteres do composto 14 derivado				
	do (S)- e (R)-Mosher, (14a e 14b)	67			
Tabela V.5:	Dados espectroscópicos de RMN de ¹ H e de ¹³ C para a 7,8-				
	epoxijasmona, (12)	69			
Tabela V.6:	Dados espectroscópicos de RMN de 1 H e de 13 C para a (±)-7-hidróxi-8-				
	metoxijasmona, [(±)-18a]	75			
Tabela V.7:	Dados espectroscópicos de RMN de ¹ H e de ¹³ C para a (±)-7-metóxi-8-				
	hidroxijasmona, [(±)-18b]	76			
Tabela V.8:	Dados parciais de RMN de ¹ H para os ésteres (±)-21a e (±)-21b	80			
Tabela V.9:	Dados espectroscópicos de RMN de ¹ H e de ¹³ C para o composto				
	(±)-21a	81			
Tabela V.10:	Dados espectroscópicos de RMN de ¹ H e de ¹³ C para o composto				
	(±)-21b	82			
Tabela V.11:	Dados espectroscópicos de RMN de ¹ H e de ¹³ C para o composto 21a	84			
Tabela V.12:	Dados espectroscópicos de RMN de ¹ H e de ¹³ C para a 7,8-				
	diidroxijasmona, (13)	85			
Tabela V.13:	Dados espectroscópicos de RMN de ¹ H e de ¹³ C para o éster da (±)-7,8-				
	diidroxijasmona, [(±)-22]	87			
Tabela V.14:	Dados espectroscópicos de RMN de ¹ H e de ¹³ C para o (±)-acetonídeo,				
	(±)- 23	89			

Tabela V.15:	Determinação da seletividade do T. cutaneum CCT 1903 frente a			
	diferentes substratos contendo ligações duplas olefínicas	94		
Tabela VI.1:	Propriedades de odores de alguns monoterpenos	100		
Tabela VI.2:	Dados espectroscópicos de RMN de ¹ H e de ¹³ C para o (1 <i>S</i> ,2 <i>R</i> ,4 <i>R</i>)-			
	neoisodiidrocarveol, (41)	105		
Tabela VI.3:	Dados espectroscópicos de RMN de ¹ H e de ¹³ C para (6 <i>R</i>)-isoprenil-			
	(3 <i>R</i>)-metil-2-oxo-oxepanona, (42)	106		
Tabela VI.4:	Dados espectroscópicos de RMN de ¹ H e de ¹³ C para o ácido-(3R)-			
	isopropenil-6-oxo-heptanóico, (43)	108		
Tabela VI.5:	Dados espectroscópicos de RMN de ¹ H e de ¹³ C para o 2,3-epóxi-(5R)-			
	isopropenil-2-metilcicloexenol, [(±)-44]	109		
Tabela VI.6:	Dados espectroscópicos de RMN de ¹ H e de ¹³ C para a 4-oxo-7,8-			
	diidro-β-ionona, (50)	112		
Tabela VI.7:	Dados espectroscópicos de RMN de 1 H e de 13 C para o α -homo-			
	ciclogeraniol, (51)	114		
Tabela VI.8:	Dados espectroscópicos de RMN de ¹ H e de ¹³ C para o limoneno-1,2-			
	diol, (54)	116		
Tabela VI.9:	Dados espectroscópicos de RMN de ¹ H e de ¹³ C para os uroterpenóis			
	(4R,8R)-(55a) e $(4R, 8S)$ -(55b)	117		
Tabela VII.1:	Oxidação microbiana da cis-jasmona (8) com células íntegras de AMA			
	7	125		
Tabela IX.1:	Solução Tampão de Sorensen	140		

Capítulo I

Biotecnologia,

Biotransformação e Biocatálise

1

Biotecnologia, Biotransformação e Biocatálise

I.1. Introdução Geral.

Muito antes mesmo que o homem entendesse a natureza química das enzimas, ele já lidava com a biotecnologia na produção de vinhos, pães e derivados lácteos. Não restam dúvidas de que a biotecnologia do século XXI é muito diferente daquela quando este termo foi utilizado, pela primeira vez, no século passado.¹ No contexto atual, a biotecnologia é o termo aplicado a quaisquer processos que utilizam organismos vivos, ou parte de organismos, para fazer ou modificar produtos, para aperfeiçoar plantas ou animais, ou para desenvolver microrganismos, ou parte deles, para usos específicos.²

Através da fermentação e transformação microbiana, os microrganismos podem ser utilizados para a produção de compostos químicos biologicamente importantes.² Enquanto que a fermentação necessita de fontes de nitrogênio e carbono, a conversão microbiana necessita de um substrato adequado. A catálise enzimática resulta numa transformação específica e simples deste substrato, o qual não precisa ser necessariamente "natural"; substratos "não-naturais" (denominados xenobióticos) também podem ser biotransformados.

Assim, dentro da biotecnologia encontra-se a biocatálise e/ou biotransformação, as quais utilizam sistemas biológicos, como células íntegras, livres ou imobilizadas, extratos de enzimas ou enzimas isoladas, para a catálise e transformação de compostos naturais ou xenobióticos. Segundo a definição de Michel Spagnol, a biocatálise envolve apenas uma etapa de transformação, enquanto, que na biotransformação um substrato simples é transformado numa molécula mais complexa a partir de uma série de reações que ocorrem num mesmo pote reacional.³

As reações de biocatálises e/ou biotransformações podem ser realizadas com: a) células em crescimento (os substratos são adicionados ao meio de cultura simultaneamente

¹ Borém, A. Biotecnologia: Ciência e Desenvolvimento 2005, 34, 10-12.

² Acree, T. E., Teranishi, R. *Flavor science: sensible principles and techniques.* Washington, DC, American Chemical Society, **1993**.

³ Rouhi, A.M. Chem. Eng. News, 2003, 81 (18), 45-55.

à inoculação ou durante a fase de crescimento do microrganismo); b) células em repouso (o microrganismo é cultivado até seu crescimento ótimo, a biomassa é filtrada ou centrifugada e ressuspensa em soluções ou solventes adequados, com posterior adição de substrato); c) células imobilizadas e d) enzimas isoladas.⁴ Cada uma das metodologias citadas apresentam vantagens e desvantagens, e a escolha de cada uma dependerá dos objetivos da reação.

A biocatálise e/ou biotransformação opera, portanto, em nível molecular, onde as barreiras estabelecidas na formação das espécies desaparecem. Isto é possível porque todos os seres vivos possuem o DNA como molécula fundamental, portadora da informação gênica, o qual codifica e determina as proteínas dos animais, das plantas e microrganismos. Esse código simplesmente transforma a seqüência dos nucleotídeos do DNA (adenina, citosina, guanina ou timina) em seqüências de aminoácidos que constituem as proteínas. Cada proteína é derivada, portanto, da transcrição e tradução de um gene.⁵

Atualmente, a biocatálise é utilizada para produzir uma variedade de produtos para a indústria de alimentos (pães, queijos, cervejas, adoçantes), química fina ($\alpha \in \beta$ -aminoácidos, vitaminas) e produtos farmacêuticos (antivirais, descongestionantes), sendo predominantes as aplicações no setor farmacêutico (**Figura I.1, Tabela I.1**).^{6,7,8}



Figura I.1: Exemplos de produtos obtidos em larga escala por biocatálise.

O progresso científico nos diferentes campos da biocatálise, é impulsionado pela evolução molecular, biologia computacional, descoberta de novas fontes de enzimas, metodologias combinatórias, engenharia genética, triagens de alto desempenho (HTS,

⁴ Wong, C.H.; Whitesides, G.M. Enzymes in Organic Chemistry, 12. Pergamon ed., 1994.

⁵ Stryer, L. *Bioquímica*. 3^a. ed., Rio de Janeiro, Guanabara-Koogan, **1992**.

⁶ Panke, S.; Held, M.; Wubbolts, M. Curr. Opin. Biotech., 2004, 15, 272-279.

⁷ Panke, S.; Wubbolts, M. Curr. Opin. Biotech., 2005, 9, 188-194.

acrônimo de *High Throughput Screening*) e otimizações de processos.⁹ Estas tecnologias tornam os bio-processos economicamente acessíveis e aplicáveis a condições não-naturais, tais como, solventes não-aquosos, valores de pH não-convencionais e altas temperaturas.

Item	Produto	Microrganismo	Enzima	Companhia
Farmacêuticos e	(S)-2- Ácido cloropropiônico	Pseudomonas sp.	Desalogenase	Avecia
intermediários	L-DOPA	Êrwinia herbícola	Tirosina fenol liase	Ajinomoto
	Ácido L- pipecólico	<i>Escherichia coli</i> recombinante.	Lisina aminotransferase (de <i>Flavobacterium lutescenns</i>) Pirrolidina-5-carboxilato redutase (de <i>E. coli</i>).	Mercian
	Hidroxiprolina	<i>E. coli</i> recombinante	Prolina hidroxilase (de <i>Streptomyces sp</i>)	Kyowa Hakko
	Álcoois quirais	<i>E. coli</i> recombinante	Oxidorredutases (de vários microrganismos).	Kaneka
	(S)-piperazina- 2-ácido carboxílico	Klebsiella terrigena	Amidase	Lonza
	Pravastatina de sódio	Streptomyces carbophilus	Citocromo P-450	Sankyo
Vitaminas	Pantotenato	Fusarium oxysporum	Lactonase	Daiichi Fine Chemical
	Nicotinamida	Rhodococcus rhodochrous J1	Nitrila hidratase	Lonza
Aminoácidos	L-aminoácidos	<i>E. coli</i> recombinante	L-hidantoinase e L- carbamoillase	Degussa
Flavorizantes	5'-GMP	<i>E. coli</i> recombinante	XMP aminase (GMP sintase de, <i>E. coli</i>) e AP/PTase (de <i>E. blattae</i>)	Kyowa Hakko e Ajinomoto
	5'-IMP	<i>E. coli</i> recombinante	Guanosina/inosina quinase (de <i>E.coli</i>) AP/PTase (de <i>E. blattae</i>)	Kyowa Hakko e Ajinomoto
Resinas	Acrilamida	Rhodococcus rhodochrous J1	Nitrila hidratase	Mitsubishi Rayon
Inseticidas	Ácido 6- hidróxi- nicotínico	Achromobacter xylosoxidans	Niacina hidroxilase	Lonza

Tabela I.1: Aplicações da biocatálise nas indústrias: farmacêutica, alimentícia e química fina.

5'-IMP: inosina-5'-monofosfato; 5'-GMP: guanosina-5'-monofosfato, AP/Ptase: fosfatase ácida/fosfotransferase.

⁸ Straathof, A.J.J.; Panke, S.; Schmid, A. Curr. Opin. Biotech. 2002, 13, 548-556.

⁹ Carr, R.; Alexeeva, M.; Turner, N. J. Org. Biomol. Chem. 2003, 1, 4133-4137.

I.2. Enzimas: Histórico e Atualidades.

Um dos primeiros experimentos em que foi possível verificar a ação de uma enzima foi demonstrado por Spallanzani em 1783, ele observou que a carne poderia ser digerida pelo suco gástrico *in vitro*. A substância ativa responsável por esta ação foi denominada por Schwan, em 1836, de pepsina.¹⁰

Em 1814, Kirchhoff observou a produção de açúcar a partir do amido utilizando a cevada. A ação hidrolítica do extrato de cevada sobre o amido, resultando em dextrina e açúcar foi melhor investigado por Payen e Persoz em 1833. O princípio ativo do malte foi denominado de diastase (do grego "separar"). A diastase é uma mistura de amilases utilizada para produzir dextrina, que era empregada principalmente na manufatura de pães e também na produção de cervejas e vinhos de frutas.¹¹

Berzelius, em 1835, reconheceu a hidrólise do amido pela diastase como uma reação catalítica e descreveu um catalisador como uma substância que pode dar vida às reações químicas.^{10,11.}

Kühne sugeriu, em 1876, que tais fermentos não-organizados deveriam ser chamados de "enzimas". O termo "fermento organizado" (extratos de leveduras livres das células) e "fermentos não organizados" (suco gástrico secretado pelas células) não são mais empregados. Em 1893, Ostwald classificou as enzimas como catalisadores.¹⁰

Até esta data, eram utilizadas culturas de microrganismos mistos para as aplicações biotecnológicas, principalmente em áreas da agricultura e nutrição. Foi L. Pasteur, em 1862, quem estabeleceu a base científica destas aplicações, promovendo a oxidação do etanol para ácido acético com uma cultura pura de *Bacterium xylinum*.¹²

Em 1894, Emil Fisher elucidou os aspectos essenciais da catálise enzimática, ele estava convencido de que as enzimas eram proteínas, no entanto, foram necessários mais de 30 anos para que a sua natureza química fosse reconhecida. Fisher observou que as enzimas denominadas "emulsinas" catalisavam a hidrólise de β -metil-D-glicosídeo, enquanto que as "maltases" eram ativas frente a α -metil-D-glicosídeo e formulou a famosa teoria "chave-e-fechadura" para explicar a **especificidade** apresentada pelas enzimas (**Figura I.2**).¹¹ Apesar de ter sido aceito por vários anos, este mecanismo não é mais utilizado, pois assume que as

¹⁰ Krishna, S. H. Biotechnol. Adv. 2002, 20, 239-267.

¹¹ Bornscheuer, U.T.; Buchholz, K. *Eng. Life. Sci.* **2005**, *5*, 309-323.

enzimas apresentam uma estrutura tridimensional rígida e não explica porque muitas enzimas podem converter não apenas seus substratos naturais, mas também numerosos compostos não-naturais possuindo diferentes características estruturais.¹³



Figura I.2: Mecanismo enzimático "chave-e-fechadura" proposto por Fisher.

Em 1897, Eduard Büchner demonstrou a conversão da glicose para etanol utilizando extratos de leveduras livres das células. Ele apresentou provas de que a fermentação não necessitaria da presença de aparatus complexos como é a célula de uma levedura. O agente responsável pela conversão era de fato uma substância solúvel, de natureza protéica, denominada "zimase". Büchner afirmou que a catálise enzimática era um processo químico não necessariamente ligado a presença e ação de células vivas.

Em 1898, Croft-Hill realizou a primeira síntese enzimática da isomaltose. O principio sintético também foi utilizado nas sínteses de numerosos glicosídeos por Fisher e colaboradores.¹¹

Warburg realizou a separação preparativa de L-leucina de uma mistura racêmica através da hidrólise do éster propilíco com extratos do figado, em 1906. Rosenberg utilizou como catalisador a D-oxinitrilase de amêndoas para as sínteses de cianoidrinas opticamente ativas, em 1908.¹⁰

Em 1913, Leonor Michaelis e Maud Menten publicaram uma consideração teórica sobre a cinética de catálise enzimática, a qual descreve uma reação em equilíbrio, em que

¹² Brown, A. J.; J. Chem. Soc. 1886, 49, 172-177.

ambos os substratos enantioméricos são transformados por uma enzima nos correspondentes produtos enantioméricos.14 Embora esse postulado não seja correto, ele levou ao desenvolvimento da então chamada equação de Michaelis e Menten (Figura I.3).

$$V_{p} = \frac{V_{max}[S]}{K_{M} + [S]}$$

$$V_{p} = no. de moles do produto formado por seg.$$

$$V_{max} = velocidade catalítica máxima$$

$$K_{M} = concentração do substrato em que a velocidade da reação é metade do seu valor máximo.$$

Figura I.3: Equação de Michaelis e Menten.

Em 1916, Nelson e Griffin demonstraram a imobilização da invertase em carvão com retenção da atividade. Até 1920, aproximadamente 12 enzimas eram conhecidas, mas nenhuma delas havia sido isolada.

Através da cristalização da urease de Canavalia ensiformis, James Sumner (1926) demonstrou que as enzimas eram de fato proteínas. Posteriormente, em 1930-1931, Northrop e Kunitz cristalizaram outras enzimas, entre elas, a tripsina.¹⁵

Por volta de 1940, era possível obter muitas enzimas na forma pura, mas não havia nenhuma evidência de que as proteínas possuíam uma seqüência única de aminoácidos. Sanger, em 1953, estabeleceu a primeira sequência de uma proteína (insulina), comprovando assim a identidade química das enzimas, ou seja, catalisadores de natureza protéica, formados por ligações peptídicas entre resíduos de aminoácidos (Figura I.4). Em 1983, Altman demonstrou que algumas moléculas de RNA também eram capazes de atuar como enzimas.16





b) Figura I.4: a) Ligação peptídica e b) Estrutura tridimensional da lisozima (primeira enzima na qual a estrutura tridimensional foi definida por cristalografia de raios X, em 1967). ¹⁷

¹³ Faber, K. Biotransformations in Organic Chemistry. 2nd ed., Heidelberg, Springer, 1995.

¹⁴ Michaelis, L.; Menten, M.L. *Biochem. Z.* **1913**, *49*, 333-369.

¹⁵ Sumner, J.B. J. Biol. Chem. **1926**, 69, 435-441.

 ¹⁶ Guerrier-Takada, C.; Altman, S. Science **1984**, 223, 285-286.
 ¹⁷ Phillips, D.C. Proc. Natl. Acad. Sci.USA **1967**, 57, 484-495.

O mecanismo de "encaixe induzido" formulado por Koshland, em 1960 (**Figura I.5**), assume que as enzimas não são inteiramente rígidas, mas são estruturas delicadas e flexíveis e que, portanto, elas podem mudar sua conformação sob a influência da estrutura do substrato durante a formação do complexo enzima-substrato [ES].¹³ Essa teoria já tentava explicar porque muitas enzimas podem transformar uma grande variedade de substratos não naturais.



Figura I.5: Diagrama mostrando o mecanismo de "encaixe induzido" proposto por Koshland.

As vantagens da utilização de enzimas como catalisadores das reações químicas são que elas apresentam características, tais como:¹³

• Quimiosseletividade: as enzimas reagem com grupos funcionais específicos, conseqüentemente outras funcionalidades, as quais poderiam reagir por catálise química, permanecem inalteradas. Por exemplo, a hidrólise enzimática de ésteres não mostra qualquer propensão para a clivagem de acetais.

• Regiosseletividade: devido à sua estrutura tridimensional, as enzimas podem distinguir entre grupos funcionais idênticos localizados em regiões diferentes de uma mesma molécula.

• Enantiosseletividade: as enzimas são catalisadores quirais, conseqüentemente o sítio ativo poderá reconhecer moléculas quirais e pró-quirais:

 \Rightarrow Na seletividade enantiomérica (ou diastereoisomérica) a enzima é capaz de diferenciar um enantiômero (ou diastereoisômero) do outro.
\Rightarrow Na seletividade enantiotópica (ou diastereotópica) há o reconhecimento pela enzima de grupos enantiotópicos (ou diastereotópicos) dentro da mesma molécula.

A classificação e nomenclatura das enzimas estão de acordo com as reações químicas que elas catalisam. A **Figura I.6** mostra que as enzimas são classificadas em 6 classes principais: Hidrolases, Oxidorredutases, Liases, Transferases, Ligases e Isomerases. A Comissão de Nomenclatura da União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular (NC-IUBMB, <u>http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/</u>) é o órgao responsável pela identificação das mesmas. Cada enzima é designada por um número de EC (prefixo) com quatro dígitos separados por pontos (EC A.B.C.D), onde os três primeiros dígitos definem a reação catalisada e o quarto é um número que garante a identidade única da enzima.



Até o momento cerca de 4000 enzimas foram catalogadas (<u>http://us.expasy.org</u>) e centenas delas podem ser obtidas comercialmente. No entanto, este número é irrisório, considerando a distribuição de enzimas e microrganismos na natureza. A biodiversidade de microrganismos constitui um dos grandes desafíos da biocatálise, sendo necessário realizar grandes triagens para encontrar enzimas específicas para um tipo de reação.

I.3. Biotransformações através do uso de oxidorredutases.

I.3.1. Aplicações e propriedades.

Baseados nos mecanismos das reações, verifica-se, na **Figura I.6**, que a maioria das enzimas comerciais são hidrolases (incluindo as lípases, esterases, proteases e nitrilases), enquanto que as oxidorredutases, as quais constituem o foco de interesse deste trabalho, representam uma pequena fração. Ao contrário, na natureza, as oxidorredutases apresentam uma alta ocorrência, podendo ser encontradas em animais, vegetais e microrganismos.¹⁸ Esta diferença entre a grande quantidade de oxidorredutases presentes na natureza e a quantidade limitada de produtos comerciais deixa um campo em aberto para a pesquisa e desenvolvimento de novos biocatalisadores baseados nas oxidorredutases.

Apesar da comercialização das oxidorredutases ainda ser baixa, a aplicação na indústria é bastante ampla, sendo que atualmente esta classe de enzimas é utilizada para:

• O melhoramento de alimentos e bebidas: a lacase e outras oxidases, por exemplo, oxidam e polimerizam compostos fenólicos indesejáveis, melhorando a cor, sabor e aroma de sucos de frutas e bebidas alcoólicas fermentadas;^{19,20,21}

• Proteção ambiental: no tratamento de efluentes e na biodegradeção de vários compostos, tais como, contaminantes indesejáveis, sub-produtos ou materiais de descarte;^{22,23}

• Aplicações técnicas e industriais: a) produção de ácidos orgânicos (lactato) a partir de açúcares por fermentação com células íntegras, b) derivatização de carboidratos, onde açúcares simples (glicose, sucrose) são transformados em açúcares de alto valor (D-frutose) ou outras substâncias, c) produção de detergentes (a lacase e peroxidase, por exemplo, são utilizadas para o branqueamento de manchas difíceis de serem removidas sob condições normais);^{24,25}

• Medicina: nas sínteses de antibióticos e no desenvolvimento de vacinas;²⁶

¹⁸ Feng, X. Industrial Biotechnology 2005, 1, 38-50.

¹⁹ Hoegh, l. PCT patent WO2004091312-A1 (2004).

²⁰ Servicetech Japan, Ygshinwa KK. Japanese patent JP2004267177-A (2004).

²¹ Descenzo, RA., Irelan, N.A. US patent US2003033627-A1 (2003).

²² Asahi kasei, KK. *Japanese patent JP2003128835-A* (2003).

²³ Xu, H.; Lund, H.; Luo, J.; Bloomfield, K. PCT patent WO2004112843-A2 (2004).

²⁴ Ishiba, N. et al. PCT patent WO2004104202-A1 (2004).

²⁵ Koka, R. et al US patent US20040151802-A1 (2004).

²⁶ Xu, F. in *The Encyclopedia of Bioprocessing Technology: Fermentation, Biocatalysis, and Bioseparation,* eds. Flickinger MC, and Drew SW. 1545-1554 (John Wiley Et Sons, New York, 1999).

• Produtos para cuidados pessoais, tais como, soluções para limpeza de lentes de contato (catalase), produtos de higiene bucal;^{27,28}

• Sínteses orgânicas, especialmente nas sínteses de compostos quirais, polímeros e nanomateriais.^{29,30}

As aplicações em sínteses assimétricas devem-se ao fato dos catalisadores enzimáticos, tais como as oxidorredutases, apresentarem ampla versatilidade, alta especificidade e alta estereosseletividade.¹⁸ A estereosseletividade pode ser explicada pela "regra dos três pontos", sugerida por A. G. Ogston já em 1948. Esta regra assume que deve haver pelo menos 3 pontos diferentes de ligações entre o substrato e o sítio ativo da enzima, tornando assim possível a discriminação de enantiômeros, grupos pró-quirais e faces enantiotópicas.

As oxidorredutases, assim como a maioria das enzimas, viabilizam reações enantiosseletivas em condições brandas, devido a uma diminuição na energia de ativação das reações químicas por elas catalisadas (temperatura abaixo de 40°C, pH próximo do neutro, pressão normal e meio aquoso). A velocidade das reações catalisadas pelas enzimas pode ser até 10¹² vezes maior do que as correspondentes não-catalisadas (**Figura I.7**).



Coordenada da reação Figura I.7: Diagrama de energia de uma reação catalisada vs. não-catalisada. (E=enzima, S=substrato, [ES]= complexo enzima-substrato, P=produto)

²⁷ Meiji Seika Kaisha Ltd., Inahata Koryo K.K.; Morishita Jintan KK *Japanese patent JP2004321077-A* (2004).

²⁸ Tsuchiya, R.; Petersen, B.R.; Christensens, S. PCT patent WO9909143-A (1999).

²⁹ Breuer, M. et al. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2004**, *43*, 788-824.

³⁰ Xu, P.; Kaplan, D.L.J. *Macromol Sci-Pure Appl. Chem.* **2004**, *41*, 1437-1445.

As oxidorredutases podem transformar um grande número de compostos aromáticos/alifáticos, funcionalizar hidrocarbonetos inertes (através de reações de hidroxilação, sulfoxidação, epoxidação, etc.), além de realizar reações régio- e enantiosseletivas (em substratos racêmicos), enantiotoposseletivas (em substratos próquirais) e reações quimiosseletivas de uma maneira ecologicamente correta.

Para exercerem sua atividade catalítica, as oxidorredutases necessitam de componentes químicos adicionais denominados cofatores ou coenzimas. O cofator pode ser um íon inorgânico (Fe²⁺, Mg²⁺, Mn²⁺, Zn²⁺) e a coenzima um complexo organometálico ou uma molécula orgânica [flavina mononucleotídeo (FMN), flavina adenina dinucleotídeo (FAD), pteridina, pirroloquinolina quinona, entre outras], **Figura I.8**. Estes centros redox ativos encontram-se protegidos pelo esqueleto polipeptídico das oxidorredutases.¹⁸



Figura I.8: Centros redox ativos empregados na catálise enzimática das oxidorredutases: flavina adenina dinucleotídeo (FAD), flavina mononucleotídeo (FMN), nicotinamida adenina dinucleotídeo fostato (NADPH), nicotinamida adenina dinucleotídeo (NADH).

O cofator nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD⁺) é o principal receptor de elétrons nas reações de oxidação de moléculas. O cofator NADPH é o principal doador de elétrons em reações redutivas. Os dinucleotídeos piridínicos (NAD⁺ e NADP⁺) estão associados às enzimas através de ligações não-covalentes relativamente fracas (ligações de hidrogênio, forças de van der Waals). Portanto, o NAD⁺ e NADP⁺ não são considerados grupos prostéticos fixos, mas também como "substratos", uma vez que esses dinucleotídeos ligam-se ou disssociam-se do sítio ativo da enzima durante a catálise enzimática.

As desidrogenases ligadas à flavina (FAD, FMN) diferem das desidrogenases ligadas às piridinas (NADH e NADPH), pois o nucleotídeo de flavina encontra-se ligado firmemente a enzima, funcionando como um grupo prostético, em muitos casos esta ligação é de forma covalente. O nucleotídeo de flavina permanece ligado a enzima durante e após o ciclo catalítico. Existem flavoenzimas (proteínas que contêm nucleotídeos de flavinas) que se ligam as enzimas através de ligação covalente entre o anel isoaloxazina do FAD e um resíduo de aminoácido da proteína. Outras flavoenzimas contêm metais, como ferro e molibdênio, sendo estas espécies essenciais para a atividade catalítica.¹³

As reações enzimáticas dependentes de cofatores são freqüentemente realizadas com **células íntegras**, pois os organismos vivos fornecem um sistema de reciclagem natural e eficiente das coenzimas intracelulares, além disso, os processos de biotransformações realizados com células íntegras são mais simples e econômicos, e as enzimas encontram-se protegidas do meio externo pelas membranas e paredes celulares. Por outro lado, devido à presença de várias enzimas nas células, há uma maior probabilidade de ocorrer reações laterais, pois tanto o substrato quanto o produto podem ser aceitos por outras enzimas presentes nas células (enzimas B e C na **Figura I.9**). Tais processos competitivos diminuem o rendimento da biotransformação desejada.³¹



Figura I.9: Biotransformações competitivas utilizando células íntegras.

³¹ Alphand, V.; Archelas, A.; Furstoss, R. J. Org. Chem. 1990, 55, 347-350.

As reações laterais competitivas podem ser minimizadas com o uso de inibidores da atividade enzimática não-desejada. Por exemplo, o pirofosfato de tetraetila inibe enzimas hidrolíticas capazes de metabolizar as lactonas formadas pela ação de Baeyer-Villigerases. Além disso, o uso de linhagens geneticamente modificadas é particularmente conveniente, pois elas fornecem altos níveis de enzimas que maximizam a velocidade das reacões.32,33,34,35

Quando as células íntegras são utilizadas, a imobilização é menos comum quando comparadas às enzimas isoladas (Figura I.10). Isto pode ser atribuído ao fato de que a imobilização limita a difusão do oxigênio necessária para manter a atividade metabólica das oxidorredutases.8,36,37



Figura I.10: Biotransformações industriais realizadas com enzimas ou células íntegras (baseadas em 134 processos).³

A utilização de enzimas isoladas em reações de biotransformações, que faz uso de oxidorredutases, necessita da adição de uma segunda enzima para a reciclagem do cofator. No entanto, nada impede que uma única enzima possa estar atuando na regeneração do cofator. Normalmente, o isolamento e a purificação das enzimas de interesse podem ser

³² Doig, S.D.; O' Sullivan, L.M.; Patel, S.; Ward, J.M.; Woodley, J.M. Enz. Microbiol. Techn. 2001, 28, 265-274. ³³ Kayser, M.; Chen, G.; Steward, J. *Synlett* **1999**, 153-158.

³⁴ Cheesman, M.J.; Kneller, M.B.; Kelly, E.J.; Thompson, S.J.; Yeung, C.K.; Eaton, D.L.; Rettie, A.E. Protein Expr. Purif. 2001, 21, 81-86.

³⁵ Steward, J.D.; Reed, K.; Kayser, M.M. J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1 1996, 8, 755-757.

³⁶ Ishige, T.; Honda, K.; Shimizu, S. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2005**, *9*, 174-180.

³⁷ Straathof, A.J.J.; Panke, S.; Schmid, A. *Curr. Opin. Biotech.*, **2002**, *13*, 548-556.

laboriosos e apresentar um alto custo. Um sistema de reciclagem bastante conhecido e eficiente é aquele que utiliza glicose 6-fosfato/glicose 6-fosfato desidrogenase, no entanto, a principal desvantagem deste sistema é exatamente o alto custo da glicose 6-fosfato.³⁸ Uma alternativa mais econômica é o sistema formato/formato desidrogenase, o qual é considerado o melhor e mais utilizado método para a reciclagem do NADH (Figura I.11).³⁹ A reciclagem da coenzima também pode ser realizada por regeneração eletroquímica⁴⁰ e ainda pelo método desenvolvido por Zambianchi e colaboradores⁴¹ no qual eles utilizam 2propanol/álcool desidrogenase de Thermoanaerobium brockii.



Figura I.11: Sistema de reciclagem de cofator utilizando formato desidrogenase.

I.3.2. Classificação das oxidorredutases.

Considerando à dependência de cofatores, as oxidorredutases podem ser classificadas em: oxigenases, oxidases, peroxidases e desidrogenases (Figura I.12).¹⁸ Nas oxigenases, oxidases e peroxidases o oxigênio molecular é o receptor de elétrons, enquanto que nas desidrogenases, que catalisam a remoção de hidrogênio, não há a participação ativa de oxigênio.42

³⁸ Wong, C.H.; Whitesides, G.M. J. Am. Chem. Soc. 1981, 103, 4890-4899.

³⁹ Wichmann, R.; Wandrey, C.; Bückmann, A.F.; Kula, M.R. *Biotechnol. Bioeng.* **1981**, *23*, 2789-2802.

⁴⁰ Somers, W.A.C.; van Hartingsveldt, W.; Stigter, E.C.A.; Van der Lugt, J.P. Trends Biotech. 1997, 15, 495-500.

⁴¹ Zambianchi, F.; Pasta, P.; Carrea, G.; Colonna, S.; Gaggero, N.; Woodley, J.M. Biotechnol. Bioeng. 2002, 78, 488-495.
 ⁴² Burton, S.G. Trends Biotechnol. 2003, 21, 543-549.



Figura I.12: Classificação das oxidorredutases.

As **álcoois desidrogenases** são reconhecidas por promoverem reduções estereosseletivas de compostos carbonílicos e seus derivados.^{43, 44}

As **oxidases** catalisam a transferência de elétrons para o oxigênio molecular, onde dois ou quatro elétrons são transferidos, através do peróxido de hidrogênio ou água como doadores de oxigênio, respectivamente (**Figura I.13**). As oxidases incluem flavoproteínas, metaloflavinas e hemeproteínas, sendo que, do ponto de vista sintético, estas oxidases ainda não são utilizadas extensivamente.

Oxidases

O ₂ + 2e ⁻		O ₂ ²⁻	<u>+2H</u> ⁺	H_2O_2
$O_2 + 2e^{-1}$	>	2O ²⁻	<u>+4H</u> +	$2H_2O$

Figura I.13: Reações de oxigenação enzimática catalisadas por oxidases.

⁴³ Carrea, G.; Riva, S. Angew. Chem. Int. Ed. 2000, 39, 2226-2254.

As oxigenases catalisam a incorporação de oxigênio molecular em compostos orgânicos e, normalmente, são mais seletivas que as oxidases e peroxidases.45,46 A transferência do oxigênio pode ocorrer através de monooxigenases e dioxigenases.

As monooxigenases incorporam um átomo de oxigênio molecular no substrato e o outro átomo de oxigênio é reduzido através da doação de dois elétrons provenientes do NADH ou NADPH para formar uma molécula de água (Figura I.14). Portanto, as monooxigenases são, também, denominadas de "oxidases/oxigenases de função mista", pois elas atuam como oxigenases e como oxidases.⁴⁷

Monooxigenases



Figura I.24: Reações de oxigenação enzimática catalisadas por mono- e dioxigenases.

As monooxigenases são capazes de catalisar uma grande variedade de reações de oxidação, desde hidroxilações de hidrocarbonetos e epoxidações de alcenos a oxidações de heteroátomos e transformações de Baever-Villiger (Figura I.15).^{47,48} O tipo de oxidação é geralmente dependente do grupo prostético presente na enzima, desta forma, alguns autores sugerem que as reações de epoxidações e hidroxilações são catalisadas por monooxigenases dependentes do citocromo P-450,47,49 e as reações de oxidações de heteroátomos e Baeyer-Villiger são realizadas por enzimas dependentes de flavinas.⁵⁰

⁴⁴ Csuk, R.; Glänzer, B.I. Chem. Rev. 1991, 91, 49-97.

⁴⁵ Hayaishi, O. In: Molecular Mechanisms of Oxygen Activation. Ed.; Academic: New York, Chapter 1, pp. 1-28, **1974**. ⁴⁶ Li, Z.; van Beilen, J.B.; Duetz, W.A.; Schmid, A.; Raadt, A.; Griengl, H.; Withold, B. *Curr. Opin. Chem.*

Biol. 2002, 6, 136-144.

⁴⁷ Sono, M.; Roach, M.P.; Coulter, E.D.; Dawson, J.H. Chem. Rev. 1996, 96, 2841-2887.

⁴⁸ Kamerbeek, N.M.; Janssen, D.B.; van Berkel, W.J.H.; Fraaije, M.W. Adv. Synth. Catal. 2003, 345, 667-678. ⁴⁹ Dawson, J.H.; Sono, M. *Chem. Rev.* **1987**, *87*, 1255-1276.

⁵⁰ Walsh, C. Acc. Chem. Res. **1980**, 13, 148-155.



Figura I.15: Reações típicas catalisadas pelas monooxigenases.

As **dioxigenases** incorporam dois átomos de oxigênio nos substratos (**Figura I.14**). A maioria das reações catalisadas por elas são dependentes de cofatores (NADH) e incluem: *cis*-diidroxilação, clivagem do anel aromático, hidroperoxidação, entre outras.

De maneira geral, as reações catalisadas pelas oxigenases incluem: hidroxilações de átomos de carbonos não-ativados, hidroxilações alílicas e benzílicas, hidroxilações aromáticas, oxidações de Baeyer-Villiger, epoxidações, peroxidações com lipoxigenases e diidroxilações.⁴⁵ Estas reações, que promovem a introdução enantiosseletiva de átomos de oxigênio em substratos racêmicos ou pró-quirais, são de grande importância na química orgânica sintética, pois elas fornecem a síntese de compostos enantiomericamente puros. Em consequência da crescente necessidade destes compostos como blocos de construções quirais houve um aumento expressivo tanto nos métodos sintéticos químicos quanto enzimáticos para as suas sínteses. O uso de rotas biocatalíticas, empregando enzimas ou microrganismos como catalisadores, tem várias vantagens quando comparadas as rotas químicas, entre as quais: As oxidações biocatalíticas frequentemente fornecem uma melhor químio-, régio- e estereosseletividade, elas usam o oxigênio como oxidante, o qual é barato, ambientalmente amigável, e as reações são realizadas em condições muito suaves. Como resultado, as oxidações biocatalíticas apresentam uma importante contribuição para a química verde, além de serem eficientes.

Capítulo II

Objetivos

Objetivos

Entre as novas tecnologias para as sínteses de compostos de alto valor agregado, a biocatálise destaca-se como uma das mais promissoras.⁵¹ Neste sentido, a exploração da biodiversidade para descobrir novos catalisadores através da seleção de microrganismos representa um método tradicional para a descoberta de novas enzimas e desenvolvimento de novos biocatalisadores em escala industrial.

Sendo o potencial catalítico dos microrganismos ainda pouco explorado dentro do contexto da transformação de substratos não-naturais e esperando disponibilizar novos catalisadores da classe das oxidorredutases junto com o conhecimento da seletividade e enantiosseletividade dos substratos de interesse, este trabalho tem por objetivos:

- a) Selecionar microrganismos para reações de oxidação;
- b) Explorar o potencial biocatalítico de microrganismos (leveduras, fungos) visando à detecção de monooxigenases;
- c) Desenvolver uma metodologia alternativa à biocatálise convencional, visando uma triagem mais rápida e eficiente;
- d) Isolar e caracterizar estruturalmente os compostos biotransformados, incluindo a determinação dos excessos enantioméricos e diastereoisoméricos, configurações relativas e absolutas;
- e) Determinar o perfil de seletividade dos microrganismos selecionados frente a diferentes substratos.

⁵¹ Bommarius, A.S.; Polizzi, K.M. Chem. Eng. Sci., 2006, 61, 1004-1016.

Capítulo III

Baeyer-Villiger Monooxigenases

Baeyer-Villiger Monooxigenases

Um dos primeiros objetivos deste trabalho foi selecionar microrganismos para reações de oxidação de Baeyer-Villiger, pois o grupo de pesquisa de Marsaioli e colaboradores,^{52,53} já vinha estudando a capacidade oxidativa (Baeyer-Villiger, hidroxilação e sulfoxidação), redutiva, hidrolítica (epóxido hidrolase) e de isomerização de diversas linhagens de microrganismos, incluindo fungos e bactérias. Portanto, em seguida serão discutidos aspectos mecanísticos, ocorrências, propriedades bioquímicas e interesse sintético das reações de oxidação de Baeyer-Villiger.

III.1. Oxidação de Baeyer-Villiger química.

A oxidação de Baeyer-Villiger é uma reação química descrita há mais de 100 anos,⁵⁴ na qual cetonas são transformadas em ésteres ou lactonas. Esta reação é realizada por oxidantes, tais como, ácido *m*-cloroperoxibenzóico, ácido trifluoroperoxiacético, ácido peroxibenzóico e peróxido de hidrogênio.⁵⁵ Nesta reação, a cetona sofre um ataque nucleofílico pelo peroxiácido, levando à formação do então chamado "intermediário de Criegee" (**Esquema III.1**). Em seguida, ocorre um rearranjo desta espécie instável, através da expulsão de um íon carboxilato e migração de uma ligação carbono-carbono, produzindo um éster/lactona e um ácido.



Esquema III.1: Oxidação de Baeyer-Villiger por perácidos.

⁵² Porto, A.L.M. Isolamento e seleção de Microrganismos Brasileiros para Reações de Biocatálise e Produção de Metabólitos. Tese de doutorado. Depto. Química Orgânica, Instituto de Química, Unicamp. 2002.
⁵³ Conselvas P.A.C. Intermediáries Sintáticas Konáteia Enguinamente Pures Obtidas para

⁵³ Gonçalves, R.A.C. Intermediários Sintéticos Versáteis, Enantiomericamente Puros, Obtidos por Biocatálise. Tese de doutorado. Depto. Química Orgânica, Instituto de Química, Unicamp. **2002.**

⁵⁴ Baeyer, A.; Villiger, V. Ber Dtsch. Chem. Ges. 1899, 32, 3625-3633.

⁵⁵ Roberts, S.M.; Wan, P.W.H. J. Mol. Catal. B: Enzym. **1998**, 4, 111-116.

A estereoquímica do grupo migrante é constantemente mantida no produto final. O rearranjo e a preferência de migração são governados por fatores estéreos, conformacionais e eletrônicos, além disso, a migração também é influenciada pelo tipo de peroxiácido usado. Dois pré-requisitos devem ser satisfeitos para ocorrer a migração do grupo alquila e eliminação do ácido carboxílico (**Figura III.1**): a) a ligação C-C migrante deve encontrarse numa posição antiperiplanar à ligação peróxi; b) a liberação do par de elétrons do átomo de oxigênio hidroxílico para o grupo migrante é essencial para o deslocamento alquílico e requer um par de elétrons na posição *anti* do átomo de oxigênio.⁵⁶



Figura III.1: Requerimentos estéreo-eletrônicos para a migração do grupo alquila.

Infelizmente, o uso de reagentes e solventes halogenados é ambientalmente desfavorável, pois os oxidantes utilizados nas reações de Baeyer-Villiger são instáveis, tóxicos e não-estereosseletivos. Métodos alternativos são desenvolvidos para evitar o uso de perácidos na realização de reações de Baeyer-Villiger. A utilização de reagentes organometálicos⁵⁷ pode ser citada como exemplo, no entanto, as lactonas formadas apresentam rendimentos e excessos enantioméricos bastante variáveis (30-70% *e.e.*).

Alternativamente, metodologias biocalíticas são utilizadas cada vez mais para superar as desvantagens citadas acima.

⁵⁶ Mihovilovic, M.D.; Müller, B.; Stanetty, P. Eur. J. Org. Chem. 2002, 22, 3711-3730.

⁵⁷ ^{a]} Bolm, C.; Schlingloff, K. Weickhardt. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1994**, *33*, 1848-1849. ^[b] Bolm, C.; Schlingloff, K. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1995**, 1247-1248. ^[e] Bolm, C.; Schlingloff, K.; Bienewald, F. *J. Mol. Catal. A: Chem.* **1997**, *117*, 347-350. ^[d] Bolm, C.; Beckmann, O; Cosp, A.; Palazzi, C. Synlett **2001**, 1461-1463. ^[e] Bolm, C.; Beckmann, O; Palazzi, C. *Can. J. Chem.* **2001**, *79*, 1593-1597.

III.2. Oxidação de Baeyer-Villiger enzimática.

Em biocatálise, o catalisador equivalente aos perácidos é representado pelas Baeyer-Villiger monooxigenases (BVMO).⁵⁶ Estas enzimas são uma subclasse da família de enzimas oxigenases, as quais, por sua vez pertencem à classe das oxidorredutases (**Figura I.12**, página 16), e portanto, elas são capazes de catalisar a oxidação de vários compostos frequentemente com rendimentos e enantiosseletividades superiores às reações catalisadas quimicamente.

A biotransformação de esteróides pelo fungo *Proactinomyces erythropolis*, descoberta em 1948, é o primeiro exemplo de uma reação de Baeyer-Villiger biológica.⁵⁸ Desde então, etapas de oxidações de Baeyer-Villiger foram encontradas nas biossínteses de muitos produtos naturais, tais como, aflatoxinas em fungos, iridóides e esteróides em plantas, e nas sínteses de aflatoxinas em frutos do mar, além destas, etapas de oxidação de Baeyer-Villiger também foram observadas nas rotas de degradação microbiana. Além do valor prático, a diversidade de microrganismos aplicados nas modificações esteroidais trouxe informações valiosas sobre a aplicação de microrganismos na química bioorgânica.

As BVMO são produzidas por: a) várias bactérias (Acinetobacter calcoaceticus, Acinetobacter SE19, Alcaligenes, Arthrobacter BP2, Nocardia globerula, Pseudomonas putida, P. fluorescens, P. cepacia, Rhodococcus ruber, R. rhodochrous, Rhodococcus phi1, Rhodococcus phi2, Rhodococcus SC1, Streptomyces, Xanthobacter, Brevibacterium sp. ChnB1, Brevibacterium sp. ChnB2, Mycobacterium tuberculosis, entre outras), b) por fungos (Curvularia lunata, Curvularia sp., Aspergillus parasitucus, Cunninghamella echinulata, Beauveria, C. destructans Cylindrocarpon radicicola, Dreschlera, Exophiala jeanselmei, Penicillium, Mucor, Cladosporium) e c) leveduras (Geotricum candidum). 59,60,61,62,63,64,65

Infelizmente, a disponibilização destas monooxigenases não é acompanhada do conhecimento da seletividade e enantiosseletividade aos substratos.⁵⁹

⁵⁸ Turfitt, G.E. *Biochem. J.* **1948**, *42*, 376-383.

⁵⁹ Kyte, B.G.; Rouvière, P.; Cheng, Q.; Steward, J.D. J. Org. Chem. 2004, 69, 12-17.

⁶⁰ Carballeira, J.D.; Alvarez, E.; Sinisterra, J.V. J. Mol. Catal. B: Enzymat. 2004, 28, 25-32.

⁶¹ Carnell, A.; Willetts, A.J. Biotechnol. Lett. 1990, 12, 885-890.

⁶² Quazzani-Chahdi, J.; Buisson, R.; Azerad, R. *Tetrahedron Lett.* **1987**, *28*, 1109-1112.

⁶³ Carnell, A.; Willetts, A.J. Biotechnol. Lett. 1992, 14, 17-21.

⁶⁴ Königsberger, K.; Braunegg, G.; Faber, K.; Griengl, H. Biotechnol. Lett. 1990, 12, 509-514.

⁶⁵ Lebreton, J.; Alphand, V.; Furtoss, R. Tetrahedron 1997, 53. 145-160.

As BVMO podem ser divididas em dois tipos: tipo I, contendo flavina adenina dinucleotideo (FAD) como cofator e NADPH como fonte de elétrons e consistem de duas subunidades idênticas, enquanto que as BVMO do tipo II contêm flavina mononucleotideo (FMN) como cofator, usam NADH como doador de elétrons e são triméricas $\alpha_2\beta$ (Figura I.8, página 12). Exceção a esta regra é a cicloexanona monooxigenase isolada de Xanthobacter sp.,66 a qual depende de FMN e NADPH, e portanto, não pode ser classificada como uma BVMO do Tipo I ou Tipo II. Até o momento, todas as BVMO clonadas foram classificadas como enzimas do Tipo I.67

O que torna as BVMO atrativas para propósitos sintéticos é o fato de que graças a natureza versátil do cofator, as flavoproteínas são capazes de realizar várias reações catalíticas de maneira régio- e enantiosseletivas, reações que são difíceis de serem realizadas por métodos químicos.⁶⁷

A Tabela III.1 resume as propriedades bioquímicas das BVMO do Tipo I caracterizadas até o momento, as quais são classificadas como cicloexanona monooxigenase (CHMO), ciclopentanona monooxigenase (CPMO), ciclododecanona monooxigenase (CDMO), esteróide monooxigenase (SMO), 4-hidroxiacetofenona monooxigenase (HAPMO) e fenilacetona monooxigenase (PAMO).48



O mecanismo enzimático de oxidação de Baeyer-Villiger é baseado nos resultados obtidos com CHMO, isolada de Acinetobacter calcoaceticus NCIMB 9871 (CHMO - EC 1.14.13.22)⁶⁸ e, recentemente, da PAMO da bactéria termofilica Thermobifida fusca.⁶⁹

A estrutura cristalina da PAMO (ilustrada ao lado) mostra que ela consiste de 2 domínios: a) o domínio de ligação ao FAD

BVMO deT. fusca

representado em verde, e b) o domínio de ligação ao NADP⁺ representado em azul. Os resíduos 167-177, ("fingerprint"), os quais caracterizam as BVMO, são mostrados em vermelho. Os aminoácidos histidina (Hist-173) e arginina (Arg-337) são resíduos altamente conservados nas BVMO. A Hist-173 é essencial para a catálise

⁶⁶ Trower, M.K.; Buckland, R.M.; Griffin, M. Eur. J. Biochem. 1989, 181, 199-206.

⁶⁷ Alphand, V.; Carrea, G.; Wohlgemuth, R.; Furstoss, R.; Woodley, J.M. *Trends Biotech.* **2003**, *21*, 7, 318-323. ⁶⁸ Donoghue, N.A.; Norris, D.B.; Trudgill, P.W. *Eur. J. Biochem.* **1976**, *63*, 175-192.

e ligação a FAD (mostrada em amarelo) e a Arg-337 faz parte do sítio ativo e está localizada na face *Re* da flavina (no dominio de ligação ao NADP⁺), **Figura III.2**. A mutação do correspondente resíduo de arginina por alanina bloqueia a capacidade de catalisar a inserção do átomo de oxigênio no substrato, e esta descoberta, sugere que o resíduo Arg-337 estabiliza o intermediário peróxido-flavina carregado negativamente. De fato, a estrutura cristalina mostra que a Arg-337 se encontra na frente do átomo C-4a da flavina, o local onde o aduto peróxido é formado.

Enzima	Dogção catalisada	Atividade	К _{М.} [b]	K _{M.NADP}	PM da
Clonagem	Reação catalisada	[U/mg] ^[a]	s [µM]	н [µM]	[kDa]
CHMO	\frown	30	4	20	60,9
1988	$ \bigcirc = 0 \longrightarrow \bigcirc = 0 $				
	ciclohexanona caprolactona				
CPMO	$\searrow_{=0} \rightarrow \bigtriangledown_{=0}$	4,3	<1	<3	62,1
2002					
CDMO		n d	n d	n d	67.5
2001					07,0
	ciclododecanona lauril lactona				
SMO		14	55	0,44	60,1
1999					
	progesterona 17-O-acetil-testosterona				
HAPMO	A A	10,5	9,2	64	71,9
2001					
	4-hidroxiacetofenona 4-hidroxifenilacetato				
B () ()				59	62
PAMO 2004	$\langle \rangle \longrightarrow \langle \rangle $				
2004	fenilacetato				

Tabela III.1: Propriedades bioquímicas das BVMO do Tipo I.

^[a] 1 Unidade é definida como a quantidade de enzimas que oxida 1 µmol de NADPH/min.

^[b] K_M é a concentração do substrato em que a velocidade da reação é metade do seu valor máximo.

⁶⁹ Malito, E.; Alfieri, A.; Fraaije, M.W.; Mattevi, A. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2004, 101, 13157-13162.



Figura III.2: Representação esquemática das principais características estruturais e mudanças conformacionais que ocorrem nas etapas catalíticas das reações de BVMO. (E=enzima, FAD=flavina adenina dinucleotideo, FADOO⁻=peróxido-flavina)

A redução da flavina pelo NADPH envolve a transferência direta de um ânion hidreto do anel nicotinamida para o átomo N-5 da coenzima. Como indicado pela estrutura tridimensional de muitas flavoenzimas, a transferência de hidreto ocorre através do posicionamento da nicotinamida adjacente à flavina ocorrendo a sobreposição dos dois anéis. No caso da PAMO, este processo deve necessariamente envolver o movimento da cadeia lateral da Arg-337, a qual deve se deslocar para longe da posição observada na estrutura cristalina para permitir a ligação da nicotinamida.

A Arg-337 existe, portanto, em duas posições: a) uma posição **IN**, correspondente àquela encontrada na estrutura cristalina, e envolvida na estabilização do intermediário peroxidoflavina durante a catálise e b) uma posição **OUT**, que fornece o espaço para o anel nicotinamida do NADPH realizar a redução da flavina.

A análise cristalográfica fornece uma base estrutural para o estudo do mecanismo de reação catalítico das BVMO (**Figura III.2**):⁶⁹

- a) A reação inicia-se com a ligação do NADPH, o qual se encontra numa posição apropriada para realizar a redução da flavina (FAD), gerando um complexo reduzido enzima-NADP⁺. Simultaneamente, a Arg-337 adota uma posição OUT.
- b) A enzima reduzida reage com o O₂ atmosférico formando o intermediário peroxidoflavina. Esta etapa ocorre com uma mudança conformacional da Arg-337 e resíduos vizinhos, os quais poderiam trazer a cadeia lateral da Arg-337 nas proximidades da flavina (posição IN) para estabilizar o intermediário peróxido carregado negativamente.
- c) O substrato é oxigenado pela flavina. A Arg-337 estaria envolvida na estabilização do intermediário tetraédrico de Criegee formado pelo ataque da peroxidoflavina ao substrato. Conforme sugerido pela análise cinética da CHMO, o NADP⁺ permanece ligado ao domínio de ligação ao NADP⁺, a qual é esperada ser uma conformação aberta similar aquela presente na estrutura cristalina. A ligação do NADP⁺ neste domínio conformacional não bloqueia o acesso do substrato ao sítio ativo.
- d) O "intermediário de Criegee" formado sofre um rearranjo para dar origem a lactona, regenerando o FAD oxidado e o cofator.

III.3. Resultados e Discussão.

III.3.1. Avaliação da presença de Baeyer-Villiger monooxigenases em fungos através de biocatálise convencional.

Para a avaliação das reações de biocatálise convencional é necessário realizar os ensaios em escala de bancada com substratos "reais", crescer os microrganismos selecionados em meios de cultura líquidos,⁷⁰ e ressuspendê-los em um erlenmeyer contendo solução tampão (**Fluxograma III.1**). As reações são mantidas em agitação constante e posteriormente monitoradas por CG-EM e CG-FID. Em cada experimento são incluídos: controle negativo (sem a presença do microrganismo), controle microbiano (sem adição de substrato) e os testes são realizados em duplicatas. A biocatálise convencional permite avaliar o microrganismo selecionado com o substrato de interesse, assim como a determinação do excesso enantiomérico (*e.e.*) e conversões.



Fluxograma III.1. Procedimento experimental para as reações de biocatálise convencional.

⁷⁰ Cappuccino, J.G.; Sherman, N. *Microbiology - A laboratory manual*. The benjamin Cummings Publishing Company, Inc. **1996**.

Neste experimento, através da utilização da biocatálise convencional a 4metilcicloexanona (1) foi utilizada como substrato para a avaliação da atividade BVMO em 12 espécies de fungos: *Aspergillus oryzae* CCT 0975, *Aspergillus terreus* CCT 3320, *Aspergillus niger* CCT 4648, *Aspergillus niger* CCT 4846, *Curvularia eragrostides* CCT 5634, *Curvularia pallescens* CCT 5654, *Drechslera halodes* CCT 5636, *Geotricum candidum* CCT 1205, *Trichoderma sp.* CCT 5551, *Curvularia lunata* CCT 5628, *Curvularia lunata* CCT 5629 e *Cunninghamella echinulata* CCT 4259. As reações de biotransformações foram realizadas predominantemente com células íntegras.

Essas reações foram promovidas adicionando-se a cetona 1 (20μ L) à uma solução tampão de fosfatos (KH₂PO₄ e Na₂HPO₄) a pH 7,0, contendo células em repouso dos fungos previamente cultivados sob condições adequadas (29° C, 96h, agitação contínua). No decorrer deste período, alíquotas das suspensões foram recolhidas e os produtos foram extraídos da fase aquosa com acetato de etila e analisados por CG-EM. O procedimento experimental encontra-se descrito em detalhes no capítulo IX, no item IX.6.1.

Os produtos da oxidação de 1 foram sintetizados por via química (**Esquema III.2**, parte experimental – item IX.6.2), visando a obtenção de lactonas padrões para o monitoramento cromatográfico (CG-FID) das reações de biotransformações com os fungos designados. Os produtos (1a e 1b) da reação foram caracterizados por RMN de ¹H e de ¹³C (espectros **E01** e **E02** em anexo).



Esquema III.2. Síntese da (±)-5-metil-ɛ-caprolactona (1a e 1b) obtida a partir da oxidação de 1 por via química.

A avaliação das conversões da 4-metilcicloexanona **1** foi baseada em padronização interna (benzoato de etila 0,005%). As configurações absolutas das lactonas formadas foram atribuídas de acordo com Porto,⁵² o qual demonstrou que o antipoda (*S*) elui primeiro

que o correspondente (*R*), em coluna cromatográfica de fase estacionária heptakis-(2,3dimetil-6-pentil- β -ciclodextrina). Os experimentos realizados confirmaram a proposta de Porto⁵² e a **Figura III.3** abaixo ilustra o cromatograma obtido pelos padrões racêmicos **1a** e **1b**.



Figura III.3: Cromatograma obtido por CG-FID característico da eluição das substâncias padrões (1a e 1b). Coluna: heptakis-(2,3-dimetil-6-pentil-β-ciclodextrina). Condições: 70°C - 130°C a 2°C/min, seguida por 30°C/min até 180°C, T_{inj.}=225°C e T_{det}=240°C.

Os excessos enantioméricos (*e.e.* %) dos produtos de oxidação foram determinados conforme a equação abaixo:

$$e.e. = \underline{\text{área}(+)} - \underline{\text{área}(-)} \times 100$$

área (+) + área (-)

Os melhores resultados de biooxidação foram obtidos com os fungos *Aspergillus oryzae* CCT 0975 e *Geotricum candidum* CCT 1205. Para o *A. oryzae* CCT 0975, a reação de oxidação da 4-metilcicloexanona (1) ocorreu em 72h, produzindo a lactona (*R*)-(+)-5metil-ε-caprolactona (1b) com excelente conversão (98%) e excesso enantiomérico (96%). O fungo *G. candidum* CCT 1205 também converteu 1 em 1b com excelente excesso enantiomérico (91%) e conversão (98%). Os fungos *A. terreus* CCT 3320, *A. niger* CCT 5559, *C. eragrostides* CCT 5634, *C. pallescens* CCT 5654, *C. lunata* CCT 5629 e *Trichoderma sp.* CCT 5551 iniciaram a conversão para as respectivas lactonas a partir de 72 e/ou 96h, mas não evoluíram quando analisados até um período de 164h. Os resultados encontram-se compilados na **Tabela III.2**.

Fungos	Tempo	•C (%)	••C ^a (%)	C (%)	e.e. (%)	Conf.
	(h)	substrato	álcool	lactona	lactona	Lactona
A. oryzae CCT 0975	72	98	19	77	96	R
A. terreus CCT 3320	72	95	93	1,8		
A. niger CCT 4648	72	25	25			
A. niger CCT 5559	96	24	23	0,8		
C. echinulata CCT 4259	72	81	81			
C. eragrostides CCT 5634	96	77	75	2		
C. pallescens CCT 5654	96	98	97	1		
C. lunata CCT 5628	24	51	51			
C. lunata CCT 5629	96	97	94	3		
D. halodes CCT 5636	72	99	99			
G. candidum CCT 1205	72	98	5	79	91	R
Trichoderma sp. CCT 5551	72	89	88	0,2		

Tabela III.2: Oxidação microbiana da 4-metilcicloexanona (1) com células íntegras de fungos.

• A conversão (C) foi determinada por CG; e.e., excesso enantiomérico;

••C^a álcool *cis/trans* obtido a partir da redução microbiana da cetona (1).

A presença de enzimas BVMO nos fungos *Aspergillus oryzae* CCT 0975 e *Geotricum candidum* CCT 1205 já haviam sido observadas.⁵² No entanto, este trabalho inicial foi importante para o aprendizado dos princípios básicos do funcionamento de um laboratório de microbiologia e da utilização de equipamentos e técnicas básicas de cultivo de microrganismos. As condições ótimas de crescimento (temperatura, pressão de oxigênio, nutrição, etc.), bem como os cuidados com assepsia constituem observações importantes para a obtenção e reprodutibilidade dos resultados nas reações de biocatálise.

Pode ser observado ainda, na **Tabela III.2** que ocorreram reações laterais competitivas, resultando na formação dos álcoois *cis/trans* 4-metilcicloexanol observados em todas as reações. Neste caso, a vantagem da utilização de enzimas isoladas é que não ocorreriam reações de redução dos substratos catalisados por desidrogenases presentes nas células íntegras.⁶⁷

A formação da lactona **1b** (**Figura III.4**) pode ser entendida a partir da formação de espécies peroxidoflavinas, conforme descrito no item III.2. A peroxidoflavina (**A**) promoveu um ataque nucleofílico na carbonila do substrato cetônico de **1**. O "intermediário de Criegee" (**B**) formado sofreu um rearranjo com conseqüente formação de uma

hidroxidoflavina (**C**). Finalmente, o ciclo catalítico é completado pela eliminação de água desta espécie, regenerando o FAD oxidado (**D**) e liberando o produto **1b** e o cofator.



Figura III.4: Mecanismo de Baeyer-Villiger monooxigenases (BVMO) dependentes de flavina mediando a oxidação da 4-metilcicloexanona (1).

III.3.2. Conclusões.

Através da triagem investigativa da presença de BVMO em 12 espécies de fungos brasileiros foi possível detectar a presença de cicloexanonas monooxigenases em *Aspergillus oryzae* CCT 0975 e *Geotricum candidum* CCT 1205, os quais produziram as correspondentes lactonas (R) com excelentes conversões (98%) e excessos enantioméricos. 96% e 91%, respectivamente).

Vale ressaltar ainda que, apesar da boa triagem realizada, a metodologia de biocatálise convencional, por CG descrita, é pouco versátil devido aos elevados custos e tempo, além da limitação de amostras a serem analisadas. Este fato levou ao desenvolvimento de metodologias alternativas a biocatálise convencional, objetivando triagens mais rápidas e eficientes.

Capítulo IV

Triagem mediante "Multibiorreações"

Triagem mediante "Multibiorreações"

Existem muitos métodos analíticos que permitem a detecção de biocatalisadores alvos para uma aplicação particular. A utilização de triagens de alto desempenho é uma maneira bastante versátil e viável economicamente de monitorar a atividade enzimática de coleções de microrganismos naturais ou modificados em reações de biocatálise. Métodos baseados no UV/VIS,⁷¹ na cromatografía (CG, CLAE),⁷² na espectrometria de massas,⁷³na emissão/absorção de energia de substratos fluoro- e/ou cromogênicos,^{71,74} por exemplo, são amplamente utilizados em triagens de alto desempenho por diversos grupos de pesquisa. Os principais interesses em desenvolver novos ensaios combinatoriais consistem em: a) reduzir o tempo de triagem; e b) estudar o maior número de amostras simultaneamente. Com estes objetivos em mente, neste capítulo será descrito a implementação de uma metodologia alternativa à biocatálise convencional, denominada "multibiorreações".

IV.1. Resultados e Discussão.

IV.1.1. Princípios da metodologia de triagem denominada "multibiorreações".

O princípio da metodologia de triagem denominada "multibiorreações" baseia-se na reação de um microrganismo com vários substratos com diferentes grupos funcionais num mesmo pote reacional.⁷⁵ A metodologia tem uma enorme vantagem sobre a triagem descrita no item III.3.1 (um substrato/um microrganismo), uma vez que, a versatilidade da triagem, neste caso, aumenta em **n** vezes, onde **n** é o número de substratos adicionados.

Para testar a eficiência desta triagem, foram selecionados uma cepa de levedura Saccharomyces cereviseae (DSM 0195) e, dois microrganismos brasileiros: a bactéria Serratia rubidea CCT 5732 e o fungo CCT 5560. Cada microrganismo foi analisado

⁷¹ Reetz, M.T.; Jaeger, K.-E. Chem. Eur. J. **2000**, *6*, 407-412.

⁷² Reetz, M.T.; Kühling, K.M.; Wilensek, S.; Husmann, H.; Häusig, U.W.; Hermes, M. *Catal.Today* **2001**, *67*, 389-396.

⁷³ Jandeleit, B.; Schaefer, D.J.; Powers, T.S.; Turner, H.W.; Weinberg, W.H. Angew. Chem. **1999**, *111*, 2648-2689.

 ⁷⁴ Badalassi, F.; Wahler, D.; Klein, G.; Crotti, P.; Reymond, J-L. Angew. Chem. Int. Ed. 2000, 39, 4067-4070.
 ⁷⁵ Marsaioli, A.J.; Chen, L.S.; Pinheiro, L.; Costa, L.A.M.A.; Bicalho, B. The 6th International Symposium on

Biocatalysis and Biotransformation, Biotrans, 2003, Olomouc, Czech Republic.

individualmente com quatro substratos, e teve como objetivo monitorar, de forma simultânea, a redução e/ou oxidação da cetona cíclica 1, a redução da cetona- β éster 2, a oxidação do sulfeto 3 para sulfóxido e sulfona e a hidrólise do epóxido 4, Figura IV.1.



Os produtos das reações foram monitorados por CG-EM.

É conhecido que em reações de biotransformações, a concentração de um substrato deve ser menor que a concentração mínima inibitória (meio reacional 50 mL; substrato 0,4 mg.mL⁻¹; 150 rpm).⁷⁶ Supondo que cada substrato atue de forma individual, teoricamente seria possível adicionar até 1,6 mg.mL⁻¹ de xenobióticos nas suspensões celulares sem perda da atividade enzimática. No entanto, foram adicionados somente 1,0 mg.mL⁻¹ da mistura **1-4** (12,5 mg de cada substrato) por 2 g (massa úmida) de células dos microrganismos.

Sabe-se que os microrganismos testados realizam reações de biocatálise em altos rendimentos e excessos enantioméricos. ^{52,77} A *Serratia rubidea* CCT 5732 é conhecida por ter atividade de oxidorredutase, e neste conjunto de reações ela promoveu a transformação do β -cetoéster (2) em β -hidroxiéster (2a) (*syn* e *anti*) em 2h e após 20h o produto 2a foi degradado. Também foi constatado o desaparecimento do substrato 3. Nesta triagem o fungo CCT 5560 catalisou a oxidação do composto 3 em 3a e 3b. A levedura *Saccharomyces cereviseae* DSM 0195 não exibiu atividade frente aos substratos testados e os microrganismos selecionados não promoveram a biotransformação dos substratos 1 e 4.

 ⁷⁶ Cagnon J.R.; Porto, A.L.M.; Marsaioli, A.J.; Manfio, G.P.; Eguchi, S.Y. Chemosphere 1999, 38, 2237-2242.
 ⁷⁷ Costa, L.A.M.A. Reações de Oxidação e Hidrólise por Migrorganismo nos Métodos de Biocatálise e de

¹¹ Costa, L.A.M.A. Reações de Oxidação e Hidrólise por Migrorganismo nos Métodos de Biocatálise e de Biorremediação. Tese de doutorado. Depto. Química Orgânica, Instituto de Química, Unicamp. 2005.

IV.1.2. Aplicação do método de triagem de multibiorreações visando a detecção de Baeyer-Villiger monooxigenases.

O método de triagem de multibiorreações foi utilizado para investigar o perfil de seletividade da levedura Trichosporum cutaneum CCT 1903 frente a várias cicloalcanonas. Este microrganismo foi previamente estudado por Marsaioli e colaboradores através da emissão de fluorescência em uma reação de Baeyer-Villiger.⁷⁸ Os substratos selecionados para a avaliação do potencial catalítico deste microrganismo foram: 4-metilcicloexanona (1), 3-metilciclopentanona (5), 2-metilcicloexanona (6). 2-alil-2carbometoxiciclopentanona (7) e cis-jasmona (8), contendo 6% de trans-jasmona (Figura IV.2). A maioria das cicloalcanonas utilizadas neste estudo foram obtidas comercialmente, com exceção de 7.



Figura IV.2: Cromatograma de íons totais (CG-EM) das cicloalcanonas utilizadas como substratos para avaliação da atividade enzimática do T. cutaneum CCT 1903: Substratos 1, 5-8. Coluna: HP-5MS - Crosslinked 5% fenilmetilsiloxano. Condições 45°C (5 min.) - 225°C a 10°C.min⁻¹, seguido por 30°C.min⁻¹ até 290°C, T_{inj}.=200°C, fluxo=1mL.min⁻¹, splitless 50.

O composto 7 foi sintetizado a partir da esterificação do ácido adípico (9) sob catálise ácida, conforme descrito na parte experimental (item IX.6.3.1),⁷⁹ Esquema IV.1. O diéster do ácido carboxílico (10) foi obtido com 71% de rendimento após purificação por destilação, sendo caracterizado por EM e RMN de ¹H. O espectro de massas (espectro E03 em anexo), mostrou um pico em m/z 143 (66%), referente a perda de 31 u.m.a., atribuído a perda de um dos fragmentos metoxílicos, e um pico base em m/z 114, o qual corresponde a perda de 28 u.m.a. correpondente a perda de -CO. No espectro de RMN de ¹H (espectro

⁷⁸ Bicalho, B.; Chen, L.S.; Grognux, J.; Reymond, J-L.; Marsaioli, A.J. J. Braz. Chem. Soc. 2004, 15, 911-916. ⁷⁹ Vogel, A. Textbook of Pratical Organic Chemistry. v.III, **1976.**

E04 em anexo), a formação do adipato de dimetila (10) foi evidenciada pela presença de um singleto em δ 3,65 (6 Hs) atribuído aos hidrogênios metoxílicos.



Esquema IV.1: Síntese da cicloalcanona substituída 7.

A utilização de um ácido de Lewis, de baixo custo e fácil manipulação, como o cloreto de alumínio, e de uma base como a trietilamina permitiram a ciclização de Dieckmann do adipato de dimetila.⁸⁰ (item IX.6.3.2, parte experimental). A 2carbometoxiciclopentanona (11) foi obtida em bom rendimento (82%) através de uma metodologia simples, utilizando condições reacionais brandas e seguras. O produto da reação foi confirmado por EM, RMN de ¹H, ¹³C, DEPT 90° e 135°. O espectro de massas de 11 (espectro E05 em anexo) apresentou um íon molecular em m/z 142 (8%), enquanto que no espectro de RMN de 1 H (espectro E06 em anexo), foi possível observar multipletos em δ 1,70-2,40 correspondentes aos hidrogênios metilênicos do ciclopentano. O multipleto em δ 3,10 foi atribuido ao hidrogênio metílico (H-2) e o singleto em δ 3,68 corresponde a presença da metoxila. Além disso, as análises dos espectros de RMN de ¹³C e DEPT 90° e 135° (espectros E07 e E08 em anexo) mostraram sinais em δ 211.9 (C-1) e δ 169.4 (C-1') atribuídos às carbonilas das funções cetona e éster, respectivamente.

Para promover a C-alquilação regiosseletiva do β-cetoéster cíclico com brometo de alila, utilizou-se a metodologia descrita por Fraga.⁸¹ Este procedimento consistiu em adicionar um leve excesso do reagente alguilante, conforme descrito na parte experimental (item IX.6.3.3.), fornecendo o composto a 2-alil-2-carbometoxiciclopentanona (7) em 86% de rendimento. O produto desta reação também foi confirmado por EM, RMN de ¹H, ¹³C, DEPT 90° e 135° (espectros E09 a E12 em anexo). A análise do espectro de massas de 7 mostrou um pico em m/z 182 (6%), correspondente ao íon molecular. No espectro de RMN de ¹H a ausência do sinal referente ao hidrogênio metílico em δ 3,10 e o aparecimento de sinais referentes aos hidrogênios alílicos em δ 5.00-5.80, confirmaram a C-alquilação do β -

 ⁸⁰ Peçanha, E. P.; Barreiro, E. J. Fraga, C. A. M. *Quím. Nova*, **1997**, *20*, 435-437.
 ⁸¹ Fraga, C.A.M.; Barreiro, E. J. *Synth. Commun.* **1995**, *25*, 1133-1144.

cetoéster (11). As ciclopentanonas com substituintes funcionalizados na posição 2, tais como 7, são consideradas bons substratos para várias espécies de microrganismos que apresentam atividade BVMO, incluindo *Acinetobacter* NCIB 9871, TD 63 e *Pseudomonas sp.* NCIMB 10007.⁸²

As reações dos substratos (1, 5-8, Figura IV.2) foram realizadas num único pote. As reações biocatalíticas foram realizadas adicionando 10 mg de cada substrato (total de 50 mg) a 2 g de células (massa úmida) do microrganismo em solução de tampão fosfato (Na₂HPO₄ e KH₂PO₄, pH 6,5). As reações foram monitoradas por CG-EM utilizando como padrão interno uma solução de pentadecano (0,2 mg.mL⁻¹) nos intervalos de 2, 12, 24, 48, 72 e 96h (parte experimental – item IX.6.4).

Após 2h de reação, o *T. cutaneum* CCT 1903 apresentou atividade oxidorredutase, transformando a 2-metilcicloexanona (6) em *cis*- e *trans*-2-metilcicloexanol (m/z 114), **Figura IV.3**. Os produtos destas reações foram confirmados através das análises dos padrões racêmicos, sintetizados pela Dra. Beatriz Bicalho.⁸³ O *cis* e *trans*-2-metilcicloexanol (**6a**, **6b**) tiveram suas estruturas confirmadas através da comparação dos respectivos cromatogramas (espectros E13 e E14 em anexo).



Figura IV.3: Cromatograma de íons totais (CG-EM) obtido após 2h de reação com *T. cutaneum* CCT 1903. Coluna: HP-5MS - Crosslinked 5% fenilmetilsiloxano. Condições: 45°C (5 min.) - 225°C a 10°C.min⁻¹, seguido por 30°C.min⁻¹ até 290°C, T_{ini}.=200°C, fluxo=1mL.min⁻¹.

⁸² Wang, S.; Chen, G.; Kayser, M.M.; Iwaki, H.; Lau, P.C.K.; Hasegawa, Y. *Can. J. Chem.* **2002**, *80*, 613-621.

⁸³ Bicalho B. Prospecção de Antibióticos e Biocatalisadores (Haloperoxidases e Baeyer-Villiger Monoxigenases) em Microrganismos. Tese de doutorado. Depto. Química Orgânica, Instituto de Química, Unicamp. 2004.

Após 12h foram observadas reações de oxidação da *cis*-jasmona (**Figura IV.4**). O cromatograma de íons totais obtido por espectrometria de massas mostrou que o pico no tempo de retenção de 17 min. apresentava um íon molecular m/z 180, correspondente a inserção de um átomo de oxigênio na *cis*-jasmona (m/z 164), espectro **E15** em anexo. Esta observação sugeria a ocorrência de reação de Baeyer-Villiger. Como será discutido no item V.3.1, realizou-se a reação de biocatálise de maneira convencional com o objetivo de caracterizar o produto biooxidado, e surpreendentemente, foi verificado que ao invés da esperada reação de Baeyer-Villiger, ocorreram reações de epoxidação e hidroxilação da *cis*-jasmona.



Figura IV.4: Cromatograma de íons totais (CG-EM) obtido após 12h de reação com *T. cutaneum* CCT 1903. Coluna: HP-5MS - Crosslinked 5% fenilmetilsiloxano. Condições: 45°C (5 min)-225°C a 10°C.min⁻¹, seguido por 30°C.min⁻¹ até 290°C, T_{inj}.=200°C, fluxo=1mL.min⁻¹).

A partir de 46h foi observada a redução da 4-metilcicloexanona (1), com conseqüente formação do *cis* e *trans*-4-metilcicloexanol (1c, Figura IV.1, espectro E16 em anexo). Os demais substratos não foram biotransformados.

IV.1.3. Conclusões.

O resultado obtido no teste da triagem de multibiorreações foi alentador, pois demonstrou que é possível fazer triagens de misturas de xenobióticos e atingir as mesmas conclusões que nas triagens individuais, mas num tempo \mathbf{n} vezes mais rápido, onde \mathbf{n} é o número de substratos adicionados.

A metodologia de triagem de multibiorreações foi otimizada para alcançar as características desejáveis de uma triagem eficiente, ou seja, redução de tempo de análise e de escala.

A metodologia de triagem de multibiorreações foi eficiente na detecção de atividade enzimática do *T. cutaneum* CCT 1903, pois o método permitiu um aumento no conhecimento do perfil de seletividade dos substratos analisados. A ação enzimática das células íntegras do microrganismo resultou na redução de metilcicloexanonas *orto-* e *para*-substituídas (1 e 6) e na oxidação da *cis*-jasmona (8).

Capítulo V

Epoxidações de Alcenos e Hidroxilações

Catalisadas por Monooxigenases

Epoxidações de Alcenos e Hidroxilações Catalisadas por Monooxigenases

O arsenal enzimático do *T. cutaneum* CCT 1903 catalisou a transformação de diversas substâncias produzindo compostos de interesse, entre eles, epóxidos enantiopuros e produtos hidroxilados. Desta forma, neste capítulo serão apresentadas as desvantagens da utilização de metodologias sintéticas químicas para as sínteses de epóxidos enantiopuros como uma justificativa para a necessidade de identificação e desenvolvimento de novos biocatalisadores e, em seguida, serão apresentados os sistemas enzimáticos já descritos na literatura, os quais catalisam epoxidações assimétricas de alcenos e também promovem reações de hidroxilações.

V.1. Sínteses assimétricas de epóxidos.

Os epóxidos e os dióis vicinais correspondentes são, sem dúvida, intermediários de alto valor em sínteses orgânicas. Isto deve-se à alta versatilidade da função oxirano que pode ser quimicamente transformada em intermediários mais elaborados para as sínteses de compostos biologicamente ativos (**Figura V.1**). Nos últimos anos, pesquisadores empenharam-se no desenvolvimento de metodologias que fornecessem epóxidos e dióis enantiomericamente puros.⁸⁴

As metodologias enzimáticas para as sínteses de epóxidos enantiopuros envolvem duas estratégias principais: a) a formação do epóxido a partir de um precursor apropriado, geralmente uma olefina, e b) a resolução de substratos racêmicos, contendo a função oxirano.

⁸⁴ ^[a] Kubo, T.; Peters, M.W.; Meinhold, P.; Arnold, F.H. Chem. Eur. J. **2006**, *12*, 1216-1220. ^[b] Chang, D.; Zhang, J.; Withold, B.; Li, Z. *Biocatal. Biotransform.* **2004**, *22*, 113-130. ^[c] Yang, D. Acc. Chem. Res. **2004**, *37*, 497-505. ^[a] Shi, Y. Acc. Chem. Res. **2004**, *37*, 488-496.



Figura V.1: Intermediários versáteis para as sínteses de compostos biologicamente ativos.

Quando comparadas aos métodos enzimáticos, as metodologias químicas são mais dispendiosas, pois dependem de catalisadores caros contendo metais pesados, os quais geram resíduos de difícil descarte do ponto de vista do impacto ambiental. Além do mais, podem apresentar número de "turnover" relativamente baixos e limitação nos tipos de substratos processados. Por exemplo, na oxidação de Sharpless, a qual é baseada na epoxidação de duplas ligações com um complexo de tartarato de titânio opticamente ativo, o material de partida deve ser um álcool alílico.85 A oxidação e hidrólise de Jacobsen-Katzuki são bastante atrativas para algumas conversões, mas têm limitações de substratos e as reações de epoxidação apenas funcionam para ligações duplas vizinhas a um substituinte aromático.⁸⁶ Já, o grupo de Mukaiyama usa oxigênio molecular e catalisadores metálicos para epoxidar cicloalcenos, mas a indução assimétrica é modesta.⁸⁷ Tais desvantagens justificam a necessidade de métodos adicionais, os quais poderiam ser fornecidos pela biocatálise.

^{85 [}a] Katsuki, T.; Sharpless, K.B. J. Am. Chem. Soc. 1980, 102, 5976-5976. [b] Klunder, J.M.; Ko, S.Y.; Sharpless, K.B. J. Org. Chem. 1986, 51, 3710-3712.

⁸⁶ ^[a] Katsuki, T. J. Synth. Org. Chem. Jpn **1995**, 53, 940-951. ^[b] Katsuki, T. Coord. Chem. Rev. **1995**, 140,

^{189-214.} ⁸⁷ ^[a] Yamada, T.; Takai, T.; Rhode, O.; Mukaiyama, T. *Chem. Lett.* **1991**, *1*, 1-4. ^[b] Mukaiyama, T.; Yamada, T.; Nagata, T.; Imagawa, K. Chem. Lett. 1993, 2, 327-330.
V.2. Catalisadores enzimáticos de reações de epoxidações de alcenos e hidroxilações.

Várias epoxidações assimétricas de alcenos e reações de hidroxilações enzimáticas encontram-se descritas na literatura.^{86,88} A maioria das enzimas envolvidas nestes processos ainda não foram classificadas, sendo que são poucos os sistemas enzimáticos que foram identificados como bons catalisadores para estes tipos de reações, entre eles: monooxigenases contendo heme, também conhecidas como citocromo P-450 e monooxigenases não-heme, tais como, alcano hidroxilases, metano monooxigenases, entre outras.

V.2.1. Monooxigenases contendo heme.

Uma das classes mais importantes de monooxigenases capazes de catalisar a epoxidação de alcenos é a família citocromo P-450. Estas heme-proteínas são encontradas em todas as células vivas, incluindo insetos, plantas, leveduras, bactérias e fungos, mas devido ao seu envolvimento em processos de desintoxicação celular, as enzimas de mamíferos foram as mais estudadas. Estas enzimas são capazes de oxigenar xenobióticos lipofílicos, sendo esta a primeira etapa do processo de desintoxicação; a segunda etapa é a conjugação com compostos, tais como, glicosídeos, glutationa e sulfatos, levando a formação de metabólitos solúveis em água e, consequentemente, excretáveis pela célula.⁸⁹

A superfamília citocromo de monooxigenases heme catalisam muitas reações envolvidas na degradação oxidativa de compostos endógenos e exógenos. Estas enzimas compartilham o mesmo mecanismo catalítico e as especificidades relativas aos substratos surgem das diferenças topológicas dos sítios ativos. O grupo prostético no sítio cataliticamente ativo, das enzimas do citocromo P-450 é uma ferroporfirina, denominada heme, o qual pode ativar o oxigênio molecular e incorporar um dos dois átomos de oxigênio numa molécula orgânica (**Figura V.2**). Dependendo das características moleculares dos substratos, estas monooxigenases permitirão, por exemplo, a hidroxilação de átomos de carbonos não-ativados ou a epoxidação de duplas ligações olefínicas.

 ⁸⁸ ^[a] Archelas, A.; Furstoss, R. Annu. Rev. Microbiol. **1997**, *51*, 491-525. ^[b] Besse, P.; Veschambre, H. Tetrahedron **1994**, *50*, 8885-8927. ^[c] De Bont, J. Tetrahedron:Asymmetry **1993**, *4*, 1331-1340. ^[d] Archelas, A.; Furstoss, R. Ann. Rev. Microbiol. **1997**, *51*, 491-525. ^[e] Schurig, V.; Betschinger, F. Chem. Rev. **1992**, *92*, 873-888.

⁸⁹ Archelas, A.; Furstoss, R. Top. Curr. Chem. 1999, 200, 159-191.



Figura V.2: Estrutura química da protoporfirina.

O mecanismo das reações catalisadas pelas enzimas citocromo P-450 foi originalmente proposto para a cânfora hidroxilase de *Pseudomonas putida* (P-450_{CAM}), ilustrada ao lado.⁹⁰ O **Esquema V.1** mostra que no estado fundamental, o Fe³⁺ encontrase coordenado equatorialmente por um grupo heme, por uma molécula de água e por um átomo de enxofre de um resíduo de cisteína (Cys-357). Posteriormente, ele se liga ao substrato, substituindo uma molécula de água, onde o Fe³⁺ é reduzido para o estado ferroso (Fe²⁺). O elétron liberado do NAD(P)H é transferido



Citocromo P-450_{CAM}

para o citocromo P-450 através de proteínas transportadoras de elétrons, as quais podem ser uma flavina nucleotídeo, uma ferrodoxina ou citocromo b_5 redutase. Na etapa seguinte, o oxigênio molecular é transferido para formar um complexo dioxigenado com o citocromo P-450. A adição de um segundo elétron, seguida de protonação da espécie formada, enfraquece a ligação O-O e permite a clivagem heterolítica do O₂, onde um átomo é utilizado para formar uma molécula de água e o outro para formar o ferro oxidado (Fe⁴⁺ ou Fe⁵⁺), os quais são fortes eletrófilos e promovem o ataque ao substrato, liberando o produto [R(O)H] regenerando a espécie de Fe³⁺, fechando assim, o ciclo catalítico.⁴⁷

⁹⁰ Poulos, T.L.; Finzel, B.C.; Gunsalus, I.C.; Wagner, G.C.; Kraut, J. J. Biol. Chem. 1985, 260, 6122-6130.



Esquema V.1: Ciclo catalítico das monooxigenases dependentes do citocromo P-450.4 * ē proveniente do NADPH ou de outro cofator

A epoxidação de vários alcenos por enzimas citocromo P-450 (de *Bacillus megaterium* e *Pseudomonas putida*) foram estudadas indicando que tanto o processo de epoxidação quanto o de hidroxilação são catalisados pela mesma monooxigenase dependente de NADPH. ^{91,92} (**Esquema V.2**).



Esquema V.2: Epoxidação estereosseletiva do *cis*-β-metilestireno, utilizando citocromo P-450_{cam} de *P. putida*.

V.2.2. Monooxigenases não-heme.

A capacidade de ativar e transferir o oxigênio molecular levando a formação de epóxidos e compostos hidroxilados não é restrita a família da citocromo P-450, e algumas monooxigenases não-heme também estão envolvidas neste processo. Este é o caso, por exemplo, das alcano hidroxilases, metano monooxigenases, estireno monooxigenases e xileno monooxigenases.

⁹¹ Ruettinger, R.T.; Fulco, A.J. J. Biol. Chem. 1981, 256, 5728-5734.

⁹² Ortiz de Montellano, P.R.; Fruetel, J.A.; Collins, J.R.; Camper, D.L.; Loew, G.H. *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 3195-3196.

As alcano hidroxilases foram detectadas em vários microrganismos (Tabela V.1).⁹³ O mecanismo enzimático destas reações foi estudado por Coon e colaboradores.94,95 os quais isolaram a então chamada enzima ω-hidroxilase, que consiste de três componentes protéicos: a) rubredoxina, b) rubredoxina redutase dependente de NADH e c) ω-hidroxilase (uma monooxigenase não-heme que contém ferro no sítio ativo).

microrganismo R_1 R_2 R₁ O₂

Tabela V.1: Epoxidação microbiana de alcenos.

Microrganismo	R ₁	\mathbf{R}_2	Configuração	ee. (%)
Pseudomonas oleovorans	$n-C_5H_{11}$	Н	R	70-80
	$n-C_7H_{15}$	Н	R	60
	Н	Н	R	86
	NH ₂ CO-CH ₂ -C ₆ H ₄ -O	Н	S^{a}	97
	$CH_3O(CH_2)_2-C_6H_4-O$	Н	S^{a}	98
Corynebacterium equi	CH ₃	Н	R	70
	$n-C_{13}H_{27}$	Н	R	~100
Mycobacterium sp.	Н	Н	R	98
	CH_3	CH_3	<i>R</i> , <i>R</i>	74
	Ph-O	Н	S^{a}	80
Xanthobacter Py2	Cl	Н	S ^a	98
	CH_3	CH_3	R,R	78
Nocardia sp. IP1	Cl	Н	S ^a	98
-	CH ₃	Н	R	98

^a A ordem de prioridade dos substituintes foi invertida.

 ⁹³ [a] May, S.W.; Abbott, B.J. J. Biol. Chem. 1973, 248, 1725-1730. ^[b] Abbott, B.J.; Hou, C.T. Appl. Microbiol. 1973, 26, 86-91. ^[c] May, S.W.; Steltenkamp, M.S.; Schwartz, R.D.; McCoy, C.J. J. Am. Chem. Soc. 1976, 98, ^[c] **1973**, *26*, 86-91. ^[6] May, S.W.; Steltenkamp, M.S.; Schwartz, R.D.; McCoy, C.J. J. Am. Chem. Soc. **1976**, *98*, 7856-7858. ^[d] Hou, C.T.; Patel, R.; Laskin, A.I.; Barnabe, N.; Barist, I. Appl. Environ. Microbiol. **1983**, *46*, 171-177. ^[e] Furuhashi, K. Ferment. Ind. **1981**, *39*, 1029-1031. ^[f] Ohta, H.; Tetsukawa, H. Agric. Biol. Chem. **1979**, *43*, 2099-2104. ^[g] Weijers, C.A.G.M.; van Ginkel, C.G.; de Bont, J.A.M. Enzyme Microb. Technol. **1988**, *10*, 214-218. ^[h] Jurtshuk, P.; Cardini, G.E. Crit. Rev. Microbiol. **1972**, *1*, 254-257. ^[i] Fu, H.; Newcomb, M.; Wong, C-H. J. Am. Chem. Soc. **1991**, *113*, 5878-5880. ^[i] May, S.W.; Schwartz, R.D.; Abbott, B.J.; Zaborsky, O.R. Biochem. Biophys Acta. **1975**, *403*, 245-255. ⁹⁴ ^[a] Peterson, J.A.; Basu, D.; Coon, M.J. J. Biol. Chem. **1966**, *241*, 5162-5168. ^[b] Desmet M-J.; Witholt, B.; W. J. L. E. M. L. T. E

Wynberg, H. *Enzyme Microb. Technol.* **1983**, *5*, 359-360. ⁹⁵ ^[a] Ruettinger, R.T.; Griffith, G.R.; Coon, M.J. Arch. Biochem. Biophys, **1977**, *183*, 528-537. ^[b]Ueda, T.;

Coon, M.J. J. Biol. Chem. 1972, 247, 5010-5014.

O gene que codifica a ω -hidroxilase de *P. oleovorans* foi expresso em *E. coli*, e estes resultados levaram a uma interessante aplicação industrial nas sínteses dos β -bloqueadores Metoprolol[®] e Atenolol^{®96} (**Esquema V.3**).



Esquema V.3: Epoxidação enantiosseletiva de ligações duplas C-C com P. oleovorans ATCC 29347.

A **xileno monooxigenase** (XO) de *Pseudomonas putida* mt-2 atua satisfatoriamente em estirenos para produzir (S)-óxidos de estirenos, os quais são obtidos com 93% *e.e.* (**Esquema V.4**). O óxido de estireno enantiopuro é um bloco de construção quiral para as sínteses de álcoois benzílicos α -substituídos opticamente ativos e foi utilizado para sintetizar vários produtos farmacêuticos.



Esquema V.4: Epoxidação assimétrica de estireno com xileno monooxigenase de P. putida mt-2.

A estireno monooxigenase de *Pseudomonas sp.* VLB120 também converte estireno em (*S*)-óxido de estireno com 99% *e.e.* Um biocatalisador recombinante, contendo o gene da estireno monooxigenase, foi construido em *E. coli* e usado para a produção de óxidos de estireno em sistemas de duas fases líquidas. A atividade média obtida foi de um volume líquido total de 152 U.L⁻¹, o que corresponde a um rendimento de 1,1 g de (*S*)-óxido de estireno, por litro, por hora. Para um processo de oxidação microbiana, esta atividade específica é considerada bastante alta. Este sistema foi recentemente usado com sucesso na

⁹⁶ Johnstone, S.L. Phillips, G.T.; Robertson, B.W.; Watts, P.D.; Bertola, M.A. *Biocatalysis in Organic Media*. Elsevier, Amsterdam, 387-392, **1987**.

epoxidação assimétrica de outros derivados do estireno, indeno e diidronaftaleno (**Figura V.3**).



Figura V.3: Produtos de epoxidação utilizando estireno monooxigenase de Pseudomonas sp. VLB120.

Outras oxigenases não-heme interessantes são as **metano monoxigenases** (MMO). Estas enzimas podem transformar metano em metanol, uma reação extremamente difícil de ser realizada por métodos químicos convencionais. Elas também são capazes de introduzir oxigênio num grande número de hidrocarbonetos como alcanos e alcenos, como também em substratos aromáticos e alicíclicos, resultando na formação de epóxidos e N-óxidos. Diferentes enzimas MMO foram isoladas de microrganismos metanotróficos, tais como *Methylococcus capsulatus, M. trichosporium, M. organophilum, Nocardia corallina* e *Xanthobacter Py2*.^{97,98,99}

As reações de epoxidações estereosseletivas de alcenos e hidroxilações foram observadas ainda através da utilização das seguintes linhagens de microrganismos: *Nocardia coralina, Rhodococcus rhodochrous, Aspergillus niger, Cunninghamella elegans, C. blakesleeana, Syncephalastrum racemosum, Beauveria bassiana, Candida tropicalis, Cephalosporium aphidicola*, entre outros, mas nestes casos, a natureza exata das enzimas não é conhecida.⁸⁹

Normalmente, os epóxidos obtidos através de biotransformação com células íntegras microbianas são instáveis em sistemas aquosos tornando-se necessário recuperar o produto *in situ* para aumentar o rendimento da reação. Além disso, tanto o substrato quanto o

⁹⁷ Elliot, S.J.; Zhu, M.; Tso, L.; Nguyen, H.H.T.; Yip, J.H.K.; Chan, S.I. *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 9949-9955.

⁹⁸ Gallagher, S.C.; Cammack, R.; Dalton, H. Eur. J. Biochem 1997, 247, 635-641.

epóxido inibem o catalisador em altas concentrações.⁴⁶ Estas limitações podem ser contornadas pelo uso de um sistema de duas fases líquidas, no entanto, nas emulsões aquosas orgânicas, o catalisador, ou seja, as células íntegras de um microrganismo, encontra-se em contato direto com o solvente orgânico, tornando necessário a utilização de um solvente orgânico de baixa toxicidade para a célula. Por outro lado, a utilização de um sistema de micelas evita o contato direto do biocatalisador com a fase orgânica, mas apresenta uma baixa produtividade volumétrica para a epoxidação, provavelmente causada pelas limitações de transferência de fase.

Uma outra alternativa para a obtenção de epóxidos enantiopuros é a utilização de enzimas isoladas, no entanto, a única epoxidação assimétrica notável de alcenos, utilizando enzimas isoladas, faz uso de uma oxidase–cloroperoxidase (CPO) do fungo *Caldariomyces fumago*.¹⁰⁰ Ao contrário das monooxigenases citadas acima, a CPO utiliza peróxido de hidrogênio ou hidroperóxido de *terc*-butila como oxidante e não necessita da regeneração de cofator, tal como, NAD(P)H. Como mostrado no **Tabela V.2**, *cis*-alcenos não-funcionalizados e olefinas 1,1-di-substituídas foram epoxidadas com excelentes seletividades. Por outro lado, alcenos alifáticos terminais e alcenos *trans*-1,2-di-substituídos foram epoxidados com baixo rendimento e moderada enantiosseletividade.



Tabela V.2: Epoxidação assimétrica de alcenos utilizando cloroperoxidase (CPO).

⁹⁹ Jin, Y.; Lipscomb, J.D. J. Biol. Inorg. Chem. **2001**, *6*, 717-725.

¹⁰⁰ Zaks, A.; Dodds, D.R. J. Am. Chem. Soc. 1995, 117, 10419-10424.

V.3. Resultados e Discussão.

V.3.1. Isolamento e identificação dos produtos obtidos a partir da oxidação da *cis*jasmona (8) por células íntegras de *T. cutaneum* CCT 1903.

O isolamento e a identificação dos produtos de oxidação da *cis*-jasmona (8), detectados a partir do método de triagem de multibiorreações (item IV.1.2), foi realizado de acordo com o protocolo das reações de biotransformações convencionais, conforme descrito na parte experimental, item IX.6.5.

Inicialmente as reações foram monitoradas por CG-EM, retirando alíquotas de 1 mL após 2, 12, 24, 48, 72 e 96h de reação. As análises dos cromatogramas mostraram que o tempo ótimo para esta reação foi de 24h com menor formação de outros produtos e significativa abundância relativa (~60) da substância com íon molecular m/z 180, cuja fragmentação permitiu sugerir a estrutura de um derivado oxigenado da *cis*-jasmona (**Figura V.4**).



Figura V.4: Monitoramento por CG-EM da ação do T. cutaneum CCT 1903 sobre a cis-jasmona.

A reação foi repetida em batelada (16 experimentos) nas mesmas condições. Os meios reacionais foram reunidos, as células eliminadas por centrifugação e os produtos brutos foram extraídos da fase aquosa com AcOEt. Após purificação por cromatografia em coluna de sílica gel, utilizando como eluentes Hex:AcOEt (19:1 a 1:1), os produtos foram identificados por RMN de ¹H e ¹³C (espectros **E17** e **E18** em anexo), sendo possível verificar a formação da 7,8-epoxijasmona (12) e da (\pm)-7,8diidroxijasmona [(\pm)-13] numa proporção de 1:1 (**Esquema V.5**). O composto (\pm)-13 foi formado a partir da hidrólise do 12 durante a etapa de purificação, pois como se observa na **Figura V.4**, não há a formação 13 após 24h de reação biocatalítica.



Esquema V.5: Produtos isolados a partir da atividade enzimática das células íntegras de *T. cutaneum* CCT 1903 sobre a *cis*-jasmona (8): 7,8-epoxijasmona (12, 13%), 7,8-diidroxijasmona (13, 6,2%), 4hidroxijasmona (14, 3,4%).

A fim de evitar a hidrólise da 7,8-epoxijasmona (12) foi realizado um segundo conjunto de experimentos, desta vez extraindo os produtos após 48h de reação e isolando os produtos da reação com Hex:AcOEt:NH₄OH (93:2:5 a 9,5:9,5:1, v/v). Além dos dois produtos obtidos anteriormente (12 e 13), foi possível observar ainda a formação de um terceiro composto (14), proveniente da hidroxilação alílica da *cis*-jasmona (Esquema V.5). Na Figura V.4 verifica-se que a hidrólise espontânea e/ou enzimática de 12 ocorreu a partir de 48 h de reação biocatalítica. Os produtos (12, 13 e 14) foram identificados a partir das análises dos espectros de RMN de ¹H, ¹³C, ¹H e ¹H gCOSY, ¹H e ¹³C HSQC e por comparação com dados da literatura.^{101,102}

A identificação por RMN dos compostos 12, 13, 14 sugere que os íons moleculares de m/z 180, 198, 180 são produtos de epoxidação, hidrólise e hidroxilação microbiológica da *cis*-jasmona, respectivamente (espectros E15, E19 e E20 em anexo).

¹⁰¹ Yamamura, S.; Ozawa, K.; Ohtani, K.; Kasai, R.; Yamasaki, K. Phytochemistry 1998, 48, 131-136.

V.3.1.1. Hidroxilação assimétrica da cis-jasmona.

A reação de hidroxilação, ou seja, a conversão de uma ligação carbono-hidrogênio para uma ligação carbono-hidroxila é uma das atividades enzimáticas mais difundidas, ocorrendo em todas as formas de vida, desde bactérias à humanos. A produção de compostos de fragrância, tais como **14**, (**Esquema V.5**) através de métodos microbianos pode ser exemplificada pelo melhoramento de várias espécies de *Aspergillus* e *Penicillium* utilizados na conversão do α -pineno para o verbenol, que apresenta sabor de hortelã (**Esquema V.6**).^{103,104}



Esquema V.6: Produção de álcoois sinteticamente úteis por hidroxilação enzimática.

Na literatura verifica-se que várias outras hidroxilações alílicas microbianas foram aplicadas em sínteses. Por exemplo, a bactéria *Rhodococcus opacus* PWD4¹⁰⁵ foi capaz de hidroxilar D-limoneno, exclusivamente na posição 6, fornecendo o (+)-*trans*-carveol, na forma enantiomericamente pura, e com alto rendimento (**Esquema V.7a**). A hidroxilação do carbono 21 do galbonolida A e B, isolado de *Micromonospora sp.* e utilizado como anti-fúngico, foi realizada pelo *Streptomyces halstedii*¹⁰⁶ (**Esquema V.7b**).



Esquema V.7: Biotranformações alílicas realizadas por: a) R. opacus PWD4 e b) Streptomyces halstedii.

¹⁰² Koch, T.; Bandemer, K.; Boland, W. Helv. Chim. Acta **1997**, 80, 838-850.

¹⁰³ Agrawal, R.; Deepika, N-U-A.; Joseph, R. Biotechnol. Bioeng. 1999, 63, 249-252.

¹⁰⁴ Vidya, C.M.; Agrawal, R. Appl. Microbiol. Biotechnol. 2003, 62, 421-422.

¹⁰⁵ Duetz, W.A.; Fjaellman, A.H.M.; Ren, S.; Jourdat, C.; Witholt, B. *Appl. Environ. Microbiol.* **2001**, *67*, 2829-2832.

A hidroxilação da *cis*-jasmona (8) e de seus derivados é de fundamental importância, pois estes compostos podem funcionar como intermediários nas sínteses de prostaglandinas (PG) ou compostos do tipo de prostaglandinas (octadenóides, isoprostanas) caracterizados por uma unidade ciclopentanônica (**Figura V.5**).¹⁰⁷ Atualmente, as sínteses e isolamento de derivados das PG despertam grande atenção em diversas áreas do conhecimento, especialmente em aplicações médicas e biológicas, devido as suas propriedades anti-inflamatórias e anti-tumorais.¹⁰⁸



Figura V.5: Prostaglandinas E₂ e D₂ e F2a.

Neste estudo, a hidroxilação alílica da *cis*-jasmona (**8**) pelo *T. cutaneum* CCT 1903 foi confirmada pela análise dos espectros de RMN de ¹H e de ¹³C, onde foi observado uma cetona, uma hidroxila, uma dupla ligação *cis* e outra tetrassubstituída. O dubleto largo em δ 4,71 foi atribuído ao H-4 (espectro **E21** em anexo), este hidrogênio encontra-se acoplado a 3 ligações ao hidrogênio em δ 2,78 (H-5), conforme pode ser observado por RMN de 2D (¹H e ¹H gCOSY espectro **E22**, em anexo). Além disso, a hidroxilação enzimática foi confirmada pela presença de um carbono carbinólico em δ 71,6 (C-4), conforme pode ser visto nos espectros de RMN de ¹³C, DEPT 90° e 135°, ¹H e ¹³C HETCOR (espectros **E23**-**E25** em anexo). A análise do espectro de massas (espectro **E20** em anexo) para o composto **14** apresentou um pico referente ao íon molecular em *m/z* 180, de acordo com a fórmula molecular C₁₁H₁₆O₂. A atribuição completa dos valores de deslocamentos químicos de hidrogênios e carbonos pode ser visualizada na **Tabela V.3** e na parte experimental, item IX.6.5.1.

 ¹⁰⁶ Shafiee, A.; Harris, G.; Motamedi, H.; Rosenbach, M.; Chen, T.; Zink, D.; Heimbuch, B. J. Mol. Catal. B:Enzym. 2001, 11, 237-242.
¹⁰⁷ ^[a] Krischke, M.; Loeffler, C.; Mueller, M.J. Phytochemistry 2003, 62, 351-358. ^[b] Vallikivi, I.; Fransson, 2005.

L.; Hult, K.; Järving, I.; Tõnis, P.; Samel, N.; Tõugu, V.; Villo, L.; Parve, O. J. Molec. Catal. B:Enzym. 2005, 35, 62-60.

HO = 11						
C #	δ _C	$\delta_{\rm H}$ (mult, J)	gCOSY			
1	204,9					
2	140,9					
3	168,7					
4	71,6	4,71 (1H, d _L , H-4)	2,78			
5	44,2	2,78 (1H, dd, J 18,4 e 6,3 Hz, H-5)	2,28; 4,71			
		2,28 (1H, dd, <i>J</i> 18,4 e 2,2 Hz, H-5)	2,78			
6	21,1	2,94 (2H, d _L , H-6)	5,23			
7	124,1	5,23 (1H, dtt, J 17,8; 7,3; 1,5 Hz, H-7)	5,41; 2,94			
8	132,9	5,41 (1H, dtt, J 17,8; 7,5; 1,5 Hz, H-8)	5,23; 2,16			
9	20,5	2,16 (2H, ddd, J 7,5; 7,3; 1,5 Hz; H-9)	5,41; 0,99			
10	14,1	0,99 (3H, t, J 7,5 Hz, H-10)	2,16			
11	13,7	2,10 (3H, s, H-11)				

Tabela V.3: Dados espectroscópicos de RMN de ¹H e de ¹³C para a 4-hidroxijasmona (14).

Este composto também foi isolado do extrato metanólico de uma planta aromática (Mentha spicata L.) na sua forma glicosilada.¹⁰⁹ Naquele caso, a fração bruta contendo o glicosídeo apresentou uma atividade anti-histamínica (anti-alérgica) significativa e a configuração (S) para o carbono 4 foi determinada por comparação dos deslocamentos químicos de RMN de ¹³C da aglicona e do glicosídeo.

 ¹⁰⁸ Rezanka, T.; Dembitsky, V.M. *Eur. J. Org. Chem.* **2003**, *3*, 309-316.
¹⁰⁹ Yamamura, S.; Ozawa, K.; Ohtani, K.; Kasai, R.; Yamasuki, K. *Phytochemistry* **1998**, *48*, 131-136.

V.3.1.1.1. Determinação da configuração absoluta da 4-hidroxijasmona (14).

Neste caso, a determinação da configuração absoluta de 14 foi realizada através da derivatização com os ácidos de Mosher. O método de Mosher, 110 desenvolvido em 1973, é um dos mais utilizados para determinar a configuração absoluta de álcoois secundários. Mosher e colaboradores utilizaram diferenças de deslocamentos de hidrogênios em análises de RMN de ¹⁹F e de ¹H dos α-metóxi-α-(trifluorometil)-fenilacetatos. A aplicação deste método foi ampliada consideravelmente por Kakisawa e colaboradores¹¹¹ por aplicação de diferenças de deslocamento de outros sinais e não somente os dos vizinhos aos centros assimétricos, como descrito pelo método convencional, já que os instrumentos de RMN utilizados por Mosher (1973) eram de 60-100 MHz e a completa atribuição dos hidrogênios de moléculas orgânicas complexas era praticamente impossível. Desde então, o ácido α metóxi- α -trifluorometil- α -fenilacético (MTPA) é o reagente derivatizante mais utilizado para a atribuição da configuração absoluta de álcoois secundários por espectroscopia de RMN.112

O procedimento inicia-se com a esterificação do álcool com os dois enantiômeros do MTPA (Figura V.6), depois que os dois ésteres diastereoisoméricos são preparados, seus espectros de RMN são adquiridos e comparados. O uso da espectroscopia de RMN de ¹H baseia-se no efeito anisotrópico que o grupo fenila do auxiliar quiral MTPA exerce nos substituintes (L_1/L_2) do álcool. Este efeito permite que seja feita uma correlação entre a posições espaciais de L1 e L2 com o grupo fenila do MTPA. Neste caso, Mosher assumiu que a conformação mais representativa é aquela na qual o C(1')H, a carbonila e o grupo CF₃ estão situados no mesmo plano (Figura V.6a). Consequentemente, os hidrogênios dos substituintes L₂ são protegidos pelo anel fenila no éster (R)-MTPA, enquanto que os hidrogênios de L_1 não são afetados. Por outro lado, no derivado (S)-MTPA, L_1 e seus hidrogênios são protegidos, enquanto L_2 não é afetado (Figura V.6b). Portanto, os substituintes L₁ serão mais protegidos no éster (S)-MTPA quando comparados ao éster (R)-MTPA, e os substituintes L2 serão mais protegidos no éster (R)-MTPA, que no derivado éster (S)-MTPA.

¹¹⁰ ^[a] Dale, J.A.; Mosher, H.S. J. Am. Chem. Soc. **1973**, 95, 512-519. ^[b] Sullivan, G.R.; Dale, J.A.; Mosher, H.S. J. Org. Chem. **1973**, 38, 2143-2147.

 ¹¹¹ Ohtani, I.; Kusumi, T.; Kashman, Y.; Kakisawa, H. J. Am. Chem. Soc. 1991, 113, 4092-4096.
¹¹² Riguera, R.; Quinoa, E.; Seco, J.M. Chem. Rev. 2004, 104, 17-117.

Estas proteções seletivas são expressas usando o parâmetro $\Delta \delta^{SR}$, o qual é definido, como a diferença entre o deslocamento químico de um certo hidrogênio do éster (*S*)-MTPA e o deslocamento químico do mesmo hidrogênio no derivado (*R*)-MTPA. Todos os hidrogênios protegidos no (*R*)-MTPA apresentarão um valor de $\Delta \delta^{SR}$ positivo, enquanto que os hidrogênios protegidos no (*S*)-MTPA apresentarão um $\Delta \delta^{SR}$ negativo.



Figura V.6: Modelos conformacionais para os ésteres do MTPA (a, b) e a influência nas magnitudes no espectro de RMN de ¹H e das medidas de $\Delta \delta^{SR}$ (c, d). As setas indicam o efeito de proteção e desproteção causado pelo sistema aromático.

No caso do álcool mostrado na **Figura V.6c**, por exemplo, os sinais para cada hidrogênio em L_1 e L_2 será:

$$\Delta \delta^{SR} \mathbf{L}_1 = \delta \mathbf{L}_1(S) - \delta \mathbf{L}_1(R) < 0$$
$$\Delta \delta^{SR} \mathbf{L}_2 = \delta \mathbf{L}_2(S) - \delta \mathbf{L}_2(R) > 0$$

Se a configuração do álcool mostrado na **Figura V.6c** for oposta, os sinais de $\Delta \delta^{SR}$ L₁ e $\Delta \delta^{SR}$ L₂ também seriam opostos (**Figura V.6d**).

Desta forma, a presença de uma hidroxila secundária no centro estereogênico permitiu a esterificação da 4-hidroxijasmona com o (R)-(+)-ácido de Mosher e com o (S)-(-)- ácido de Mosher separadamente na presença de 4-dimetilaminopiridina e

dicicloexilcarbodiimida (parte experimental, itens IX.6.5.1.1 e IX.6.5.1.2). Os produtos das reações foram analisados por CG-EM (espectros **E26** e **E27** em anexo) e por RMN de ¹H (espectro **E28** e **E29** em anexo). As análises dos espectros de RMN de ¹H (**Figura V.7**) revelaram a presença de hidrogênios carbinólicos em δ 5,98 (**14a**) e δ 5,85 e (**14b**), o que indica que as hidroxilas foram esterificadas com os ácidos α -metóxi- α -trifluorometil- α -fenilacético (MTPA). Os deslocamentos e valores de $\Delta \delta^{SR}$ apresentados na **Tabela V.4** revelaram a desproteção dos hidrogênios H-5 (δ 2,98 e 2,33) e a proteção dos hidrogênios metílicos H-11 (δ 1,88) no composto **14a**, devido ao efeito anisotrópico do grupo fenila do auxiliar quiral (*R*)-MTPA, enquanto que no composto **14b** a proteção do auxiliar quiral (*S*)-MTPA ocorreu nos hidrogênios H-5 (δ 2,93 e 2,19). A atribuição completa dos deslocamentos químicos de hidrogênios para os compostos **14a** e **14b** encontram-se descritas na parte experimental (itens itens IX.6.5.1.1 e IX.6.5.1.2). Os dados de RMN de ¹H dos derivados (*R*) e (*S*) de Mosher mostraram que o carbono assimétrico tem configuração (*S*).



Figura V.7: Modelos conformacionais para os ésteres do MTPA do composto 14 e os deslocamentos químicos de ¹H, que sofrem o efeito anisotrópico do sistema aromático e as magnitudes das medidas de $\Delta \delta^{SR}$.

H₂C

Hidrogênio		δη	$\Delta \delta^{SR}$
	14a	14b	
5	2,98	2,93	-0,05
5	2,33	2,19	-0,14
11	1,88	2,03	0,15

Tabela V.4: Dados parciais de RMN de ¹H para os ésteres do composto 14 derivado do (S)- e (R)-Mosher (14a e 14b).

V.3.1.1.2. Determinação do excesso enantiomérico da 4-hidroxijasmona (14).

A dificuldade para determinar o excesso enantiomérico é central para as pesquisas em biocatálise, sendo necessário aplicar um método eficiente para discriminar os enantiômeros. Neste contexto, a cromatografia a gás (CG) em fase quiral é um dos métodos mais eficientes no que se refere ao custo e benefício.^{113,114} Trata-se de um método sensível, que tem a vantagem de não ser afetado pela presença de impurezas nas amostras, além de ser um método preciso e de fácil manuseio.

A separação quiral, através de CG, pode ser direta ou indireta. O meio indireto envolve a derivatização de um composto quiral com um auxiliar quiral. Os diastereoisômeros formados por esta associação podem ser separados por uma fase estacionária aquiral. Pelo meio direto, utiliza-se uma fase estacionária quiral, não-racêmica apresentando discriminação enantiomérica para o composto de interesse.

O excesso enantiomérico para o composto **14** foi calculado através da análise do éster do (*S*)-MTPA-**14b** (**Figura V.8**). A análise foi feita por CG pelo meio indireto, utilizando uma coluna capilar de sílica fundida com fase estacionária aquiral HP-5MS crosslinked 5% fenilmetilsiloxano. A (4*S*)-hidroxijasmona (**14**) apresentou excesso enantiomérico de 86%, mostrando que a hidroxilação da *cis*-jasmona além de régio- foi também estereosseletiva.



Figura V.8: Cromatograma de íons totais (CG-EM) do éster do (S)-MTPA-14b. Coluna: HP-5MS -Crosslinked 5% fenilmetilsiloxano. Condições: 50°C -290°C a 15°C.min⁻¹, T_{inj}.=220°C, split 50, fluxo=1mL.min⁻¹).

¹¹³ Allenmark, S.G. *Chromatographic Enantioseparations Methods and Applications*. 2nd. ed., New Jersey, Prentice Hall, **1991**.

¹¹⁴ Eliel, E.L.; Wilen, S. H.; Mander, L.N. *Stereochemistry of Organic Compounds*. New York, John Wiley & Sons, **1994**.

V.3.1.2. Epoxidação assimétrica da cis-jasmona.

A formação da 7,8-epoxijasmona (12) a partir da *cis*-jasmona, pelo *T. cutaneum* CCT 1903, foi confirmada por CG-EM (espectro E15 em anexo) e pela análise dos espectros de RMN de ¹H (espectro E30 em anexo), onde mostra que os sinais em δ 3,01 e 2,84 foram atribuídos aos hidrogênios H-7 e H-8, respectivamente. Estas atribuições foram confirmadas através dos dados obtidos no espectro de¹H e ¹H gCOSY (espectro E31 em anexo), onde se verificou o acoplamento a três ligações entre os hidrogênios em δ 3,01 e 2,26; 2,49 (H-7 e H-6), respectivamente. Além disso, foi possível observar o acoplamento a três ligações entre os hidrogênios H-9 e H-8 (δ 1,60 e 2,84). Os deslocamentos químicos dos carbonos em δ 58,5 e δ 55,6 atribuídos ao C-8 e C-7, respectivamente (espectros E32-E34 em anexo), são característicos de epóxidos. A atribuição completa dos sinais de deslocamentos químicos de carbonos e hidrogênios para o composto 12 pode ser vista na Tabela V.5 e no item IX.6.5.2 (parte experimental).

$5 \underbrace{\begin{pmatrix} 0 \\ 1 \\ 4 \\ 4 \\ 4 \\ 11 \end{pmatrix}}_{4 3 \\ 11 } \underbrace{\begin{pmatrix} 0 \\ 7 \\ 0 \\ 10 \\ 10 \\ 10 \\ 10 \\ 10 \\ 10$					
C #	δ _C	δ _H (mult, <i>J</i>)	gCOSY		
1	209,1				
2	136,7				
3	172,5				
4	34,1	2,37 (2H, m, H-4)	2,09; 2,53		
5	31,8	2,53 (2H, m, H-5)	2,37		
6	21,9	2,49 (1H, m, H-6)	3,01; 2,26		
		2,26; (1H, dd, <i>J</i> 14,0 e 7,5 Hz, H-6)	3,01; 2,49		
7	55,6	3,01 (1H, dd, <i>J</i> 6.5 e 4.5 Hz, H-7)	2,26; 2,49		
8	58,5	2,84 (1H, td, <i>J</i> 6.5 e 4.5 Hz, H-8)	1,60		
9	21,1	1,60 (2H, m, H-9)	1,03; 2,84		
10	10,5	1,03 (3H, t, J 7,5 Hz, H-10)	1,60		
11	17,5	2,09 (3H, s, H-11)	2,37		

Tabela V.5: Dados es	pectroscópicos de	e RMN de ¹ I	H e de ¹³ C	para a 7,8-e	poxijasmona,	(12).

V.3.1.2.1. Determinação do excesso enantiomérico da 7,8-epoxijasmona (12).

Inicialmente, o produto racêmico (±)-12 (Esquema V.8) foi utilizado para otimizar as condições cromatográficas e alcançar a resolução satisfatória e simultânea de todos os estereoisômeros.



Esquema V.8: Síntese da (±)-7,8-epoxijasmona, [(±)-12] e hidrólise.

De acordo com a literatura,¹¹⁵ epóxidos *cis* apresentam constantes de acoplamento (*J*) iguais a 4,0 Hz, enquanto que epóxidos *trans* têm constantes de acoplamento da ordem de 2,5 Hz. A reação de epoxidação da *cis*-jasmona foi realizada com ácido *meta*-cloroperbenzóico (parte experimental, item IX.6.5.2.1). Normalmente esta reação é estéreo-específica, portanto, epóxidos *cis* devem ser formados. De fato, os hidrogênios H-7 e H-8 apresentaram constantes de acoplamento iguais a 4,5 Hz e, conseqüentemente, configuração relativa *cis*.

A análise dos espectros de RMN de ¹H e ¹³C (espectros **E35** e **E36** em anexo) do composto (\pm)-**12** mostrou que parte do epóxido sofreu abertura, durante a aquisição de dados, levando a formação do diol (\pm)-**13** (**Esquema V.8**). Para evitar a abertura do epóxido, as análises de RMN de (\pm)-**12** foram realizadas em CDCl₃ previamente tratado em alumina básica (espectros **E37** e **E38** em anexo). Com este procedimento, não foi observada a formação do diol (\pm)-**13** proveniente da epóxi-jasmona (\pm)-**12**, a qual estava simplesmente sendo hidrolisada por traços de ácido presentes no solvente deuterado.

Um extenso trabalho cromatográfico de otimização para a resolução dos estereoisômeros de (\pm)-12 foi realizado. Para as análises por CG-FID utilizaram-se colunas capilares de sílica fundida com as fases quirais: a) Chirasil- β -ciclodextrina, b) Lipodex E (2,6-Pe-3-Bu- γ -CD), c) Per-*O*-Me- β -ciclodextrina e d) Heptakis 2,6-di-*O*-metil-*O*-pentil-3-

¹¹⁵ Silverstein, R.M.; Bassler, G. C.; Morrill, T.C. *Identificação espectrométrica de compostos orgânicos.* 5^a. ed., Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, **1994**.

β-ciclodextrina. Para a CLAE se fez uso de uma coluna quiral (*S*,*S*) Whelk-01. Uma resolução satisfatória foi obtida com a coluna heptakis 2,6-di-*O*-metil-*O*-pentil-3-β-ciclodextrina (**Figura V.9a**). Na **Figura V.9a** observa-se a presença de epóxidos *trans* (6%) resultantes da reação com a *trans*-jasmona, presente no substrato utilizado (8). A análise do substrato 8 foi realizada na coluna quiral citada acima para confirmar a estéreo-especificidade da reação de epoxidação.

A configuração relativa do par de diastereoisômeros majoritários foi determinada por RMN de ¹H, a partir do cálculo das constantes de acoplamento e a configuração absoluta foi determinada a seguir conforme descrito no item V.3.1.2.2. Estabelecidas às condições de análise para o racemato, foi analisada a 7,8-epoxijasmona (**12**) obtida a partir da reação com *T. cutaneum* CCT 1903, sendo que a mesma apresentou um excelente excesso enantiomérico de 92% (**Figura V.9b**).



Figura V.9: Cromatogramas obtidos por CG-FID quiral da: a) (±)-7,8-epoxijasmona [(±)-12], b) 7,8-epoxijasmona (12) obtida por biocatálise. Coluna: heptakis 2,6-di-*O*-metil-*O*-pentil-3-β-ciclodextrina. Condiçõe: 50°C - 180°C a 2°C.min⁻¹, T_{inj.} = 220°C e T_{det.} = 280°C, P=10 psi.

Portanto a avaliação da atividade enzimática do *T. cutaneum* CCT 1903, frente a *cis*-jasmona, através de catálise convencional (item V.3.1), permitiu a detecção de uma alceno monooxigenase.¹¹⁶

V.3.1.2.2. Determinação da configuração absoluta da 7,8-epoxijasmona (12).

Com o intuito de determinar a configuração absoluta do epóxido funcionalizado, ou seja, a 7,8-epoxijasmona (12) obtida por biocatálise, foi proposta a síntese de um álcool secundário contendo uma única hidroxila livre para, em seguida, realizar a reação com os ácidos de Mosher.

O composto (±)-12 foi reduzido com LiAlH₄ à temperatura ambiente durante 1h (Esquema V.9 e parte experimental – item IX.6.5.2.2). A etapa seguinte, ou seja, a oxidação alílica foi realizada sem a prévia purificação dos produtos de redução, (±)-15a e (±)-15b, conforme descrito na parte experimental (itens IX.6.5.2.3).¹¹⁷ Após purificação por cromatografia em camada delgada preparativa, utilizando como eluente Hex:AcOEt 1:1, e análises por CG-EM, verificou-se que a reação produziu como produto principal o composto (±)-17 (*m*/*z* 166, espectro E41 em anexo), formado a partir da eliminação de água dos dióis (±)-15a e (±)-15b, e uma mistura 1:1 dos compostos (±)-16a e (±)-16b com um rendimento de apenas 17% (Figura V.10, espectros E39-E40 em anexo).



Esquema V.9: Redução da (±)-7,8-epoxijasmona [(±)-12] com LiAlH₄ e oxidação alílica, utilizando MnO₂.

A reação de (\pm)-16a e (\pm)-16b com o reagente de Mosher somente seria viável se estes compostos pudessem ser identificados na mistura. Isto não ocorreu, uma vez que além do baixo rendimento da reação e dificuldade de separá-los fisicamente, os produtos (\pm)-16a

¹¹⁶ Gonçalves, R.A.C.; Porto, A.L.M.; Pinheiro, L.; Cagnon, J.R.; Manfio, G.P.; Marsaioli, A.J. *Food Technol. Biotech.* **2004**, *42*, 355-361.

¹¹⁷ Meira, P.R.R. *Estudos Visando a Síntese Total da (-)-Calistatina A*. Tese de doutorado. Depto. Química Orgânica, Instituto de Química, Unicamp. **2004**.

e (\pm)-16b foram obtidos em quantidades semelhantes, o que dificultou a atribuição dos sinais em RMN de ¹H baseada nas abundâncias relativas distintas. Portanto, procurou-se investir em outra estratégia que possibilitasse a reação com o MTPA e, conseqüentemente, a determinação da configuração absoluta do composto 12.



Figura V.10: Cromatograma de íons totais (CG-EM) obtido após redução da (±)-7,8-epoxijasmona [(±)-12] com LiAlH₄ e subseqüente oxidação alílica com MnO₂. Coluna: HP-5MS - Crosslinked 5% fenilmetilsiloxano. Condições: 50°C-290°C a 15°C.min⁻¹, T_{inj}.=200°C, fluxo=1mL.min⁻¹, split 50.

Sabe-se que um dos métodos mais comuns para a proteção de cetonas simples é a formação de dialquil acetais acíclicos.¹¹⁸ Na maioria das vezes estes compostos são sintetizados sob catálise ácida, utilizando álcoois como solventes da reação. A catálise ácida prótica também pode ser realizada por *p*-tolueno sulfonato de piridínio (PPTS) ou pelo ácido *p*-tolueno sulfônico (PTSA). Usando PPTS, a formação do acetal ocorre através da coordenação do sal de piridínio com a carbonila, aumentando sua nucleofilicidade enquanto que o nucleófilo, geralmente um *orto*-acetato, resulta na proteção da cetona. No entanto, esta reação não é verificada no caso de cetonas α , β -insaturadas, tais como, o composto **12**.

Tentou-se a reação da (\pm) -7,8-epoxijasmona (\pm) -12 (50,0 mg, 0,278 mmol) com trimetil-*orto*-acetato e PPTS,¹¹⁹ conforme descrito na parte experimental (item IX.6.5.2.4). A proteção da cetona não foi observada, mas sim, a abertura do epóxido com a formação dos compostos (\pm) -7-hidróxi-8-metoxijasmona [(\pm) -18a] e (\pm) -7-metóxi-8-hidroxijasmona [(\pm) -18b], numa razão 4:1 (Esquema V.10). A síntese de (\pm) -18 solucionou de forma

¹¹⁸ Kocienski, P. J. Protecting groups. Stuttgart, Georg Thieme Verlag, 1994.

¹¹⁹ Wenkert, E.; Goodwin, T.E. Synth. Commun, 1977, 7 (6), 409-415.

bastante satisfatória a proposta inicial de obter um álcool secundário, contendo uma única hidroxila livre, para realizar a reação com os ácidos de Mosher.



Esquema V.10: Síntese da (±)-7-hidróxi-8-metoxijasmona [(±)-18a] e (±)-7-metóxi-8-hidroxijasmona [(±)-18b].

Os produtos (±)-18a e (±)-18b foram caracterizados por CG-EM, RMN de ¹H, e ¹³C, DEPT 135° e 90°, ¹H e ¹H gCOSY e ¹H e ¹³C HSQC.

A análise do espectro de massas (espectros **E42** e **E43** em anexo) mostrou um pico em 8,6 min com *m/z* 180 (11%), correspondente à perda de metoxila do composto (±)-**18a** (*m/z* 212) e um outro pico em 8,4 min, produzido pela perda de água, com *m/z* 194 (6%), do composto (±)-**18b**. No espectro de RMN de ¹H (espectro **E44** em anexo), foram observados um duplo duplo dubleto em δ 3,70 atribuído ao H-7 e um duplo tripleto em 3,01 atribuído ao H-8 [composto (±)-**18a**]. No espectro de ¹H e ¹H gCOSY (espectro **E45** em anexo) observou-se um acoplamento entre estes dois hidrogênios (H-7 e H-8). Além disso, o hidrogênio em 3,70 (H-7) encontra-se acoplado aos hidrogênios metilênicos em δ 2,45 e 2,33 (H-6), e o hidrogênio em δ 3,01 (H-8) encontra-se acoplado aos hidrogênios metilênicos da metila em δ 0,95 (H-10). Para o composto (±)-**18b**, foi constatado que os hidrogênios H-7 e H-8 aparecem como um multipleto na região δ 3,20-3,14, tais hidrogênios, encontram-se acoplados aos hidrogênios metilênicos em δ 2,49 (H-6) e em δ 1,75-1,50 (H-9).

O espectro de RMN de ¹³C (espectro **E46** em anexo) revelou a presença de 19 sinais com diferentes deslocamentos químicos, cujos padrões de hidrogenação foram estabelecidos pela análise dos espectros obtidos pela técnica DEPT 135° e 90° (espectro **E47** em anexo). Os sinais em δ 71,0 e δ 84,8 foram atribuídos ao C-7 e C-8 do composto (±)-**18a**, respectivamente, e os sinais em δ 81,5 e δ 73,7 foram atribuídos ao C-7 e C-8 do composto (±)-18b, respectivamente. Observa-se a desproteção de aproximadamente $\delta 10$ para o C-8 do composto (±)-18a quando comparado ao mesmo carbono do composto (±)-18b. Esta observação está de acordo com a regra de aditividade estabelecida por Grant e Paul¹²⁰ para o deslocamento químico de ¹³C de alcanos, a qual estabelece que a substituição de um H por C causa a desproteção nas posições β de aproximadamente δ 9.

A atribuição completa dos sinais de deslocamentos químicos de carbonos e hidrogênios dos compostos (\pm)-18a e (\pm)-18b encontra-se compilada nas **Tabelas V.6 e V.7** e foram confirmadas pela análise do espectro ¹H e ¹³C HSQC (espectro **E48** em anexo).

Tabela V.6: Dados espectroscópicos de RMN de ¹H e de ¹³C para a (±)-7-hidróxi-8metoxijasmona [(±)-18a].

	6	9
4 3		0013

5

C#	δ_{C}	$\delta_{\rm H}$ (mult, J)	gCOSY
1	210,9		
2	138,0		
3	172,9		
4	34,2	2,41 (t, <i>J</i> 4,5 Hz, 2H)	2,56
5	32,0	2,56 (m, 2H)	2,41
6	27,6	2,45 (dd, <i>J</i> 14,0 e 3,2 Hz, 1H)	3,70
		2,33 (dd, <i>J</i> 14,0 e 9,3 Hz, 1H)	
7	71,0	3,70 (ddd, <i>J</i> 9,3, 4,8 e 3,2 Hz, 1H)	3,01; 2,33; 2,45
8	84,8	3,01 (dt, <i>J</i> 6,5 e 4,8, 1H)	3,70; 1,75-1,50
9	22,2	1,75-1,50 (m , 2H)	3,01; 0,95
10	9,7	0,95 (t, <i>J</i> 7,4 Hz, 3H)	1,75-1,50
11	17,5	2,11 (s, 3H)	
-OCH ₃	58,0	3,42 (s, 3H)	

¹²⁰ Paul, E.G.; Grant, D.M. In.: Breitmaier, R.; Voelter, W. Carbon-13 NMR Spectroscopy: high resolution methods and application in organ. Chemistry and biochemistry. Weinheim, New York, NY:VCH, **1987**.

Tabela V.7: Dados espectroscópicos de RMN de ¹H e de ¹³C para a (±)-7-metóxi-8hidroxijasmona [(±)-18b].



C#	δ_{C}	$\delta_{\rm H}$ (mult, J)	gCOSY
1	210,9		
2	138,0		
3	172,9		
4	34,2	2,41 (t, <i>J</i> 4,5 Hz, 2H)	
5	31,9	2,56 (m, 2H)	
6	24,2	2,49 (m, 2H)	3,20-3,14
7	81,5	3,20-3,14 (m, 1H)	2,50-2,30
8	73,7	3,20-3,14 (m, 1H)	1,75-1,50; 0,94
9	26,6	1,75-1,50 (m , 2H)	3,20-3,14
10	10,4	0,94 (t, <i>J</i> 7,4 Hz, 3H)	
11	17,5	2,13 (s, 3H)	
-OCH ₃	58,6	3,41 (s, 3H)	

A partir da identificação dos regioisômeros (\pm)-18a e (\pm)-18b foi possível reavaliar a reação de hidroximetoxilação de (\pm)-12 (Esquema V.10), constatando que estes eram os únicos produtos formados. Portanto, a reação de abertura do epóxido foi estéreo-específica. O mecanismo de ação proposto para a reação seria explicado através de uma catálise levemente ácida, promovida pelo *p*-tolueno sulfonato de piridínio, levando a abertura do epóxido [(\pm)-**12**], enquanto que o trimetil-*orto*-acetato atuaria como nucleófilo. A regiosseletividade (4:1) da reação foi justificada pelo ataque nucleofilico no átomo de carbono menos impedido da (\pm)-7,8-epoxijasmona, pela face oposta a abertura do epóxido, neste caso o C-8. A proteção da carbonila, conforme discutido acima, não é esperada por se tratar de uma cetona α , β -insaturada e, portanto, menos eletrodeficiente e menos reativa que uma cetona normal. Por outro lado, a solvatação promovida pelo metanol poderia contribuir para a formação dos produtos observados.

O mecanismo de reação proposto mereceu uma melhor investigação, no sentido de verificar: a) controle da abertura do epóxido, b) se a reação é sempre do tipo $S_N 2$ e, c) se o método é eficiente na determinação da configuração absoluta de outros epóxidos funcionalizados, pois até onde se sabe, não há na literatura um método que permita obter esta informação para sistemas complexos, tais como, no caso do composto **12**.

Um estudo preliminar com (±)-1,2-epoxidecano [(±)-19] mostrou que a reação foi regiosseletiva, e apresentou a mesma razão (4:1) observada para os compostos (±)-18a e (±)-18b. Os produtos da reação de (±)-20 foram identificados por RMN de ¹H e ¹³C, DEPT 135° e 90° (Esquema V.11, parte experimental – item IX.6.5.2.5, espectros E49-E51 em anexo).



Esquema V.11: Síntese do (±)-1-hidróxi-2-metoxidecano [(±)-20a] e do (±)-1-metóxi-2-hidroxidecano [(±)-20b].

No espectro de RMN de ¹³C foi possível observar que o C-2 do composto majoritário, ou seja, o (\pm)-1-hidróxi-2-metoxidecano [(\pm)-20a] sofreu desproteção quando comparado ao mesmo carbono do (\pm)-1-metóxi-2-hidroxidecano [(\pm)-20b], de acordo com a regra de aditividade estabelecida por Grant e Paul.¹²⁰

A regiosseletividade da reação (4:1) pode ser justificada pelo ataque do nucleófilo no átomo de carbono que melhor acomoda uma carga positiva, neste caso, o C-2 do composto (\pm)-**19**. Este grau considerável de caráter carbocátion é desenvolvido durante o estado de transição em reações S_N2 sob catálise ácida, e a substituição ocorre com inversão de configuração.¹²¹

Com o objetivo de verificar se o metanol anidro, utilizado como solvente da reação, seria o responvável pela abertura dos epóxidos (\pm)-12 e (\pm)-19 (Esquemas V.10 e V.11), uma nova reação foi realizada sob as mesmas condições citadas na parte experimental – item IX.6.5.2.4, entretanto sem utilizar o trimetil-*orto*-acetato. Neste caso, a reação não ocorreu, sugerindo que o -OCH₃ adicionado aos epóxidos (\pm)-12 e (\pm)-19 são provenientes do trimetil-*orto*-acetato.

Da mesma forma, a derivatização da 7,8-epoxijasmona (12), obtida a partir da reação com *T. cutaneum* CCT 1903, foi realizada utilizando trimetil-*orto*-acetato e PPTS (Esquema V.12). Os produtos desta reação (18a e 18b) também foram caracterizados por CG-EM, RMN de ¹H e ¹³C, DEPT 90° e 135° (espectros E52 a E56 em anexo) e estão de acordo com os dados obtidos para os compostos provenientes da reação com o epóxido racêmico [(\pm)-12], conforme pode ser visto na parte experimental, item IX.6.5.2.6).



Esquema V.12: Síntese da 7-hidróxi-8-metoxijasmona (18a) e 7-metóxi-8-hidroxijasmona (18b).

Após obter os compostos quirais **18a** e **18b** pela reação de hidroximetoxilação, foi realizada em seguida a esterificação da mistura com o (*S*)-MTPA. Os dados de

¹²¹ Carey, F.A. Organic Chemistry. 4th ed., Boston, Mc Graw-Hill, 2000.

caracterização destes ésteres foram comparados com os resultados de RMN obtidos da reação com os ésteres de (S)-MTPA de (\pm) -18a e (\pm) -18b.

V.3.1.2.2.1. Formação dos ésteres de (S)-MTPA a partir da (\pm) -7-hidróxi-8metoxijasmona [(\pm) -18a] e da 7-hidróxi-8-metoxijasmona (18a) obtida por biocatálise.

A mistura (±)-7-hidróxi-8-metoxijasmona e (±)-7-metóxi-8-hidroxijasmona [(±)-**18a** e (±)-**18b**], na razão 4:1 foi esterificada com o (*S*)-(-)-ácido de Mosher (parte experimental item IX.6.5.2.7, **Esquema V.13**). Os produtos desta reação (±)-**21a** e (±)-**21b** foram analisados por CG-EM (espectros **E57** e **E58** em anexo), RMN de ¹H e ¹³C, DEPT 90° e 135°, ¹H e ¹H gCOSY, ¹H e ¹³C HSQC.



Esquema V.13: Modelos conformacionais para os ésteres do (S)-MTPA dos compostos (±)-21a e (±)-21b.

A análise do espectro de RMN de ¹H (espectro **E59** em anexo) revelou a presença de um multipleto, na região de δ 5,47-5,43 atribuído aos metinos carbinólicos (H-7), indicando que as hidroxilas foram esterificadas com o (*S*)-MTPA. Foi possível observar que os sinais de deslocamentos químicos referentes à mistura de diastereoisômeros (7*S*,2'*S*)-[(±)-21a] e (7*R*, 2'*S*)-[(±)-21b] encontravam-se na razão 1:1, isolando-se apenas os produtos de esterificação do composto principal (±)-18a.

No espectro de RMN de ¹H, os sinais correspondentes ao composto (±)-**21b** mostraram que os hidrogênios em δ 3,40 (C(8)-O<u>CH</u>₃), δ 3,22-3,19 (H-8) e δ 0,91 (H-10) encontravam-se mais protegidos devido ao efeito anisotrópico do grupo fenila do auxiliar quiral (*S*)-MTPA, enquanto que os hidrogênios metilênicos em δ 2,41-2,39 (H-4) e a metila sob dupla em δ 2,01 (H-11) encontravam-se mais desprotegidos quando comparados aos

para o derivado do (S)-MTPA (±)-21a (Tabela V.8).	

mesmos hidrogênios do composto (\pm) -21a. Por outro lado, verificou-se um efeito inverso

Hidrogênio	δ _H		$\Delta \delta^{SR}$
	(±)- 21a	(±)- 21b	
4	2,29	2,41-2,39	-0,11
8	3,29-3,25	3,22-3,19	0,06
10	0,98	0,91	0,07
11	1,79	2,01	-0,22
(C(8)-O <u>CH</u> ₃)	3,44	3,40	0,04

Tabela V.8: Dados parciais de RMN de ¹H para os ésteres (±)-21a e (±)-21b.

Pela análise do espectro de ¹H e ¹H gCOSY (espectro **E60** em anexo) verifica-se para o composto (±)-**21a** um acoplamento a três ligações entre os hidrogênios metínicos em δ 5,47-5,43 (H-7) e δ 3,29-3,25 (H-8), estes encontravam-se acoplados também a três ligações aos hidrogênios metilênicos em δ 1,64-1,53 (H-9), os quais, por sua vez, estavam acoplados aos hidrogênios metílicos em δ 0,98 (H-10). Para o composto (±)-**21b**, observouse um acoplamento a três ligações entre hidrogênios metínicos em δ 5,47-5,43 (H-7) e δ 3,22-3,19 (H-8), estes últimos encontravam-se acoplados aos hidrogênios metilênicos em δ 1,52-1,35 (H-9), os quais também estavam acoplados aos hidrogênios da metila em δ 0,91 (H-10). Além disso, foi observado um acoplamento entre os hidrogênios metínicos em δ 5,47-5,43 (H-7) e os hidrogênios metilênicos em δ 2,62-2,46 (H-6).

O espectro de RMN de ¹³C (espectro **E61** em anexo) revelou trinta e três sinais com diferentes deslocamentos químicos, cujos padrões de hidrogenação foram estabelecidos pela análise dos espectros obtidos pela técnica DEPT 135° e 90° (espectro **E62** em anexo). A atribuição completa dos sinais de deslocamentos químicos de carbonos e hidrogênios dos ésteres de (*S*)-Mosher da (\pm)-7-hidróxi-8-metoxijasmona pode ser visualizada nas **Tabelas V.9** e **V.10**. Tais atribuições foram realizadas a partir das análises complementares do espectro de ¹H e ¹³C HSQC (espectro **E63** em anexo).



C #	δ _C	$\delta_{\rm H}$ (mult, <i>J</i>)	gCOSY
1	210,1		
2	135,4		
3	174,4		
4	34,0	2,29 (t, J 4,5 Hz, 2H)	
5	31,7	2,52-2,44 (m, 2H)	
6	23,3	2,62-2,46 (m, 2H)	5,47-5,43
7	74,1	5,47-5,43 (m, 1H)	3,29-3,25; 2,62-2,46
8	82,4	3,29-3,25 (m, 1H)	5,47-5,43; 1,64-1,53
9	22,2	1,64-1,53 (m, 2H)	3,29-3,25; 0,98
10	9,7	0,98 (t, J 7,5 Hz, 3H)	1,64-1,53
11	17,0	1,79 (s, 3H)	
C(8)-O <u>CH</u> 3	58,7	3,44 (s, 3H)	
1'	166,2		
2'	122,2		
3'	158,5		
C(2')-O <u>CH</u> ₃	55,4	3,51 (s, 3H)	
C(2')-Ph	131,6; 129,7; 128,6; 127,5	7,62-7,34 (m, 5H)	

Tabela V.9: Dados espectroscópicos de RMN de ¹H e de ¹³C para o composto (±)-21a.

Tabela V.10: Dados espectroscópicos de RMN de ¹H e de ¹³C para o composto (±)-21b.

C #	δ _C	$\delta_{\rm H}$ (mult, J)	gCOSY
1	210,1		
2	135,8		
3	174,4		
4	34,1	2,41-2,39 (m, 2H)	
5	31,9	2,52-2,44 (m, 2H)	
6		2,62-2,46 (m, 2H)	5,47-5,43
7	74,3	5,47-5,43 (m, 1H)	3,22-3,19; 2,62-2,46
8	82,2	3,22-3,19 (m, 1H)	5,47-5,43; 1,52-1,35
9	22,0	1,52-1,35 (m, 2H)	3,22-3,19; 0,91
10	9,8	0,91 (t, <i>J</i> 7,5 Hz, 3H)	
11	17,2	2,01 (s, 3H)	
C(8)-O <u>CH</u> ₃	58,0	3,40 (s, 3H)	
1'	169,4		
2'	124,2		
3'	158,3		
C(2')-O <u>CH</u> ₃	55,4	3,51 (s, 3H)	
C(2')-Ph	131,6; 129,7; 128,6; 127,5	7,62-7,34 (m, 5H)	

A mistura 7-hidróxi-8-metoxijasmona e 7-metóxi-8-hidroxijasmona (**18a:18b**, 4:1) também foi esterificada com o (*S*)-(-)-ácido de Mosher na presença de 4-dimetilaminopiridina e dicicloexilcarbodiimida, sob refluxo durante 48h (**Esquema V.14**, parte experimental item IX.6.5.2.8). Os produtos da reação (**21a** e **21b**) foram confirmados através das análises dos espectros de CG-EM (espectros **E64** e **E65** em anexo), RMN de ¹H e ¹³C, DEPT 90° e 135°, ¹H e ¹H gCOSY, ¹H e ¹³C HSQC e gHMBC, espectros **E66** e **E71** em anexo.



Esquema V.14: Modelos conformacionais para os ésteres do (S)-MTPA dos compostos 21a e 21b.

A análise do espectro de RMN de ¹H (espectro **E66** em anexo), da mistura de ésteres (*S*)-MTPA de **21a** e **21b**, mostrou que os sinais de ressonância eram idênticos aqueles obtidos para os racematos (\pm)-**21a** e (\pm)-**21b**, mas presentes na razão 7:1, permitindo assim, a atribuição dos sinais mais intensos ao **21a**. As atribuições dos sinais de deslocamentos químicos de carbonos e hidrogênios para o éster da (*S*)-MTPA **21a** obtido a partir da reação com *T. cutaneum* CCT 1903 encontram-se compilados na **Tabela V.11**.

Ao se comparar os dados espectrais obtidos para os compostos (±)-21a, (±)-21b e 21a, 21b, constatou-se que a configuração preferencial obtida pela ação enzimática do *T. cutaneum* CCT 1903 é aquela representada pelo composto 21a, o qual apresenta configuração (7*S*). Levando em consideração que a abertura esteréo-específica do epóxido 12 (Esquema V.12) ocorreu por um mecanismo do tipo semelhante a S_N2 , pode-se concluir que 18a apresenta configuração absoluta (7*S*) e (8*S*). Sabendo-se que a 7,8-epoxijasmona (12) apresenta configuração relativa *cis* (item V.3.1.2), foi possível determinar a configuração (*R*) para o carbono 8 de 12 (Esquema V.15). Desta forma, a oxidação da dupla ligação da *cis*-jasmona pelas células íntegras do *T. cutaneum* CCT 1903 levou a formação preferencial do composto 12 com a configuração absoluta (7*S*,8*R*).



Esquema V.15: Atribuição da configuração absoluta para os compostos 12 e 18a.

Tabela V.11: Dados espectroscópicos de RMN de ¹H e de ¹³C para o composto 21a.



C#	$\delta_{\rm C}$	$\delta_{\rm H}$ (mult, J)	gCOSY	gHMBC
1	208,6			$2,52-2,42 (J^2); 2,24 (J^3)$
2	135,4			2,52-2,42 (J ³); 1,78 (J ³)
3	173,0			$2,52-2,42 (J^3); 2,24 (J^2); 1,78 (J^2);$
4	34,0	2,24 (t, J 4,5 Hz, 2H)		
5	31,5	2,52-2,42 (m, 2H)		$2,24 (J^2); 1,78 (J^4)$
6	23,3	2,52-2,42 (m, 2H)	5,47-5,43	
7	74,1	5,48-5,44 (m, 1H)	3,29-3,25;	2,52-2,42 (J ²); 1,62-1,52 (J ³)
			2,62-2,46	
8	82,4	3,28-3,24 (m, 1H)	5,47-5,43;	$3,44(J^3);1,62-1,52(J^2);0,99(J^3);$
			1,64-1,53	
9	22,2	1,62-1,52 (m, 2H)	3,29-3,25;	5,48-5,44 (J ³); 3,28-3,24 (J ²); 0,99
			0,98	(J^2)
10	9,7	0,99 (t, J 7,5 Hz, 3H)	1,64-1,53	3,28-3,24 (<i>J</i> ³); 1,62-1,52 (<i>J</i> ²)
11	17,0	1,78 (s, 3H)		
C(8)-OCH ₃	57,7	3,44 (s, 3H)		3,28-3,24 (<i>J</i> ³)
1'	166,1			
2'	122,0			
3'	-			
C(2')-	55,4	3,53 (s, 3H)		
OCH ₃				
C(2')-Ph	132,3;	7,64-7,35 (m, 5H)		$7,64-7,35 (J^2)$
	129,5			
	128,2;			
	127,3			

V.3.1.3. Diidroxilacao da cis-jasmona.

A identificação da 7,8-diidroxijasmona (13) foi confirmada por CG-EM (espectro E19 em anexo) e através da análise do espectro de RMN de ¹H (espectro E72 em anexo), que mostra os multipletos em δ 3,46 e 3,19, atribuídos aos hidrogênios H-7 e H-8, respectivamente. A análise complementar com o espectro de ¹H e ¹H gCOSY (espectro E73 em anexo) mostrou que o hidrogênio em δ 3,19 encontrava-se acoplado a três ligações com os hidrogênios em δ 1,52 (hidrogênios H-8 e H-9, respectivamente), enquanto que o hidrogênio em δ 3,46 (H-7) encontrava-se acoplado também a três ligações aos hidrogênios em δ 2,45-2,41 (H-6). Os deslocamentos químicos dos carbonos C-7 e C-8 foram δ_C 72,6 e 74,1 (espectro E74 e E75 em anexo) e caracterizam dióis, fato confirmado pela análise do espectro de ¹H e ¹³C HETCOR (espectro E76 em anexo). As atribuições dos sinais de carbonos e hidrogênios para o composto 13 estão compilados na Tabela V.12 e no item IX.6.5.3 (parte experimental).

$5 \underbrace{\int_{4-3}^{1} \frac{2}{10} \frac{6}{7-8} \frac{9}{10}}_{11} 10$					
C#	δ _C	$\delta_{\rm H}$ (mult, <i>J</i>)	gCOSY		
1	212,1				
2	137,3				
3	174,4				
4	34,1	2,45-2,41 (2H, m, H-4)			
5	32,1	2,60-2,56 (2H, m, H-5)	2,45-2,41		
6	28,3	2,45-241 (2H, m, H-6)	2,60-2,56; 3,46		
7	72,6	3,46 (1H, m, H-7)	2,45-2,41		
8	74,1	3,19 (1H, m, H-8)	1,52		
9	26,1	1,52 (2H, m, H-9)	0,94; 3,19		
10	10,2	0,94 (3H, t, <i>J</i> 7,5 Hz, H-10)	1,52		
11	17,4	2,09 (3H, s, H-11)			

Tabela V.12: Dados espectroscópicos de RMN de	¹ H e de ¹³ C para a 7,8-diidroxijasmona, (13)
---	--

V.3.1.3.1. Determinação do excesso enantiomérico da 7,8-diidroxijasmona (13).

Inicialmente, a determinação do *e.e.* para o composto **13** foi realizada por CG-FID, utilizando uma coluna capilar de sílica fundida com fase estacionária quiral Chirasil-βciclodextrina. No entanto, esta fase estacionária forneceu um cromatograma onde não foi observada a resolução dos estereoisômeros do composto **13**. Os compostos de alta polaridade, tais como **13**, eluidos em cromatografía gasosa geralmente sofrem adsorção na coluna ou decomposição (na coluna ou no injetor), dificultando a obtenção de dados, entretanto esta limitação pode ser contornada através de derivatização.¹²²

A otimização da derivatização e das condições analíticas foram realizadas com o racemato (±)-22, obtido por via química (Esquema V.16, itens IX.6.5.2.1, IX.6.5.3.1 e IX.6.5.3.2 – parte experimental).^{123,124} O diol (±)-13 foi derivatizado com anidrido acético, levando à formação de um composto menos polar, (±)-22, o qual foi caracterizado por RMN de ¹H e ¹³C.



Esquema V.16: Acetilação da (±)-7,8-diidroxijasmona (13). Reagentes e condições: *i*) AMCPB, CH₂Cl₂, 0°C, 75%, *ii*) H₂SO₄, 1,4-dioxano, H₂O, *iii*) Anidrido acético, piridina, DMAP, 89%.

As atribuições dos sinais de deslocamentos químicos dos carbonos e hidrogênios de (\pm) -22 podem ser visualizadas na **Tabela V.13**. A análise do espectro de RMN de ¹H (espectro E77 em anexo) do composto (\pm) -22 mostrou dois singletos em δ 2,08 e 2,02, atribuídos às metilas da porção -OCO<u>CH</u>₃, e dois multipletos em δ 5,14 (H-7) e δ 4,87 (H-8). Além disso, a análise do espectro de ¹³C (espectro E78 em anexo) revelou a presença de dois sinais em δ 170,6 e 170,2, atribuídos às carbonilas -O<u>C</u>OCH₃.

¹²² Lanças, F. M. Cromatografia em fase gasosa. São Carlos, Acta, 1993.

¹²³ Lin, B.; Whalen, D.L. *J. Org. Chem.* **1994**, *59*, 1638-1641.

¹²⁴ Cook, A. F.; Maichuk, D.T. J. Org. Chem. 1970, 35, 1940-1943.

$\begin{array}{c} O \\ 0 \\ 0 \\ 0 \\ 0 \\ 0 \\ 0 \\ 0 \\ 0 \\ 0 \\$						
C#	δ _C	δ_{H} (mult, J)				
1	208,6					
2	135,8					
3	172,2					
4	34,0	2,44-2,33 (4H, m, H-4)				
5	31,7	2,52-2,46 (2H, m, H-5)				
6	24,6	2,44-2,33 (4H, m, H-6)				
7	71,8	5,14 (1H, m, H-7)				
8	74,8	4,87 (1H, m, H-8)				
9	23,7	1,61 (2H, m, H-9)				
10	9,5	0,89 (3H, t, J 7,5 Hz, H-10)				
11	17,3	2,12 (3H, s, H-11)				
-OCH ₃	20,9	2,08 (3H, s, -OCH ₃)				
-OCH ₃	20,7	2,02 (3H, s, -OCH ₃)				
-O <u>C</u> OCH ₃	170,6					
-O <u>C</u> OCH ₃	170,2					

Tabela V.13: Dados espectroscópicos de RMN de ¹H e de ¹³C para o éster da (±)-7,8diidroxijasmona [(±)-22].

A determinação do excesso enantiomérico de **13** não foi possível através do derivado (±)-**22**. Inúmeras tentativas visando otimizar as condições cromatográficas foram realizadas, conforme já descrita no item V.3.1.2.1. O melhor resultado, porém não satisfatório, foi obtido utilizando a coluna capilar com a fase quiral Chirasil- β -ciclodextrina (**Figura V.11**). Decidiu-se, então, realizar uma nova derivatização de (±)-**13**.



Figura V.11: Cromatograma obtido por CG-FID quiral do composto (±)-22. Coluna: Chirasil-βciclodextrina. Condições:70°C - 180°C a 2°C.min⁻¹, T_{ini}=200°C e T_{det}=240°C.

O (±)-acetonídeo (±)-23 foi obtido a partir de (±)-13, conforme descrito por Solladié e colaboradores,¹²⁵ na tentativa de resolver os estereoisômeros (Esquema V.17, parte experimental, item IX.6.5.3.3). O composto (±)-23 foi caracterizado por CG-EM, RMN de ¹H e ¹³C, DEPT 90° e 135°.



A análise do cromatograma de íons totais (CG-EM) de (±)-23 mostraram dois picos, um em 10,3 min e outro 10,8 min cujos espectros de massas apresentaram sinais de m/z 238 (4%) e de m/z 224 (6%), referentes aos íons moleculares dos diastereoisômeros majoritário (10,27 min) e minoritário (10,79 min), respectivamente (espectros **E79** e **E80** em anexo). No espectro de RMN de ¹H (espectros **E81** em anexo) foram observados dois singletos em δ 1,35 e 1,34, atribuídos às duas metilas geminais. O espectro de RMN de ¹³C (espectro **E82** em anexo) revelou a presença de quatorze sinais com diferentes deslocamentos químicos, os quais foram classificados em CH₃, CH₂, CH e C₀ a partir da análise dos

¹²⁵ Solladie, G.; Gressot, L.; Colobert, F.O. Eur. J. Org. Chem. 2000, 2, 357-364.
espectros obtidos pela técnica DEPT 135° e 90° (espectros **E83** em anexo), sendo que o carbono em δ 107,9 foi atribuído ao C1' quaternário e os sinais em δ 27,3 e 27,1 foram atribuídos às metilas geminais. As atribuições dos deslocamentos químicos dos sinais de carbonos e hidrogênios do (±)-acetonídeo (±)-23 estão sumariados na **Tabela V.13** e no item IX.6.5.3.3 (parte experimental).

$5 \underbrace{\bigvee_{4=3}^{1}}_{11} \underbrace{\bigvee_{1}^{6}}_{11} \underbrace{\bigvee_{1}^{7}}_{11} \underbrace{\bigvee_{1}^{9}}_{10} \underbrace{10}$			
C #	δ _C	δ _H (mult, J)	
1	-		
2	136,6		
3	171,1		
4	31,8	2,47-2,37 (4H, m, H-4)	
5	34,2	2,54-2,51 (2H, m, H-5)	
6	26,8	2,47-2,37 (4H, m, H-6)	
7	79,0	3,74 (1H, m, H-7),	
8	81,9	3,57 (1H, m, H-8),	
9	25,7	1,52 (2H, m, H-9),	
10	10,2	0,99 (3H, t, <i>J</i> 7,3 Hz, H-10)	
11	17,8	2,05 (3H, s, H-11)	
C-1′	107,9		
(<u>CH</u> ₃) ₂ -C1′),	27,3; 27,1	1,34 e 1,35 (6H, d, <i>J</i> 3 Hz, (CH ₃) ₂ -C1')	

Tabela V.14: Dados espectroscópicos de RMN de ¹H e de ¹³C para o (±)-acetonídeo (±)-23.

A otimização das condições cromatográficas resultou na seleção da coluna capilar quiral Chirasil- β -ciclodextrina (**Figura V.12a**) para a discriminação diastereoisomérica e enantiomérica dos estereoisômeros de (±)-23.



Figura V.12: Cromatogramas obtidos por CG-FID quiral do: a) acetonídeo (±)-23 e b) acetonídeo 23 obtido por biocatálise. Coluna: Chirasil-β-ciclodextrina. Condições: 70°C - 180°C a 3°C.min⁻¹, T_{inj}=220°C e T_{det}=250°C, P=15 psi.

A estereoquímica relativa dos isômeros majoritários de (±)-23 foi determinada a partir da análise do espectro de RMN de ¹³C (espectro E82 em anexo). Verificou-se que as metilas geminais do acetonídeo apresentavam deslocamentos químicos aproximadamente iguais ($\delta_C 27,3 \ e \ \delta_C 27,1$). Estes dados estão de acordo com o estudo de Rychnovsky e colaboradores,¹²⁶ onde foi observado que acetonídeos *trans* originados de dióis-1,2-*syn* e dióis-1,3-*anti* apresentam deslocamentos químicos iguais para os carbonos das metilas geminais. Enquanto que, os acetonídeos *cis* provindos de dióis-1,2-*anti* e dióis-1,3-*syn* apresentam deslocamentos químicos para os carbonos das metilas geminais (Figura V.13). Com base nestes estudos, foi possível concluir que o diastereoisômero majoritário de (±)-23 possui isomeria *trans*.



rigura v.15: Desiocamentos químicos de Rivilo de C para as methas geminais dos acetonideos *cis trans.*

¹²⁶ Rychnovsky, S.D.; Rogers, B.N.; Richardson, T.I. Acc. Chem. Res. 1998, 31, 9-17.

Estabelecidas as condições de análise para o racemato (\pm)-23, procedeu-se a derivatização da 7,8-diidroxijasmona (13) obtida a partir da reação com *T. cutaneum* CCT 1903 (parte experimental – item IX.6.5.3.4). O produto da reação (23) foi confirmado por CG-EM (espectros **E84** e **E85** em anexo), o qual apresentou exatamente o mesmo padrão de fragmentação encontrado para o composto (\pm)-23. Desta forma o acetonídeo resultante 23 foi analisado por CG-FID, utilizando as condições de análises pré-estabelecidas para o composto (\pm)-23 (**Figura V.12b**). Foi possível verificar um excesso enantiomérico de apenas 53%. O baixo *e.e.* do diol 13 quando comparado ao do epóxido 12 (92% *e.e.*) foi atribuído em parte à abertura espontânea do oxirano observada em um experimento em paralelo, onde o epóxido 12, em solução tamponada (Na₂HPO₄, KH₂PO₄, pH, 6,5) sofreu uma abertura parcial.

V.3.2. Determinação do perfil de seletividade de diferentes substratos contendo duplas ligações olefínicas.

Os resultados discutidos anteriormente incentivaram uma investigação mais ampla da seletividade do *T. cutaneum* CCT 1903 frente à diferentes olefinas.

A seletividade ou a especificidade sobre os substratos é um parâmetro importante que determina se uma enzima terá ou não utilidade sintética, pois os biocatalisadores que são capazes de aceitar vários substratos levando a formação de produtos enantiopuros são de grande interesse em sínteses orgânicas.¹²⁷

A especifidade enzimática da alceno monooxigenase de *Trichosporum* foi verificada através da seleção de olefinas alifáticas acíclicas, alicíclicas e aromáticas: 6-metil-5-hepten-2-ona [24], (*R*)-(-)-carvona [25], α - e β -iononas [26 e 27], linalool [28], β -citronelol [29], geraniol [30], α -bisabolol [31], (*R*)-(+)-limoneno [32], 1-isopropenil-2,5-dimetóxi-4metilbenzeno [33], valenceno [34], α - e β -pinenos [35 e 36] e jinkoh-eremol [37]. Os substratos foram obtidos comercialmente, com exceção de 33 e 37, os quais foram isolados de plantas aromáticas brasileiras.¹²⁸

¹²⁷ Koeller, K.M.; Wong, C-H. Nature 2001, 409, 232-240.

¹²⁸ de Souza, E.M.R. *Estudo de Fragrâncias Amadeiradas da Amazônia*, Dissertação de Mestrado, IQ-Unicamp, **2005**.

As reações de biotransformação dos substratos **24-37** foram divididas em 4 grupos, como ilustrado nas **Figuras V.14** a **V.17**. As reações foram monitoradas por CG-EM nos intervalos de 24, 48, 72 e 96h e os resultados encontram-se sumariados na **Tabela V.15**, página 86.



Figura V.14: Cromatograma de íons totais (CG-EM) da 6-metil-5-hepten-2-ona (24), (*R*)-(-)-carvona (25), α- e β-iononas (26 e 27). Coluna: HP-5MS - Crosslinked 5% fenilmetilsiloxano. Condições: 50°C a 290°C, 15 °C.min⁻¹, T_{inj}=200°C, fluxo=1mL.min⁻¹, split 50.



Figura V.15: Cromatograma de íons totais (CG-EM) do linalool (28), β-citronelol (29), geraniol (30) e α-bisabolol (31). Coluna: HP-5MS - Crosslinked 5% fenilmetisiloxano. Condições: 50°C a 290°C, 15 °C.min⁻¹, T_{inj},=200°C, fluxo=1mL.min⁻¹, split 50.



Figura V.16: Cromatograma de íons totais (CG-EM) do (*R*)-(+)-limoneno (32), 1-isopropenil-2,5dimetóxi-4-metilbenzeno (33) e valenceno (34). Coluna: HP-5MS - Crosslinked 5% fenilmetilsiloxano. Condições: 50°C a 290°C, 15 °C.min⁻¹, T_{inj}=200°C, fluxo=1mL.min⁻¹, split 50.



Figura V.17: Cromatograma de íons totais (CG-EM) do α- e β-pinenos (35 e 36) e jinkoh-eremol (37). Coluna: HP-5MS - Crosslinked 5% fenilmetilsiloxano. Condições: 50°C a 290°C a 15 °C.min⁻¹, T_{inj}.=200°C, fluxo=1mL/.min⁻¹, split 50.

A análise do grupo 1 mostrou que o *T. cutaneum* CCT 1903 exibiu atividade oxidorredutase, transformando a (*R*)-(-)-carvona (**25**) após 24h de reação. Pela análise do espectro **E86** em anexo, foi possível sugerir a redução do sistema carbonílico α , β insaturado do substrato **25**. Além disso, o pico em 7,6 min com íon molecular de *m/z* 194 é consistente com a redução da α - ou β -ionona (**26** e/ou **27**), conforme pode ser observado no espectro **E87** em anexo. Após 96h foi observada reação de oxidação da α - ou β -ionona, o espectro de massas do sinal em 8,8 min mostrou um íon molecular de *m/z* 208 (espectro **E88** em anexo), correspondente à inserção de um átomo de oxigênio na α - ou β -ionona.

	Substrato	Tempo (h)	Reação enzimática
Grupo 1	6-metil-5-hepten-2-ona (24)	96	-
	(<i>R</i>)-(-)-carvona (<i>m</i> / <i>z</i> 150) (25)	24	Redução (<i>m/z</i> 154)
	25	48	Oxidação (<i>m/z</i> 168)
	α- e β-iononas (m/z 192) (26 e 27)	24	Redução (m/z 194)
	26 e 27	96	Oxidação (mz 208)
Grupo 2	linalool (28)	96	ND
	β -citronelol (29)	96	-
	geraniol (30)	96	-
	α -bisabolol (31)	96	ND
Grupo 3	(<i>R</i>)-(+)-limoneno (<i>m</i> / <i>z</i> 136) (32)	18	Oxidação (m/z 152)
	1-isopropenil-2,5-dimetóxi-4-	96	ND
	metilbenzeno (33)		
	valenceno (34)	96	ND
Grupo 4	α - e β -pinenos (35 e 36)	96	-
	jinkoh-eremol (37)	96	ND

 Tabela V.15: Determinação da seletividade do T. cutaneum CCT 1903 frente a diferentes substratos contendo ligações duplas olefínicas.

(-) = substratos não detectados durante as análises

ND = substratos não degradados pelo microrganismo

Após 96h de reação, linalool (28), α -bisabolol (31), 1-isopropenil-2,5-dimetóxi-4metilbenzeno (33), valenceno (34) e jinkoh-eremol (37) não foram degradados, nem consumidos pelo microrganismo. E os substratos: 6-metil-5-hepten-2-ona (24), citronelol (29), geraniol (30), (*R*)-(+)-limoneno (33) e α - e β -pinenos (35 e 36) não foram detectados durante as análises, e também nenhum produto de biotransformação foi observado.

Uma análise posterior das biotransformações das misturas 6-metil-5-hepten-2-ona (24) com (R)-(-)-carvona (25), e (R)-(+)-limoneno (32) com 1-octeno (38) foi realizada de maneira análoga à descrita anteriormente.

A avaliação da atividade enzimática do *T. cutaneum* CCT 1903 com os substratos **24** e **25** mostrou que a (*R*)-(-)-carvona foi reduzida e oxidada após 48h. O cromatograma de íons totais mostrou um pico em 9,3 min cujo íon molecular de m/z 168 (espectro **E89** em

anexo) foi atribuido à redução da (R)-(-)-carvona, seguida da adição de um átomo de oxigênio. De maneira análoga ao experimento anterior com vários substratos, o composto **24** não foi detectado durante as análises e também não foi observado nenhum produto de biotransformação.

Para 32 e 38, verificou-se que após 18h de reação biocatalítica, foi observado um pico de m/z 152 (espectro **E90** em anexo), indicando a inserção de um átomo de oxigênio no (*R*)-(+)-limoneno (m/z 136). Por outro lado, o substrato 38 não foi detectado durante as análises.

Além destes substratos foram avaliados o ácido oleico (**39**), e o sulfinato de alquila (**40**), os quais foram analisados de acordo com o protocolo das reações de biotransformações tradicionais (meio reacional 50 mL, substrato 0,4 mg.mL⁻¹, 150 rpm), **Figura V.18**.



Figura V.18: Ácido oleico (39) e sulfinato de alquila (40).

As análises dos cromatogramas mostraram que até 96h de reação, ambos os substratos (**39** e **40**) não foram degradados, nem consumidos pelo microrganismo.

V.3.3. Conclusões.

O sistema enzimático da levedura T. cutaneum CCT 1903 promoveu uma hidroxilação e epoxidação da cis-jasmona provavelmente através de uma monooxigenase dependente de citocromo P-450⁴⁹ e não do tipo dependente de flavina.⁵⁰

A hidroxilação da cis-jasmona foi realizada com e.e. de 86% e a configuração absoluta (4S) foi determinada utilizando os ácidos de Mosher.

A epoxidação da cis-jasmona foi régio- e enantiosseletiva, e o produto obtido apresentou e.e. de 92%. Trata-se do primeiro relato de epoxidação microbiana da cisjasmona.129

Para a determinação da configuração absoluta foi desenvolvido um método indireto, no qual reagiu-se a epoxijasmona 12 com trimetil-orto-acetato e PPTS, o que levou a abertura regiosseletiva de 12 permitindo a determinação da configuração absoluta através da utilização do reagente de Mosher.¹³⁰

As células íntegras de T. cutaneum CCT 1903 apresentaram também uma excelente atividade oxidativa sobre os monoterpenos: (R)-(-)-carvona (25), α - e β -iononas (26 e 27) e (*R*)-(+)-limoneno (**32**).

 ¹²⁹ Pinheiro, L.; Marsaioli, A.J. Submetido para *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 2006.
 ¹³⁰ Pinheiro, L.; Marsaioli, A. J. Manuscrito em preparação.

Capítulo VI

Biotransformações Oxidativas Aplicadas a Terpenos e Compostos de Fragrâncias

Biotransformações Oxidativas Aplicadas a Terpenos e Compostos de Fragrâncias

Os terpenos correspondem a maior família de produtos naturais, sendo que foram identificados até o momento cerca de 30000 monoterpenos naturais diferentes.¹³¹ Notavelmente, muito pouco é conhecido sobre o metabolismo destes compostos, especialmente com relação às enzimas envolvidas no mecanismo de degradação.

Sendo assim, este capítulo tem como objetivos realizar o isolamento e a identificação dos produtos obtidos pela ação enzimática oxidativa das células íntegras do T. cutaneum CCT 1903 sobre a: (R)-(-)-carvona (25), α - e β -iononas (26 e 27) e (R)-(+)limoneno (32) observadas pelo método de triagem de multibiorreações (item V.3.2), e como consequência obter informações a respeito da(s) enzima(s) envolvida(s) na biotransformação destes monoterpenos.

VI.1. Biossíntese e Biotransformação de Terpenos.

Os terpenos são compostos formados por unidades de isopreno (Esquema VI.1).¹³² Na natureza, estas unidades são provenientes de derivados do acetato, tendo como intermediário uma molécula de difosfato de isopentenila (isopreno ativo). O nome terpeno deriva do fato de que os primeiros membros desta classe foram isolados da terebentina (em alemão "terpentin") em 1850. Os compostos que apresentam duas unidades de isopreno são denominados monoterpenos. Os monoterpenos são considerados a unidade base, da qual a nomenclatura subseqüente é derivada. Todos os terpenos são derivados de fusões repetidas, formadas por unidades ramificadas de cinco carbonos, baseados no esqueleto do isopentano. Estes monômeros são geralmente denominados de isoprenos pelo fato de que a decomposição térmica de muitos terpenos produzirem o gás isopreno.

¹³¹ Trytek, M.; Fiedurek, J. *Biotechnol. Lett.* 2005, *27*, 149-153.
¹³² Buchanan, B.; Gruissem, W.; Jones, R. In: Croteua, R.; Kutchan, T. M.; Lewis, N. G. *Biochemistry &* Molecular Biology of Plants, p. 1250-1317, 2000.



Esquema VI.1: Biossíntese de terpenos e unidade de isopreno (no canto inferior esquerdo).

Os monoterpenos podem ser divididos em três subgrupos principais: monoterpenos lineares, monocíclicos e bicíclicos.¹³² Os terpenos biotransformados pelas células íntegras de *T. cutaneum* CCT 1903 [(*R*)-(-)-carvona (**25**), α - e β -iononas (**26** e **27**) e (*R*)-(+)-limoneno (**32**)] são classificados como monoterpenos monocíclicos.

O interesse comercial por esta classe tem aumentado em função do maior entendimento na sua utilização para a prevenção e terapia de diversas doenças, além de sua atividade como inseticida natural e agente anti-microbiano. Estas propriedades podem ser úteis na agricultura, e ainda como blocos de construções para as sínteses de vários compostos valiosos.

A biotransformação de terpenos também é interessante na produção de substâncias flavorizantes e compostos de fragrâncias enantiomericamente puros, os quais podem ser produzidos sob condições reacionais brandas. A quiralidade destes compostos é importante porque a percepção do odor, do sabor e aroma dependem da configuração absoluta dos isômeros.¹³³ Isômeros diferentes do mesmo composto podem apresentar odores bastante distintos, como por exemplo, os sumariados na **Tabela VI.1**.

Monoterpeno	Enantiômero	Fragrância
Carvona	(<i>R</i>)-(-)	Hortelã
	(<i>S</i>)-(+)	Alcaravia
Limoneno	(R)-(+)	Laranja
	<i>(S)</i> -(-)	Terebentina
α-pineno	(1R,5R)-(+)	Hortelã (suave)
-	(1 <i>S</i> ,5 <i>S</i>)-(-)	Pinheiro

Tabela VI.1: Propriedades de odores de alguns monoterpenos.

¹³³ Brenna, E.; Fuganti, C.; Serra, S. Tetrahedron: Asymmetry 2003, 14, 1-42.

A baixa solubilidade em meio aquoso (R)-(+)-limoneno, 0,15 mmol.L⁻¹, (S)-(+)carvona, 8,8 mmol.L⁻¹), a alta volatilidade dos substratos e a toxicidade dos terpenos para os microrganismos constituem obstáculos para o desenvolvimento de sistemas efetivos de biotransformações.¹³⁴

Assim como para a maioria dos compostos químicos, as reações de biotransformações dos terpenos são realizadas em meio aquoso, utilizando como reatores, frascos em agitação. No entanto, devido a insolubilidade destes compostos, meios alternativos e não-convencionais (solventes orgânicos, líquidos iônicos e fluidos supercríticos) são aplicados com sucesso em biotransformações.¹³⁵

Quase dois terços dos trabalhos publicados nos últimos 10 anos, relativos à produção e/ou biotransformação de terpenos, utilizam bactérias ou fungos como biocatalisadores (Figura VI.1), sendo que apenas 7% dos estudos utilizam enzimas isoladas.¹³⁴



Figura VI.1: Tipos de biocatalisadores utilizados para produção de terpenos no período entre 2006-1996.

Exemplos de células íntegras de microrganismos capazes de realizar a biotranformação de terpenos são: a) fungos: *Aspergillus niger, Gongronella butleri, Glomerella cingulata, Diplogelasinospora grovesii, Mucor plumbeus, Penicillium caseifulvum, Pleutorus sapidus, Bovista sp., Wolfiporia cocos, Mycena pura;* b) bactérias:

¹³⁴ de Carvalho, C.C.C.R.; da Fonseca, M.M.R. *Biotechnol. Adv.* 2006, 24, 134-142.

¹³⁵ ^[a] Lee, M.Y.; Dordick, J.S. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2002**, *13*, 376-384. ^[b] Pfruender, H.; Amidjojo, M.; Kraugl, U.; Weuster-Botz, D. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 4529-4531. ^[c] Ikushima Y. *Adv. Colloid. Interface Sci.* **1997**, *71-72*, 259-280.

Pseudomonas rhodesiae, P. putida, P. sp. PIN, Alcaligenes defragans, Rhodococcus erythropolis, R. opacus, Escherichia. coli, Xanthobacter sp. C20; c) leveduras: Schizosaccharomyces octosporus, Kluyveromyces lactis, Pichia quercuum, P. heedii.¹³⁶

Em seguida, as análises dos monoterpenos monocíclicos [(R)-(-)-carvona (**25**), α - e β -iononas (**26** e **27**) e (R)-(+)-limoneno (**32**)] foram realizadas de acordo com o protocolo das reações de biotransformação convencionais utilizando células íntegras de levedura.

VI.2. Resultados e Discussão.

VI.2.1. Biooxidações da (R)-(-)-carvona.

As reações realizadas para a conversão da (*R*)-(-)-carvona (**25**) utilizando células íntegras de *T. cutaneum* CCT 1903 foram monitoradas por CG-EM após 2, 24, 48, 72 e 96h. As análises mostraram que o tempo ótimo para esta reação foi de 48h, com conversão do substrato de 100% e significativa abundância relativa do composto de *m/z* 168, referente à redução do sistema carbonílico α , β -insaturado e incorporação de um átomo de oxigênio na (*R*)-(-)-carvona (espectro **E89** em anexo).

A reação de biotransformação da (R)-(-)-carvona foi repetida em uma batelada de 17 experimentos (item IX.6.6 – experimental), e permitiu o isolamento de quatro compostos (**Esquema VI.2**): (1*S*,2*R*,4*R*)-neoisodiidrocarveol, (41), (6*R*)-isoprenil-(3*R*)-metil-2-oxooxepanona, (42), ácido-(3*R*)-isopropenil-6-oxo-heptanóico, (43) e 2,3-epóxi-(5*R*)isopropenil-2-metilcicloexenol (44).

 ¹³⁶ ^[a] Carballeira, J.D.; Valmaseda, M.; Alvarez, E.; Gago, J.V.S. *Enzyme Microb. Technol.* 2004, *34*, 611-623. ^[b] Carter, O.A.; Peters, R.J.; Croteau, R. *Phytochemistry* 2003, *64*, 425-433. ^[c] de Carvalho, C.C.C.R.; da Fonseca, M.M.R. *Tetrahedron: Asymmetry* 2003, *14*, 3825-3931. ^[d] Chen, A.R.M.; Reese, P.B. *Phytochemistry* 2002, *59*, 57-62. ^[e] Larsen, T.O. *Int. Dairy J.* 1998, *8*, 883-887. ^[f] Duetz, W.A; Fjallman, A.H.M.; Ren, S.Y.; Jourdat, C.; Withold, B. *Appl. Environ. Microbiol.* 2001, *67*, 2829-2832. ^[g] Fischer, G.; Schwalbe, R.; Möller, M.; Ostrowski, R.; Dott, W. *Chemosphere* 1999, *39*, 795-810. ^[h] Fontanille, P.; Lê Flèche, A.; Larroche, C. *Biocatal. Biotransform.* 2002, *20*, 413-421. ^[i] Fraga, B.M.; Hernández, M.G.; González, P.; López, M.; Suárez, S. *Tetrahedron* 2001, *57*, 761-770. ^[i] Heyen, U.; Harder, J. *FEMS Microbiol. Lett.* 1998, *169*, 67-71. ^[I] Miyazawa, M.; Nankai, H.; Kameoka, H. *Phytochemistry* 1995, *40*, 1133-1137. ^[m] Oda, S.; Ohta, H. *J. Ferment. Bioeng.* 1997, *8*, 423-428. ^[n] Onken, J.; Berger, R.G. *J. Biotechnol.* 1999, *69*, 163-168. ^[o] Rasser, F.; Ankea, T.; Stemerb, O. *Tetrahedron* 2002, *58*, 7785-7789. ^[p] van der Werf, M.J.; Keijzer, P.M.; van der Schaft, P.H. *J. Biotechnol.* 2000, 84, 133-143. ^[q] van Keulen, F.; Correia, C.N.; da Fonseca, M.M.R. *J. Mol. Catal. B-Enzym.* 1998, *5*, 295-299. ^[r] Verstegen-Haaksma, A.A.; Swarts, H.J. Jansen, B.J.M.; de Groot, A.; Bottema-MacGillavry, N.; Withold, B. *Ind. Crops. Prod.* 1995, *4*, 15-21. ^[s] Yoo, S.K.; Day, D.F. *Process Biochem.* 2002, *37*, 739-745. ^[t] Krings, U.; Abraham, B.; Berger, R.G. *Perf. Flavor* 1995, *20*, 79-86.



Esquema VI.2: Produtos obtidos a partir da biotransformação da (*R*)-(-)-carvona (25): (1*S*,2*R*,4*R*)neoisodiidrocarveol (41, 3,8%), (6*R*)-isoprenil-(3*R*)-metil-2-oxo-oxepanona (42, 31%), ácido-(3*R*)isopropenil-6-oxo-heptanóico (43, 5%) e 2,3-epóxi-(5*R*)-isopropenil-2-metilcicloexenol (44, 2,2%).

VI.2.1.1. Produto de biorredução da (*R*)-(-)-carvona: (1*S*,2*R*,4*R*)-neoisodiidrocarveol (41).

A redução do sistema carbonílico da (*R*)-(-)-carvona (**25**) resultou na formação do (1*S*,2*R*,4*R*)-neoisodiidrocarveol (**41**), constatado pela análise dos espectros de CG-EM, RMN de ¹H e ¹³C, DEPT 90° e 135° (espectros **E86, E91-E93** em anexo). As **enoatos redutases** são responsáveis pela redução de ligações duplas α , β -insaturadas, elas são dependentes de cofatores (NADH) e quando isoladas são extremamente sensíveis a traços de oxigênio. Foi comprovado através de cetonas α , β -insaturadas deuteradas que a adição de hidrogênio na ligação C=C ocorre com estereoquímica *anti*.¹³⁷ No entanto, a adição *syn*, embora pouco usual, também pode ocorrer.¹³

As **desidrogenases** realizam a redução estereosseletiva de cetonas nas células (**Figura I.12**, página 16). Durante o curso da biorredução, a enzima pode transferir estereosseletivamente o íon hidreto pela face *Si* ou pela face *Re* da cetona para formar álcoois enantiomericamente puros. Em muitos casos, o curso estereoquímico desta transferência de hidreto, depende das interações supramoleculares entre o substrato e a enzima. Prelog¹³⁸ sugeriu um modelo, conhecido como "regra de Prelog" no qual o hidreto ataca pela face *Re* da cetona pró-quiral. É importante ressaltar que neste modelo, os grupos mais volumosos coincidem com os grupos de maior preferência na regra de Cahn-Ingold-Prelog para a configuração absoluta de centros estereogênicos. Na **Figura VI.2**, o plano do papel representa o sítio ativo da enzima e a molécula está acomodada para melhor abrigar os substituintes, e neste complexo enzima-substrato, o hidreto do NADH será transferido

¹³⁷ Dauphin, G.; Gourcy, J-G.; Veschambre, H. Tetrahedron: Asymmetry 1992, 3, 595-598.

¹³⁸ Prelog V. Pure Applied. Chem. 1964, 9, 119-127.

para a face *Re*, produzindo um álcool com configuração (*S*). Esta regra tem como suporte o fato de que muito álcoois produzidos por biorreduções possuem configuração (*S*).



Figura VI.2: Regra de Prelog para a redução assimétrica de cetonas.

Possivelmente, a ação conjunta de enzimas do tipo enoato redutases e desidrogenases levaram a síntese do (1S,2R,4R)-neoisodiidrocarveol (41). A atribuição completa dos sinais de deslocamentos químicos de carbonos e hidrogênios para o composto 41 encontra-se compilada na Tabela VI.2 e na parte experimental, item IX.6.7.1.

A configuração absoluta foi determinada tendo como referência o centro (*R*) em C-4 e por comparação da rotação óptica com o valor descrito na literatura.^{139,140} A rotação óptica experimental para o composto **41** foi $[\alpha]^{23}{}_{\rm D} = -13,6$ (0,1, EtOH), enquanto que a rotação óptica descrita na literatura¹³⁹ foi $[\alpha]^{25}{}_{\rm D} = -20$ (0,2, EtOH). Sugere-se que ocorreu uma adição estereosseletiva de hidrogênio na face *Re* do C-1 (dupla ligação C-C), resultando na síntese da (1*S*,4*R*)-diidrocarvona (**45**) e, consecutivamente, um ataque do hidreto na face *Si* do C-2 (grupo carbonila), **Esquema VI.3**.



Esquema VI.3: Redução do sistema carbonílico α, β-insaturado da (*R*)-(-)-carvona (25) por ataque estereosseletivo do hidrogênio, utilizando células íntegras de *T. cutaneum* CCT 1903.

¹³⁹ Hirata, T.; Hamada, H.; Aoki, T.; Suga, T. *Phytochemistry* **1982**, *21*, 2209-2212.

¹⁴⁰Kim, G-S.; Park, S-H.; Chang, Y-J; Lim Y-H.; Kim, S-U. *Biotechnol. Lett.* **2002**, *24*, 1553-1556.

$\begin{bmatrix} \overline{1} & 2 \\ 5 & 4 \\ 10 \end{bmatrix} \xrightarrow{10} 9$			
C#	$\delta_{\rm C}$	δ _H (mult, <i>J</i>)	
1	36,0	1,56 (1H, m, H-1)	
2	71,0	3,89 (1H, s _l , H-2)	
3	38,6	1,91 (1H, ddd, <i>J</i> 13,3, 3,3, 3,2 Hz, H-3)	
		1,42 (1H, m, H-3)	
4	37,8	2,27 (1H, ddd, <i>J</i> 12,5, 3,3, 3,2 Hz, H-4)	
5	31,4	1,76 (1H, dddd, J 12,5, 3,5, 3,3, 3,2 Hz, H-5);	
		1,25 (1H, dddd, J 12,5, 12,4, 4,5, 3,2 Hz, H-5)	
6	28,1	1,46 (2H, m, H-6)	
7	21,0	0,97 (3H, d, <i>J</i> 6.0 Hz, H-7)	
8	150,3		
9	108,4	4,70 (2H, s _l , H-9)	
10	18,3	1,72 (3H, s, H-10)	

Tabela VI.2: Dados espectroscópicos de RMN de ¹H e de ¹³C para o (1*S*,2*R*,4*R*)neoisodiidrocarveol (41).

≣7

VI.2.1.2. Produtos de biooxidações da (R)-(-)-carvona: (6R)-isoprenil-(3R)-metil-2oxo-oxepanona (42), ácido-(3R)-isopropenil-6-oxo-heptanóico (43) e 2,3-epóxi-(5R)isopropenil-2-metilcicloexenol (44).

Na biotransformação da (R)-(-)-carvona, as reações de oxidações prevaleceram sobre as reações de reduções, e os seguintes produtos foram identificados: (6R)-isoprenil-(3R)-metil-2-oxo-oxepanona (42), ácido-(3R)-isopropenil-6-oxo-heptanóico (43) e 2,3epóxi-(5R)-isopropenil-2-metilcicloexenol (44), Esquema VI.2.

A formação da (6R)-isoprenil-(3R)-metil-2-oxo-oxepanona (42) ocorreu a partir da redução parcial regiosseletiva da (R)-(-)-carvona, passando por um possível intermediário, a (4R)-diidrocarvona (45), e esta foi possivelmente a etapa inicial da formação do produto de oxidação de Baeyer-Villiger (**Esquema VI.4**).

A Baeyer-Villiger monooxigenase de *T. cutaneum* CCT 1903 converteu a (*R*)-(-)carvona (**25**) em **42**, com excelente rendimento (28,6 mg, 0,170 mmol, 31%), sendo o produto caracterizado por CG-EM, RMN de ¹H e ¹³C, DEPT 90° e 135° (espectros **E89**, **E94-E96** em anexo) e por comparação com dados descritos na literatura.¹⁴¹ A atribuição completa dos sinais de deslocamentos químicos de carbonos e hidrogênios encontra-se descrita na **Tabela VI.3** e na parte experimental, item IX.6.6.2.



Esquema VI.4: Oxidação de Baeyer-Villiger da (*R*)-(-)-carvona (25) com células íntegras de *T. cutaneum* CCT 1903.

Tabela VI.3: Dados espectroscópicos de RMN de ¹H e de ¹³C para (6*R*)-isoprenil-(3*R*)metil-2-oxo-oxepanona (42).

C #	δ _C	$\delta_{\rm H}$ (mult, J)
1	-	
2	182,3	
3	39,3	2,26 (1H, m, H-3)
4	26,6	1,45-1,35 (2H, m, H-4)
5	31,0	1,61 (1H, m, H-5)
		1,45-1,35 (1H, m, H-5)
6	49,8	2,44 (1H, m, H-6)
7	64,0	3,53 (2H, m, H-7)
8	16,7	1,18 (3H, d, <i>J</i> 7.0 Hz, H-8)
9	144,5	
10	114,1	4,94 (1H, m, H-10); 4,83 (1H, m, H-10)
11	18,7	1,67 (3H, s, H-11)

A estereoquímica do C-4 não é alterada durante a biotransformação de 25 para 42, portanto, a configuração absoluta da (R)-(-)-carvona em C-4 torna-se (R)-C-6 em 42. A

¹⁴¹ Alphand, V.; Furstoss, R. Tetrahedron: Asymmetry 1992, 3, 379-382.

configuração em C-3 (R) do composto 42, foi determinada através da configuração conhecida em C-6 (R) e através de um experimento de nOe, onde foi possível observar que a irradiação do hidrogênio em δ 2,44 (H-6) levou a um incremento de nOe em δ 1,18, correspondente aos hidrogênios metílicos em C-8. A adição de hidrogênio a ligação dupla C-C (C-1) em 25 ocorreu de maneira estereosseletiva na face Si, deixando os hidrogênios em δ 1,18 (42) espacialmente próximos ao hidrogênio em δ 2,44 (42).

É interessante notar que, ao contrário das oxidações de Baeyer-Villiger por via química realizadas com perácidos, a ligação dupla exocíclica (C-9 e C-10) não foi oxidada. Também se observa que a regiosseletividade de 42, é oposta ao produto esperado por via química, ou seja, a inserção do átomo de oxigênio ocorreu entre a carbonila e o átomo de carbono menos substituído.

A síntese do ácido-(3R)-isopropenil-6-oxo-heptanóico (43) é baseada no mecanismo de degradação dos monoterpenos alíciclicos descrito por Trudgill¹⁴² e confirmado posteriormente por van der Werf,¹⁴³ o qual descreve a formação da lactona pela ação de uma monooxigenase, como a primeira etapa em direção a abertura do anel. A Baeyer-Villiger monooxigenase utilizada por Trudgill catalisa a inserção de um átomo de oxigênio próximo a um grupo ceto alicíclico, e a lactona formada é hidrolisada por uma lactona hidrolase, ou então, sofre um rearranjo espontâneo para o correspondente oxo-ácido, quando o átomo de oxigênio é inserido entre um grupo ceto e outro hidróxi.

Baseado em Trudgill¹⁴² e van der Werf,¹⁴³ propõe-se que ocorreu uma redução parcial regiosseletiva da dupla ligação em C-1/C-6 da (R)-(-)-carvona (25), formando a diidrocarvona, que após a hidroxilação do C-1 gera a 1-hidróxi-2-oxo-limoneno (46), Esquema VI.5. A hidroxilactona formada 47 é instável e sofre um rearranjo espontâneo produzindo o ácido-(3R)-isopropenil-6-oxo-heptanóico (43). No presente estudo, os intermediários 46 e 47 não foram detectados.

O produto foi caracterizado por CG-EM, RMN de ¹H e ¹³C, DEPT 90° e 135° (espectros E97-E100 em anexo). As atribuições dos deslocamentos químicos de carbonos e

¹⁴² Trudgill, P.W. in The Bacteria. A Treatise on Structure and Function, The Biology of Pseudomonas, Academic Press, Orlando, **1986**. ¹⁴³ van der Werf, M.J. *Biochem. J.* **2000**, *347*, 693-701.

hidrogênios encontram-se compilados na Tabela VI.4 e na parte experimental, item IX.6.6.3.



Esquema VI.5: Mecanismo de degradação da (R)-(-)-carvona (25) e a formação do ácido-(3R)isopropenil-6-oxo-heptanóico (43, 5%), catalisada por células íntegras de *T. cutaneum* CCT 1903.

C#	δ _C	δ _H (mult, <i>J</i>)
1	178,0	-
2	38,7	2,41 (2H, m, H-2)
3	42,8	2,57 (1H, m, H-3)
4	26,2	1,74 (2H, m, H-4)
5	41,1	2,41 (2H, m, H-5)
6	208,6	-
7	30,0	2,13 (3H, s, H-7)
8	145,0	-
9	113,1	4,82 (1H, m, H-9)
		4,77 (1H, m, H-9)
10	18,4	1,66 (3H, d, <i>J</i> 5,1 Hz, H-10)

Tabela VI.4: Dados espectroscópicos de RMN de ¹H e de ¹³C para o ácido-(3*R*)isopropenil-6-oxo-heptanóico (43).

A epoxidação regiosseletiva da (*R*)-(-)-carvona (**25**) levou à formação do 2,3-epóxi-(5*R*)-isopropenil-2-metilcicloexenol (**44**), parte experimental, item IX.6.6.4). Para confirmar a formação deste composto, o produto (\pm)-**44** foi sintetizado por via química (**Esquema VI.6**). Inicialmente, a carbonila de **25** foi reduzida estereosseletivamente com uma solução de hidreto de diisobutilalumínio em hexano (DIBALH 1,0 M, 3,2 mmol), o que resultou na formação do carveol (\pm)-**48**, (parte experimental – item IX.6.6.4.1). O composto (\pm)-**48** foi então epoxidado com o ácido *meta*-cloroperbenzóico (AMCPB) e posteriormente purificado por cromatografia em coluna de sílica gel, fornecendo o produto (\pm) -44 (parte experimental – item IX.6.6.4.2).



Esquema VI.6: Síntese da 2,3-epóxi-(5R)-isopropenil-2-metilcicloexenol [(±)-44].

O composto (±)-44 foi identificado por CG-EM, RMN de ¹H e¹³C, DEPT 90° e 135°, ¹H e ¹H gCOSY (espectros E101-E104 em anexo). Os deslocamentos químicos de carbonos e hidrogênios estão descritos na Tabela VI.5 e as atribuições estão de acordo com os dados descritos na literatura.^{144,145}

C #	δ _C	$\delta_{\rm H}$ (mult, J)	gCOSY
1	72,3	3,85 (1H, s _L , H-2)	
2	60,3	-	
3	62,3	3,16 (1H, d, <i>J</i> 5,1 Hz, H-3)	1,40-1,26;1,45
4	29,2	1,40-1,26 (2H, m, H-4)	3,16
5	40,5	2,04-1,93 (1H, m, H-5)	1,82-1,70; 1,40-1,26
6	34,1	1,82-1,70 (1H, m, H-6)	2,04-1,93
		1,40-1,26 (1H, m, H-6)	2,04-1,93
7	19,3	1,45 (3H, s, H-7)	3,16
8	147,5	-	
9	109,7	4,70 (2H, m, H-9)	1,68
10	20,3	1,68 (3H, s, H-10)	4,70

Tabela VI.5: Dados espectroscópicos de RMN de ¹H e de ¹³C para o 2,3-epóxi-(5*R*)iconvonanil 2 matilaialagyanal [(+)-44]

O composto 44 obtido por biocatálise teve sua estrutura confirmada através da comparação dos respectivos cromatogramas e espectros E101 e E105 em anexo.

 ¹⁴⁴ Kover, B. W.; Jones, J. J. Synth. Commun. 1995, 25, 3907-3921.
 ¹⁴⁵ Matsunaga, Y.; Fujita, K.; Yamada, J.; Ashitani, T.; Sakai, K. Nat. Prod. Research 2003, 17 (6), 441-443.

VI.2.2. Biooxidações das α- e β-iononas (26 e 27).

Muitos trabalhos foram realizados envolvendo a biotransformação das (\pm) - α iononas e (\pm)- β -iononas (**Figura VI.3**). Tang e Suga,¹⁴⁶ por exemplo, relataram a redução da dupla ligação C-C adjacente a carbonila da α - e β -iononas, utilizando células imobilizadas de Nicotiana tabacum (Solanaceae). Por outro lado, produtos de oxidações das α - e β -iononas foram obtidos por Sakamaki e colaboradores,¹⁴⁷ utilizando cultura de células de Caragana chamlagu (Leguminosae). Além disso, Yamasaki e colaboradores¹⁴⁸ verificaram a bioconversão da α-ionona para 3-hidróxi-α-ionona por Aspergillus niger JTS.

A introdução de grupos funcionais nas (\pm) - α - e (\pm) - β -iononas é uma reação importante na química sintética, não apenas pelo fato desses compostos serem importantes na indústria de fragrâncias, mas também porque elas apresentam bioatividade.¹⁴⁹ A βionona, por exemplo, é um sesquiterpeno importante usado na síntese da vitamina A¹⁵⁰ e também como material de partida na síntese do ácido abscísico (49).¹⁵¹



Figura VI.3: α-ionona (26), β-ionona (27) e seu derivado, ácido abscísico (49).

Neste trabalho, as reações realizadas para as conversões das α- e β-iononas, utilizando células íntegras de T. cutaneum CCT 1903, foram monitoradas por CG-EM, retirando alíquotas de 1 mL do meio reacional nos intervalos de 24, 48, 72 e 96h. O cromatograma de íons totais mostrou um pico em 10,87 min e outro em 7,79 min cujos

¹⁴⁶ Tang, Y-X.; Suga, T. Phytochemistry **1994**, 37, 737-740.

¹⁴⁷ Sakamaki, H.; Ito, K.; Chai, W.; Hayashida, Y.; Kitanaka, S.; Horiuchi, A. J. Mol. Catal. B-Enzym. 2004, 27, 177-181. ¹⁴⁸ Yamazaki, Y.; Hayashi, Y.; Arita, M.; Hieda T.; Mikami Y. Appl. Environ. Microbiol. **1988**, *54*, 2354-

^{2360.} ¹⁴⁹ ^[a] Taylor, H. F.; Burden, R.S. *Phytochemistry* **1970**, *9*, 2217-2223. ^[b] Meinwald, J.; Erickson, M.; Hartshorn, M.; Meinwald, Y.C.; Eisner, T. *Tetrahedron Lett.* **1968**, *9*, 2959-2962. ¹⁵⁰ Erickson, R.E. *J. Nat. Products* **1976**, *39*, 8-19.

espectros de massas apresentaram íons moleculares de m/z 208 e de m/z 168, respectivamente. Após 72h de reação biocatalítica, observou-se que a conversão do substrato foi de 90%.

A reação foi repetida em batelada (12 experimentos) nas mesmas condições, conforme escrito na parte experimental (item IX.6.7). Os dois produtos isolados foram identificados como 4-oxo-7,8-diidro- β -ionona (50) e α -homo-ciclogeraniol (51), Esquema VI.7.



A formação da 4-oxo-7,8-diidro- β -ionona (**50**) ocorreu a partir da redução da dupla ligação C-7/C-8 e da adição de um átomo de oxigênio no C-4 da β -ionona.

A análise do espectro de massas (espectro **E88** em anexo) para o composto **50** apresentou um pico referente ao íon molecular de m/z 208 (M^{•+}, 41), que está de acordo com a fórmula molecular C₁₃H₂₀O₂. A inserção de um átomo de oxigênio no C-4 da ionona foi confirmada pela análise do espectro de RMN de ¹H (espectro **E106** em anexo), onde foi observada a presença de duas metilas geminais em δ 1,15 (H-11 e H-12), uma metila sobre a dupla em δ 1,73 (H-13), e uma metila alfa a carbonila, em δ 2,19 (H-10). O espectro de ¹H e ¹H gCOSY (espectros **E107** em anexo) mostrou acoplamentos entre os hidrogênios metilênicos em δ 2,47 (H-7) e 2,59 (H-8), e também foi possível observar que os hidrogênios em δ 1,81 (H-2) encontravam-se acoplados aos hidrogênios em δ 2,47 (H-3). O espectro de RMN de ¹³C revelou a presença de 5 sinais de carbonos quaternários, 4 metilas terciárias e 4 metilenos (espectros **E108** e **E109** em anexo), sendo que os sinais em δ 207,0 e 198,8 foram atribuídos às carbonilas C-4 e C-9, respectivamente. As atribuições dos sinais de carbonos e hidrogênios do composto **50** estão compiladas na **Tabela VI.8** e descritos na parte experimental, item IX.6.7.1. Tais atribuições foram realizadas a partir das

¹⁵¹ ^[a] Cornforth, J.W.; Milborrow, B.V.; Ryback, G. *Nature* **1965**, *206*, 715. ^[b] Roberts, D.L.; Heckman, R.A.; Hege, B.P.; Bellin, S.A. J. Org. Chem. **1968**, 33, 3566-3569.

análises complementares dos espectros de ¹H e ¹³C HETCOR, ¹H e ¹³C gHSQC (espectros **E110** e **E111** em anexo).

Hartman e colaboradores¹⁵² também observaram a formação do composto **50** a partir da β -ionona pelo fungo *Cunninghamella blakesleeana*.

Tabela VI.6: Dados espectroscópicos de RMN de ¹H e de ¹³C para a 4-oxo-7,8-diidro-β-ionona (50).



C#	δ _C	$\delta_{\rm H}$ (mult, J)	gCOSY	gHMBC
1	36,4			$1,15 (J^2), 2,47 (J^3), 1,81(J^2)$
2	37,2	1,81 (t, <i>J</i> 6,9 Hz, 2H)	2,47	$1,15 (J^3)$
3	34,1	2,47 (m, 2H)	1,81	$1,81 (J^2)$
4	198,8			$1,73 (J^3), 1,81 (J^3), 2,47 (J^2)$
5	131,3			$1,73 (J^2), 2,47 (J^3)$
6	163,4			$1,15 (J^3), 1,73 (J^3), 1,81 (J^3), 2,47 (J^2)$
7	24,0	2,47 (m, 2H)	2,59	$2,59 (J^2)$
8	42,2	2,59 (m, 2H)	2,47	$2,47 (J^2), 2,19 (J^3)$
9	207,0			$2,19 (J^2), 2,59 (J^2)$
10	29,8	2,19 (s, 3H)		
11	26,7	1,15 (s, 3H)		1,15 (J ³), 1,81 (J ³)
12	26,7	1,15 (s, 3H)		1,15 (J ³), 1,81 (J ³)
13	11,4	1,73 (s, 3H)		

A análise do espectro de massas (espectro **E112** em anexo) para o composto **51** apresentou um pico referente ao íon molecular de m/z 168 (2%), que está de acordo com a fórmula molecular C₁₁H₂₀O. No espectro de RMN de ¹H (espectro **E113** em anexo) foi observado a presença de duas metilas geminais em δ 0,92 e 0,82 (H-9 e H-10), uma metila

¹⁵² Hartman, D.A.; Pontones, M.E.; Kloss, VC.F.; Curley, R.W.; Robertson, L.W. J. Nat. Prod. **1988**, *51* (5), 947-953.

sobre a dupla em δ 1,71 (H-11), um tripleto em δ 3,69 atribuído aos hidrogênios metilênicos em H-8 e um singleto largo em δ 5,32 atribuído ao hidrogênio metínico (H-4). O espectro de ¹H e ¹H gCOSY (espectro **E114** em anexo) mostrou que os hidrogênios em δ 1,77 e 1,65 (H-7) apresentavam acoplamentos com os hidrogênios em δ 3,69 (H-8) e com o hidrogênio metínico em δ 1,51 (H-6). Já os hidrogênios em δ 2,36 (H-2) e em δ 1,97 (H-3) encontravam-se acoplados entre si, além disso, observou-se que este último estava acoplado aos hidrogênios metilênicos em δ 5,32 (H-4).

O espectro de RMN de ¹³C (espectro **E115** em anexo) revelou a presença de onze sinais com diferentes deslocamentos químicos, cujos padrões de hidrogenação foram estabelecidos pela análise dos espectros obtidos pela técnica DEPT 135° e 90° (espectro **E116** em anexo), sendo que o sinal em δ 63,4 foi atribuído ao carbono carbinólico (C-8). As atribuições dos sinais de carbonos e hidrogênios do composto **51** foram confirmadas pela análise do espectro ¹H e ¹³C HETCOR (espectro **E117** em anexo) e estão compilados na **Tabela VI.7** e na parte experimental, item IX.6.7.2.

A formação do composto **51** envolve a degradação da cadeia lateral da α-ionona, por enzimas do tipo oxigenase.¹⁵³ Um mecanismo para a degradação da α-ionona foi proposto baseado na degradação enzimática de esteróides descrita por Prairie & Talalay,¹⁵⁴ os quais usaram um sistema de enzimas solúveis de *Penicillium lilacinum* em combinação com NADPH e oxigênio molecular.

Sugere-se que enzimas do tipo oxigenase atacam o grupo ceto da α -ionona (26), levando a formação de um intermediário peróxido, o qual sofre um rearranjo para o enol éster 52.¹⁵³ Subseqüentemente, o enol éster 52 é hidrolisado por uma esterase para formar o β -ciclo-homocitral 53 e ácido acético; o aldeído é rapidamente reduzido por uma redutase para o álcool 51 correspondente, (Esquema VI.8, página 105).

¹⁵³ Krasnobajew, V.; Helminger, D. Helv. Chim. Acta 1982, 65 (5), 1590-1601.

¹⁵⁴ Prairie, R.L.; Talalay, P. Biochemistry 1963, 2 (1), 203-208.

(31).			
C#	δ _C	$\delta_{\rm H}$ (mult, J)	gCOSY
1	32,4		
2	31,3	2,36 (t, J 8,0 Hz, 2H)	1,97
3	23,0	1,97 (m, 2H),	5,32 e 2,36
4	120,4	5,32 (s _l , 1H)	1,97 e 1,71
5	136,4		
6	45,9	1,51 (m, 1H)	3,69; 1,77 e 1,65
7	34,4	1,77 e 1,65 (m, 2H,)	3,69 e 1,51
8	63,4	3,69 (t, 7,5 Hz, 2H)	1,77; 1,65 e 1,51
9	27,3	0,89 (s, 3H),	
10	27,2	0,92 (s, 3H)	
11	23,4	1,71 (d, J 2,0 Hz, 3H)	5,32

Tabela VI.7: Dados espectroscópicos de RMN de ¹H e de ¹³C para o α-homo-ciclogeraniol (51).



Esquema VI.8: Mecanismo de ação proposto para a degradação da cadeia lateral da α-ionona (26).

VI.2.3. Biooxidações do (R)-(+)-limoneno.

A oxi-funcionalização régio-específica do limoneno, ou seja, a introdução régioespecífica de hidroxilas ou carbonilas, através de catálise química é difícil de ser realizada, pois as propriedades eletrônicas dos grupos metilênicos alílicos (carbonos 3 e 6) e dos grupos metílicos alílicos (carbonos 7 e 10) são bastante similares (**Esquema VI.9**). Como conseqüência, os métodos de oxidação clássicos levam a uma mistura de produtos, e por esta razão, desde 1960, as oxidações enzimáticas são consideradas atrativas e numerosas transformações microbianas do limoneno são relatadas na literatura.^{105,155}

Inicialmente, a biotransformação do (*R*)-(+)-limoneno (**32**) utilizando células íntegras de *T. cutaneum* CCT 1903 foi realizada através do monitoramento das reações por CG-EM após 24, 48, 72 e 96h (100% conversão). Os cromatogramas de íons totais mostraram dois picos, um em 8,04 min e outro em 8,96 min, cujos espectros de massas apresentaram fragmentos de m/z 152 (M^{•+}-H₂O, 20) e de m/z 152 (M^{•+}-H₂O, 37), respectivamente (espectros **E90** e **E121** em anexo) sugerindo a inserção de um átomo de oxigênio no (*R*)-(+)-limoneno (m/z 136).

A reação foi repetida em batelada (10 experimentos) nas mesmas condições, conforme descrito na parte experimental, item IX.6.8). Os produtos foram isolados e identificados espectroscopicamente (RMN de ¹H e ¹³C e DEPT 90° e 135°, espectros **E118-E120** e **E122-E125** em anexo), como: limoneno-1,2-diol (**54**) e (+)-(4*R*)-*p*-1-menteno-8,9-diol (**55**), **Esquema VI.9**.



Esquema VI.9: Formação de limoneno-1,2-diol (54, 5%) e uroterpenol (55, 6,1%) a partir da biotransformação do (*R*)-(+)-limoneno (32).

¹⁵⁵ Miyazawa, M.; Wada, T.; Kameoka, H. J. Agric. Food Chem. **1998**, 46, 300-303.

O limoneno-1,2-diol (54) foi produzido pela oxidação da dupla ligação C-1/C-2 do (*R*)-(+)-limoneno e os deslocamentos químicos de RMN de ¹³C estão de acordo com os da literatura¹⁵⁶ (**Tabela VI.8**, parte experimental, item IX.6.8.1). Tentou-se atribuir a estereoquímica relativa de 54 através de um experimento de nOe, entretanto o estudo não foi conclusivo, pois a irradiação dos hidrogênios em δ 3,67 (H-2) e 1,26 (H-7) não levou a nenhum incremento significativo de nOe.

7 OH 6 2 OH 5 4 3 3 3 10 9				
C #	$\delta_{\rm C}$	$\delta_{\rm H}$ (mult, J)		
1	71,9			
2	73,7	3,67 (1H, s _l , H-2)		
3	34,1	1,95-1,50 (2H, m, H-3)		
4	37,5	2,40-2,23 (1H, m, H-4)		
5	28,2	1,95-1,50 (2H, m, H-5)		
6	34,4	1,95-1,50 (2H, m, H-6)		
7	24,5	1,26 (3H, s, H-7)		
8	149,1			
9	108,9	4,71 (2H, m, H-9)		
10	21,2	1,73(3H, s, H-10)		

Tabela VI.8: Dados espectroscópicos de RMN de ¹H e de ¹³C para o limoneno-1,2-diol (54).

Na literatura verifica-se que outras espécies de microrganismos (*Cladosporium sp.* T7, *Diplodia gossypina* ATCC 10936, *Corynespora cassiicola* DSM 62474/5, *Rhodococcus erythropolis* DCL14, *Pseudomonas sp.* PL, *Aspergillus cellulosae* M-77,

¹⁵⁶ ^[a] Abraham, W. R.; Stumpf, B.; Kieslich, K. *Appl. Microbiol.Biotechnol.* **1986**, *24*, 24-30. ^[b] Demyttenaere, J.; van Belleghem, K.; de Kimpe, N. *Phytochemistry* **2001**, *57*, 199-208.

Armillareira mellae) também são capazes de biotransformar o (R)-(+)-limoneno, levando a síntese de *trans*-limoneno-1,2-diol.^{156,157}

O (+)-(4*R*)-*p*-1-menten-8,9-diol ou uroterpenol (**55**) foi produzido a partir da oxidação da dupla ligação C-8/C-9 do *R*-(+)-limoneno, e nesse caso, foi obtido uma mistura de diastereoisômeros inseparáveis (4*R*,8*R*)-(**55a**) e (4*R*,8*S*)-(**55b**), **Tabela VI.9**, parte experimental, item IX.6.8.2).

Tabela VI.9: Dados espectroscópicos de RMN de ¹H e de ¹³C para os uroterpenóis (4*R*, 8*R*)-(55a) e (4*R*, 8*S*)-(55b).

2	H 4R $8R$ 0	Γ
H ₃ C 1 6	5 HO CH ₃	H ₃ C
	10	



(4 <i>R</i> ,8 <i>R</i>)-(55a)				(4 <i>R</i> , 8 <i>S</i>)-(55b)	
C #	δ_{C}	$\delta_{\rm H}$ (mult, <i>J</i>)	C#	δ _C	$\delta_{\rm H}$ (mult, J)
1	134,3		1	133,9	
2	120,0	5,41 (1H, m, H-2)	2	120,4	5,35 (1H, m, H-2)
3	26,9		3	25,8	
4	40,8		4	40,6	
5	23,0		5	24,3	
6	30,8		6	31,0	
7	23,4	1,65 (3H, s, CH ₃ -7)	7	133,9	1,65 (3H, s, CH ₃ -7)
8	74,6		8	23,3	
9	68,6	3,58; 3,44 (2H, q, <i>J</i> 10,8 Hz, H-9)	9	68,3	3,55; 3,40 (2H, q, <i>J</i> 10,8 Hz, H-9)
10	19,4	1,13 (3H, s, CH ₃ -10)	10	20,5	1,09 (3H, s, CH ₃ -10)
OH	-	1,98 (1H, m, 2xOH)	OH	-	1,98 (1H, m, 2xOH)

Os uroterpenóis são compostos interessantes, uma vez que eles são intermediários para as sínteses do bisabolol. O bisabolol pode ser obtido, em apenas duas etapas, a partir do uroterpenol (**Esquema VI.10**). Todos os estereoisômeros do bisabolol são constituintes de óleos essenciais, sendo que o (-)-(4S,8S)- α -bisabolol é utilizado em escala industrial na

¹⁵⁷ ^[a] Duetz, W.A.; Bouwmeester, H.; van Beilen, J.B. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2003**, *61*, 269-277. ^[b] van der Werf, M.J.; de Bont, J.A.M. in Kieslich, K.; van der Beek, C.P.; de Bont, J.A.M. van der Tweel, W.J.J. (Ed.). *Screening for microorganisms converting limonene into carvone*, Elsevier, p 231, **1998**.

preparação de cremes e loções devido as suas propriedades anti-inflamatória, bactericida e anti-micótica.¹⁵⁸



Esquema VI.10: Síntese do bisabolol a partir do uroterpenol. (TsCl=cloreto de tosila, C₅H₉MgCl=3-metil-2-butenil-cloreto de magnésio).

A formação dos dióis 54 e 55 ocorre provavelmente através de um epóxido intermediário, seguido da ação de hidrolases presentes nas células íntegras do microrganismo, embora a reação também ocorra em meio levemente ácido.

Normalmente, os microrganismos apresentam rotas metabólicas similares, denominadas de posições oxidativas. Em geral, as oxidações da dupla ligação C-1/C-2, da posição C-7 e da posição C-6 são as principais rotas metabólicas na biotransformação do limoneno pelos microrganismos.^{156,159} Por outro lado, as oxidações da dupla ligação C-8/C-9 e da posição C-7 são as principais reações enzimáticas na biotransfomação do limoneno pelos mamíferos.¹⁶⁰ As reações realizadas com células íntegras de *T. cutaneum* CCT 1903 mostraram que este microrganismo não fez distinção entre uma e outra rota metabólica, sendo capaz de oxidar as duplas ligações C-1/C-2 e C-8/C-9 do (*R*)-(+)-limoneno.

¹⁵⁸ Chen, X-J.; Archelas, A.; Furstoss, R. J. Org. Chem. 1993, 58, 5528-5532.

 ¹⁵⁹ ^[a] Dhavalikar, R. S.; Bhattacharyya, P. K. Indian J. Biochem. 1966, 3, 144-157. ^[b] Dhavalikar, R. S.;
 Rangachari, P. N.; Bhattacharyya, P. K. Indian J. Biochem 1966, 3, 158-164. ^[c] Mukherjee, B. B.; Kraidman, G.; Mill, I. D. Appl. Microbiol. 1973, 25, 447-453. ^[d] Bowen, E.R. Proc. Fla. State Hortc. Soc. 1976, 88, 304-308. ^[e] Devi, J. R.; Bhattacharyya, P. K. Indian J. Biochem Biophys. 1977, 14, 288-291. ^[f] Devi, J. R.;
 Bhattacharyya, P. K. Indian J. Biochem Biophys. 1977, 14, 288-291. ^[f] Devi, J. R.;
 Bhattacharyya, P. K. Indian J. Biochem Biophys. 1977, 14, 359-363. ^[g] Abraham, W. R.; Kieslich, K.; Reng, H.; Stumpf, B. Eur. Congr. Biotechnol. 1984, 1, 245-248. ^[h] Cadwallader, K. R.; Braddock, R. J.; Parish, M.E.; Higgins, D. P. J. Food Sci. 1989, 54, 1241-1245. ^[i] Noma, Y.; Yamasaki, S.; Asakawa, Y. Phytochemistry 1992, 31, 2725-2727.

 ¹⁶⁰ ^[a] Igimi, H.; Nishimura, M.; Kodama, R.; Ide, H. *Xenobiotica* **1974**, *4*, 77-84. ^[b] Kodama, R.; Noda, K.; Ide, H. *Xenobiotica* **1974**, *4*, 85-95. ^[e] Kodama, R.; Yano, T.; Furukawa, K.; Noda, K.; Ide, H. *Xenobiotica* **1976**, *6*, *377-389*. ^[d] Regan, J. W.; Bjeldanes, L.F. J. Agric. Food Chem. **1976**, *24*, 377-380. ^[e] Watabe, T.; Hiratsuka, A.; Isobe, M.; Ozawa, N. *Biochem. Pharmacol.* **1980**, *29*, 1068-1071. ^[d] Watabe, T.; Hiratsuka, A.; Ozawa, N.; Isobe, M. *Xenobiotica* **1981**, *11*, 333-344.

Devido ao interesse industrial destes compostos (**54**, **55**) várias otimizações das condições de biotransformação do limoneno são encontradas na literatura, tais como, variações do pH, da temperatura, da concentração do substrato, utilização de sistemas de imobilização celular e engenharia genética.^{131,161}

VI.2.4. Conclusões.

Foram detectadas quatro enzimas envolvidas no mecanismo de degradação da (R)-(-)-carvona: enoato redutases e desidrogenases, responsáveis pela identificação do (1S,2R,4R)-neoisodiidrocarveol (**41**), Baeyer-Villiger monooxigenases, responsáveis pela formação do (6R)-isoprenil-(3R)-metil-2-oxo-oxepanona (**42**) e ácido-(3R)-isopropenil-6-oxo-heptanóico (**43**) e alceno monooxigenases, responsáveis pela identificação do 2,3-epóxi-(5R)-isopropenil-2-metilcicloexanol (**44**).

Foi demonstrado que *T. cutaneum* CCT 1903 promoveu a hidrogenação e concomitante oxidação da β -ionona, através da identificação da 4-oxo-7,8-diidro- β -ionona (**50**). Por outro lado, a formação do α -homo-ciclogeraniol (**51**), a partir da α -ionona, confirmou a ação de Baeyer-Villigerases.

A alceno monooxigenase de *T. cutaneum* CCT 1903 está envolvida na conversão do (R)-(+)-limoneno. A rota metabólica desta levedura foi semelhante às encontradas nos mamíferos. Os compostos obtidos, limoneno-1,2-diol (54) e (+)-(4*R*)-*p*-1-menteno-8,9-diol (55) são importantes blocos de construções nas sínteses de produtos industriais.

¹⁶¹ Van der Werf, M. J.; Swarts, H. J.; de Bont, J. A. M. Appl. Envir. Microbiol. 1999, 65, 2092-2102.

Capítulo VII

Avaliação da Atividade Enzimática do *Rhyzopus oryzae CC*T 1022, AMA 7 e do Fungo *CC*T 5632

Avaliação das Atividades Enzimáticas de *Rhyzopus oryzae CC*T 1022, AMA 7 e do Fungo *CC*T 5632

A implementação das triagens de alto desempenho baseadas na utilização de sondas fluorogênicas adaptadas à células íntegras foi realizada pelo grupo de pesquisa de Marsaioli e colaboradores.⁷⁸¹⁶² Baseados na emissão de fluorescência, os microrganismos que apresentaram intensa atividade monooxigenase foram: os fungos CCT 5632, *Rhyzopus oryzae* CCT 1022 e a levedura AMA 7, os quais foram selecionados pela doutoranda Lu Shi Chen.

O estudo das atividades enzimáticas, assim como, as determinações dos perfis de seletividade dos microrganismos *Rhyzopus oryzae* CCT 1022, AMA 7 e do fungo CCT 5632 foram analisadas através da metodologia de multibiorreações e por reações de biotransformações convencionais. Os substratos selecionados foram: *cis*-jasmona (**8**), (*R*)-(-)-carvona (**25**), α - e β -iononas (**26**, **27**) e (*R*)-(+)-limoneno (**32**), sendo que os produtos obtidos foram analisados por CG-EM e comparados com aqueles obtidos nos itens V.3 e VI.2.

VII.1. Resultados e Discussão.

VII.1.1. Avaliação da atividade enzimática e determinação do perfil de seletividade da levedura AMA 7.

O método de triagem de multibiorreações foi utilizado para investigar o perfil de seletividade da levedura AMA 7 frente à *cis*-jasmona (8) e aos monoterpenos monocíclicos: (*R*)-(-)-carvona (25), α - e β -iononas (26, 27) e (*R*)-(+)-limoneno (32).

As reações dos substratos (8, 25-27 e 32) foram realizadas em um único pote (Figura VII.1). e monitoradas por CG-EM utilizando como padrão interno uma solução de pentadecano $(0,2 \text{ mg.mL}^{-1})$ nos intervalos de 2, 12, 24, 48, 72, 96 e 120h.

¹⁶² Sicard, R.; Chen, L.S.; Marsaioli A.J.; Reymond, J.L. Adv. Synth. Catal. 2005, 347, 1041-1050.



Figura VII.1: Cromatograma de íons totais (CG-EM) dos substratos: 8, 25-27 e 32 utilizados para avaliação da atividade enzimática da AMA 7. Coluna: HP-5MS - Crosslinked 5 % fenilmetilsiloxano. Condições: 50°C - 290°C a 15°C.min⁻¹, T_{inj}.=200°C, fluxo=1mL.min⁻¹.

Após 2h de reação, a AMA 7 apresentou atividade redutase transformando a (R)-(-)carvona (25) em diidrocarvona (45, espectro E125 em anexo). A epoxidação da *cis*jasmona foi observada após 24h de reação conforme mostrado na Figura VII.2. (espectro E15 em anexo). A partir 72h de reação todos os substratos e produtos foram degradados e/ou consumidos pelo microrganismo.



Figura VII.2: Cromatograma de íons totais (CG-EM) obtido após 24h de reação com AMA 7. Substratos: 8, 25-27 e 32. Produtos: 7,8-epoxijasmona (12) e diidrocarvona (45). Coluna: HP-5MS -Crosslinked 5 % fenilmetilsiloxano. Condições: 50°C – 290°C a 15°C.min⁻¹, T_{inj}.=200°C, fluxo=1mL.min⁻¹.

Em seguida, a *cis*-jasmona (**8**) foi analisada de acordo com o protocolo das reações de biotransformações tradicionais (meio reacional 50 mL; substrato 0,4 mg.mL⁻¹, 150 rpm) utilizando células integras da AMA 7. As reações foram monitoradas por CG-EM, retirando alíquotas de 1 mL do meio reacional em 2, 24, 48, 72 e 96h.

As análises dos cromatogramas mostraram que após 2h de reação iniciou-se a formação da 7,8-epoxijasmona (**12**). A síntese deste composto evoluiu até um período de 48h conforme pode ser observado na **Tabela VII.1** através dos dados de conversões, baseadas em padronização interna (pentadecano 0,2 mg.mL⁻¹).

Na **Tabela VII.1** observa-se que o composto **12** apresentou excelente conversão (51%). Além disso, verificou-se que a 4-hidroxijasmona (**14**) foi formada a partir de 24h de reação, com uma conversão de 22%.

A conversão da *cis*-jasmona para a 7,8-diidroxijasmona (13) ocorreu a partir de 48h, mas não evoluiu quando analisadas até um período de 96h. A formação de 13 pode ser atribuída em parte à abertura espontânea do oxirano de 12.

	AMA 7		НО ОН Н	
8 Tempo (h)	• C (%) substrato 8	12 ••C (%) 12	13 ••C (%) 13	14 ••C (%) 14
2	1,5	1,5	-	-
24	86	51	-	22
48	95	43	5	22
72	-	-	-	-
96	-	-	-	-
	8 Tempo (h) 2 24 48 72 96	AMA 7 O 8 • C (%) substrato 8 2 1,5 24 86 48 95 72 - 96 -	AMA 7 Image: Constraint of the second se	AMA 7 i <t< th=""></t<>

Tabela VII.1: Oxidação microbiana da cis-jasmona (8) com células íntegras de AMA 7.

• A conversão (C) foi determinada por CG;

••C dos produtos: 7,8-epoxijasmona (12), 7,8-diidroxijasmona (13), 4-hidroxijasmona (14).

VII.1.2. Avaliação das atividades enzimáticas e determinação do perfil de seletividade de *Rhyzopus oryzae* CCT 1022 e do fungo CCT 5632.

Os substratos *cis*-jasmona (8), (*R*)-(-)-carvona (25), α - e β -iononas (26, 27) e (*R*)-(+)-limoneno (32) foram analisados pelo método de triagens de multibiorreações, e utilizando células íntegras de *Rhyzopus oryzae* CCT 1022 e do fungo CCT 5632. As reações foram monitoradas por CG-EM, retirando alíquotas de 1 mL do meio reacional em 2, 24, 48, 72, 96 e 120h. As condições de análises foram semelhantes àquelas descritas no item VII.1.1, **Figura VII.1**.

A atividade monooxigenase do fungo *R. oryzae* CCT 1022 frente a *cis*-jasmona (8) foi verificada a partir da formação da 4-hidroxijasmona [14], (Esquema VII.1, espectro E20, em anexo). No entanto, a conversão foi baixa (0,3%) e não evoluiu até o período analisado de 120h.



Esquema VII.1: Síntese da 4-hidroxijasmona (14) utilizando células íntegras de R. oryzae CCT 1022.

Uma atividade redutase de *R. oryzae* CCT 1022 foi observada através da redução do sistema carbonílico α,β -insaturado da (*R*)-(-)-carvona (**25**). A formação do neoisodiidrocarveol [**41**], (espectro **E86** em anexo) ocorreu a partir de 24h de reação. As α -e β -iononas (**26**, **27**) foram consumidas pelo microrganismo a partir de 48h de reação, no entanto, não foi possível identificar nenhum produto resultante de sua biotransformação. O (*R*)-(+)-limoneno (**32**) não foi detectado durante as análises, e também não foi observado nenhum produto de biotransformação a partir dele.

O fungo CCT 5632 apresentou atividade monooxigenase através da redução da ligação dupla C-7/C-8 e da oxidação em C-4 da β -ionona (27), produzindo a 4-oxo-7,8-diidro- β -ionona (50), Esquema VII.2. A formação do composto 50 ocorreu a partir de 96h de reação (espectro E88 em anexo). A *cis*-jasmona (8) não foi degradada, nem consumida pelo microrganismo até um período de 120h. A (*R*)-(-)-carvona (25) e o (*R*)-(+)-limoneno

(32) não foram detectados durante as análises, e também não foram observados produtos de biotransformação a partir deles.



Esquema VII.2: Síntese da 4-oxo-7,8-diidro-β-ionona (50) utilizando células íntegras do fungo CCT 5632.

VII.1.3. Conclusões.

As células íntegras de AMA 7 e R. *oryzae* CCT 1022 apresentaram atividade oxidorredutase sobre a (R)-(-)-carvona e *cis*-jasmona.

A levedura AMA7 produziu a: 7,8-epoxijasmona (12), 7,8-diidroxijasmona (13), 4hidroxijasmona (14) e a diidrocarvona (45), enquanto que o fungo *R. oryzae* CCT 1022 foi capaz de produzir a 4-hidroxijasmona (14) e o neoisodiidrocarveol (41).

O fungo CCT 5632 também apresentou atividade monooxigenase verificada a partir da formação da 4-oxo-7,8-diidro- β -ionona (**50**).
Capítulo VIII

Considerações Finais

e

Perspectivas

Considerações Finais e Perspectivas

A metodologia de triagem de multibiorreações foi eficiente no aumento da velocidade de avaliação das atividades enzimáticas dos microrganismos selecionados.

O sistema enzimático presente nas células íntegras dos microrganismos analisados foi aplicado na biotransformação de compostos de fragrância, resultando na formação de lactonas, epóxidos, compostos hidroxilados, além de outros produtos enantiomericamente puros.

As biotransformações promovidas pelas células íntegras de *T. cutaneum* CCT 1903 ocorreram em substratos contendo grupos funcionais diferentes, os quais incluem, ligações duplas olefinícas alifáticas e alicíclicas (*cis*-jasmona, (*R*)-(+)-limoneno, respectivamente) e em sistemas carbonílicos α,β -insaturados [(*R*)-(-)-carvona, e α - e β -iononas]. A capacidade que uma única enzima tem de transformar substratos diferentes é denominado em biocatálise de "promiscuidade catalítica". A transformação química pode diferir no grupo funcional envolvido (tipo de reação formada ou clivada) e/ou no mecanismo catalítico. A maioria dos exemplos inclui ambas as mudanças.¹⁶³

Diante disto, concluiu-se que *T. cutaneum* CCT 1903 apresenta, sem dúvida, atividade oxigenase, no entanto, algumas questões permanecem sem resposta, entre as quais: os compostos isolados seriam resultantes da ação de diferentes monooxigenases (tais como, citocromo P-450 ou Baeyer-Villiger monooxigenases) presentes nas células microbianas? Ou ainda, seria possível que uma única enzima estaria catalisando mais de um tipo de reação química?

Estudos subsequentes revelarão se as reações de hidroxilação, epoxidação e reações de Baeyer-Villiger são catalisadas por monooxigenases dependentes de citocromo P450 e/ou Baeyer-Villigerases dependentes de flavinas.

De uma maneira geral, os produtos obtidos neste projeto de doutoramento apresentam grande interesse acadêmico e industrial.

Os resultados obtidos neste projeto de doutoramento abriram perspectivas interessantes para futuros trabalhos, comentadas brevemente a seguir.

A utilização da metodologia de triagem de multibiorreações foi implementada e novos projetos de triagem da diversidade de microrganismos já fazem uso deste método para avaliação das atividades enzimáticas de microrganismos selecionados.

A metodologia aplicada para a determinação da configuração absoluta da (7S,8*R*)epoxijasmona, através da utilização de trimetil-*orto*-acetato e PPTS, poderá ser utilizada como um método eficiente na determinação da configuração absoluta de outros epóxidos funcionalizados.

Um tópico a ser explorado é o isolamento e a expressão da(s) enzima(s) oxidorredutase(s) de *T. cutaneum* CCT 1903, visando melhorar os rendimentos das reações, o que viabilizaria a utilização deste biocatalisador em processos industriais.

Um dos resultados preliminares interessantes e que necessita de mais investigações é a reação de hidroxilação da *cis*-jasmona com o AMA7, pelo fato destes derivados serem intermediários importantes para as sínteses de compostos biologicamente ativos, tais como, as prostaglandinas e seus análogos. A determinação de enantiosseletividade e configuração absoluta dariam seqüência aos estudos de identificação de compostos enantiomericamente puros obtidos por células íntegras microbianas.

¹⁶³ Bornscheuer, U.T.; Kazlauskas, R.J. Angew. Chem. Int. Ed. 2004, 43, 6032-6040.

Capítulo IX

Parte Experimental

Parte experimental

IX.1. Instrumentação e condições.

Os espectros de RMN de ¹H foram obtidos em espectrômetros Gemini 300P – Varian Instruments (300,07 MHz) ou Inova 500 (499,88 MHz). Os deslocamentos químicos foram registrados em δ , tendo o sinal do tetrametilsilano em δ 0,00, do CHCl₃ residual do CDCl₃ em δ 7,24 e o sinal do CH₃OH residual no CD₃OD em δ 3,30 como padrões de referência interna. Os espectros de hidrogênio são expressos na ordem: número de hidrogênios, multiplicidade (s, singleto; sl, singleto largo; d, dubleto; t, tripleto; q, quarteto; quint, quinteto; sext, sexteto; hept, hepteto; m, multipleto; dd, duplo dubleto; dt, duplo tripleto; dq, duplo quarteto; td, triplo dubleto, tl, tripleto largo, ddd, duplo, duplo dubleto; sl, sinal largo) e as constantes de acoplamento (*J*) são expressas em Hz.

Os espectros de RMN de ¹³C foram registrados em espectrômetros Gemini 300P – Varian Instruments (75,45 MHz) ou Inova 500 (125,70 MHz). Os deslocamentos químicos foram registrados em δ , tomando-se como padrões de referência interna o tetrametilsilano (TMS, δ 0,00), o clorofórmio (CDCl₃, δ 77,0) ou o metanol (CD₃OD, δ 49,0).

Os espectros de DEPT (Distortionless Enhancement by Polarization Transfer) com ângulos de 135° e 90° foram utilizados para determinar o tipo dos carbonos metil, metileno e metino nos espectros de ¹³C, de acordo com a convenção: C (carbono quaternário, determinado pela comparação entre o espectro de RMN de ¹³C desacoplado), CH (carbono metínico), CH₂ (carbono metilênico) e CH₃ (carbono metílico).

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

As análises de espectrometria de massas de baixa resolução foram realizadas em espectrômetro de massas acoplado a um cromatógrafo gasoso (CG) modelo Hewlett Packard 5973, empregando a técnica de ionização por elétrons, com 70 eV de voltagem de ionização. A coluna capilar de sílica fundida empregada foi HP-5MS - Crosslinked 5% fenilmetilsiloxano - (30 m de comprimento x 0,25 mm de diâmetro interno x 0,25 µm de espessura do filme). O gás de arraste utilizado foi o hélio, sob fluxo de 1,0 mL.min⁻¹ (modo "split"). A programação utilizada na maioria dos casos foi: temperatura inicial (45°C ou

50°C), velocidade de aquecimento (15° C ou 20° C.min⁻¹), temperatura final (290° C), temperatura do injetor (200° C ou 220° C), temperatura do detector (280° C), temperatura na linha de transferência ou interface (280° C), faixa de massas (40 a 600 Da). O volume injetado das amostras, adequadamente diluídas, foi *ca*. 1µl na concentração de 1 mg.mL⁻¹.

As análises por CG das amostras quirais foram realizadas num cromatógrafo modelo Hewlett Packard 5973, com detector de ionização em chama (FID), equipado com as seguintes colunas capilares: a) uma coluna capilar de sílica fundida, com a fase quiral Chirasil- β -ciclodextrina (25 m x 0,25 mm x 0,25 μ m); b) uma coluna Lipodex E (2,6-Pe-3-Bu- γ -CD) – (28 m x 0,25 mm x 0,25 μ m); c) uma coluna Per-O-Me- β -ciclodextrina (22 m x 0,25 mm x 0,25 μ m); e d) uma coluna capilar heptakis (2,6-di-O-metil-O-pentil-3)- β ciclodextrina (25 m x 0,25 μ m). O hidrogênio (H₂) foi utilizado como gás de arraste (ca. 1mL.min⁻¹). O volume injetado das amostras, adequadamente diluídas, foi *ca*. 1 μ l. As condições empregadas encontram-se descritas no procedimento experimental dos compostos sintetizados.

As purificações dos compostos por cromatografia em coluna foram realizadas utilizando-se sílica gel 60 (Merck, 0,040-0,063 mm, 230-400 mesh ASTM) e solventes destilados para eluição.

As CCD analíticas, para monitoramento das reações e acompanhamento da purificação dos produtos, foram realizadas empregando-se cromatofolhas de alumínio (4 x 2 cm), recobertas com sílica gel com indicador de fluorescência em $UV_{254 nm}$ (Merck).

A revelação dos compostos em CCD foi realizada através da irradiação com lâmpada UV_{254nm} e/ou pulverização com uma solução de *p*-anisaldeído, ¹⁶⁴ preparada pela mistura de *p*-anisaldeído, H₂SO₄, HOAc e EtOH, na proporção de 1:2:1:100 em volumes, respectivamente, e subsequente aquecimento a 300°C, com pistola aquecedora.

Os valores de rotação óptica específica foram determinados em um polarímetro Perkin Elmer, modelo 341, com lâmpada de sódio e precisão de 0,001°, empregando-se EtOH e CHCl₃ como solventes. A rotação óptica específica, em função do comprimento de onda da raia D do sódio.

IX.2. Outros materiais e equipamentos utilizados para a realização das reações de biocatálise.

Os reagentes e solventes utilizados foram analiticamente puros e/ou indicados pelos fabricantes para o uso em laboratório. Sempre que necessário os reagentes foram submetidos aos métodos gerais de purificação e os solventes anidros preparados conforme as metodologias descritas por Perrin & Armarego¹⁶⁴.

As reações sensíveis a umidade foram realizadas em atmosfera de gás inerte (argônio ou nitrogênio), cujas vidrarias utilizadas foram aquecidas a altas temperaturas sob vácuo. A secagem dos gases foi obtida passando-os previamente por um frasco Dewar resfriado a –76°C (etanol/gelo seco) e a seguir conectado à linha de ar contendo frascos de mercúrio, sílica gel azul ativada (Synth), cloreto de cálcio e hidróxido de potássio.

Pipetas Pasteur, pipetas automáticas, ponteiras, agulha de inoculação, alça de platina (calibre 24 a 26 cm, haste de 6,5 cm), "Schott Duran", autoclave Vac Cicloman, forno microondas – Brastemp, capela de fluxo laminar Veco, estufa incubadora B.O.D., geladeira e refrigerador Cônsul, incubadora refrigerada (Shaker), da marca Marconi, modelo MA420 e MA830, centrífuga da marca Harrier, modelo 18/80, balança da marca Gehaka, modelo BG1000, balança da marca Mettler Toledo, modelo PB303-S e balança da marca CG-Libror, modelo L-600.

IX.3. Procedimentos gerais adotados no laboratório de biocatálise.

A vidraria foi lavada e seca, sendo então acondicionada com papel (Kraft, jornal, etc.) e esterilizada em autoclave a 121°C por 30 min. Todo o material utilizado com microrganismos, e portanto, contaminado, foi depositado num frasco de descarte contendo uma solução de HClO 5% e posteriormente esterilizado em autoclave a 121°C durante 40min.

Todos os meios de culturas, soluções, tubos de ensaio, pipetas e outros materias utilizados em contato direto com os microrganismos foram autoclavados (121°C, 15 min., 1,5 Pa) ou então esterilizados em bico de Bünsen, sob radiação UV, em soluções de etanol 70% ou em hipoclorito de sódio 0,2%.

¹⁶⁴ Perrin, D.D.; Armarego, W.L., Purification of Laboratory Chemicals. 3th ed, New York, Pergamon, 1988.

As soluções de álcool 70% e solução de hipoclorito de sódio 5% foram utilizadas para desinfetar as bancadas de trabalho e câmara de fluxo laminar. Praticamente todas as manipulações microbiológicas foram realizadas em câmaras de fluxo laminar, diminuindo a contaminação do material manipulado e do meio externo.

IX.4. Microrganismos utilizados nas reações de biocatálise.

As linhagens de referência utilizadas nesta pesquisa foram obtidas na Coleção de Culturas Tropicais (http://www.cct.org.br/), da Fundação "André Tosello", no Parque Taquaral, Campinas, e na Coleção Brasileira de Microrganismos de Ambiente e Indústria (http://www.cpqba.unicamp.br/cbmai), do centro Pluridisciplinar de Pesquisa Química, Biológica e Agrícola (CPQBA) da Unicamp, localizado na Vila Betel, Paulínia, ambos em São Paulo.

As linhagens utilizadas foram: AMA 7, *Aspergillus niger* CCT 4648, *Aspergillus niger* CCT 4846, *Aspergillus oryzae* CCT 0975, *Aspergillus terreus* CCT 3320, *Curvularia eragrostides* CCT 5634, *Curvularia pallescens* CCT 5654, *Curvularia lunata* CCT 5628, *Curvularia lunata* CCT 5629, *Cunninghamella echinulata* CCT 4259, *Drechslera halodes* CCT 5636, *Geotricum candidum* CCT 1205, *Rhyzopus oryzae* CCT 1022, *Trichoderma sp.* CCT 5551, *Trichosporum cutaneum* CCT 1903 e Fungo 5632.

IX.5. Meios de cultura e soluções destinados a manutenção e reativação das linhagens em estudo.

Os microrganismos foram reativados em tubos de ensaio (18 x 180 mm) contendo 20 mL do meio de cultura específico (20 g.L⁻¹), a 29°C. Após 72-96h, as culturas foram transferidas para frascos Erlenmeyer de 250 mL contendo 50 mL do meio de cultivo líquido (20 g.L⁻¹), os quais foram incubados por 4 dias, a 29°C sob agitação de 150 rpm. em agitador rotatório.

IX.5.1. Meio YM: Extrato de levedura e malte.

O extrato de levedo e malte foi utilizado para a reativação e crescimento do *T. cutaneum* CCT 1903 e *G. candidum.* CCT 1205). Composição: extrato de levedura (0,30 g), extrato de malte (0,30 g), peptona (0,50 g), D-glicose anidra (1,0 g) e água destilada (100,0 mL).

IX.5.2. Meio ME: Extrato de malte.

O extrato de malte foi utilizado para reativação e crescimento dos seguintes fungos: Aspergillus oryzae CCT 0975, Aspergillus terreus CCT 3320, Aspergillus niger CCT 4648, Aspergillus niger CCT 4846, Curvularia eragrostides CCT 5634, Curvularia pallescens CCT 5654, Drechslera halodes CCT 5636, Geotricum candidum CCT 1205, Trichoderma sp. CCT 5551. Composição: extrato de malte (2 g), ágar (2 g) e água destilada (100,0 mL).

IX.5.3. Meio MEA: Extrato de malte e peptona.

O extrato de malte e peptona foi utilizado para reativação e crescimento dos seguintes fungos: *Cunninghamella echinulata* CCT 4259, *Curvularia lunata* CCT 5628, *Curvularia lunata* CCT 5629. Composição: extrato de malte (20 g), peptona (1 g), glicose (20 g), ágar (20 g) e água destilada (1000,0 mL).

IX.5.4. Meios de cultura sólidos.

Os meios de culturas sólidos que foram destinados aos crescimentos e repiques dos microrganismos foram preparados de modo idêntico aos meios líquidos, sendo que nestes casos foram adicionados 2% de ágar-ágar. O ágar não constitui alimento para os microrganismos, sendo apenas um agente solidificante. Os meios foram vertidos em tubos de ensaio inclinados ("slants") ainda quentes, enquanto se encontravam liquefeitos.

IX.5.5. Solução Tampão de Sorensen (Na₂HPO₄ – KH₂PO₄).¹⁶⁵

Inicialmente, foi preparada uma solução de Na₂HPO₄ dissolvendo 11,876 g do sal monoácido em água destilada o suficiente para completar 1 L de solução e uma solução de KH₂PO₄ foi também preparada através da dissolução de 9,078 g do sal previamente desidratado em água destilada o suficiente para completar 1 L de solução. A solução tampão com o pH desejado foi preparada de acordo com a **Tabela IX.1** abaixo:

j L					
Solução usada			Solução usada		
Na ₂ HPO ₄	KH ₂ PO ₄	pH desejado	Na ₂ HPO ₄	KH ₂ PO ₄	pH desejado
(mL)	(mL)		(mL)	(mL)	
0,25	9,75	5,288	5,0	5,0	6,813
0,5	9,5	5,589	6,0	4,0	6,979
1,0	9,0	5,906	7,0	3,0	7,168
2,0	8,0	6,239	8,0	2,0	7,318
3,0	7,0	6,468	9,0	1,0	7,731
4,0	6,0	6,643	9,5	0,5	8,043

Tabela IX.1: Solução Tampão de Sorensen

IX.6. Parte experimental referente aos compostos sintetizados.

IX.6.1. Procedimento geral para a reação biocatalítica da 4-metilcicloexanona (1).

As reações enzimáticas da cetona **1** foram realizadas em Erlenmeyers estéreis (125 mL) dispostos num agitador rotatório (150 rpm). Aos frascos contendo solução tampão de fosfato estéril a pH 7,0 (Na₂HPO₄ e KH₂PO₄, 30 mL) e células íntegras do microrganismo (2,0 g, peso úmido), adicionou-se uma alíquota da 4-metilcicloexanona (20 μ L). A suspensão resultante foi agitada em "shaker", mantendo-se a temperatura em 29°C. As reações foram então monitoradas tomando-se alíquotas (1,0mL) em tempos periódicos (24, 48, 72 e 96h), extraindo-as com AcOEt (3 x 800 μ L), após saturar a fase aquosa com NaCl. As amostras foram analisadas por CG-EM, empregando uma coluna HP-5MS - Crosslinked 5% fenilmetilsiloxano sob as seguintes condições: 50°C (5 min) – 180°C (5 min) a 10°C.min⁻¹, T_{ini}=225°C, fluxo=1mL.min⁻¹, modo "splitless".

¹⁶⁵ Morita, T. Assumpção, R.M.V. *Manual de Soluções, Reagentes e Solventes: Padronização, Preparação e Purificação.* 2^a. ed., São Paulo, Edgard Blücher, **1972**.

A análise por cromatografía gasosa (FID), para a determinação do excesso enantiomérico dos produtos de biooxidação, foram realizadas utilizando-se uma coluna capilar de sílica fundida, com a fase quiral heptakis-(2,3-dimetil-6-pentil- β -ciclodextrina (0,25 mm x 25 m x 0,25 µm), sendo que as condições de análises empregadas foram: 70°C – 130°C a 2°C.min⁻¹, seguida por 30°C.min⁻¹ até 180°C, T_{ini}=225°C e T_{det}=240°C.

IX.6.2. Síntese da (±)-5-metil-ɛ-caprolactona (1a, 1b).



A uma solução resfriada (0°C) de 4-metilcicloexanona (0,1 mL; 0,9 mmol) em diclorometano (5,0 mL), sob agitação, foi adicionado NaHCO₃ (250 mg; 3,0 mmol) e, após 5 min. ácido *meta*-cloroperbenzóico (250 mg; 1,5 mmles). Após 12h, a mistura reacional foi consecutivamente lavada com soluções saturadas de NaHCO₃ (2 x 10 mL), NaHSO₃ (2 x 10 mL) e

com H₂O destilada (2 x 10 mL). A fase orgânica foi seca com Na₂SO₄ (anidro) e concentrada sob pressão reduzida. Posterior purificação por cromatografia em coluna de sílica gel eluida com mistura de solventes de polaridades crescentes (Hex:AcOEt, 9:1-1:1) forneceu os produtos **1a e 1b** como um óleo incolor (0,8 mL, 0,7 mmol, 80%).

MM: 128,17g.mol⁻¹ (C₇H₁₂O₂).

IE/EM *m/z* (int. rel.): 128 ($M^{\bullet+}$, 11), 98 (21), 83 (8), 69 (64), 56 (100), 55 (50), 53 (6). T_R=13,5 min.

RMN de¹**H** (300,06 MHz, CDCl₃): δ 4,28 (1H, dd, *J* 12,6; 2,2 Hz, H-7eq.), 4,15 (1H, dd, *J* 12,6; 10,6 Hz, H-7_{ax}), 2,64 (2H, m, H-3), 1,98-1,69 (3H, m, H-4 e H-5), 1,56-1,26 (2H, m, H-6).

RMN de ¹³C (75,45 MHz, CDCl₃): δ 175,8 (C-2), 68,1 (CH₂-7), 37,3 (CH₂-3), 35,3 (CH₂-5), 33,2 (CH₂-6), 30,8 (CH₂-4), 22,2 (CH₃-8).

IX.6.3. Sintese da cicloalcanona substituída (7). IX.6.3.1. Síntese do adipato de dimetila (10).



Em um balão equipado com uma coluna de fracionamento conectada a um condensador adicionou-se ácido adípico (1,004 g, 6,8 mmol), metanol (3,0 mL) tolueno (1,2 mL) e ácido sulfúrico

concentrado (1 gota). Essa mistura foi submetida a aquecimento de 115°C, quando o ácido foi dissolvido uma mistura azeotrópica de álcool, tolueno e água começou a destilar a 60°C, a destilação continuou até a temperatura de 62°C. O destilado foi seco sobre K₂CO₃ anidro e o filtrado foi recolocado no balão e aquecido até 62°C e então destilado a pressão reduzida. O álcool e o tolueno destilaram primeiro e o adipato de dimetila foi destilado a 81°C, fornecendo 0,85 g do produto **10** (71% de rendimento). Aspecto físico: líquido incolor. A identificação de **10** foi realizada por CG-EM, IV e RMN de ¹H. As análises por CG-EM foram realizadas sob as seguintes condições: 50°C -290°C (2 min) a 15°C.min⁻¹, T_{inj} = 200°C, fluxo 1mL.min⁻¹, split 50.

MM: 174,09g.mol⁻¹ (C₈H₁₄O₄).

IE/EM *m/z* (int. rel.): 174 ($M^{\bullet+}$, ausente), 143 ($M^{\bullet+}$ -OCH₃, 66), 142 (15), 115 (22), 114 (100), 111 (73), 101 (67), 87 (14), 83 (27), 82 (11), 74 (39), 73 (32), 59 (92), 55 (81), 43 (24), 41 (23). **T**_R=7 min.

IV v_{max} (cm⁻¹) (filme): 2954 (v C-H), 1738 (v C=O), 1199, 1173 (v C-O).

RMN de ¹**H** (300,06 MHz, CDCl₃): δ 3,65 (6H, s, OCH₃), 2,32 (4H, t_L, *J* 7,0 Hz, H-2 e H-5) 1,65 (4H, dt, *J* 7,0 Hz e 3,5 Hz, H-3 e H-4).

IX.6.3.2. Síntese da 2-carbometoxiciclopentanona (11).



O procedimento experimental empregado consistiu em adicionar a um balão contendo AlCl₃ anidro (2,77 mmol) uma solução do diéster (1,068 mmol) em diclorometano (2,0 mL). A mistura foi resfriada a 0 °C sob agitação magnética, e então foram gotejados trietilamina (2,77

mmol) através de um funil de adição. A mistura reacional foi agitada a temperatura ambiente por 1 hora e, em seguida, uma mistura 1:1 de HCl_{aq} . 10% e gelo (2,0 mL) foram adicionados lentamente. A mistura obtida foi extraída com diversas porções de CH_2Cl_2 (4 x

10,0 mL), os extratos orgânicos foram reunidos, secos com sulfato de sódio anidro e concentrados em evaporador rotatório, sendo o produto **11** obtido com ótimo rendimento (82%). A identificação de **11** foi realizada por CG-EM, RMN de ¹H e ¹³C. As análises por CG-EM foram realizadas sob as seguintes condições: 50° C -140°C a 15° C.min⁻¹. seguido por 30°C.min⁻¹ até 290°C, T_{inj}= 200°C, fluxo 1mL.min⁻¹, split 50.

MM: 142,06 g.mol⁻¹ (C₇H₁₀O₃).

IE/EM *m/z* (int. rel.): 142 ($M^{\bullet+}$), 114 (68), 111 (36), 110 (24), 87 (55), 83 (16), 82 (18), 69 (11), 59 (12), 55 (100), 54 (13), 41 (12). **T**_R=5 min.

RMN de ¹H (300,06 MHz, CDCl₃): δ 3,68 (3H, s, -OCH₃), 3,10 (1H, m, H-2), 1,70-2,40 (6H, m, CH₂ do anel ciclopentano).

RMN de ¹³C (75,50 MHz, CDCl₃): δ 211,9 (C-1), 169,4 (C-1'), 54,5 (C-2), 52,3 (C-2''), 38,0 (C-5), 27,3 (C-3), 20,9 (C-4).

IX.6.3.3. Síntese da 2-alil-2-carbometoxiciclopentanona (7).



Numa suspensão de carbonato de potássio anidro (5,85 g, 42,3 mmol) em acetona anidra (26,5 mL) foi adicionada uma solução de β -cetoéster **11** (1,5 g 10,6 mmol) em acetona anidra (13,25 mL). A mistura reacional mostrou uma cor amarela característica depois de

15 minutos de agitação a temperatura ambiente. Então, o brometo de alila (1,9 mL, 21,96 mmol) foi adicionado lentamente e a mistura foi refluxada por 1 hora. A suspensão formada foi filtrada para retirar o sal (KHCO₃), o filtrado concentrado a pressão reduzida e o resíduo diluído com éter (25,0 mL). A solução foi purificada por cromatografia em coluna (Hex:AcOEt (9:1), fornecendo 86% do composto 7 como um óleo levemente amarelo. O produto 7 foi identificado por CG-EM, IV, RMN de ¹H e ¹³C. As análises por CG-EM foram realizadas sob as seguintes condições: 50°C -140°C a 15°C.min⁻¹. seguido por 30°C.min⁻¹ até 290°C, T_{inj}= 200°C, fluxo 1mL.min⁻¹, split 50.

MM: 182,09 g.mol⁻¹ (C₁₀H₁₄O₃).

IE/EM *m/z* (int. rel.): 182 (M^{•+}, 6), 154 (100), 123 (36), 122 (41), 95 (89), 94 (70), 81 (34), 80 (80), 79 (56), 67 (90), 41 (43). **T**_R=7,3 min.

IV v_{max} (cm⁻¹) (filme): 3079 e 2955 (v C-H), 1752 e 1728 (v C=O), 1227 cm⁻¹ (v C-O).

RMN de ¹**H** (300,06 MHz, CDCl₃): δ 5,00-5,80 (3H, m, CH₂-<u>CH</u>=<u>CH₂</u>), 3,71 (s, 3H, O-<u>CH₃</u>), 1,80-2,80 (8H, m, CH₂ do anel ciclopentano e <u>CH₂</u>-CH=CH₂). **RMN** de ¹³C (75,50 MHz, CDCl₃): δ 214,1 (C-1), 171,1 (C-1'), 132,8 (C-2''), 119,0 (C-3''), 60,0 (C-2), 52,6 (C-2'), 38,1 (C-5), 38,0 (C-1''), 32,2 (C-3), 19,6 (C-4).

IX.6.4. Procedimento para a reação biocatalítica utilizando o método de triagem de multibiorreações.

O microrganismo T. cutaneum CCT 1903 foi reativado em tubos de ensaio (18 x 180 mm) contendo 20,0 mL de extrato de levedura e malte-ágar, a 30°C. Após 72-96h as culturas foram transferidas para frascos de 250 mL contendo 50 mL de extrato de levedura e malte, os quais foram incubados a 28°C por 72-96h, sob agitação (150 rpm). As células foram centrifugadas (5000 rpm, 15 min.) e, então 2,0 gramas de massa úmida foram adicionadas em tampão fosfato (50,0 mL, pH 6,5) juntamente com 10,0 µL de cada um dos seguintes substratos: 4-metilcicloexanona (1), 3-metilciclopentanona 2-(5). metilcicloexanona (6), 2-alil-2-carbometoxiciclopentanona (7) e cis-jasmona (8). Os controles das reações biocatalíticas foram realizados adicionando-se apenas os substratos no tampão fosfato (sem o microrganismo) e adicionando-se células da levedura no tampão fosfato (sem os substratos). Estas suspensões foram novamente incubadas sob agitação (150 rpm), e as reações de biocatálises foram acompanhadas retirando-se alíquotas de 1,0 mL a cada 2, 12, 24, 48, 72 e 96h. As alíquotas foram extraídas com AcOEt (3 x 800 μL) após a adição de NaCl até saturação, o solvente orgânico foi evaporado e o resíduo ressuspendido com 100,0 µL de uma solução de pentadecano (0,2 mg.mL⁻¹). As análises foram realizadas por CG-EM (condições de análises: 45°C (5 min.) - 225°C a 10°C.min⁻¹, seguido por 30° C.min⁻¹ até 290°C, T_{ini}=200°C, fluxo=1mL.min⁻¹, splitless 50).

IX.6.5. Biotransformação da *cis-jasmona* (8) utilizando células íntegras de *T. cutaneum* CCT 1903.

O microrganismo *T. cutaneum* CCT 1903 foi incubado em estufa conforme descrito no item IX.6.4. Após 72-96h as culturas foram transferidas para frascos de 500 mL (12 unidades) contendo extrato de levedura e malte (100 mL), os quais foram incubados a 28°C, 96h, sob agitação (150 rpm). As células foram centrifugadas (5000 rpm, 15 min) e, então 2 gramas de massa úmida foram adicionadas em frascos de 125 mL (15 unidades) contendo tampão fosfato (50 mL, pH 6,5), juntamente com a *cis*-jasmona (20 μ L), e perfazendo um total de 300 μ L do substrato. Os controles das reações biocatalíticas foram realizados adicionando-se apenas os substratos no tampão fosfato (sem o microrganismo) e adicionando-se células da levedura no tampão fosfato (sem os substratos). Estas suspensões foram novamente incubadas sob agitação (150 rpm), e então, extraídas com AcOEt após 48h de reação biocatalítica. O solvente orgânico foi evaporado e os produtos da reação purificados por cromatografia em coluna de sílica gel, eluida com uma mistura de solventes de polaridades crescentes, Hex:AcOEt (19:1, 9:1, 17:5, 4:1, 7:3, 1:1) e contendo NH4OH 5% (vol/vol). As frações foram reunidas e analisadas por CG-EM sob as seguintes condições: 50°C-290°C a 15 °C.min⁻¹, T_{inj}.=220°C, fluxo=1mL.min⁻¹, split 50. As 3 frações com *m/z* 180, [composto **12** (43,5 mg, 0,242 mmol,13%), composto **13** (22,1 mg, 0,112 mmol, 6,2%) e composto **14** (11,2 mg, 0,062 mmol, 3,4%)] foram analisadas e identificadas por RMN de 1D e 2D.

IX.6.5.1. Síntese da 4-hidroxijasmona (4-hidróxi-3-metil-2-pent-2-enil-2ciclopentanona) [14].



Este composto foi obtido por biocatálise (item IX.6.5) como um óleo amarelo (0,062 mmol, 3,4% rendimento isolado). **MM**: 180,12 g.mol⁻¹ ($C_{11}H_{16}O_2$).

IE/EM *m/z* (int. rel.): 180 (M^{•+}, 100), 151 (83), 137 (39), 133 (47), 111 (40), 109 (82), 105 (49), 95 (48), 79 (54) 77 (51), 67

(38), 53 (30), 43 (81). $T_R = 9,9$ min.

RMN de ¹H (499,88 MHz, CDCl₃): δ 5,41 (1H, dtt, *J* 17,8; 7,5; 1,5 Hz, H-8), 5,23 (1H, dtt, *J* 17,8; 7,3; 1,5 Hz, H-7), 4,71 (1H, d_L, H-4), 2,94 (2H, d_L, H-6), 2,78 (1H, dd, *J* 18,4 e 6,3 Hz, H-5), 2,28 (1H, dd, *J* 18,4 e 2,2 Hz, H-5), 2,16 (2H, ddd, *J* 7,5; 7,3; 1,5 Hz; H-9), 2,10 (3H, s, H-11), 0,99 (3H, t, *J* 7,5 Hz, H-10).

RMN de ¹³C (125,69 MHz, CDCl₃): δ 204,9 (C-1), 168,7 (C-3), 140,9 (C-2), 132,9 (C-8), 124,1 (C-7), 71,6 (C-4), 44,2 (C-5), 21,1 (C-6), 20,5 (C-9), 13,7 (C-11), 14,1 (C-10).

IX.6.5.1.1. Síntese do éster do (R)-MTPA (14a).



O ácido de Mosher (*R*)-MTPA (19,43 mg, 0,0825 mmol) foi adicionado a uma solução do álcool secundário **14** (10,0 mg) em diclorometano seco (0,2 mL) a 0°C sob agitação e atmosfera de argônio. Em seguida, adicionou-se a 4-dimetilaminopiridina (quantidade catalítica) e

finalmente a dicicloexilcarbodiimida (17,0 8mg, 0,0825 mmol). Observou-se a formação de um precipitado branco, caracterizando a formação de DCC-uréia e então o banho de gelo foi removido. Após 20h de reação a análise por CCD, (CHCl₃:CH₃OH, 9:1), revelou que apenas uma pequena quantidade de produto havia sido formado, e portanto o ácido (*R*)-MTPA foi adicionado em excesso. Após 24h de reação o produto foi filtrado em coluna contendo celite e o solvente orgânico evaporado sob pressão reduzida. A purificação do produto foi realizada por cromatografia em coluna de sílica gel eluida com mistura de solventes de polaridades crescentes, CH_2Cl_2 e CH_2Cl_2 :MeOH (19:1). O produto **14a** foi obtido como um óleo amarelo (12,7 mg, 0,032 mmol, 58%) e identificado por CG-EM (Coluna: HP-5MS - Crosslinked 5% fenilmetilsiloxano. Condições: 50°C - 290°C a 15° C.min⁻¹, T_{inj}=220°C, split 50, fluxo=1mL.min⁻¹) e por RMN de ¹H.

MM: 396,15 g.mol⁻¹ (C₂₁H₂₃F₃O₄).

IE/EM *m/z* (int. rel.): 396 ($M^{\bullet+}$, ausente), 190 (10), 189 (100), 162 (55), 133 (46), 105 (28), 91 (21), 77 (22), 55 (14), 41 (8). **T**_R = 14,9 min.

IE/EM *m/z* (int. rel.): 396 (M^{•+}, ausente), 190 (10), 189 (100), 162 (60), 133 (49), 105 (32), 91 (25), 77 (25), 55 (15), 41 (8). **T**_{**R**} = 14,7 min.

RMN de ¹**H** (300,06 MHz, CDCl₃): δ 7,53-7,51 (2H, m, Ph), 7,43-7,41 (3H, m, Ph), 5,98 (1H, d, *J* 6,0 Hz, H-4), 5,41 (1H, m, H-8), 5,20 (1H, m, H-7), 3,54 (3H, s, -OCH₃), 2,98-2,63 (3H, m, H-5 e H-6), 2,33 (1H, dd, *J* 18,7 e 2,23 Hz, H-5), 2,11 (2H, m, H-9), 0,97 (3H, t, *J* 7,5 Hz, H-10).

IX.6.5.1.2. Síntese do éster do (S)-MTPA (14b).



Seguindo o procedimento descrito anteriormente para a obtenção do éster (*R*)-MTPA, a reação de esterificação da 4-hidroxijasmona (8,7 mg, 0,0485 mmol) foi realizada desta vez, com o ácido de Mosher (*S*)-MTPA (34,2 mg, 0,1455 mmol) em uma solução de diclorometano (0,4 mL), 4-

dimetilaminopiridina (quantidade catalítica) e dicicloexilcarbodiimida (29,97 mg, 0,1455 mmol). Após purificação, o éster (*S*)-MTPA **14b** foi obtido como um óleo amarelo (11,9 mg, 0,03 mmol, 62%) e identificado por CG-EM (Coluna: HP-5MS - Crosslinked 5% fenilmetilsiloxano. Condições: 50° C - 290°C a 15° C.min⁻¹, T_{inj} .=220°C, split 50, fluxo=1mL.min⁻¹) e por RMN de ¹H.

MM: 396,15 g.mol⁻¹ (C₂₁H₂₃F₃O₄).

IE/EM *m/z* (int. rel.): 396 ($M^{\bullet+}$, ausente), 190 (11), 189 (100), 162 (59), 133 (50), 105 (31), 91 (25), 77 (23), 55 (14), 41 (9). **T**_R = 14,9 min.

IE/EM *m/z* (int. rel.): 396 ($M^{\bullet+}$, ausente), 190 (10), 189 (100), 162 (60), 133 (49), 105 (32), 91 (25), 77 (25), 55 (15), 41 (8). **T**_R = 14,7 min.

RMN de ¹**H** (300,06 MHz, CDCl₃): δ 7,52-7,49 (2H, m, Ph), 7,43-7,40 (3H, m, Ph), 5,85 (1H, d, *J* 6.3 Hz, H-4), 5,42 (1H, m, H-8), 5,20 (1H, m, H-7), 3,57 (3H, s, -OCH₃), 2,96 (2H, d₁, *J* 7.5 Hz, H-6), 2,93 (1H, dd, *J* 19,3 e 6,3 Hz, H-5), 2,19 (1H, dd, *J* 19,3 e 2,1 Hz, H-5), 2,13 (2H, m, H-9), 2,03 (2H, s, H-11), 0,97 (3H, t, *J* 7,6 Hz, H-10).

IX.6.5.2. Síntese da 7,8-epoxijasmona (2-(3-etil-oxiranilmetil)-3-metil-2ciclopentanona) [12].



Este composto foi obtido por biocatálise (item IX.6.5) como um óleo amarelo claro (0,242 mmol, 13% rendimento isolado). **MM**: 180,12 g.mol⁻¹ ($C_{11}H_{16}O_2$).

IE/EM *m*/*z* (int. rel.): 180 (M^{•+}, 8), 165 (26), 122 (46), 110 (64),

109 (32), 107 (19), 95 (26), 79 (100) 67 (31) 41 (28). T_R = 9,7 min.

RMN de ¹H (499,88 MHz, CDCl₃): δ 3,01 (1H, dd, *J* 6,5 e 4,5 Hz, H-7), 2,84 (1H, td, *J* 6,5 e 4,5 Hz, H-8), 2,53 (2H, m, H-5), 2,49 (1H, m, H-6), 2,37 (2H, m, H-4), 2,26 (1H, dd, *J* 14,0 e 7,5 Hz, H-6), 2,09 (3H, s, H-11), 1,60 (2H, m, H-9), 1,03 (3H, t, *J* 7,5 Hz, H-10).
RMN de ¹³C (125,69 MHz, CDCl₃): δ 209,1 (C-1), 172,5 (C-3), 136,7 (C-2), 58,5 (C-8), 556 (C-7), 34,1 (C-4), 31,8 (C-5), 21,9 (C-6), 21,1 (C-9), 17,5 (C-11), 10,5 (C-10).

IX.6.5.2.1. Síntese da (±)-7,8-epoxijasmona [(±)-12].



Uma solução resfriada (0°C) de ácido *meta*-cloroperbenzóico (53 mg; 0,305 mmol) em diclorometano (0,96 mL) foi preparada num balão de fundo redondo (25,0 mL) e submetido a agitação. Em seguida, uma solução de *cis*-jasmona (50,0 mg; 0,305 mmol) em diclorometano (0,304 mL) foi adicionada lentamente a primeira.

Após 12h, a mistura reacional foi consecutivamente lavada com soluções saturadas de NaHCO₃ (20 mL, 2 x), NaHSO₃ (20 mL, 2x) 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 em coluna de sílica gel e eluição com diclorometano forneceu o produto como um óleo amarelo (41,2 mg, 0,229 mmol, 75%).

MM: 180,12 g.mol⁻¹ (C₁₁H₁₆O₂).

IE/EM *m/z* (int. rel.): 180 ($M^{\bullet+}$, 8), 165 (26), 122 (46), 110 (64), 109 (32), 107 (19), 95 (26), 79 (100) 67 (31) 41 (28). **T**_R = 9,7 min.

RMN de ¹**H** (499,88 MHz, CDCl₃): δ (integração, multiplicidade, *J*, atribuição): 3,04 (1H, m, H-7), 2,88 (1H, m, H-8), 2,60-2,27 (6H, m, H-6, H-5, H-4), 2,12 (3H, s, H-11), 1,64 (2H, m, H-9), 1,06 (3H, t, *J* 7,5 Hz, H-10).

RMN de ¹³C (125,69 MHz, CDCl₃): δ 209,2 (C-1), 172,6 (C-3), 136,8 (C-2), 58,6 (C-8), 55,7 (C-7), 34,2 (C-4), 31,9 (C-5), 22,0 (C-6), 21,2 (C-9), 17,6 (C-11), 10,6 (C-10).

IX.6.5.2.2. Síntese de (±)-15a e (±)-15b.



A uma solução contendo a (±)-7,8epoxijasmona (200,0 mg, 1,11 mmol) em THF (30,0 mL) foi adicionado hidreto de lítio e alumínio (217,8 mg, 5,19 mmol). A reação foi acompanhada por CCD,

utilizando-se como eluentes Hex:AcOEt 1:1. A mistura foi agitada a temperatura ambiente, durante 1h, diluída em água e extraída com éter etílico. O solvente orgânico foi evaporado sob pressão reduzida fornecendo 170 mg da mistura como um óleo amarelo. **MM**: 184,15 g.mol⁻¹ ($C_{11}H_{20}O_2$).

IX.6.5.2.3. Síntese de (±)-16a e (±)-16b.



Para uma solução do diol (170 mg, 0,92 mmol) em CH₂Cl₂ seco (13,6 mL) sob agitação, foram adicionados 402,9 mg de MnO₂ ativado, sendo que a mistura reacional permaneceu sob agitação a 25°C

durante 24h. A mistura reacional foi filtrada em sílica e evaporada sob vácuo fornecendo o produto como um óleo amarelo (120,0 mg, 0,66 mmol). A purificação dos produtos foi realizada por cromatografia em camada delgada preparativa, utilizando-se como eluentes uma mistura Hex:AcOEt 1:1. Foram obtidas 5 frações as quais foram analisadas sob luz UV e então extraídas com AcOEt. O solvente orgânico foi evaporado sob pressão reduzida e as frações analisadas por CG-EM. A fração contendo a mistura de dióis e o composto proveniente da desidratação do material de partida foi isolada com um rendimento de 17% (30,0 mg, 0,165 mmol). As análises por CG-EM foram realizadas sob as seguintes condições: 50° C - 290°C a 20°C.min⁻¹, T_{inj}= 200°C, fluxo 1mL.min⁻¹, split 50.

MM: 182,13 g.mol⁻¹ (C₁₁H₁₈O₂).

IE/EM *m/z* (int. rel.): 182 ($M^{\bullet+}$, 4), 167 ($M^{\bullet+}$ -CH₃, 8), 139 (23), 110 (100), 95 (21), 82 (12), 67 (20), 55 (9) 41 (10). **T**_R=8,0 min.

IE/EM *m/z* (int. rel.): 182 ($M^{\bullet+}$, 2), 164 ($M^{\bullet+}$ -H₂O, 100), 153 (65), 135 (50), 124 (54), 109 (86), 79 (60), 67 (34), 55 (24), 41 (26). **T**_R=8,1 min.

IX.6.5.2.4. Derivatização da (±)-7,8-epoxijasmona com trimetil-orto-acetato e PPTS.

Uma solução de (±)-7,8-epoxijasmona [(±)-**12**] (50,0 mg, 0,278 mmol), *p*-tolueno sulfonato de piridínio (1,97 mg, 7,87 mmol) e trimetil-*orto*-acetato (0,272 mL, 2,128 mmol) em metanol anidro (2,0 mL) foi agitada a temperatura ambiente sob atmosfera de argônio durante 18h e então diluída em éter etílico, sendo a reação acompanhada por CCD (Hex:AcOEt 3:7). A solução foi lavada com uma mistura de hidróxido de sódio 5% e solução salina saturada (1:1). A fase orgânica foi seca com MgSO₄ (anidro) e concentrada sob pressão reduzida produzindo um óleo amarelo (22,4 mg). Posterior purificação do produto por cromatografia em coluna de sílica gel eluida com mistura de solventes de polaridades crescentes, (Hex:AcOEt 9:1-1:3) forneceu uma mistura (4:1) da (±)-7-hidróxi-8-metoxijasmona [(±)-**18a**] e (±)-7-metóxi-8-hidrxijasmona [(±)-**18b**], respectivamente (10,2 mg, 0,032 mmol, 12%). Os produtos foram identificados por CG-EM, RMN de ¹H e ¹³C. As análises por CG-EM foram realizadas sob as seguintes condições: 50-290°C a 20° C.min⁻¹, T_{ini}= 240°C, fluxo 1 mL.min⁻¹, split50.

IX.6.5.2.4.1. Síntese da (±)-7-hidróxi-8-metoxijasmona [(±)-18a].



MM: 212,29 g.mol⁻¹ ($C_{12}H_{20}O_3$).

IE/EM *m/z* (int. rel.): 212 ($M^{\bullet+}$, ausente), 180 (11), 139 (100), 110 (36), 73 (18), 41 (12). **T**_{**R**} = 8,6 min.

RMN de ¹H (499,88 MHz, CDCl₃): δ 3,70 (1H, ddd, *J* 9,3, 4,8 e

3,2 Hz, H-7), 3,42 (3H, s, OCH₃) 3,01 (1H, dt, *J* 6.5 e 4.8 Hz, H-8), 2,56 (2H, m, H-5), 2,45 (1H, dd, *J* 14,0 e 3,2 Hz, H-6), 2,41 (2H, t, *J* 4,5 Hz, H-4), 2,33 (1H, dd, *J* 14,0 e 9,3 Hz, H-6), 2,11 (3H, s, H-11), 1,75-1.50 (2H, m, H-9), 0,95 (3H, t, *J* 7,4 Hz, H-10). **RMN** de ¹³C (125,69 MHz, CDCl₃): δ 210,9 (C-1), 172,9 (C-3), 138,0 (C-2), 84,8 (C-8), 71,0 (C-7), 58,0 (-OCH₃), 34,2 (C-4), 32,0 (C-5), 27,6 (C-6), 22,2 (C-9), 17,5 (C-11), 9,7 (C-10). IX.6.5.2.4.2. Síntese da (±)-7-metóxi-8-hidroxijasmona [(±)-18b].



MM: 212,29 g.mol⁻¹ (C₁₂H₂₀O₃).
IE/EM *m/z* (int. rel.): 212 (M^{•+}, ausente), 194 (5), 179 (8), 154 (26), 153 (100), 139 (26), 110 (33), 41 (10). T_R = 8,4 min.
RMN de ¹H (499,88 MHz, CDCl₃) δ: 3,41 (3H, s, OCH₃) 3,17

(2H, m, H-7 e H-8), 2,56 (2H, m, H-5), 2,49 (2H, m, H-6), 2,41 (2H, t, *J* 4,5 Hz, H-4), 2,13 (3H, s, H-11), 1,75-1,50 (2H, m, H-9), 0,94 (3H, t, *J* 7,4 Hz, H-10). **RMN** de ¹³C (125,69 MHz, CDCl₃): δ 210,9 (C-1), 172,9 (C-3), 138,0 (C-2), 81,5 (C-7), 73,7 (C-8), 58,6 (-OCH₃), 34,2 (C-4), 31,9 (C-5), 26,6 (C-9), 24,2 (C-6), 17,5 (C-11), 10,4

(C-10).

IX.6.5.2.5. Derivatização do (±)-1,2-epoxidecano $[(\pm)-19]$, com trimetil-*orto*-acetato e PPTS.

Procedimento similar ao empregado na síntese da (\pm)-7-hidróxi-8-metoxijasmona, [(\pm)-18a] e (\pm)-7-metóxi-8-hidroxijasmona, [(\pm)-18b] (item IX.6.5.2.4). Neste caso, utilizou-se o (\pm)-1,2-epoxidecano [(\pm)-19], (50,0 mg, 0,320 mmol), o *p*-tolueno sulfonato de piridínio (2,28 mg, 9,06 mmol) e o trimetil-*orto*-acetato (0,313 mL, 2,45 mmol) em metanol anidro (2,0 mL). A reação foi agitada a temperatura ambiente sob atmosfera de argônio durante 48h. Após purificação por cromatografia em coluna de sílica gel eluida com mistura de solventes de polaridades crescentes, (Hex, Hex:AcOEt 19:1, Hex:AcOEt 9:1), os produtos (\pm)-1-hidróxi-2-metoxidecano [(\pm)-20a] e (\pm)-1-metóxi-2-hidroxidecano [(\pm)-20b] foram obtidos na razão 4:1, respectivamente.

IX.6.5.2.5.1. Síntese do (±)-1-hidróxi-2-metoxidecano [(±)-20a].



MM: 188,31 g.mol⁻¹ (C₁₁H₂₄O₂). RMN de ¹³C (75,45 MHz, CDCl₃): 81,6 (C-2), 64,0 (C-1), 57,0 (OCH₃), 31,8, 30,3, 29,8, 29,5, 29,2, 25,3, 22,6 (C3-C-9), 14,1 (C-10).

IX.6.5.2.5.2. Síntese do (±)-1- metóxi-2-hidroxidecano [(±)-20b].



MM: 188,31 g.mol⁻¹ (C₁₁H₂₄O₂). RMN de ¹³C (75,45 MHz, CDCl₃): 74,0 (C-1), 69,5 (C-2), 57,0 (OCH₃), 14,1 (C-10).

IX.6.5.2.6. Derivatização da 7,8-epoxijasmona (12) obtida a partir da reação com T. cutaneum CCT 1903, com trimetil-*orto*-acetato e PPTS.

Procedimento similar ao empregado na síntese do (\pm) -7-hidróxi-8-metoxijasmona $[(\pm)$ -**18a**] e (\pm) -7-metóxi-8-hidroxijasmona $[(\pm)$ -**18b**], (item IX.6.5.2.4).

IX.6.5.2.6.1. Síntese da 7-hidróxi-8-metoxijasmona (18a).



MM: 212,29 g.mol⁻¹ (C₁₂H₂₀O₃). **IE/EM** *m*/*z* (int. rel.): 212 ($M^{\bullet+}$, ausente), 180 (11), 139 (100), 110 (36), 73 (20), 41 (12). **T**_R = 8,6 min.

RMN de ¹H (300,06 MHz, CDCl₃): δ 3,70 (1H, ddd, J 9,3, 4,8 e

3,2 Hz, H-7), 3,42 (3H, s, OCH₃) 3,01 (1H, dt, *J* 6,5 e 4,8 Hz, H-8), 2,56 (2H, m, H-5), 2,45 (1H, dd, *J* 14,0 e 3,2 Hz, H-6), 2,41 (2H, t, *J* 4,5 Hz, H-4), 2,33 (1H, dd, *J* 14,0 e 9,3 Hz, H-6), 2,11 (3H, s, H-11), 1,75-1,50 (2H, m, H-9), 0,96 (3H, t, *J* 7,4 Hz, H-10).

RMN de ¹³C (75,45 MHz, CDCl₃): δ 210,8 (C-1), 172,9 (C-3), 138,0 (C-2), 84,7 (C-8), 71,0 (C-7), 58,0 (-OCH₃), 34,2 (C-4), 32,0 (C-5), 27,6 (C-6), 22,2 (C-9), 17,5 (C-11), 9,7 (C-10).

IX.6.5.2.6.2. Síntese da 7-metóxi-8-hidroxijasmona (18b).



MM: 212,29 g.mol⁻¹ (C₁₂H₂₀O₃).

IE/EM *m/z* (int. rel.): 212 ($M^{\bullet+}$, ausente), 194 (6), 179 (9), 154 (26), 153 (100), 139 (24), 110 (34), 41 (9). **T**_R = 8,4 min.

RMN de ¹H (300,06 MHz, CDCl₃): δ 3,41 (3H, s, OCH₃) 3,17

(2H, m, H-7 e H-8), 2,56 (2H, m, H-5), 2,49 (2H, m, H-6), 2,41 (2H, t, *J* 4,5 Hz, H-4), 2,13 (3H, s, H-11), 1,75-1,50 (2H, m, H-9), 0,95 (3H, t, *J* 7,4 Hz, H-10).

RMN de ¹³C (75,45 MHz, CDCl₃): δ 210,9 (C-1), 172,9 (C-3), 138,0 (C-2), 81,5 (C-7), 73,7 (C-8), 58,6 (-OCH₃), 34,2 (C-4), 31,9 (C-5), 26,6 (C-9), 24,3 (C-6), 17,5 (C-11), 10,4 (C-10).

IX.6.5.2.7. Sínteses dos ésteres de (S)-MTPA a partir da (\pm) -7-hidróxi-8metoxijasmona [(\pm) -18a].

O ácido de Mosher (*S*)-MTPA (12,6 mg, 0,053 mmol) foi adicionado a uma solução do álcool secundário (\pm)-**18a** (7,6 mg, 0,036 mmol) em diclorometano seco (0,3 mL) sob agitação e atmosfera de argônio. Em seguida, adicionou-se a 4-dimetilaminopiridina (quantidade catalítica) e finalmente a dicicloexilcarbodiimida (10,9 mg, 0,053 mmol). Observou-se a formação de um precipitado branco, caracterizando a formação de DCC-uréia. A mistura reacional foi deixada em refluxo durante 48h, sendo acompanhada por CCD, utilizando-se como eluentes Hex:AcOEt 1:1. O produto foi filtrado em coluna contendo celite e o solvente orgânico evaporado sob pressão reduzida. A purificação do produto foi realizada por cromatografia em coluna de sílica gel eluida com mistura de solventes de polaridades crescentes, Hex:AcOEt (9:1-8:2). Os produtos (\pm)-**21a** e (\pm)-**21b** foram obtidos como um óleo amarelo (11,5 mg, 0,027 mmol, 75%) e identificados por CG-EM, RMN de ¹H e ¹³C, DEPT 90° e 135°, ¹H e ¹H gCOSY, ¹H e ¹³C-HSQC. As análises por CG-EM foram realizadas sob as seguintes condições: 100°C - 290°C (20 min.) a 20°C.min⁻¹, T_{inj}=200°C, fluxo 1 mL.min⁻¹, split50.

IX.6.5.2.7.1. Síntese do éster de (S)-Mosher da (7S)-hidróxi-(8S)-metoxijasmona [(±)-



21a].

MM: 428,18 g.mol⁻¹ (C₂₂H₂₇F₃O₅).

IE/EM *m/z* (int. rel.): 428 (M^{\bullet^+} , ausente), 396 (10), 194 (15), 189 (100), 163 (18), 139 (16), 123 (30), 105 (20), 73 (48). **T**_R = 9,6 min.

RMN de ¹H (499,88 MHz, CDCl₃): δ: 7,62-7,34 [5H,

m, Ph-C(2')], 5,47-5,43 (1H, m, H-7), 3,51 (3H, s, H₃CO-C2'), 3,44 (3H, s, H₃CO-C8), 3,29-3,25 (1H, m, H-8), 2,62-2,46 (2H, m, H-6), 2,52-2,44 (2H, m, H-5), 2,29 (2H, t, *J* 4,5 Hz, H-4), 1,79 (3H, s, H-11), 1,64-1,53 (2H, m, H-9), 0,98 (3H, t, *J* 7,5 Hz, H-10).

RMN de ¹³C (125,69 MHz, CDCl₃): δ 210,1 (C-1), 174,4 (C-3), 166,2 (C-1'), 158,5 (C-3'), 135,4 (C-2), 131,6, 129,7, 128,6, 127,5 (Ph-C2') 122,2 (C-2'), 82,4 (C-8), 74,1 (C-7), 57,7 (H₃CO-C8), 55,4 (H₃CO-C2'), 34,0 (C-4), 31,7 (C-5), 23,3 (C-6), 22,2 (C-9), 17,0 (C-11), 9,7 (C-10).

IX.6.5.2.7.2. Síntese do éster de (S)-Mosher da (7R)-hidróxi-(8R)-metoxijasmona [(\pm)-21b].



MM: 428,18 g.mol⁻¹ ($C_{22}H_{27}F_3O_5$).

IE/EM *m/z* (int. rel.): 428 (M^{•+}, ausente), 319 (49), 194 (40), 189 (87), 179 (41), 153 (100), 105 (19), 101 (19), 77 (13). **T**_{**R**} = 9,8 min.

RMN de ¹**H** (499,88 MHz, CDCl₃): δ: 762-7,34 (5H, m, Ph-C(2')), 5,47-5,43 (1H, m, H-7), 3,51 [3H, s, H₃CO-

C(2')], 3,40 [3H, s, H₃CO-C(8)], 3,22-3,19 (1H, m, H-8), 2,62-2,46 (2H, m, H-6), 2,52-2,44 (2H, m, H-5), 2,41-2,39 (2H, m, H-4), 2,01 (3H, s, H-11), 1,52-1,35 (2H, m, H-9), 0,91 (3H, t, *J* 7,5 Hz, H-10).

RMN de ¹³C (125,69 MHz, CDCl₃): δ 210,1 (C-1), 174,4 (C-3), 169,4 (C-1'), 158,3 (C-3'), 135,8 (C-2), 131,6, 129,7, 128,6, 127,5 (Ph-C2'), 124,2 (C-2'), 82,2 (C-8), 74,3 (C-7), 58,0 (H₃CO-C8), 55,4 (H₃CO-C2'), 34,1 (C-4), 31,9 (C-5), 22,0 (C-9), 17,2 (C-11), 9,8 (C-10).

IX.6.5.2.8. Sínteses dos ésteres de (S)-MTPA a partir da 7-hidróxi-8-metoxijasmona obtida por biocatálise (18a).

O procedimento realizado foi idêntico ao descrito no item IX.6.5.2.7. para a obtenção do (*S*)-MTPA a partir da (±)-7-hidróxi-8-metoxijasmona, [(±)-**18a**]. Os produtos **21a** e **21b** foram obtidos como um óleo amarelo (11,5 mg, 0,027 mmol, 75%) e identificados por CG-EM, RMN de ¹H e ¹³C, DEPT 90° e 135°, ¹H e ¹H gCOSY, ¹H e¹³C HSQC e ¹H e ¹³C gHMBC. As análises por CG-EM foram realizadas sob as seguintes condições: 100°C - 290°C (20 min.) a 20°C.min⁻¹, T_{inj}= 200°C, fluxo 1 mL.min⁻¹, split50.

IX.6.5.2.8.1. Síntese do éster de (S)-Mosher da (7S)-hidróxi-(8S)-metoxijasmona

(21a).



MM: 428,18 g.mol⁻¹ (C₂₂H₂₇F₃O₅). **IE/EM** *m*/*z* (int. rel.): 428 (M^{•+}, ausente), 396 (10), 194 (15), 189 (100), 163 (18), 139 (16), 123 (30), 105 (20), 73 (48). **T**_{**R**} = 9,6 min.

RMN de ¹H (499,88 MHz, CDCl₃): δ 7,64-7,35 [5H, m,

Ph-C(2')], 5,48-5,44 (1H, m, H-7), 3,53 (3H, s, H₃CO-C2'), 3,44 (3H, s, H₃CO-C8), 3,28-3,24 (1H, m, H-8), 2,52-2,42 (4H, m, H-6 e H-5), 2,24 (2H, t, *J* 4,5 Hz, H-4), 1,79 (3H, s, H-11), 1,62-1,52 (2H, m, H-9), 0,98 (3H, t, *J* 7,5 Hz, H-10).

RMN de ¹³C (125,69 MHz, CDCl₃): δ 208,6 (C-1), 173,0 (C-3), 166,1 (C-1'), 135,4 (C-2), 132,3, 129,5, 128,2, 127,3 (Ph-C2') 122,0 (C-2'), 82,4 (C-8), 74,1 (C-7), 57,7 [H₃CO-C(8)], 55,4 [H₃CO-C(2')], 34,0 (C-4), 31,5 (C-5), 23,3 (C-6), 22,2 (C-9), 17,0 (C-11), 9,7 (C-10).

IX.6.5.3. Síntese da 7,8-diidroxijasmona (2-(2,3-diidróxi-pentil)-3-metil-2ciclopentanona) [13].



A 7,8-diidroxijasmona (13) foi obtida por biocatálise (item IX.6.5) como um óleo amarelo (0,112 mmol, 6,2% rendimento isolado).

MM: 198,13 g.mol⁻¹ ($C_{11}H_{18}O_3$).

IE/EM m/z (int. rel.): 198 (M⁺⁺, ausente), 180 (13), 140 (20), 139 (100), 111 (23), 110 (86), 95 (18), 79 (17), 67 (20), 41 (15). **T_R=10,9** min.

RMN de ¹**H** (499,88 MHz, CDCl₃): δ 3,46 (1H, m, H-7), 3,19 (1H, m, H-8), 2,60-2,56 (2H, m, H-5), 2,45-2,41 (4H, m, H-6 e H-4), 2,09 (3H, s, H-11), 1,52 (2H, m, H-9), 0,94 (3H, t, *J* 7,5 Hz, H-10).

RMN de ¹³C (125,69 MHz, CDCl₃): δ 212,1 (C-1), 174,4 (C-3), 137,3 (C-2), 74,1 (C-8), 72,6 (C-7), 34,1 (C-4), 32,1 (C-5), 28,3 (C-6), 26,1 (C-9), 17,4 (C-11), 10,2 (C-10).

IX.6.5.3.1. Síntese da (±)-7,8-diidroxijasmona [(±)-13].



Uma solução da (±)-7,8-epoxijasmona (41,2 mg, 0,229 mmol) em H₂SO₄ (0,1 M, 4,5 mL) e 1,4 dioxano:H₂O (1:9 v/v) foi agitada a temperatura ambiente. Após 16h a solução foi extraída com AcOEt (10 mL, 5 mL) e os extratos orgânicos foram combinados, lavados com H₂O (2 mL), secos com CaSO₄ e

concentrados sob pressão reduzida. O produto da reação (22,4 mg, 0,113 mmol) foi purificado por cromatografia em coluna de sílica gel, utilizando-se como eluentes CH_2Cl_2 :AcOEt, 1:1.

MM: 198,13 g.mol⁻¹ (C₁₁H₁₈O₃). **IE/EM** *m/z* (int. rel.): 198 (M^{•+}, ausente), 180 (13), 140 (20), 139 (100), 111 (23), 110 (86), 95 (18), 79 (17), 67 (20), 41 (15). **T**_R=10,9 min.

IX.6.5.3.2. Síntese de (±)-22.



Uma solução do diol (±)-13 (22,4 mg, 0,113 mmol) em anidrido acético (58 μ L) e 4-dimetilaminopiridina (0,0113 mmol) foi agitada à temperatura ambiente durante aproximadamente 12h. A reação foi acompanhada por CCD,

utilizando-se como eluentes CH₂Cl₂:AcOEt 1:1. A mistura reacional foi consecutivamente lavada com solução aquosa de ácido clorídrico 10% (5,0 mL, 2x) e sulfato de sódio (5,0 mL, 2x). A fase orgânica foi seca com Na₂SO₄ (anidro) e concentrada sob pressão reduzida. Posterior purificação por cromatografía em coluna de sílica gel eluida com mistura de solventes de polaridades crescentes, CH₂Cl₂:AcOEt 49:1; 19,6:1 e 9:1, forneceu o produto (±)-**22** como um óleo amarelo (28,4 mg, 0,107 mmol, 89%), o qual foi identificado por CG-EM, RMN de ¹H e ¹³C. As análises por CG-EM foram realizadas sob as seguintes condições: 70°C - 290 °C a 15°C.min⁻¹, T_{inj}= 220°C, fluxo 1 mL.min⁻¹, split50. **MM**: 282,15 g.mol⁻¹ (C₁₅H₂₂O₅).

IE/EM *m/z* (int. rel.): 282 (M^{•+}, ausente), 222 (10), 180 (100), 162 (38), 151 (26), 139 (94), 123 (68), 110 (85), 79 (12), 67 (11), 43 (84). **T**_R=10,7 min.

RMN de ¹**H** (499,88 MHz, CDCl₃): δ 5,14 (1H, m, H-7), 4,87 (1H, m, H-8), 2,52-2,46 (2H, m, H-5), 2,44-2,33 (4H, m, H-6 e H-4), 2,12 (3H, s, H-11), 2,08 (3H, s, -OCH₃), 2,02 (3H, s, -OCH₃), 1,61 (2H, m, H-9), 0,89 (3H, t, *J* 7,5 Hz, H-10).

RMN de ¹³C (125,69 MHz, CDCl₃): δ 208,6 (C-1), 172,2 (C-3), 170,6 (-O<u>C</u>OCH₃), 170,2 (-O<u>C</u>OCH₃), 135,8 (C-2), 74,8 (C-8), 71,8 (C-7), 24,6 (C-6), 20,9 (-OCO<u>CH₃</u>), 20,7 (-OCO<u>CH₃</u>), 31,7 (C-5), 34,0 (C-4), 23,7 (C-9), 17,3 (C-11), 9,5 (C-10).

IX.6.5.3.3. Síntese do (±)-acetonídeo (±)-23.



Conforme o procedimento descrito por Solladié *et al*¹²⁵ incluindo as devidas modificações, uma solução resfriada (0°C) da (\pm)-7,8diidroxijasmona (10,0 mg; 0,05 mol) em acetona (3,0 mL) foi preparada num balão de fundo redondo (25,0 mL) e submetida a

agitação. Após 10 min. uma solução de acetona (1,0 mL) contendo 1 gota de H₂SO₄ foi adicionada a primeira. A reação foi acompanhada por CCD, utilizando-se como eluentes CH₂Cl₂:MeOH 9:1. Após 30 min, a mistura reacional foi consecutivamente lavada com solução saturada de NaHCO₃ (10 mL, 3 x). A fase orgânica foi extraída com hexano (10 mL, 3 x) e então reunidas e adicionados Na₂SO₄ para eliminação da água residual. O solvente foi evaporado sob pressão reduzida, fornecendo o produto (±)-**23** como um óleo amarelo (9,3 mg, 0,034 mols, 78%). As análises por CG-EM foram realizadas sob as seguintes condições: 50 - 290°C a 15°C.min⁻¹, T_{inj}=220°C, fluxo 1mL.min⁻¹, split50. **MM**: 238,15 g.mol⁻¹ (C₁₄H₂₂O₃).

IE/EM *m/z* (int. rel.): 238 (M^{•+}, 4), 223 (46), 180 (100), 163 (74), 129 (71), 123 (66), 122 (43), 110 (41), 59 (68), 43 (37). **T**_R = 10,3 min.

IE/EM *m/z* (int. rel.): 238 ($M^{\bullet+}$, ausente), 223 (35), 181 (47), 180 (83), 163 (44), 151 (26), 129 (100), 110 (47), 71 (43), 59 (93), 43 (41). **T**_{**R**} = 10,8 min.

RMN de ¹**H** (300,06 MHz, CDCl₃) δ: 3,74 (1H, m, H-7), 3,57 (1H, m, H-8), 2,54-2,51 (2H, m, H-5), 2,47-2,37 (4H, m, H-6 e H-4), 2,05 (3H, s, H-11), 1,52 (2H, m, H-9), 1,34 e 1,35 (6H, d, *J* 3 Hz, (CH₃)₂-C1²), 0,99 (3H, t, *J* 7,3 Hz, H-10).

RMN de ¹³**C** (75,50 MHz, CDCl₃) δ: 171,1 (C-3), 136,6 (C-2), 107,9 (C-1'), 81,9 (C-8), 79,0 (C-7), 34,2 (C-5), 31,8 (C-4), 27,3; 27,1 (CH₃)₂-C1'), 26,8 (C-6), 25,7 (C-9), 17,8 (C-11), 10,2 (C-10).

IX.6.5.3.4. Síntese do acetonídeo 23.



A síntese do acetonídeo **23** a partir 7,8-diidroxijasmona (**13**) obtida por biocatálise foi realizada conforme descrito no item IX.6.5.3.3.

MM: 238,15 g.mol⁻¹ (C₁₄H₂₂O₃).

IE/EM m/z (int. rel.): 238 (M^{•+}, 4), 223 (46), 180 (100), 163 (74), 129 (71), 123 (66), 122 (43), 110 (41), 59 (68), 43 (37). **T**_{**R**} = 10,3 min. **IE/EM** m/z (int. rel.): 238 (M^{•+}, ausente), 223 (35), 181 (47), 180 (83), 163 (44), 129 (100), 110 (47), 71 (43), 59 (93), 43 (41). **T**_{**R**} = 10,8 min.

IX.6.6. Biotransformação da (R)-(-)-carvona utilizando células íntegras de T. cutaneum CCT 1903.

O microrganismo *T. cutaneum* CCT 1903 foi incubado em estufa conforme descrito no item IX.6.4. Após 96h a cultura foi transferida para frascos de 500 mL (12 unidades) contendo extrato de levedura e malte (100 mL), os quais foram incubados a 28°C, 96h, sob agitação (150 rpm). As células foram centrifugadas (5000 rpm, 15 min) e, então 2 gramas de massa úmida foram adicionadas em frascos de 125 mL (17 unidades) contendo tampão fosfato (50 mL, pH 6,5), juntamente com a (*R*)-(-)-carvona (20 μ L), e perfazendo um total de 340 μ L do substrato. Os controles das reações biocatalíticas foram realizados adicionando-se apenas os substratos no tampão fosfato (sem o microrganismo) e adicionando-se células da levedura no tampão fosfato (sem os substratos). Estas suspensões foram novamente incubadas sob agitação (150 rpm), e então, extraídas com AcOEt após 48h de reação biocatalítica. O solvente orgânico foi evaporado e os produtos da reação (82 mg) purificados por cromatografia em coluna de sílica gel eluida com mistura de solventes de polaridades crescentes, Hexano, Hex:AcOEt (19:1, 9:1, 17:5, 4:1, 7:3, 1:1), AcOEt. As frações semelhantes foram reunidas e analisadas por CG-EM sob as seguintes condições: 50-290°C a 15°C.min⁻¹, T_{inj}.=200°C, fluxo=1mL.min⁻¹, split 50. As frações com *m/z* 154 (3,2 mg, 0,021 mmol, 3,8%), *m/z* 168 (28,6 mg, 0,170 mmol, 31%), *m/z* 168 (2,0 mg, 0,012 mmol, 2,18%) e *m/z* 184 (5,0 mg, 0,027 mmol, 5,0%) foram identificadas por RMN de 1D.

IX.6.6.1. Síntese do (1S,2R,4R)-neoisodiidrocarveol (41).



O composto **41** foi obtido por biocatálise (item IX.6.6) como um óleo amarelo, (3,2 mg, 0,021 mmol, 3,8% rendimento isolado). **MM**: 154,14 g.mol⁻¹ C₁₀H₁₈O. $[\alpha]^{23}{}_{D} = -13,6 (c. 0,1, EtOH), [Lit.^{139} [\alpha]^{25}{}_{D} = -20 (c. 0,2, EtOH).$ **IE/EM** *m/z* (int. rel.): 154 (M^{•+}, 2), 136 (80), 121 (100), 107 (98), 93 (94), 79 (91), 67 (66), 55 (41), 41 (75). **T**_R = 6,7 min.

RMN de ¹**H** (499,88 MHz, CDCl₃) δ: 4,70 (2H, s_l, H-9), 3,89 (1H, s_l, H-2), 2,27 (1H, ddd, *J* 12,5, 3,3, 3,2 Hz, H-4), 1,91 (1H, ddd, *J* 13,3, 3,3, 3,2 Hz, H-3), 1,76 (1H, dddd, *J* 12,5, 3,5, 3,3, 3,2 Hz, H-5), 1,72 (3H, s, H-10), 1,56 (1H, m, H-1), 1,46 (2H, m, H-6), 1,42 (1H, m, H-3), 1,25 (1H, dddd, *J* 12,5, 12,4, 4,5, 3,2 Hz, H-5), 0,97 (3H, d, *J* 6,0 Hz, H-7). **RMN** de ¹³**C** (125,69 MHz, CDCl₃) δ: 150,3 (C-8), 108,4 (C-9), 71,0 (C-2), 38,6 (C-3), 37,8 (C-4), 36,0 (C-1), 31,4 (C-5), 28,1 (C-6), 21,0 (C-7), 18,3 (C-10)

IX.6.6.2. Síntese da (6R)-isoprenil-(3R)-metil-2-oxo-oxepanona (42).



O composto **42** foi obtido por biocatálise (item IX.6.6) como um óleo amarelo, (28,6 mg, 0,170 mmol, 31% rendimento isolado).

MM: 168,12 g.mol⁻¹ ($C_{10}H_{16}O_2$).

IE/EM *m/z* (int. rel.): 168 ($M^{\bullet+}$, 13), 156 (21), 138 (19), 123 (33), 109 (40), 95 (64), 83 (91), 67 (100), 55 (66), 41 (98). **T**_{**R**} = 9,4 min

RMN de ¹**H** (499,88 MHz, CDCl₃) δ: 4,94, 4,83 (2H, m, H-10), 3,53 (2H, m, H-7), 2,44 (1H, m, H-6), 2,26 (1H, m, H-3), 1,67 (3H, s, H-11), 1,61 (1H, m, H-5), 1,45-1,35 (3H, m, H-4, H-5), 1,18 (3H, d, *J* 7,0 Hz, H-8).

RMN de ¹³C (125,69 MHz, CDCl₃) δ: 182,3 (C-2), 144,5 (C-9), 114,1 (C-10), 64,0 (C-7), 49,8 (C-6), 39,3 (C-3), 31,0 (C-5), 26,6 (C-4), 18,7 (C-11), 16,7 (C-8).

IX.6.6.3. Síntese do ácido-(3R)-isopropenil-6-oxo-heptanóico (43).



O composto **43** foi obtido por biocatálise (item IX.6.6) como um óleo amarelo, (5,0 mg, 0,027 mmol, 5% rendimento isolado). **MM**: 184,11 g.mol⁻¹ (C₁₀H₁₆O₃). **IE/EM** *m/z* (int. rel.): 184 (M^{•+}, ausente), 166 (M^{•+}-H₂O, 28), 151 (8), 123 (26), 107 (25), 95 (25), 79 (25), 67 (23), 53 (22), 43 (100). **T**_R = 8,9 min.

RMN de ¹H (499,88 MHz, CDCl₃) δ: 4,82, 4,77 (2H, m, H-9), 2,57 (1H, m, H-3), 2,41 (4H, m, H-2 e H-5), 2,13 (3H, s, H-7), 1,74 (2H, m, H-4), 1,66 (3H, d, *J* 5.1 Hz, H-10).
RMN de ¹³C (125,69 MHz, CDCl₃) δ: 208,6 (C-6), 178,0 (C-1), 145,0 (C-8), 113,1 (C-9), 42,8 (C-3), 41,1 (C-5), 38,7 (C-2), 30,0 (C-7), 26,2 (C-4), 18,4 (C-10).

IX.6.6.4. Síntese da 2,3-epóxi-(5R)-isopropenil-2-metilcicloexenol (44).



O composto **44** foi obtido por biocatálise (item IX.6.6) como um óleo amarelo, (2,0 mg, 0,012 mmol, 2,2% rendimento isolado). **MM:** 168,12 g.mol⁻¹ (C₁₀H₁₆O₂). **IE/EM** *m/z* (int. rel.): 168 (M^{•+}, 4), 150 (13), 135 (19), 109 (67), 91

(100), 79 (60), 67 (60), 53 (37), 43 (77). **T**_{**R**} = 7,7 min.

RMN de ¹H (300,06 MHz, CDCl₃) δ: 4,70 (2H, H-9), 4,18 (1H, H-2),

3,11 (1H, d, J 5.1 Hz, H-6), 2,45-1,20 (5H, m, H-3, H-4, H-5), 1,68 (3H, s, H-10), 1,42 (3H, s, H-7).

RMN de ¹³C (75,50 MHz, CDCl₃) δ: 148,4 (C-8), 109,6 (C-9), 77,0 (C-2), 69,6 (C-6), 60,0 (C-1), 33,0 (C-4), 32,9 (C-3), 28,9 (C-5), 20,2 (C-10), 19,5 (C-7).

IX.6.6.4.1. Síntese do (±)-carveol (±)-48.



Uma solução de hidreto de diisobutilalumínio (DIBALH) em hexano (1,0 M, 3,2 mmol) foi adicionada a uma solução de (*R*)-(-)-carvona **24** (100,0 mg, 0,67 mmol) em THF (6,7 mL) a 0 °C. Após 30 min adicionou-se AcOEt (0,6 mL) cuidadosamente para eliminar o excesso de hidreto, seguido pela adição de H₂O (0,8 mL). Esta solução foi diluída em Et₂O (12 mL) e H₂O (6,0 mL). Adicionou-se HCl_{aq}. 1 mol.L⁻¹ (8,0 mL) para

dissolver o sal de alumínio e então as fases foram separadas. A fase aquosa foi extraída com 2 porções de Et_2O (4,0 mL). Os extratos orgânicos foram combinados e lavados com solução aquosa de NaHCO₃ saturado (8,0 mL) e solução salina (8,0 mL), seca com MgSO₄ (anidro) e concentrado a vácuo. Após a análise por CCD utilizando-se como eluentes Hex:AcOEt (4:1), o produto da reação (60 mg, 0,39 mmol, 66%) foi analisado por CG-EM e RMN de ¹H. Aspecto físico: óleo amarelo.

MM: 152,12 g.mol⁻¹ (C₁₀H₁₆O).

IE/EM *m/z* (int. rel.): 152 ($M^{\bullet+}$, 2), 134 (61), 119 (52), 109 (62), 91 (100), 84 (67), 77 (57), 67 (35), 55 (43), 41 (64). **T**_{**R**} = 7,0 min.

RMN de ¹H (300,06 MHz, CDCl₃): δ 5,49 (1H, m, H-3), 4,73 (2H, s, H-9), 4,19 (1H, m, H-1), 2,4-1,5 (5H, m, H-4, H-5, H-6), 1,76 (3H, s, H-10), 1,74 (3H, s, H-7).

IX.6.6.4.2. Síntese da (±)-2,3-epóxi-(5R)-isopropenil-2-metilcicloexenol [(±)-44].



A epoxidação do (±)-carveol (60,0 mg, 0,39 mmol) foi realizada seguindo-se o procedimento descrito no item IX.6.5.2.1. Posterior purificação por cromatografia em coluna de sílica gel eluida com mistura de solventes de polaridades crescentes, Hex:AcOEt (9:1–1:1) forneceu o produto como um óleo amarelo (27,5 mg, 0,164 mmol, 42%). **MM**: 168,12 g.mol⁻¹ ($C_{10}H_{16}O_{2}$).

IE/EM *m/z* (int. rel.): 168 ($M^{\bullet+}$, 4), 150 (5), 135 (9), 125 (24), 109 (43), 91 (48), 79 (48), 67 (63), 53 (48), 43 (100). **T**_R = 7,7 min.

RMN de ¹**H** (300,06 MHz, CDCl₃): δ 4,70 (2H, m, H-9), 3,85 (1H, s_L, H-1), 3,16 (1H, d, *J* 5,1 Hz, H-3), 2,04-1,93 (1H, m, H-5), 1,82-1,70 (1H, m, H-6), 1,68 (3H, s, H-10), 1,45 (3H, s, H-7), 1,40-1,26 (3H, m, H-4, H-6).

RMN de ¹³C (75,50 MHz, CDCl₃): δ 147,5 (C-8), 109,7 (C-9), 72,3 (C-1), 62,3 (C-3), 60,3 (C-2), 40,5 (C-5), 34,1 (C-6), 29,2 (C-4), 20,3 (C-10), 19,3 (C-7).

IX.6.7. Biotransformações das α - e β -iononas utilizando células íntegras de *T*. *cutaneum* CCT 1903.

O microrganismo T. cutaneum CCT 1903 foi incubado em estufa conforme descrito no item IX.6.4. Após 96h a cultura foi transferida para frascos de 500 mL (13 unidades) contendo extrato de levedura e malte (100 mL), os quais foram incubados a 28°C, 96h, sob agitação (150 rpm). As células foram centrifugadas (5000 rpm, 15 min) e, então 2,0 gramas de massa úmida foram adicionadas em frascos de 125 mL (18 unidades) contendo tampão fosfato (50 mL, pH 6,5), juntamente com 20,0 μ L de uma mistura de α - e β -iononas, perfazendo um total de 360,0 µL do substrato. Os controles das reações biocatalíticas foram realizados adicionando-se apenas os substratos no tampão fosfato (sem o microrganismo) e adicionando-se células da levedura no tampão fosfato (sem os substratos). Estas suspensões foram novamente incubadas sob agitação (150 rpm), e então, extraídas com AcOEt após 72h de reação biocatalítica. O solvente orgânico foi evaporado e os produtos da reação (139 mg) purificados por cromatografia em coluna de sílica gel, eluida com mistura de solventes de polaridades crescentes, Hex:AcOEt (9:1-1:1). As frações foram reunidas e analisadas por CG-EM sob as seguintes condições: 50-290°C a 15°C.min⁻¹, T_{inj}.=200°C, fluxo=1mL.min⁻¹, splitl 50. As frações com m/z 208 (20,9 mg) e m/z 168 (27,8 mg) foram analisadas por RMN de ¹H. A fração com m/z 168 (27,8 mg) foi purificada por cromatografia em coluna de sílica gel, eluida com mistura de solventes de polaridades crescentes, Hex:AcOEt (48:1, 19:1, 9:1, 1:1). A fração com m/z 208 (20,9 mg) foi purificada por cromatografia em camada delgada preparativa, utilizando-se como eluentes Hex:AcOEt 7:3. As frações foram re-analisadas por CG-EM sob as condições citadas anteriormente e então identificadas por RMN 1D e RMN 2D.

IX.6.7.1. Síntese da 4-oxo-7,8-diidro-β-ionona (50).



O composto **49** foi obtido por biocatálise (item IX.6.7) como um óleo amarelo (8,0 mg, 0,038 mmol, 5,3% rendimento isolado). **MM**: 208,15 g.mol⁻¹ (C₁₃H₂₀O₂). **IE/EM** *m/z* (int. rel.): 208 (M^{•+}, 41), 165 (100), 151 (15), 137 (56), 135 (42), 123 (37), 109 (37), 107 (36), 93 (18), 79 (23), 55

(16), 43 (47). $T_R = 10,9$ min.

RMN de ¹H (300,06 MHz, CDCl₃) δ: 2,59 (2H, m, H-8), 2,47 (4H, m, H-3 e H-7), 2,19 (3H, s, H-10), 1,81 (2H, t, *J* 6.9 Hz, H-2), 1,73 (3H, s, H-13), 1,15 (6H, s, H-11 e H-12).
RMN de ¹³C (75,50 MHz, CDCl₃) δ: 207,0 (C-9), 198,8 (C-4), 163,4 (C-6), 131,3 (C-5), 42,2 (C-8), 37,2 (C-2), 36,4 (C-1), 34,1 (C-3), 29,8 (C-10), 26,7 (C-11 e C-12), 24,0 (C-7), 11,4 (C-13).

IX.6.7.2. Síntese do α-homo-ciclogeraniol (51).



O composto **48** foi obtido foi obtido por biocatálise (item IX.6.7) como um óleo amarelo (6,0 mg, 0,036 mmol, 5% rendimento isolado).

MM: 168,15 g.mol⁻¹ (C₁₁H₂₀O).

IE/EM *m/z* (int. rel.): 168 ($M^{\bullet+}$,2), 124 (53), 112 (32), 109 (41), 107 (35), 94 (35), 93 (21), 91 (30), 84 (23), 83 (23), 82 (31), 81 (100), 79 (54), 77 (23), 67 (31), 53 (18), 41 (34). T_R = 7,8 min.

RMN de ¹**H** (300,06 MHz, CDCl₃) δ: 5,32 (1H, s₁, H-4), 3,69 (2H, t, 7,5 Hz, H-8), 2,36 (2H, t, *J* 8.0 Hz, H-2), 1,97 (2H, m, H-3), 1,77 e 1,65 (2H, m, H-7), 1,71 (3H, d, *J* 2.0 Hz, H-11), 1,51 (1H, m, H-6), 0,92 (3H, s, H-10), 0,89 (3H, s, H-9).

RMN de ¹³C (75,50 MHz, CDCl₃) δ: 136,4 (C-5), 120,4 (C-4), 63,5 (C-8), 45,9 (C-6), 34,4 (C-7), 32,4 (C-1), 31,3 (C-2), 27,3 (C-9), 27,2 (C-10), 23,4 (C-11), 23,0 (C-3).

IX.6.8. Biotransformação do (R)-(+)-limoneno utilizando células íntegras de T. cutaneum CCT 1903.

O microrganismo T. cutaneum CCT 1903 foi incubado em estufa conforme descrito no item IX.6.4. Após 96h a cultura foi transferida para frascos de 500 mL (10 unidades) contendo extrato de levedura e malte (100 mL), os quais foram incubados a 28°C, 96h, sob agitação (150 rpm). As células foram centrifugadas (5000 rpm, 15 min) e, então 2,0 gramas de massa úmida foram adicionadas em frascos de 125 mL (10 unidades) contendo tampão fosfato (50 mL, pH 6,5), juntamente com (R)-(+)-limoneno (20 μ L), perfazendo um total de 200 µL do substrato. Os controles das reações biocatalíticas foram realizados adicionandose apenas os substratos no tampão fosfato (sem o microrganismo) e adicionando-se células da levedura no tampão fosfato (sem os substratos). Estas suspensões foram novamente incubadas sob agitação (150 rpm), e então, extraídas com AcOEt após 96h de reação biocatalítica. O solvente orgânico foi evaporado e os produtos da reação (42mg) purificados por cromatografia em coluna de sílica gel eluida com mistura de solventes de polaridades crescentes, Hex:AcOEt (9:1-1:1). As frações foram reunidas e analisadas por CG-EM (Coluna: HP-5MS - Crosslinked 5% fenilmetilsiloxano) sob as seguintes condições: 50 -290°C a 15°C.min⁻¹, T_{ini}.=200°C, fluxo=1mL.min⁻¹, splitl 50. As frações com m/z 152 (3,2 mg) e m/z 152 (2,6 mg) foram identificadas por RMN 1D.

IX.6.8.1. Síntese do limoneno-1,2-diol (54).



O composto **39** foi obtido por biocatálise (item IX.6.8) como um óleo amarelo, (2,6 mg, 0,015 mmol, 5% rendimento isolado). **MM**: 170,25 g.mol⁻¹ (C₁₀H₁₈O₂). **IE/EM** *m/z* (int. rel.): 170 ($M^{\bullet+}$, ausente), 152 ($M^{\bullet+}$ -H₂O, 20), 137 (23), 123 (17), 108 (36), 79 (41), 71 (70), 67 (56), 55 (28), 43 (100). **T**_R = 8,0 min.

RMN de ¹H (499,88 MHz, CDCl₃) δ: 4,71 (2H, m, H-9), 3,67 (1H, s₁, H-2), 2,40-2,23 (1H, m, H-4), 1,95-1,50 (6H, m, H-3, H-5, H-6), 1,73 (3H, s, H-10), 1,26 (3H, s, H-7).
RMN de ¹³C (125,69 MHz, CDCl₃) δ: 149,1 (C-8), 108,9 (C-9), 73,7 (C-2), 71,9 (C-1), 37,5 (C-4), 34,4 (C-6), 34,1 (C-3), 28,2 (C-5), 24,5 (C-7), 21,2 (C-10).

IX.6.8.2. Síntese do (+)-(4*R*)-*p*-1-menteno-8,9-diol (55).



O composto **40** foi obtido por biocatálise (item IX.6.8) como um óleo amarelo, (3,2 mg, 0,019 mmol, 6,1% rendimento isolado). **MM**: 170,13 g.mol⁻¹ (C₁₀H₁₈O₂). **IE/EM** *m/z* (int. rel.): 170 (M^{•+}, ausente), 152 (M^{•+}-H₂O, 37), 139 (41), 121 (100), 95 (49), 79 (31), 71 (33), 57 (27), 43 (74). **T**_R = 8,9 min. **RMN** de ¹**H** (499,88 MHz, CDCl₃) δ : mistura 6:5 de (4*R*,8*R*) e (4*R*,8*S*);

5,41 (*R*), 5,35 (*S*), (1H, m, H-2), 3,58, 3,44 (*R*), 3,55, 3,40 (*S*), (2H, qAB, *J* 10,8 Hz, H-9), 1,98 (2H, m, 2 x OH), 1,65 (3H, s, CH₃-7), 1,13 (*R*), 1,09 (*S*), (3H, s, CH₃-10). **RMN** de ¹³C (125,69 MHz, CDCl₃) δ: mistura 6:5 de (4*R*,8*R*); 134,3 (C-1), 120,0 (C-2), 74,6 (C-8), 68,6 (C-9), 40,8 (C-4), 30,8 (C-6), 26,9 (C-3), 23,0 (C-5), 23,4 (C-7), 19,4 (C-10) e (4*R*, 8*S*), 133,9 (C-1), 120,4 (C-2), 74,6 (C-8), 68,3 (C-9), 40,6 (C-4), 31,0 (C-6), 25,8 (C-3), 24,3 (C-5), 23,3 (C-7), 20,5 (C-10). Capítulo X

Anexo
Anexo

E01:	Espectro de RMN de ¹ H (300,06 MHz, CDCl ₃) da (\pm)-5-metil- ϵ -caprolactona (1a	
	e 1b)	177
E02:	Espectro de RMN de ^{13}C (75,45 MHz, CDCl3) da (±)-5-metil- $\epsilon\text{-caprolactona}$ (1a	
	e 1b)	177
E03:	Espectro de massas obtido por ionização de elétrons (70 eV) do adipato de	
	dimetila (10)	178
E04:	Espectro de RMN de ¹ H (300,06 MHz, CDCl ₃) do adipato de dimetila (10)	178
E05:	Espectro de massas obtido por ionização de elétrons (70 eV) da 2-carbometoxi-	
	ciclopentanona (11)	179
E06:	Espectro de RMN de ¹ H (300,06 MHz, CDCl ₃) da 2-carbometoxiciclopentanona	
	(11)	179
E07:	Espectro de RMN de ¹³ C (75,45 MHz, CDCl ₃) da 2-carbometoxi-ciclopentanona	
	(11)	180
E08:	Espectro de RMN de ${}^{13}C_{1}^{1}H_{1}^{1}$ (a) DEPT 90° e (b) DEPT 135° (75,45 MHz,	
	CDCl ₃) da 2-carbometoxiciclopentanona (11)	180
E09:	Espectro de massas obtido por ionização de elétrons (70 eV) da 2-alil-2-	
	carbometoxiciclopentanona (7)	181
E10:	Espectro de RMN de ¹ H (300,06 MHz, CDCl ₃) da 2-alil-2-	
	carbometoxiciclopentanona (7)	181
E11:	Espectro de RMN de ¹³ C (75,45 MHz, CDCl ₃) da 2-alil-2-	
	carbometoxiciclopentanona (7)	182
E12:	Espectro de RMN de ${}^{13}C({}^{14}H)$ (a) DEPT 90° e (b) DEPT 135° (75,45 MHz,	100
-	CDCl ₃) da 2-alil-2-carbometoxiciclopentanona (7)	182
E13:	Espectro de massas obtido por ionização de eletrons (70 eV) do cis - e trans-2-	102
F14	metileicloexanol (6a e 6b) obtido por biocatalise	183
E14:	Espectro de massas obtido por ionização de eletrons (70 eV) do (±)-2-	102
	metilcicloexanol $[(\pm)-6a \ e \ 6b]$	185
E15:	Espectro de massas obtido por ionização de elétrons (70 eV) da 7,8-epoxijasmona	104
F1 (184
E16:	Espectro de massas obtido por ionização de eletrons (70 eV) do cis e trans 4-	104
515	metricicioexanol (Ic) (10)	184
E17:	Espectro de Kivin de H (499,88 MHz, $CDCI_3$) da /,8-epoxijasmona (12) e da	

	(\pm)-7,8-diidroxijasmona [(\pm)-13].	185
E18:	Espectro de RMN de ¹³ C (125,69 MHz, CDCl ₃) da 7,8-epoxijasmona (12) e da	
	(±)-7,8-diidroxijasmona [(±)-13].	185
E19:	Espectro de massas obtido por ionização de elétrons (70 eV) da 7,8-	
	diidroxijasmona (13)	186
E20:	Espectro de massas obtido por ionização de elétrons (70 eV) da 4-hidroxijasmona	
	(14)	186
E21:	Espectro de RMN de ¹ H (499,88 MHz, CDCl ₃) da 4-hidroxijasmona (14)	187
E22:	Espectro de RMN 2D (¹ H e ¹ H gCOSY, 499,88 MHz ,CDCl ₃) da 4-	
	hidroxijasmona (14)	187
E23:	Espectro de RMN de ¹³ C (125,69 MHz, CDCl ₃) da 4-hidroxijasmona (14)	188
E24:	Espectro de RMN de ${}^{13}C_{1}^{1}H_{1}^{1}$ (a) DEPT 90° e (b) DEPT 135° (125,69 MHz,	
	CDCl ₃) da 4-hidroxijasmona (14)	188
E25:	Espectro de RMN 2D (¹ H e ¹³ C HETCOR, CDCl ₃) da 4-hidroxijasmona (14)	189
E26:	Espectro de massas obtido por ionização de elétrons (70 eV) do (R)-MTPA da 4-	
	hidroxijasmona (14a)	189
E27:	Espectro de massas obtido por ionização de elétrons (70 eV) do (S)-MTPA da 4-	
	hidroxijasmona (14b)	190
E28:	Espectro de RMN de ¹ H (499,88 MHz, CDCl ₃) do (R)-MTPA da 4-	
	hidroxijasmona (14a)	190
E29:	Espectro de RMN de 'H (300.06 MHz, CDCl ₃) do (S)-MTPA da 4-	
	hidroxijasmona (14b)	191
E30:	Espectro de RMN de 'H (499,88 MHz, CDCl ₃) da 7,8-epoxijasmona (12)	191
E31:	Espectro de RMN 2D ('H e 'H gCOSY, 499,88 MHz ,CDCl ₃) da 7,8-	100
	epoxijasmona (12) $\sum_{i=1}^{n} \sum_{j=1}^{n} \sum_{i=1}^{n} \sum_{i=1}^{n$	192
E32:	Espectro de RMN de 12 C (125,69 MHz, CDCl ₃) da 7,8-epoxijasmona (12)	192
E33:	Espectro de RMN de $C(^{+}H)$ (a) DEPT 90° e (b) DEPT 135° (125,69 MHz,	102
	$CDCl_3$) da 7,8-epoxijasmona (12)	193
E34:	Espectro de RMN 2D ('H e 13 C HETCOR, CDCl ₃) da 7,8-epoxijasmona (12)	193
E35:	Espectro de RMN de 'H (499,88 MHz, CDCl ₃) da (\pm)-7,8-epoxijasmona [(\pm)-12]	104
	e da (\pm)-7,8-diidroxijasmona [(\pm)-13	194
E36:	Espectro de RMN de ¹³ C (125,69 MHz, CDCl ₃) da (\pm)-7,8-epoxijasmona [(\pm)-12]	
	e da (\pm)-7,8-diidroxijasmona [(\pm)-13]	194

E37:	Espectro de RMN de ¹ H (499,88 MHz, CDCl ₃) da (\pm)-7,8-epoxijasmona [(\pm)12]	195
E38:	Espectro de RMN de 13 C (125,69 MHz, CDCl ₃) da (±)-7,8-epoxijasmona [(±)-12]	195
E39:	Espectro de massas obtido por ionização de elétrons (70 eV) do composto 17	196
E40:	Espectro de massas obtido por ionização de elétrons (70 eV) do composto (\pm)-16a	
	ou (±)-16b	196
E41:	Espectro de massas obtido por ionização de elétrons (70 eV) do composto (\pm)-16a	
	ou (±)-16b	197
E42:	Espectro de massas obtido por ionização de elétrons (70 eV) da (\pm)-7-hidróxi-8-	
	metoxijasmona [(±)-18a]	197
E43:	Espectro de massas obtido por ionização de elétrons (70 eV) da (±)-7-metóxi-8-	
	hidroxijasmona [(±)-18b]	198
E44:	Espectro de RMN de ¹ H (499,88 MHz, CDCl ₃) da (±)-7-hidróxi-8-metoxijasmona	
	[(±)-18a] e da (±)-7-metóxi-8-hidroxijasmona [(±)-18b]	198
E45:	Espectro de RMN 2D (¹ H e ¹ H gCOSY, 499,88 MHz ,CDCl ₃) da (±)-7-hidróxi-8-	
	metoxijasmona [(±)-18a] e da (±)-7-metóxi-8-hidroxijasmona [(±)-18b]	199
E46:	Espectro de RMN de 13 C (125,69 MHz, CDCl ₃) da (±)-7-hidróxi-8-	
	metoxijasmona [(±)-18a] e da (±)-7-metóxi-8-hidroxijasmona [(±)-18b]	199
E47:	Espectro de RMN de ${}^{13}C\langle {}^{1}H \rangle$ (a) DEPT 90° e (b) DEPT 135° (125,69 MHz,	
	CDCl ₃) da (±)-7-hidróxi-8-metoxijasmona [(±)-18a] e da (±)-7-metóxi-8-	
	hidroxijasmona [(±)-18b]	200
E48:	Espectro de RMN 2D (¹ H e ¹³ C HSQC, CDCl ₃) da (±)-7-hidróxi-8-	
	metoxijasmona [(±)-18a] e da (±)-7-metóxi-8-hidroxijasmona [(±)-18b]	200
E49:	Espectro de RMN de ¹ H (300,06 MHz, CDCl ₃) do (±)-1-hidróxi-2-metoxidecano	
	[(±)-20a] e (±)-1-metóxi-2-hidroxidecano [(±)-20b]	201
E50:	Espectro de RMN de ¹³ C (75,45 MHz, CDCl ₃) do (±)-1-hidróxi-2-metoxidecano	
	[(±)-20a] e (±)-1-metóxi-2-hidroxidecano [(±)-20b]	201
E51:	Espectro de RMN de ${}^{13}C_1^{1}H_1^{1}$ (a) DEPT 90° e (b) DEPT 135° (75,45 MHz,	
	CDCl ₃) do (\pm) -1-hidróxi-2-metoxidecano $[(\pm)$ -20a] e (\pm) -1-metóxi-2-	
	hidroxidecano [(±)-20b]	202
E52:	Espectro de massas obtido por ionização de elétrons (70 eV) da 7-hidróxi-8-	
	metoxijasmona (18a)	202
E53:	Espectro de massas obtido por ionização de elétrons (70 eV) da 7-metóxi-8-	
	hidroxijasmona (18b)	203

E54:	Espectro de RMN de ¹ H (499,88 MHz, CDCl ₃) da (±)-7-hidróxi-8-metoxijasmona	
	(18a) e da (±)-7-metóxi-8-hidroxijasmona (18b)	203
E55:	Espectro de RMN de ¹³ C (75,45 MHz, CDCl ₃) da 7-hidróxi-8-metoxijasmona	
	(18a) e da 7-metóxi-8-hidroxijasmona (18b)	204
E56:	Espectro de RMN de $^{13}\text{C}^{\{^1\text{H}\}}$ (a) DEPT 90° e (b) DEPT 135° (75,45 MHz,	
	CDCl ₃) da 7-hidróxi-8-metoxijasmona (18a) e da 7-metóxi-8-hidroxijasmona	
	(18b)	204
E57:	Espectro de massas obtido por ionização de elétrons (70 eV) do composto	
	(±)- 21a	205
E58:	Espectro de massas obtido por ionização de elétrons (70 eV) do composto	
	(±)- 21b	205
E59:	Espectro de RMN de ¹ H (499,88 MHz, CDCl ₃) dos ésteres do (S)-MTPA dos	
	compostos (±)-21a e (±)-21b	206
E60:	Espectro de RMN 2D (¹ H e ¹ H gCOSY, 499,88 MHz ,CDCl ₃) dos ésteres do (S)-	
	MTPA dos compostos (±)-21a e (±)-21b	206
E61:	Espectro de RMN de ¹³ C (125,69 MHz, CDCl ₃) dos ésteres do (S)-MTPA dos	
	compostos (±)-21a e (±)-21b	207
E62:	Espectro de RMN de ${}^{13}C_1^{1}H_1^{1}$ (a) DEPT 90° e (b) DEPT 135° (125,69 MHz,	
	CDCl ₃) dos ésteres do (S)-MTPA dos compostos (±)-21a e (±)-21b	207
E63:	Espectro de RMN 2D (¹ H e ¹³ C HSQC, CDCl ₃) dos ésteres do (S)-MTPA dos	
	compostos (±)-21a e (±)-21b	208
E64:	Espectro de massas obtido por ionização de elétrons (70 eV) do éster do (S)-	
	MTPA do composto 21a	208
E65:	Espectro de massas obtido por ionização de elétrons (70 eV) do éster do (S)-	
	MTPA do composto 21b	209
E66:	Espectro de RMN de ¹ H (499,88 MHz, CDCl ₃) dos ésteres do (S)-MTPA dos	
	compostos 21a e 21b	209
E67:	Espectro de RMN 2D (¹ H e ¹ H COSY, 499,88 MHz ,CDCl ₃) dos ésteres do (S)-	
	MTPA dos compostos 21a e 21b	210
E68:	Espectro de RMN de ¹³ C (125,69 MHz, CDCl ₃) dos ésteres do (S)-MTPA dos	
	compostos 21a e 21b	210
E69:	Espectro de RMN de ${}^{13}C_{1}^{1}H_{1}^{1}$ (a) DEPT 90° e (b) DEPT 135° (125,69 MHz,	
	CDCl ₃) dos ésteres do (S)-MTPA dos compostos 21a e 21b	211

E70:	Espectro de RMN 2D (¹ H e ¹³ C HSQC, CDCl ₃) dos ésteres do (S)-MTPA dos	011
		211
E71:	Espectro de RMN 2D ('H e 'C gHMBC, CDCl ₃) dos esteres do (S)-M1PA dos	
		212
E72:	Espectro de RMN de 'H (499,88 MHz, $CDCl_3$) da 7,8-diidroxijasmona (13)	212
E73:	Espectro de RMN 2D ('H e 'H gCOSY, 499,88 MHz ,CDCl ₃) da 7,8-	
	diidroxijasmona (13)	213
E74:	Espectro de RMN de ¹³ C (125,69 MHz, CDCl ₃) da 7,8-diidroxijasmona (13)	213
E75:	Espectro de RMN de ${}^{13}C{}^{1}H{}$ (a) DEPT 90° e (b) DEPT 135° (125,69 MHz,	
	$CDCl_3$) da 7,8-diidroxijasmona (13)	214
E76:	Espectro de RMN 2D (¹ H e ¹³ C HETCOR, CDCl ₃) da 7,8-diidroxijasmona (13)	214
E77:	Espectro de RMN de 13 H (300,06 MHz, CDCl ₃) do composto (±)-22	215
E78:	Espectro de RMN de 13 C (75,45 MHz, CDCl ₃) do composto (±)-22	215
E79:	Espectro de massas obtido por ionização de elétrons (70 eV) do trans (±)-	
	acetonídeo (±)-23	216
E80:	Espectro de massas obtido por ionização de elétrons (70 eV) do cis (±)-	
	acetonídeo (±)-23	216
E81:	Espectro de RMN de ¹ H (300,06 MHz, CDCl ₃) do (\pm)-acetonídeo (\pm)-23	217
E82:	Espectro de RMN de 13 C (75,45 MHz, CDCl ₃) do (±)-acetonídeo (±)- 23	217
E83:	Espectro de RMN de ${}^{13}C_{1}^{1}H_{1}^{1}$ (a) DEPT 90° e (b) DEPT 135° (75,45 MHz,	
	$CDCl_3$) do (±)-acetonídeo (±)-23	218
E84:	Espectro de massas obtido por ionização de elétrons (70 eV) do trans acetonídeo	
	23	218
E85:	Espectro de massas obtido por ionização de elétrons (70 eV) do cis acetonídeo 23	219
E86:	Espectro de massas obtido por ionização de elétrons (70 eV) do (1S,2R,4R)-	
	neoisodiidrocarveol (41)	219
E87:	Espectro de massas obtido por ionização de elétrons (70 eV) da redução da α - ou	
	β-iononas (26 ou 27)	220
E88:	Espectro de massas obtido por ionização de elétrons (70 eV) da 4-oxo-7,8-diidro-	
	β-ionona (50)	220
E89:	Espectro de massas obtido por ionização de elétrons (70 eV) da (6R)-isoprenil-	
	(3 <i>R</i>)-metil-2-oxo-oxepanona (42)	221
E90:	Espectro de massas obtido por ionização de elétrons (70 eV) do limoneno-1,2-	

	diol (54)	221
E91:	Espectro de RMN de ¹ H (300,06 MHz, CDCl ₃) do $(1S,2R,4R)$ -	
	neoisodiidrocarveol (41)	222
E92:	Espectro de RMN de ¹³ C (125,69 MHz, CDCl ₃) do $(1S,2R,4R)$ -	
	neoisodiidrocarveol (41)	222
E93:	Espectro de RMN de ${}^{13}C_{1}^{\downarrow}H_{1}^{\downarrow}$ (a) DEPT 90° e (b) DEPT 135° (125,69 MHz,	
	$CDCl_3$) do $(1S,2R,4R)$ -neoisodiidrocarveol (41)	223
E94:	Espectro de RMN de ¹ H (499,88 MHz, $CDCl_3$) e experimento de nOe da (6 <i>R</i>)-	
	isoprenil-(3 <i>R</i>)-metil-2-oxo-oxepanona (42).	223
E95:	Espectro de RMN de ¹³ C (125,69 MHz, CDCl ₃) da (6 <i>R</i>)-isoprenil-(3 <i>R</i>)-metil-2-	
	oxo-oxepanona (42)	224
E96:	Espectro de RMN de ${}^{13}C_1^{\downarrow}H_1^{\downarrow}$ (a) DEPT 90° e (b) DEPT 135° (125,69 MHz,	
	$CDCl_3$) da (6 <i>R</i>)-isoprenil-(3 <i>R</i>)-metil-2-oxo-oxepanona (42)	224
E97:	Espectro de massas obtido por ionização de elétrons (70 eV) do ácido (3R)-	
	isopropenil-6-oxo-heptanóico (43)	225
E98:	Espectro de RMN de ¹ H (300,06 MHz, CDCl ₃) do ácido (3 R)-isopropenil-6-oxo-	
	heptanóico (43)	225
E99:	Espectro de RMN de 13 C (125,69 MHz, CDCl ₃) do ácido (3 <i>R</i>)-isopropenil-6-oxo-	
	heptanóico (43)	226
E100:	Espectro de RMN de ${}^{13}C{}^{1}H{}$ (a) DEPT 90° e (b) DEPT 135° (125,69 MHz,	
	CDCl ₃) do ácido (3 <i>R</i>)-isopropenil-6-oxo-heptanóico (43)	226
E101:	Espectro de massas obtido por ionização de elétrons (70 eV) do $2,3$ -epóxi-($5R$)-	
	isopropenil-2-metilcicloexenol [(±)-44]	227
E102:	Espectro de RMN de ¹ H (300,06 MHz, CDCl ₃) do 2,3-epóxi-($5R$)-isopropenil-2-	
	metilcicloexenol [(±)-44]	227
E103:	Espectro de RMN de ¹³ C (75,45 MHz, CDCl ₃) do 2,3-epóxi-(5 R)-isopropenil-2-	
	metilcicloexenol [(±)-44]	228
E104:	Espectro de RMN de ${}^{13}C{}^{1}H{}$ (a) DEPT 90° e (b) DEPT 135° (75,45 MHz,	
	CDCl ₃) do 2,3-epóxi-(5 <i>R</i>)-isopropenil-2-metilcicloexenol [(±)-44]	228
E105:	Espectro de massas obtido por ionização de elétrons (70 eV) do 2,3-epóxi-(5R)-	
	isopropenil-2-metilcicloexenol (44)	229
E106:	Espectro de RMN de ¹ H (499,88 MHz, CDCl ₃) da 4-oxo-7,8-diidro- β -ionona (50)	
		229

E107:	Espectro de RMN 2D (¹ H e ¹ H gCOSY, 499,88 MHz ,CDCl ₃) da 4-oxo-7,8-	
	diidro-β-ionona (50)	230
E108:	Espectro de RMN de ¹³ C (125,69 MHz, CDCl ₃) da 4-oxo-7,8-diidro-β-ionona	
	(50)	230
E109:	Espectro de RMN de ${}^{13}C_1^{\downarrow 1}H_1^{\downarrow}$ (a) DEPT 90° e (b) DEPT 135° (125,69 MHz,	
	CDCl ₃) da 4-oxo-7,8-diidro-β-ionona (50)	231
E110:	Espectro de RMN 2D (¹ H e ¹³ C HETCOR, CDCl ₃) da 4-oxo-7,8-diidro-β-ionona	
	(50)	231
E111:	Espectro de RMN 2D (¹ H e ¹³ C gHMBC, CDCl ₃) da 4-oxo-7,8-diidro-β-ionona	
	(50)	232
E112:	Espectro de massas obtido por ionização de elétrons (70 eV) do α -homo-	
	ciclogeraniol (51)	232
E113:	Espectro de RMN de ¹ H (300,06 MHz, CDCl ₃) do α -homo-ciclogeraniol, (51)	233
E114:	Espectro de RMN 2D (¹ H e ¹ H gCOSY, 300,06 MHz, CDCl ₃) do α -homo-	
	ciclogeraniol (51)	233
E115:	Espectro de RMN de ¹³ C (75,45 MHz, CDCl ₃) do α -homo-ciclogeraniol (51)	234
E116:	Espectro de RMN de $^{13}\text{C}{\uparrow}^1\text{H}{\uparrow}$ (a) DEPT 90° e (b) DEPT 135° (75,45 MHz,	
	$CDCl_3$) do α -homo-ciclogeraniol (51)	234
E117:	Espectro de RMN 2D (¹ H e ¹³ C HETCOR, CDCl ₃) do α-homo-ciclogeraniol (51)	235
E118:	Espectro de RMN de ¹ H (499,88 MHz, CDCl ₃) do limoneno-1,2-diol (54)	235
E119:	Espectro de RMN de ¹³ C (125,69 MHz, CDCl ₃) do limoneno-1,2-diol (54)	236
E120:	Espectro de RMN de $^{13}\mathrm{C}^{\downarrow1}_{1}\mathrm{H}^{\downarrow}_{1}$ (a) DEPT 90° e (b) DEPT 135° (125,69 MHz,	
	CDCl ₃) do limoneno-1,2-diol (54)	236
E121:	Espectro de massas obtido por ionização de elétrons (70 eV) do (+)-(4R)-p-1-	
	menteno-8,9-diol (55)	237
E122:	Espectro de RMN de ¹ H (499,88 MHz, $CDCl_3$) do (+)-(4 <i>R</i>)- <i>p</i> -1-menteno-8,9-diol	
	(55)	237
E123:	Espectro de RMN de ¹³ C (125,69 MHz, CDCl ₃) do (+)-($4R$)- <i>p</i> -1-menteno-8,9-diol	
	(55)	238
E124:	Espectro de RMN de ${}^{13}C_1^{\downarrow}H_1^{\downarrow}$ (a) DEPT 90° e (b) DEPT 135° (125,69 MHz,	
	$CDCl_3$) do (+)-(4 <i>R</i>)- <i>p</i> -1-menteno-8,9-diol (55)	238
E125:	Espectro de massas obtido por ionização de elétrons (70 eV) da diidrocarvona	
	(45)	239





E02: Espectro de RMN de 13 C (75,45 MHz, CDCl₃) da (±)-5-metil- ϵ -caprolactona (1a e 1b).

















carbometoxiciclopentanona (11).











E13: Espectro de massas obtido por ionização de elétrons (70 eV) do *cis*- e *trans*-2-metilcicloexanol (6a e 6b) obtido por biocatálise.



E14: Espectro de massas obtido por ionização de elétrons (70 eV) do (\pm)-2-metilcicloexanol [(\pm)-6a e (\pm)-6b].



E15: Espectro de massas obtido por ionização de elétrons (70 eV) da 7,8-epoxijasmona (12).



(1c).



E17: Espectro de RMN de ¹H (499,88 MHz, CDCl₃) da 7,8-epoxijasmona (12) e da (±)-7,8diidroxijasmona [(±)-13].



E18: Espectro de RMN de ¹³C (125,69 MHz, CDCl₃) da 7,8-epoxijasmona (12) e da (±)-7,8diidroxijasmona [(±)-13].



E19: Espectro de massas obtido por ionização de elétrons (70 eV) da 7,8-diidroxijasmona (13).



E20: Espectro de massas obtido por ionização de elétrons (70 eV) da 4-hidroxijasmona (14).



E22: Espectro de RMN 2D (¹H e ¹H gCOSY, 499,88 MHz ,CDCl₃) da 4-hidroxijasmona (14).





E25: Espectro de RMN 2D (¹H e ¹³C HETCOR, CDCl₃) da 4-hidroxijasmona (14).





E27: Espectro de massas obtido por ionização de elétrons (70 eV) do (S)-MTPA da 4hidroxijasmona (14b).



E28: Espectro de RMN de ¹H (499,88 MHz, CDCl₃) do (*R*)-MTPA da 4-hidroxijasmona (14a).



E29: Espectro de RMN de ¹H (300,06 MHz, CDCl₃) do (S)-MTPA da 4-hidroxijasmona (14b).



E30: Espectro de RMN de ¹H (499,88 MHz, CDCl₃) da 7,8-epoxijasmona (12).



E31: Espectro de RMN 2D (¹H e ¹H gCOSY, 499,88 MHz ,CDCl₃) da 7,8-epoxijasmona (12).



E32: Espectro de RMN de ¹³C (125,69 MHz, CDCl₃) da 7,8-epoxijasmona (12).



E33: Espectro de RMN de ${}^{13}C_1^{\downarrow 1}H_1^{\downarrow}$ (a) DEPT 90° e (b) DEPT 135° (125,69 MHz, CDCl₃) da 7,8-epoxijasmona (**12**).



E34: Espectro de RMN 2D (¹H e ¹³C HETCOR, CDCl₃) da 7,8-epoxijasmona (12).



E35: Espectro de RMN de ¹H (499,88 MHz, CDCl₃) da (±)-7,8-epoxijasmona [(±)-12] e da (±)-7,8diidroxijasmona [(±)-13]



E36: Espectro de RMN de ¹³C (125,69 MHz, CDCl₃) da (±)-7,8-epoxijasmona [(±)-12] e da (±)-7,8-diidroxijasmona [(±)-13].



E37: Espectro de RMN de ¹H (499,88 MHz, CDCl₃) da (\pm)-7,8-epoxijasmona [(\pm)-12].



E38: Espectro de RMN de 13 C (125,69 MHz, CDCl₃) da (±)-7,8-epoxijasmona [(±)-12].



E39: Espectro de massas obtido por ionização de elétrons (70 eV) do composto (\pm)-16a ou (\pm)-16b.



196







 $\begin{array}{c} 3.8 \\ 3.6 \\ 1.00 \end{array} \xrightarrow{3.4} 3.2 \\ 0.61 \end{array} \xrightarrow{3.0} 2.8 \\ 0.61 \end{array} \xrightarrow{2.6} 2.4 \\ 0.61 \\ 0.61 \end{array} \xrightarrow{2.2} 2.0 \\ 1.8 \\ 1.17 \\ 1.26 \\ 1.17 \\ 1.$



 $\begin{array}{l} \textbf{E45:} \ \text{Espectro de RMN 2D (}^1\text{H e }^1\text{H gCOSY, 499,88 MHz ,CDCl_3) da (\pm)-7-hidróxi-8-metoxijasmona [(\pm)-18a] e da (\pm)-7-metóxi-8-hidroxijasmona [(\pm)-18b]. \end{array}$



E46: Espectro de RMN de ¹³C (125,69 MHz, CDCl₃) da (±)-7-hidróxi-8-metoxijasmona [(±)-18a] e da (±)-7-metóxi-8-hidroxijasmona [(±)-18b].



E47: Espectro de RMN de ¹³C¹H¹/₄ (a) DEPT 90° e (b) DEPT 135° (125,69 MHz, CDCl₃) da (±)-7hidróxi-8-metoxijasmona [(±)-**18a**] e da (±)-7-metóxi-8-hidroxijasmona [(±)-**18b**].



E48: Espectro de RMN 2D (¹H e ¹³C HSQC, CDCl₃) da (±)-7-hidróxi-8-metoxijasmona [(±)-**18a**] e da (±)-7-metóxi-8-hidroxijasmona [(±)-**18b**].



E49: Espectro de RMN de ¹H (300,06 MHz, CDCl₃) do (±)-1-hidróxi-2-metoxidecano [(±)-20a] e (±)-1-metóxi-2-hidroxidecano [(±)-20b].







(**18a**).



E54: Espectro de RMN de ¹H (499,88 MHz, CDCl₃) da (±)-7-hidróxi-8-metoxijasmona (18a) e da (±)-7-metóxi-8-hidroxijasmona (18b).



E56: Espectro de RMN de ¹³C¹₁H[↓] (a) DEPT 90° e (b) DEPT 135° (75,45 MHz, CDCl₃) da 7hidróxi-8-metoxijasmona (18a) e da 7-metóxi-8-hidroxijasmona (18b).






E59: Espectro de RMN de ¹H (499,88 MHz, CDCl₃) dos ésteres do (S)-MTPA dos compostos (\pm) -21a e (\pm) -21b.

.



E60: Espectro de RMN 2D (¹H e ¹H gCOSY, 499,88 MHz ,CDCl₃) dos ésteres do (*S*)-MTPA dos compostos (±)-21a e (±)-21b.



E62: Espectro de RMN de ${}^{13}C_{1}^{\downarrow}{}^{1}H_{1}^{\downarrow}$ (a) DEPT 90° e (b) DEPT 135° (125,69 MHz, CDCl₃) dos ésteres do (S)-MTPA dos compostos (±)-**21a** e (±)-**21b**.



E63: Espectro de RMN 2D (¹H e ¹³C HSQC, CDCl₃) dos ésteres do (S)-MTPA dos compostos (\pm)-21a e (\pm)-21b.





E66: Espectro de RMN de ¹H (499,88 MHz, CDCl₃) dos ésteres do (S)-MTPA dos compostos 21a e 21b.



E67: Espectro de RMN 2D (¹H e ¹H gCOSY, 499,88 MHz ,CDCl₃) dos ésteres do (*S*)-MTPA dos compostos **21a** e **21b**.



E68: Espectro de RMN de ¹³C (125,69 MHz, CDCl₃) dos ésteres do (*S*)-MTPA dos compostos 21a e 21b.



. . . .



E70: Espectro de RMN 2D (¹H e ¹³C HSQC, CDCl₃) dos ésteres do (*S*)-MTPA dos compostos 21a e 21b.



E71: Espectro de RMN 2D (¹H e ¹³C gHMBC, CDCl₃) dos ésteres do (*S*)-MTPA dos compostos **21a** e **21b**.



E72: Espectro de RMN de ¹H (499,88 MHz, CDCl₃) da 7,8-diidroxijasmona (13).



E73: Espectro de RMN 2D (¹H e ¹H gCOSY, 499,88 MHz ,CDCl₃) da 7,8-diidroxijasmona (13).



E74: Espectro de RMN de ¹³C (125,69 MHz, CDCl₃) da 7,8-diidroxijasmona (13).



E76: Espectro de RMN 2D (¹H e ¹³C HETCOR, CDCl₃) da 7,8-diidroxijasmona (**13**).

4.0



E77: Espectro de RMN de ¹³H (300,06 MHz, CDCl₃) do composto (±)-22.



E78: Espectro de RMN de 13 C (75,45 MHz, CDCl₃) do composto (±)-22.



E79: Espectro de massas obtido por ionização de elétrons (70 eV) do *trans* (±)-acetonídeo (±)-23.





E81: Espectro de RMN de ¹H (300,06 MHz, CDCl₃) do (\pm)-acetonídeo (\pm)-23.







E84: Espectro de massas obtido por ionização de elétrons (70 eV) do trans acetonídeo 23.





E86: Espectro de massas obtido por ionização de elétrons (70 eV) do (1*S*,2*R*,4*R*)neoisodiidrocarveol (**41**)





E89: Espectro de massas obtido por ionização de elétrons (70 eV) da (6*R*)-isoprenil-(3*R*)-metil-2oxo-oxepanona (**42**).



E90: Espectro de massas obtido por ionização de elétrons (70 eV) do limoneno-1,2-diol (54).





E92: Espectro de RMN de ¹³C (125,69 MHz, CDCl₃) do (1*S*,2*R*,4*R*)-neoisodiidrocarveol (41).



E94: Espectro de RMN de ¹H (499,88 MHz, CDCl₃) e experimento de nOe da (6*R*)-isoprenil-(3*R*)metil-2-oxo-oxepanona (**42**).



E96: Espectro de RMN de ${}^{13}C_{1}^{1}H_{1}^{1}$ (a) DEPT 90° e (b) DEPT 135° (125,69 MHz, CDCl₃) da (6*R*)isoprenil-(3*R*)-metil-2-oxo-oxepanona (**42**).



E97: Espectro de massas obtido por ionização de elétrons (70 eV) do ácido (3*R*)-isopropenil-6-oxo-heptanóico (**43**).



(43).



E99: Espectro de RMN de ¹³C (125,69 MHz, CDCl₃) do ácido (3*R*)-isopropenil-6-oxo-heptanóico (43).



E100: Espectro de RMN de ${}^{13}C_{1}^{\downarrow}H_{1}^{\downarrow}$ (a) DEPT 90° e (b) DEPT 135° (125,69 MHz, CDCl₃) do ácido (3*R*)-isopropenil-6-oxo-heptanóico (43).



E101: Espectro de massas obtido por ionização de elétrons (70 eV) do (\pm) -2,3-epóxi-(5*R*)isopropenil-2-metilcicloexenol [(±)-44].





E104: Espectro de RMN de ${}^{13}C_{1}^{\downarrow 1}H_{1}^{\downarrow}$ (a) DEPT 90° e (b) DEPT 135° (75,45 MHz, CDCl₃) do (±)-2,3-epóxi-(5*R*)-isopropenil-2-metilcicloexenol [(±)-44].



E105: Espectro de massas obtido por ionização de elétrons (70 eV) do 2,3-epóxi-(5*R*)-isopropenil-2-metilcicloexenol (**44**).





E107: Espectro de RMN 2D (¹H e ¹H gCOSY, 499,88 MHz ,CDCl₃) da 4-oxo-7,8-diidro- β -ionona (50).





oxo-7,8-diidro- β -ionona (50).



E110: Espectro de RMN 2D (¹H e ¹³C HETCOR, CDCl₃) da 4-oxo-7,8-diidro-β-ionona (50).



E111: Espectro de RMN 2D (1 H e 13 C gHMBC, CDCl₃) da 4-oxo-7,8-diidro- β -ionona (50).



E112: Espectro de massas obtido por ionização de elétrons (70 eV) do α -homo-ciclogeraniol (51).



E113: Espectro de RMN de ¹H (300,06 MHz, CDCl₃) do α -homo-ciclogeraniol (51).



E114: Espectro de RMN 2D (1 H e 1 H gCOSY, 300,06 MHz, CDCl₃) do α -homo-ciclogeraniol (51).



E116: Espectro de RMN de ${}^{13}C_{1}^{1}H_{1}^{1}$ (a) DEPT 90° e (b) DEPT 135° (75,45 MHz, CDCl₃) do α -homo-ciclogeraniol (**51**).





E117: Espectro de RMN 2D (¹H e ¹³C HETCOR, CDCl₃) do α -homo-ciclogeraniol (51).







E121: Espectro de massas obtido por ionização de elétrons (70 eV) do (+)-(4*R*)-*p*-1-menteno-8,9diol (55).



E122: Espectro de RMN de ¹H (499,88 MHz, CDCl₃) do (+)-(4R)-p-1-menteno-8,9-diol (55).



E123: Espectro de RMN de ¹³C (125,69 MHz, CDCl₃) do (+)-(4*R*)-*p*-1-menteno-8,9-diol (55).



E124: Espectro de RMN de ${}^{13}C_{1}^{1}H_{1}^{1}$ (a) DEPT 90° e (b) DEPT 135° (125,69 MHz, CDCl₃) do (+)-(4*R*)-*p*-1-menteno-8,9-diol (**55**).



