



MARIA LAIR SABÓIA DE OLIVEIRA LIMA

**BIOPROSPECÇÃO E INVESTIGAÇÃO DO PERFIL ENZIMÁTICO E
ENANTIOSSELETIVO DE MICRO-ORGANISMOS DE REJEITOS DE
MINAS DE COBRE (PA)**

Campinas

2013

i



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE QUÍMICA

MARIA LAIR SABÓIA DE OLIVEIRA LIMA

**BIOPROSPECÇÃO E INVESTIGAÇÃO DO PERFIL
ENZIMÁTICO E ENANTIOSELETIVO DE MICRO-ORGANISMOS
DE REJEITOS DE MINAS DE COBRE (PA)**

**ORIENTADORA: PROFA. DRA. ANITA JOCELYNE
MARSAIOLI**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO
APRESENTADA AO INSTITUTO DE
QUÍMICA DA UNICAMP PARA
OBTENÇÃO DO TÍTULO DE
MESTRA EM QUÍMICA NA ÁREA
DE QUÍMICA ORGÂNICA.**

**ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA DISSERTAÇÃO
DEFENDIDA POR MARIA LAIR SABÓIA DE OLIVEIRA LIMA E ORIENTADA
PELA PROFA.DRA. ANITA JOCELYNE MARSAIOLI.**

Assinatura do Orientador

CAMPINAS

2013

iii

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR SIMONE LUCAS - CRB8/8144 -
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE QUÍMICA DA UNICAMP

L628b Lima, Maria Lair Sabóia de Oliveira (1989-).
Bioprospecção e investigação do perfil enzimático e enantiosseletivo de micro-organismos de rejeitos de minas de cobre (PA) / Maria Lair Sabóia de Oliveira Lima. – Campinas, SP: [s.n.], 2013.

Orientadora: Anita Jocelyne Marsaioli.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Química.

1. Bioprospecção. 2. Triagem de alto desempenho. 3. Enantiosseletividade. 4. Quick-E. I. Marsaioli, Anita Jocelyne. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Química. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em inglês: Bioprospection and enzymatic profiling of copper mine micro-organisms

Palavras-chave em inglês:

Bioprospection
High throughput screening
Enantioselectivit
Quick-E

Área de concentração: Química Orgânica

Titulação: Mestra em Química na área de Química Orgânica

Banca examinadora:

Anita Jocelyne Marsaioli [Orientadora]
André Luiz Meleiro Porto
Cláudio Francisco Tormena

Data de defesa: 25/02/2013

Programa de pós-graduação: Química

Dedico este trabalho a:

Meus pais, Elza e Ronaldo, por todo apoio que me foi concedido durante toda a minha vida para realização dos meus sonhos, mesmo que em meio a dificuldades, demonstrando sempre o seu amor incondicional;

Meus avós Izabel e Manoel, Maria Lair e Ariolino (in memoriam) por suas lutas diárias que fortaleceram nossos laços familiares;

Minha irmãzinha querida, Layane, por mostrar que as pessoas podem ser melhores e que a vida pode ser sempre mais bonita do que aparenta.

“Agora, pois, permanecem a fé, a esperança e o amor, estes três, mas o maior destes é o amor.”

1 Coríntios 13:13

AGRADECIMENTOS

À Profa. Anita pela orientação concedida durante estes dois anos de mestrado e pela confiança para realização deste trabalho.

Aos amigos e colegas de grupo: Haleem (Piúcho, muitas saudades! “Que coisa?”), Marília, Felipe, Fabi, Rapha, Dávila, Carlinha, Eduardo (Duda), Célio, Lucas, Thiago, Fran e Dani pela convivência e amizade durante esta jornada e, em especial, à Carol, Diana, Bruna e Dri, pela paciência e humildade ao transmitir seus conhecimentos.

Aos amigos Arnaldo, Silvão, Simone (bonitona) e Jú pelas “não conversas sobre trabalho” que com amizade e simpatia, ajudaram a tornar os dias tão mais felizes.

Aos ICs Jr. Mariana e Gabriel pela dedicação, auxílio, eficiência e amizade durante a realização de nosso trabalho.

Aos técnicos do laboratório: Dona Maria, Dona Léa, Rapha e Priscila por tornarem mais fácil o nosso cotidiano, auxiliando sempre na manutenção e organização de nosso laboratório.

Aos funcionários da CPG: Bel, Miguel e Gabi, por serem tão acessíveis e prestativos.

Aos amigos do meu nordeste e aos agregados mais que bem vindos: Michel, Fê (a vidente do Rio Grande do Sul), Dri (a *top model* do Maranhão), Paula, Flamys, Gisele, Irla, Thiaguin, Pedro, Lívia (por ter me acolhido em sua casa no início do mestrado), Io, Rômulo, Lucas, Janaína, Samuel, Luelc, Amandinha, Ricardo, Zé Tiago e Ramon pelos momentos em que nos reuníamos para amenizar a saudade tão grande de nossa terra.

À minha família que me acolheu em São Paulo, em especial à Andréia, ao meu tio Wilson e às minhas priminhas Alana, Nandinha e Andressa pelo carinho sempre demonstrado.

Aos amigos que, embora distantes, se fazem sempre presentes: Patrícia, Alyson (meu primo querido), Túlio (catiras), Fernanda Matoso, Jéssica, Nicole, Gabriela e “Susy” (a do Box, rsrs).

Ao “Dé” pelo incentivo e por sempre apostar positivo em mim.

À Sara por estar sempre sorrindo e nos transmitindo muita paz com a sua presença.

Aos funcionários do Instituto de Química da UNICAMP pelos serviços prestados.

À FAPESP (Processo: 2011/10385-1) pelo auxílio financeiro que permitiu a realização deste trabalho.

À VALE por nos auxiliar prontamente com a concessão das amostras de rejeitos de mineração da Mina do Sossego.

Por último e não menos importante, agradeço a Deus pela maravilhosa família que tenho (Elza, Ronaldo, Layane e Maraisa), pelos amigos que tenho e por me dar força e discernimento em minhas atitudes, tornando os meus dias menos dolorosos.

A todos vocês, o meu muito obrigada!

Curriculum Vitae

Formação Acadêmica

(2011 – 2013) Mestrado em Química - Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP.

Título: Bioprospecção e investigação do perfil enzimático e enantiosseletivo de micro-organismos de rejeitos de minas de cobre (PA).

Orientação: Profa. Dra. Anita Jocelyne Marsaioli.

Bolsista da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP.

(2007 – 2010) Bacharelado em Química - Habilitação em Química Industrial - Universidade Federal do Ceará, UFC.

Título: Influência da temperatura, do tempo de estocagem e da dulcificação na estabilidade do ácido ascórbico em suco de manga.

Orientação: Profa. Dra. M^a Mozarina Beserra Almeida e Dra. M^a Elisabeth Barros de Oliveira.

Estagiária na Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, EMBRAPA – CE

Principais Trabalhos Científicos Apresentados em Congressos

1. **Lima, M. L. S. O.** ; Costa, B. Z. ; Marsaioli, A. J.; *Perfil enzimático de micro-organismos isolados de rejeitos de minas de cobre da região de Canaã dos Carajás - PA*. VI BiocatBiotrans, **2012**.
2. Costa, B. Z.; **Lima, M. L. S. O.**; Ferreira, D.; Rodrigues-Fo, E.; Pilau, E. J.; Marsaioli, A. J.; *Isolamento de micro-organismos de rejeitos de mineração de cobre e caracterização por MALDI-TOF*; VI BiocatBiotrans, **2012**.
3. **Lima, M. L. S. O.** ; Gonçalves, C. C. S. ; Marsaioli, A. J.; *Deteção intracelular de proteínas tirosina fosfatases (PTPs) de células de câncer com 3,6-difosfato de fluoresceína*. 35^aRASBQ, **2012**.

4. **Lima, M. L. S. O.**; Oliveira, M. E. B.; Almeida, M. M. B.; Almeida, R. F.; *Comportamento cinético do ácido ascórbico em sucos de manga sob a influência dos parâmetros tempo, temperatura e teor de dulcificação*; XXI Congresso Brasileiro de Fruticultura. Frutas: Saúde, Inovação e Sustentabilidade, **2010**.
5. **Lima, M. L. S. O.**; Lucas, F. W. S.; Oliveira, T. I. S.; Gomes, J. S.; Gouveia, S. T.. *A construção de mapas de risco para laboratórios de ensino de química como um instrumento didático na formação acadêmica*; 60ª Reunião da Sociedade Brasileira para o Progresso da Ciência - SBPC, **2008**.

Premiações

Lucas, F. W. S. ; **Lima, M. L. S. O.** ; Gomes, J. S.; Oliveira, T. I. S.; *Confecção de mapas de riscos na disseminação do tema segurança laboratorial nos laboratórios de ensino em química*. Trabalho premiado entre os 10 melhores no XVII Encontro de Iniciação à Docência. Universidade Federal do Ceará, **2008**.

Demais Tipos de Produção Técnica

Lima, M. L. S. O.; *Riscos ambientais e mapeamento de risco dos laboratórios químicos*. **2010**. Curso de curta duração ministrado.

Lima, M. L. S. O.; *III Congresso Manguezais de Sapiranga*. **2007**. Curso de curta duração ministrado.

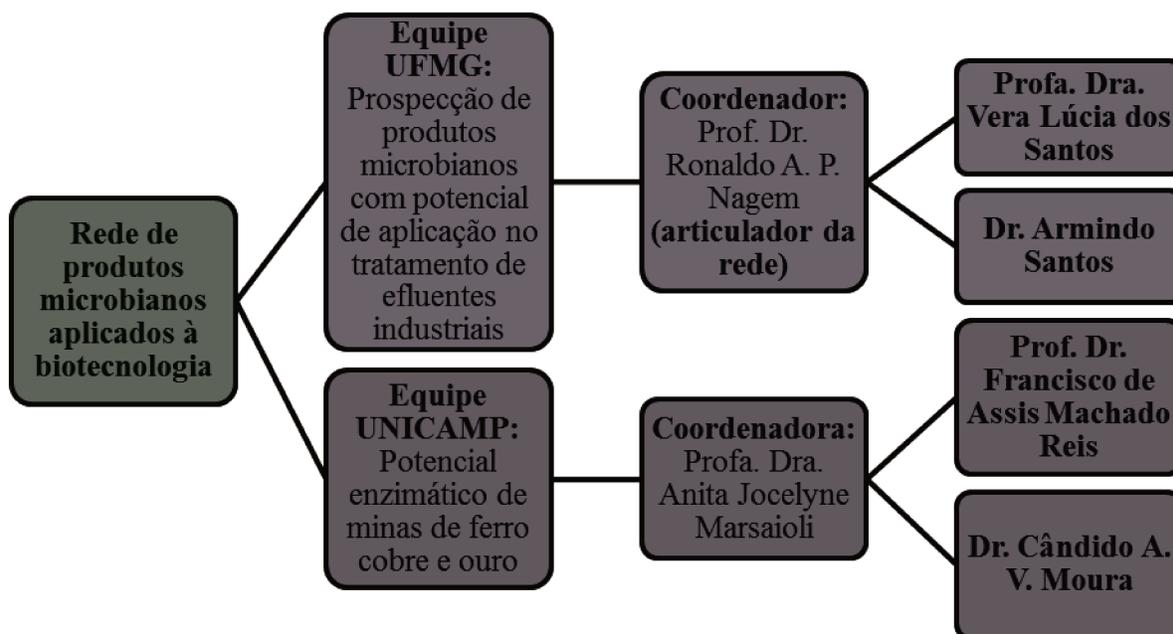
Atividades Complementares

(**2010**) Bolsista do Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica - PIBIC/CNPq, *Atividade antibiótica de fungos filamentosos*, sob orientação do Prof. Dr. Jair Mafezoli.

(**2009**) Monitora da Disciplina de Química Analítica II, no Departamento de Química Analítica e Físico-Química, sob Orientação da Profa. Dra. Gisele Simone Lopes.

(**2007 – 2009**) Bolsista do Programa de Educação Tutorial - PET-SESU/MEC, desenvolvendo atividades voltadas ao ensino, à pesquisa e à extensão, sob orientação do Prof. Dr. Sandro Thomaz Gouveia.

Esta dissertação faz parte do projeto “Potencial enzimático de minas de ferro, cobre e ouro” (FAPESP - Processo: 2010/51278-0) que está inserido na Rede de produtos microbianos aplicados à biotecnologia, resultado da parceria entre a UNICAMP, a UFMG, a UFPA, a FAPESP, a FAPEMIG e a VALE.



RESUMO

Bioprospecção e investigação do perfil enzimático e enantiosseletivo de micro-organismos de rejeitos de minas de cobre (PA)

O uso de catalisadores biológicos é importante na academia e na indústria, pois une o ecologicamente correto com o ecologicamente viável. Assim, a busca por novas rotas reacionais viáveis e menos poluentes se enquadra no contexto da química verde, onde o ambiente e os rejeitos são levados em consideração. Com base nestes princípios o presente trabalho visa avaliar o perfil enzimático de micro-organismos provenientes de rejeitos de mineração da Mina do Sossego (Canaã dos Carajás – PA), pertencente à “VALE”. Após o isolamento e preservação, as cepas foram caracterizadas por espectrometria de massas, com a técnica MALDI-TOF, onde foram encontradas bactérias dos gêneros *Pseudomonas* sp., *Bacillus* sp., *Acinetobacter* sp., *Delfitia* sp. e *Escherichia* sp. As atividades enzimáticas foram avaliadas através de uma triagem rápida e eficiente (HTS, *high throughput screening*) utilizando sondas fluorogênicas não comerciais baseadas na umbeliferona. Dos 228 micro-organismos isolados, 156 tiveram suas atividades enzimáticas avaliadas das quais 70 apresentaram atividade para esterases, 80 para lipases, 11 para epóxi-hidrolases e 53 para mono-oxigenases. Ainda com base no princípio da triagem enzimática de alto desempenho, foram sintetizadas sondas fluorogênicas quirais e um composto competidor para implementação de uma metodologia conhecida como *Quick-E*. Esta metodologia visa uma avaliação rápida da enantiosseletividade de esterases em células íntegras através de

medidas das velocidades iniciais das biorreações com as sondas fluorogênicas quirais avaliadas separadamente.

Palavras-chave: *bioprospecção, triagem de alto desempenho, enantiosseletividade, Quick-*

E.

ABSTRACT

Bioprospection and enzymatic profiling of copper mine micro-organisms

Biocatalysts are important in academia and industry joining the ecological friendly to the ecological safe and efficient processes. Thus, the search for new synthetic routes and reactions producing less hazardous residues fits into the principles of green chemistry as environment and residues are taken into consideration. Based on these principles, present study aims at the enzymatic profiling of microorganisms (156 strains) from copper mine (Sossego's mine, Canaã dos Carajás- PA), belonging to VALE. After isolation (228 microorganisms) and preservation, the strains were characterized by mass spectrometry (MALDI-TOF, 62 strains), being characterized bacterias *Pseudomonas* sp., *Bacillus* sp., *Acinetobacter* sp., *Delfitia* sp. and *Escherichia* sp.. The enzymatic activities were evaluated by a high throughput screening using fluorogenic probes based on umbelliferone. Outstanding enzymatic activities of these 156 micro-organisms were: esterases (70), lipases (80), epoxy hydrolases (11) and monooxygenases (53). Additionally the implementation of a novel Quick-E methodology with chiral fluorogenic probes and a competitor will allow the rapid evaluation of esterases enantioselectivities in whole cells by measuring inicial rates of bioreactions in micro scale reactions.

Keywords: *bioprospection, high throughput screening, enantioselectivit, Quick-E.*

ÍNDICE

LISTA DE ESQUEMAS	xxiii
LISTA DE FIGURAS	xxv
LISTA DE TABELAS	xxix
<i>INTRODUÇÃO</i>	1
<i>OBJETIVOS</i>	17
<i>Capítulo I: Isolamento e caracterização de micro-organismos de rejeitos de mineração de cobre</i>	21
RESULTADOS E DISCUSSÃO	23
1. Coleta das amostras	23
2. Meios de cultura	26
3. Isolamento das culturas puras	28
4. Caracterização de culturas puras	31
<i>Capítulo II: Perfil enzimático e enantiosseletivo de micro-organismos de rejeitos de mineração de cobre</i>	35
RESULTADOS E DISCUSSÃO	37
1. Triagem de alto desempenho	37
2. Adaptação do <i>Quick-E</i> com células íntegras para identificação de esterases enantiosseletivas	41
<i>CONCLUSÕES</i>	49

<i>MATERIAIS E MÉTODOS</i>	53
1. Métodos cromatográficos.....	55
2. Métodos espectrométricos de RMN de ¹ H e ¹³ C.....	56
3. Métodos espectrofotométricos de fluorescência.....	56
4. MEV-EDS	57
5. Rotação óptica [α] _D ²⁰	57
6. Reagentes e solventes.....	58
7. Procedimentos gerais adotados no laboratório de biocatálise ...	58
8. Micro-organismos	58
9. Meios de cultura	59
10. Formação dos consórcios microbianos	60
11. Isolamento das culturas puras	62
12. Preservação das culturas puras e das amostras enriquecidas .	62
12.1. Preservação em temperatura ultra-baixa	62
12.2. Liofilização	64
12.3. Preservação em óleo mineral	65
12.4. Preservação em água destilada estéril – Castellani	66
13. Soluções de preservação	66
13.1. Glicerol 10%	66

13.2.	Leite semi-desnatado 10%	66
14.	Caracterização das culturas puras	66
14.1.	Coloração diferencial de Gram	67
14.1.1.	Preparação e fixação do esfregaço.....	67
14.1.2.	Preparo das soluções	68
14.2.	Caracterização por MALDI-TOF	69
14.2.1.	Procedimento padrão de preparo de amostras	69
15.	Preparo das soluções	70
15.1.	Soluções das sondas.....	70
15.2.	Solução de NaIO ₄ 20mmol/L.....	70
15.3.	Solução de BSA 5,0mg/L	70
15.4.	Tampão borato pH 7,4	71
16.	Ensaio de triagem de alto desempenho	71
17.	Ensaio de <i>Quick-E</i>	74
17.1.	Curva de calibração	75
18.	Procedimentos sintéticos	76
18.1.	Síntese do <i>p</i> -toluenossulfonato de 3-butenila (11)	76
18.2.	Síntese de <i>O</i> -(3-butenil)umbeliferona (12).....	77
18.3.	Síntese do (<i>R</i>)-(3,4-diidroxibutil)umbeliferona ((R)-9)	78

18.4. Síntese do (<i>S</i>)- (3,4-diidroxibutil)umbeliferona ((S)- 9)	78
18.5. Síntese do (<i>R</i>)-(3,4-diacetoxibutil)umbeliferona ((R)- 1) ...	79
18.6. Síntese do (<i>S</i>)-3,4-diacetoxibutil)umbeliferona ((S)- 1).....	80
18.7. Síntese do 2-(hidroxietil)umbeliferona (14)	80
18.8. Síntese do 2-(acetoxietil)umbeliferona (13)	81
<i>ESPECTROS</i>	83
<i>ANEXOS</i>	109

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1. Reação de oxidação enzimática de enzimas mono-oxigenases.....	5
Esquema 2. Resolução cinética enzimática de uma reação irreversível frente a dois enantiômeros.....	14
Esquema 3. Síntese das sondas fluorogênicas (S)-(3,4-diacetoxibutil)umbeliferona, ((S)-1) e (R)-(3,4-diacetoxibutil)umbeliferona, ((R)-1).....	41
Esquema 4. Formação dos consórcios microbianos a partir das amostras enriquecidas e não enriquecidas para as amostras a e b.....	61
Esquema 5. a) Diluição seriada das amostras; b) Transferência da alíquota diluída para placa de Petri; c) Espalhamento com alça de Drigalski; d) Formação do consórcio microbiano. (<i>Fotos: amostras VALE, M^a Lair Sabóia de O. Lima e Bruna Zucoloto da Costa</i>).	61
Esquema 6: a) Centrifugação das amostras e descarte do sobrenadante; b) Adição da solução de glicerol 10%; c) Homogeneização em vórtex; d) Armazenamento em ultrafreezer. (<i>Fotos: amostras VALE, M^a Lair Sabóia de O. Lima e Bruna Zucoloto da Costa</i>).	63
Esquema 7: a) Colônia isolada; b) Transferência da colônia para lâmina de vidro e adição da solução salina estéril; c) Fixação em chama.....	67

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Hidrólise enzimática catalisada por esterases. **1)** Ataque nucleofílico da Ser do sítio ativo ao átomo de carbono da carbonila da ligação peptídica a ser clivada para formar um intermediário tetraédrico; **2)** A decomposição do intermediário tetraédrico no intermediário acil-enzima, pela catálise ácida geral através da His polarizada pelo Asp do sítio ativo, seguida da perda do produto e sua substituição por uma molécula de água; **3)** o reverso da etapa **2**, formando um segundo intermediário tetraédrico e **4)** o reverso da etapa **1** para gerar o produto carboxila da reação e a enzima ativa.....8
- Figura 2. Exemplo genérico da catálise enzimática de um substrato fluorogênico.....9
- Figura 3. Diagrama de níveis de energia mostrando alguns dos processos que ocorrem durante **a)** absorção de radiação incidente, **b)** relaxação não-radiativa e **c)** emissão fluorescente por espécies..... 11
- Figura 4. (a) Umbeliferona, (b) resofurina e (c) fluoresceína: ânions conjugados utilizados em substratos fluorogênicos que na forma neutra são não fluorescentes..... 12
- Figura 5. Pontos de coleta das amostras **(a)**, **(b)** e **(c)** do processo de mineração de cobre na Mina do Sossego.....24
- Figura 6. Representação dos consórcios obtidos a partir das amostras enriquecidas e não enriquecidas.....27

Figura 7. Consórcios microbianos obtidos com enriquecimento a) TSB, b) NB, c) YM e d) ME sem seus respectivos meios semi-sólidos e consórcios oriundos das amostras sem prévio enriquecimento e) TSA, f) NA, g) YMA e h) MEA. (Fotos: amostras VALE, M ^a Lair Sabóia de O. Lima e Bruna Zucoloto da Costa).	28
Figura 8. Amostra da diversidade microbiana isolada a partir dos consórcios das amostras enriquecidas. (Fotos: amostras VALE, M ^a Lair Sabóia de O. Lima e Bruna Zucoloto da Costa).	29
Figura 9. Representação das paredes celulares de bactérias a) Gram (+) e b) Gram (-).	32
Figura 10. Micro-organismos corados pelo método de Gram.	32
Figura 11: Representação de um ensaio de HTS em microplaca de 96 poços, apresentando o ensaio, controle negativo, controle positivo e mecanismo da reação em cascata que ocorre após a liberação do produto via catálise enzimática.....	38
Figura 12: Gráficos representativos das atividades enzimáticas dos micro-organismos isolados dos diferentes consórcios microbianos utilizando as sondas fluorogênicas.	40
Figura 13. Representação de um ensaio de HTS, de um ensaio sem competição e de um ensaio com competição utilizando as sondas fluorogênicas quirais ((S)-1 e (R)-1) e o competidor (2-acetoxietil)umbeliferona (13).....	42
Figura 14. Ensaio de <i>Quick-E</i> com as sondas fluorogênicas (S)-1 e (R)-1 mostrando a influência do composto competidor (13) na intensidade de	

fluorescência produzida ao final do ensaio. (<i>Fotos Quick-E: Maria Lair Sabóia de O. Lima</i>).....	43
Figura 15. Curva de calibração para o ânion umbeliferila.....	44
Figura 16. Gráficos do monitoramento das velocidades reacionais dos micro-organismos V-NA-7, V-NA-17 e V-NA-22 utilizando as sondas fluorogênicas ((S)- 1) (em vermelho) e ((R)- 1) (em azul) para detecção enantiosseletiva de esterases com e sem competição.	45
Figura 17: Amostras submetidas ao processo de liofilização. (<i>Fotos: amostras VALE, M^a Lair Sabóia de O. Lima e Bruna Zucoloto da Costa</i>).	65
Figura 18. Representação de ensaio de HTS em placas de 96 poços, mostrando os possíveis resultados das reações enzimáticas.	73

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Vantagens e desvantagens do uso de enzimas isoladas e células íntegras em biocatálise.	4
Tabela 2. Exemplos de aplicações de esterases e micro-organismos de origem	6
Tabela 3. Resultados da análise MEV-EDS para as amostras (a), (b) e (c).....	25
Tabela 4: Micro-organismos isolados a partir das amostras de rejeitos de mineração de cobre enriquecidas.	30
Tabela 5: Micro-organismos isolados a partir das amostras de rejeitos de mineração de cobre não enriquecidas.	30
Tabela 6. Resultados obtidos a partir dos ensaios de <i>Quick-E</i> com as sondas fluorogênicas ((<i>S</i>)- 1) e ((<i>R</i>)- 1) avaliadas individualmente e na presença do competidor (13).	46
Tabela 7. Meios de cultura utilizados para o enriquecimento de microbiotas de bactérias, fungos e leveduras das amostras de rejeitos de mineração de cobre.	59
Tabela 8. Solução Tampão ácido bórico- bórax.	71
Tabela 9. Atribuição dos dados de RMN de ¹³ C (100,62 MHz, CDCl ₃), RMN de ¹ H (400,13 MHz, CDCl ₃) e IE/EM <i>m/z</i> para o <i>p</i> -toluenossulfonato de 3-butenila (11).	87
Tabela 10. Atribuição dos dados de RMN de ¹³ C (125,70 MHz, CDCl ₃), RMN de ¹ H (499,88 MHz, CDCl ₃) e IE/EM <i>m/z</i> para o <i>O</i> -(3-butenil)umbeliferona (12).	90
Tabela 11. Atribuição dos dados de RMN de ¹³ C (62,90 MHz, CD ₃ OD), RMN de ¹ H (125,13 MHz, CD ₃ OD), IE/EM <i>m/z</i> e [α] _D ²⁰ para o (<i>S</i>)-(3,4-diidroxibutil)umbeliferona ((<i>S</i>)- 9).	93

Tabela 12. Atribuição dos dados de RMN de ^{13}C (125,70 MHz, CD_3OD), RMN de ^1H (499,89 MHz, CD_3OD), IE/EM m/z e $[\alpha]_D^{20}$ para o (<i>R</i>)-(3,4-diidroxibutil)umbeliferona ((R)- 9).....	96
Tabela 13. Atribuição dos dados de RMN de ^{13}C (62,89 MHz, CDCl_3), RMN de ^1H (250,23 MHz, CDCl_3) e IE/EM m/z para o (<i>S</i>)-(3,4-diacetoxibutil)umbeliferona ((S)- 1).	99
Tabela 14. Atribuição dos dados de RMN de ^{13}C (125,69 MHz, CDCl_3), RMN de ^1H (499,88 MHz, CDCl_3) e IE/EM m/z para o (<i>R</i>)-(3,4-diacetoxibutil)umbeliferona ((R)- 1).....	102
Tabela 15. Atribuição dos dados de RMN de ^{13}C (125,69 MHz, CDCl_3), RMN de ^1H (499,88 MHz, CDCl_3) e IE/EM m/z para o 2-(hidroxietil)umbeliferona (14).	105
Tabela 16. Atribuição dos dados de RMN de ^{13}C (100,62 MHz, CDCl_3), RMN de ^1H (600,17 MHz, CDCl_3) e IE/EM m/z para o 2-(acetoxietil)umbeliferona (13).	108
Tabela 17. Percentuais de conversão dos micro-organismos isolados dos consórcios de NA das amostras não enriquecidas ao final de 72 horas.....	111
Tabela 18. Percentuais de conversão dos micro-organismos isolados dos consórcios de TSA das amostras não enriquecidas ao final de 72 horas.....	112
Tabela 19. Percentuais de conversão dos micro-organismos isolados dos consórcios de YMA das amostras não enriquecidas ao final de 72 horas.	113
Tabela 20. Percentuais de conversão dos micro-organismos isolados dos consórcios de NA das amostras enriquecidas ao final de 72 horas.	115
Tabela 21. Percentuais de conversão dos micro-organismos isolados dos consórcios de TSA das amostras enriquecidas ao final de 72 horas.....	117
Tabela 22. Percentuais de conversão dos micro-organismos isolados dos consórcios de YMA das amostras enriquecidas ao final de 72 horas.	119

INTRODUÇÃO

INTRODUÇÃO

A preservação do meio ambiente é uma preocupação ascendente tanto da academia quanto da indústria. Com base nesta afirmativa, observa-se a ascensão de um pensamento que visa unir o “ecologicamente correto” com o “ecologicamente viável”. Esta realidade implica em investimentos em pesquisas, por parte das indústrias, resultando num aproveitamento dos recursos naturais de modo mais adequado.¹ Neste contexto a biocatálise é uma alternativa “verde” e sustentável para o desenvolvimento de novos catalisadores de uso industrial a partir do vasto potencial catalítico de micro-organismos (fungos, bactérias e leveduras) oriundos dos mais diferentes ambientes². Esta técnica ganhou grande destaque nos últimos anos para a produção de intermediários sintéticos de compostos biologicamente ativos, como agentes antitumorais, antivirais e drogas anti-Alzheimer.³

Dentre as metodologias utilizadas em reações de biocatálise, podemos citar a utilização de células íntegras, enzimas puras e sistemas multienzimáticos.⁴ Cada uma apresenta vantagens e desvantagens e a escolha da metodologia ideal dependerá de uma análise cuidadosa de todos os parâmetros envolvidos na reação (Tabela 1).⁵

¹ Conti, R.; Rodrigues, J. A. R.; Moran, P. J. S., *Quim. Nova*, **2001**, 24, No. 5, 672.

² Reetz, M. T.; Becker, M. H.; Kuhling K. M.; Arnold F. H.; *Angew. Chem. Int. Ed.*, **1998**, 37, 2647.

³ Patel, R. N.; *Curr. Org. Chem.*, **2006**, 10, 1289.

⁴ Lin, C. H.; Shen, G. J.; Garcia-Junceda, E.; Wong, C. H., *J. Am. Chem. Soc.*, **1995**, 117, 8031.

⁵ Faber, K.; *Biotransformations in Organic chemistry*, **2000**, 4ª edição, Springer.

Tabela 1. Vantagens e desvantagens do uso de enzimas isoladas e células íntegras em biocatálise ⁵

Biocatalizador	Forma de utilização	Vantagens	Desvantagens
Enzimas isoladas	Geral	Melhor produtividade, simples de trabalhar, maior tolerância de concentração.	Necessidade de reciclar o cofator, exceto as hidrolases
	Solubilizada em água	Alta atividade enzimática	Outras reações secundárias são possíveis, substratos lipofílicos são insolúveis.
	Suspensa em solventes orgânicos	Fácil de trabalhar, substratos lipofílicos são solúveis, são facilmente recuperadas.	Redução da atividade.
	Imobilizada	Facilmente recuperada.	Perde atividade durante a imobilização.
Células íntegras	Geral	Não é necessária a reciclagem do cofator.	Baixa produtividade, baixa tolerância a solventes orgânicos, formação de subprodutos e presença de metabólitos.
	Células em crescimento (mais jovens)	Alta atividade.	Elevada quantidade de biomassa, subprodutos.
	Células em repouso	Fácil de trabalhar, formação de menos subprodutos.	Baixa atividade.
	Células imobilizadas	Possível reutilizar a célula	Baixa atividade.

É importante salientar algumas propriedades intrínsecas das enzimas que as tornam tão promissoras no contexto sintético. Dentre elas, podemos

citar: especificidade, temperaturas brandas de reações, reações em meio aquoso e pH próximo ao neutro, por exemplo.

As enzimas são classificadas de acordo com o tipo de reação que catalisam. Das classes atualmente conhecidos, têm-se as: Oxirredutases, Transferases, Hidrolases, Liases, Isomerases e Ligases.^{5, 6} As Oxirredutases podem ser classificadas como oxidases, peroxidases, desidrogenases e oxigenases sendo a última dividida em mono-oxigenases e dioxigenases.⁷

As mono-oxigenases catalisam reações de hidroxilação de hidrocarbonetos, epoxidação de alcenos, oxidação de heteroátomos e transformações de Baeyer-Villiger.⁸ Estas enzimas incorporam um átomo de oxigênio molecular no substrato gerando uma molécula de água a partir da doação de dois elétrons provenientes do cofator (FADH₂ ou NADPH ou NADH) ao segundo átomo de oxigênio (Esquema 1).⁹



Esquema 1. Reação de oxidação enzimática de enzimas mono-oxigenases.

As hidrolases são constituídas por enzimas que catalisam a hidrólise de ésteres, amidas, lactonas, epóxidos e nitrilas, por exemplo. Estas enzimas não dependem de nenhum tipo de cofator para sua atividade catalítica, diferente das Oxirredutases.⁵

⁶ Patel, R. N.; *Food Technol. Biotechnol.*, **2004**, 42, 305.

⁷ Hanson, J. R., *An Introduction to Biotransformations in Organic Chemistry*, **1995**, W.H. FREEMAN SPEKTRUM.

⁸ Voet, D.; Voet, J. G., *Biochemistry*, **1995**, John Wiley & Sons, New York.

⁹ Dawson, J. H.; *Sciense*, **1988**, 240, 433.

Dentre as hidrolases as esterases tem papel relevante na hidrólise de ésteres ¹⁰ e são amplamente distribuídas nos organismos vivos, em tecidos de vertebrados, insetos, plantas, frutas, micro-organismos dos gêneros *Pseudomonas* sp., *Bacillus* sp., *Brevibacterium* sp., *Lactobacillus* sp., *Rodococcus* sp., *Aspergillus* sp., *Geotrichum* sp.) e mamíferos ¹¹ e são amplamente aplicadas em biotecnologia (Tabela 2).

Tabela 2. Exemplos de aplicações de esterases e micro-organismos de origem

Tipo de esterase	Aplicação	Micro-organismo de origem
Aril-esterase ¹²	Aromas de alimentos e bebidas	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
Esterase recombinante (PF1-K) ¹³	Preparação do (S)-flurbiprofeno	<i>Pseudomonas</i> sp.
Esterol-esterase, esteril-esterase e colesteril-esterase ^{14, 15}	Fabricação de papel	<i>Ophiostoma piceae</i> , <i>Pseudomonas</i> sp., <i>Chromobacterium</i>
Metil jasmonato- esterase ¹⁶	Hidrólise de ésteres metílicos do ácido abscísico	<i>Lycopersicon esculentum</i>
Feruloil-esterase ^{17, 18}	Síntese do éster pentilferulato usado em cosméticos e indústrias de perfumes.	<i>A. niger</i> , <i>Streptomyces Avermitilis</i> .

A atividade enzimática das esterases é diretamente dependente da chamada tríade catalítica. Os aminoácidos serina (Ser), histidina (His) e aspartato (Asp) são os componentes desta tríade. A hidrólise do substrato inicia com o ataque de um oxigênio ativado da hidroxila da Ser à carbonila do

¹⁰ Bornscheuer, U. T.; *FEMS Microbiology Reviews*, **2002**, 26, 73.

¹¹ Panda, T.; Gowrishankar, B. S., *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **2005**, 67, 160.

¹² Lomolino, G.; Rizzi, C.; Spettoli, P.; Curioni, A.; Lante, A., *Biotechnology*, **2003**, Nov/Dec, 32.

¹³ Baron, A.; Rombouts, F.; Drilleau, J. F.; Pilnik, W., *Lebensm. Wiss. Technol.*, **1980**, 13, 330.

¹⁴ Calero-Rueda, O.; Plou, F. J.; Ballesteros, A.; Martinez, A. T.; Martinez, M. J., *Biochim. Biophys. Acta.*, **2002**, 1599, 28.

¹⁵ Kontkanen, H.; Tenkanen, M.; Fagerstrom, R.; Reinikainen, T., *J. Biotechnol.*, **2004**, 108, 51.

¹⁶ Stuhlfelder, C.; Lottspeich, F.; Mueller, M. J., *Phytochemistry*, **2002**, 60, 233.

¹⁷ Giuliani, S.; Piana, C.; Setti, L.; Hochkoepler, A.; Pifferi, P. G.; Williamson, G., *Biotechnol. Lett.*, 2001, 23, 325.

¹⁸ Garcia, B. L.; Ball A. S.; Rodriguez J.; Perez-Leblic M. I.; Arias M. E.; Copa-Patino J.L., *Microbiol. Lett.*, **1998**, 158, 95.

substrato (éster) formando um intermediário tetraédrico. Este intermediário é estabilizado pelas ligações de hidrogênio formadas entre este e os grupos NH dos resíduos da cavidade do oxianion. A seguir, uma molécula de álcool é liberada e uma molécula de água ou outra molécula de álcool ataca o intermediário covalente promovendo a hidrólise. A His ativa esta molécula de água pela remoção de um próton e a hidroxila resultante ataca a carbonila do grupo acila ligado covalentemente à Ser. Ocorre então a formação de um segundo intermediário tetraédrico que também é estabilizado pelas ligações de hidrogênio com os grupos NH presentes. A His doa um próton ao oxigênio da Ser, liberando um ácido carboxílico. Finalmente a enzima fica livre para hidrolisar um novo substrato (Figura 1).^{5, 19, 20}

¹⁹ Bornscheuer, U. T., *FEMS Microbiology Reviews*, **2002**, 26, 73.

²⁰ Voet, D.; Voet, J. G.; Pratt, C. W., *Fundamentos de Bioquímica*, Artmed editora, **2000**.

Para avaliação da atividade enzimática, podem-se realizar ensaios de biocatálise monitorando uma reação por vez ou monitorando várias reações simultaneamente (multibiorreação).²¹ Estes ensaios são realizados em escala de 10-1000 mL ou em microescala e analisados por cromatografia a gás, cromatografia líquida de alta eficiência, por espectrometria de massas, ressonância magnética nuclear, por absorvância (com substratos cromogênicos) ou por fluorescência (com substratos fluorogênicos). Dentre as metodologias utilizadas, a triagem em microescala com sondas fluorogênicas, também denominada de triagem de alto desempenho (*high-throughput screening* – HTS), permite avaliar um grande número de amostras por unidade de tempo. Devido à sensibilidade o método emprega pequenas quantidades do catalisador e baixas concentrações dos substratos fluorogênicos.²² Estes substratos (sondas) são compostos que, em condições reacionais adequadas, liberam um fluoróforo, resultante da ação enzimática (Figura 2).²³

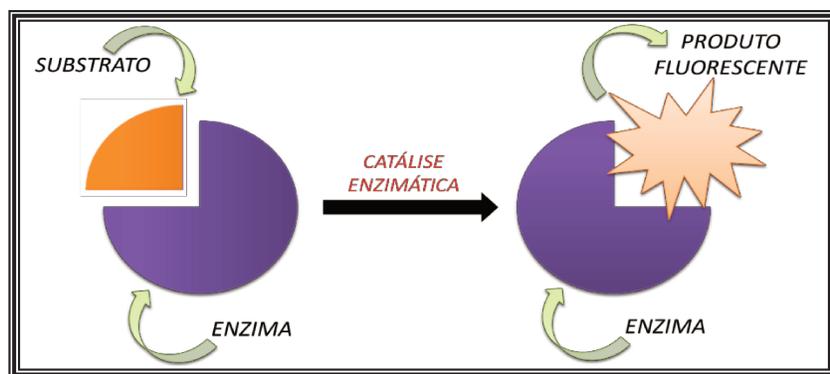


Figura 2. Exemplo genérico da catálise enzimática de um substrato fluorogênico.

²¹ Pinheiro, L., *Multibiorreações e suas aplicações para as sínteses de compostos enantiomericamente puros*, Tese de doutorado, UNICAMP, 2006.

²² Reymond, J. L. *Enzyme Assays: High-Throughput Screening, Genetic Selection and Fingerprinting* 2006, 1ª edição, WILEY-VCH.

²³ Goddard, J. P.; Reymond, J. L., *Trends in Biotechnol.*, 2004, 7, 363-370.

A fluorescência é um fenômeno que envolve a transição de um estado excitado singleto para o estado fundamental singleto. Essa transição é altamente provável sendo o tempo de vida do estado excitado singleto muito curto (10^{-5} s ou menos). Para um melhor entendimento de como ocorre tal fenômeno, é importante compreender os processos de relaxações vibracionais. A Figura 3 apresenta um diagrama parcial dos níveis de energia para uma molécula hipotética. São apresentados três níveis eletrônicos de energia: E_0 , E_1 e E_2 , sendo E_0 o estado fundamental e E_1 e E_2 os estados eletrônicos excitados. Uma vez excitada para E_1 ou E_2 , muitos processos que acarretam em perda de energia podem ocorrer, sendo os dois mais importantes a relaxação não-radiativa e a radiativa com emissão de fluorescência.

Dentre os métodos de relaxação não-radiativa estão a relaxação vibracional, que envolve a transferência do excesso de energia de uma espécie excitada vibracionalmente para as moléculas do solvente, podendo levar até 10^{-15} s para ocorrer (processo muito rápido) e o processo de conversão interna, caracterizado por ser uma relaxação não-radiativa entre níveis vibracionais mais baixos de um estado eletrônico para os níveis vibracionais mais altos de outro estado eletrônico (Figura 3b).

Já a fluorescência pode ser observada a partir do estado eletrônico (excitado) mais baixo, E_1 , para os vários níveis vibracionais de E_0 , havendo emissão de energia (Figura 3c).²⁴

²⁴ Holler, F. J.; Skoog, D. A.; Crouch, S. R., *Princípios de Análise Instrumental*, 8ª edição, 2009, 699.

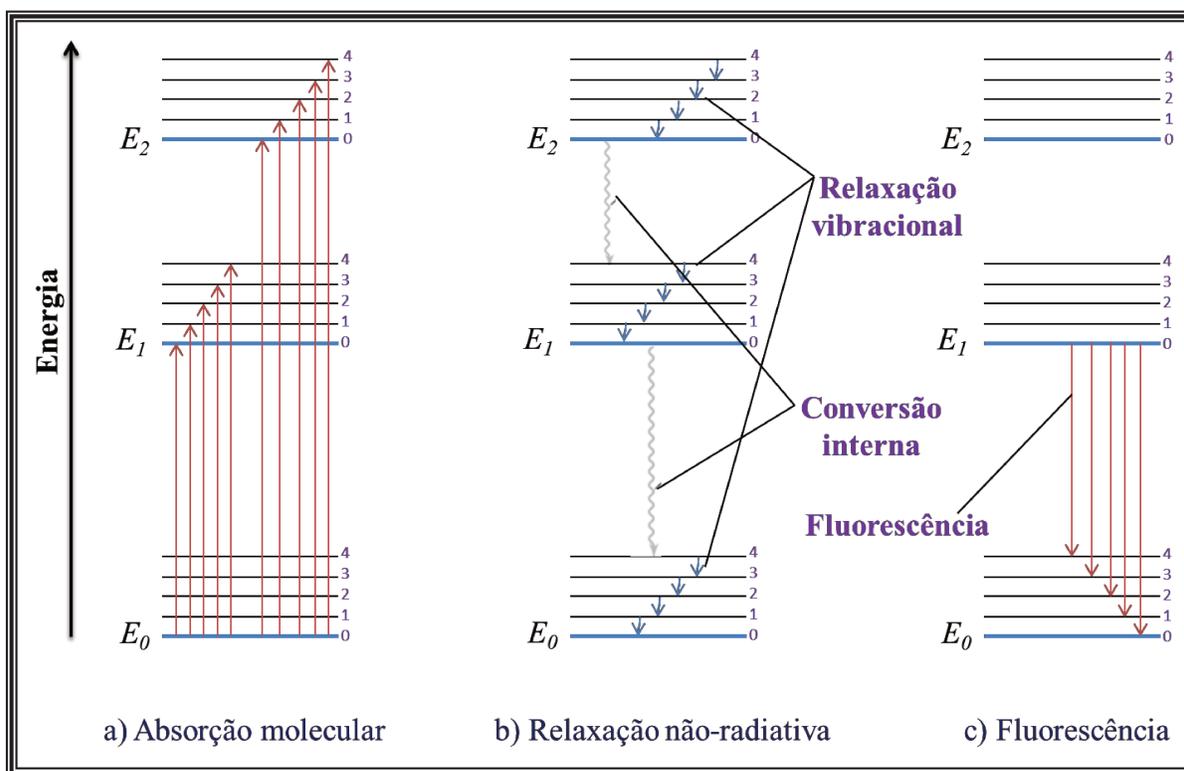


Figura 3. Diagrama de níveis de energia mostrando alguns dos processos que ocorrem durante **a)** absorção de radiação incidente, **b)** relaxação não-radiativa e **c)** emissão fluorescente por espécies

Os ânions fluorescentes mais utilizados estão os da umbeliferona ($\lambda_{\text{ex}} = 360\text{nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 460\text{nm}$), resofurina ($\lambda_{\text{ex}} = 570\text{nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 585\text{nm}$) e a fluoresceína ($\lambda_{\text{ex}} = 490\text{nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 514\text{nm}$),²⁵ que fluorescem no azul, vermelho e verde respectivamente²⁶ (Figura 4).

²⁵ λ_{ex} : comprimento de onda de excitação; λ_{em} : comprimento de onda de emissão.

²⁶ Reymond, J. L., *Enzyme Assays*, 2004, 22, 51-56;

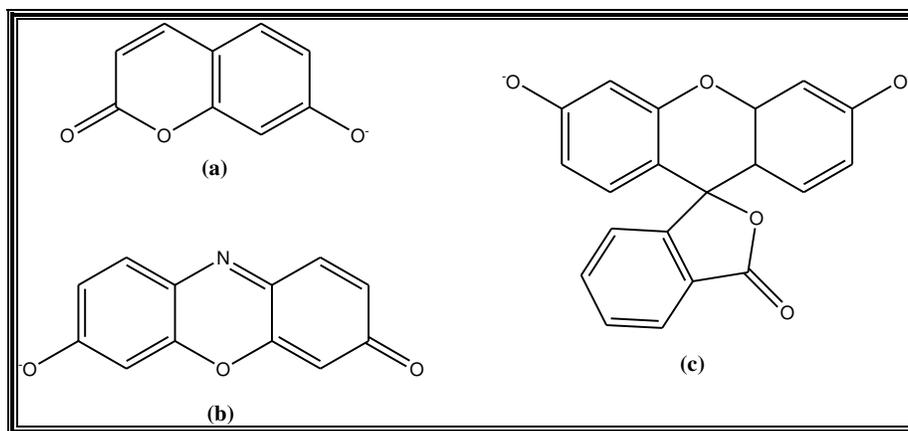


Figura 4. (a) umbeliferona, (b) resofurina e (c) fluoresceína: ânions conjugados utilizados em substratos fluorogênicos que na forma neutra são não fluorescentes.

Dentre as metodologias de triagem enzimática baseadas em fluorescência, a que utiliza a umbeliferona como sensor é uma das mais importantes, sendo aplicada, por exemplo, na avaliação da atividade catalítica de epóxido hidrolase, lipases, esterases e Baeyer-Villiger mono-oxigenases (BVMO).²⁷

Conhecendo-se o potencial biocatalítico, as enzimas podem ser aplicadas na construção rotas quimioenzimáticas de síntese com elevadas régio-, químio-, estéreo- e enantiosseletividade levando à produção de compostos com altos valores agregados.²⁸

Alguns modelos teóricos foram propostos com a finalidade de explicar as reações enzimáticas. Em 1984, E. Fischer propôs um mecanismo onde a interação da enzima com o substrato apresentava-se como o de uma chave e uma fechadura, respectivamente. Porém, este modelo admite completa rigidez da estrutura enzimática. Posteriormente, Koshland Jr. propôs o mecanismo de

²⁷ Reymond, J. L., *Enzyme Assays: High-Throughput Screening, Genetic Selection and Fingerprinting*, **2006**, 1ª edição, WILEY-VCH;

²⁸ a) Patel, R. N., *Food Techno. Biotechnol.*, **2004**, 42, 305. b) Faber, K., *Biotransformations in Organic Chemistry*, **2000**, 4ª edição, Springer.

encaixe induzido, onde já foi assumida a não rigidez da enzima e que um substrato pode induzir uma alteração na conformação enzimática para que possa haver o encaixe do substrato no sítio ativo da enzima e posterior formação do complexo enzima-substrato. Outros modelos foram propostos a fim de explicar as velocidades das reações catalisadas pelas enzimas e a enantiosseletividade. Em 1948, A. G. Ogston propôs a teoria dos três pontos, onde se admite que há um encaixe tridimensional do substrato no sítio ativo da enzima o que explica o seu comportamento enantiosseletivo. Devido a serem constituídas por resíduos de L-aminoácidos a quiralidade apresentada pelo substrato pode ser reconhecida. Logo, numa mistura racêmica, os enantiômeros podem reagir com diferentes velocidades.²⁷

A origem da enantiosseletividade das reações enzimáticas provem da discriminação enantiomérica pelo sítio ativo da enzima. Assim um enantiômero poderá reagir mais rapidamente que outro. Porém este é um ponto de vista muito simplificado, pois muitas enzimas distinguem centros próquirais e faces próquirais assim dando origem a compostos enantiomericamente puros ou quase puros a partir de compostos aquirais.⁵ Mais complexo ainda é explicar a formação de um único enantiômero a partir de um racemato por estereoinversão ou pela atuação diferenciada de uma única enzima sobre os enantiômeros num processo de enantioconvergência.

29, 30

A enantiosseletividade de uma enzima frente a um substrato é definida pela razão entre as constantes de especificidade (k_{cat} / K_M) para cada

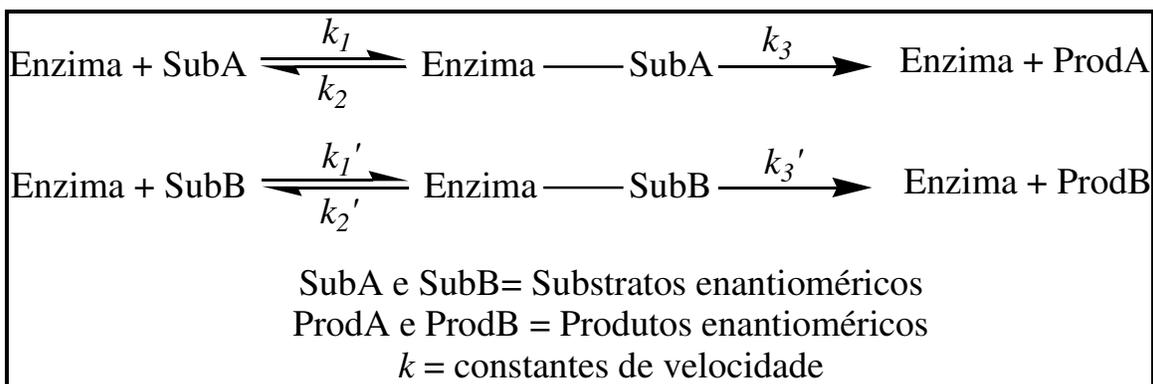
²⁹ Monterde, M. I.; Lombard, M.; Archelas, A.; Cronin, A.; Arand, M.; Furstoss, R., *Tetrahedro*, **2004**, *15*, 2801.

³⁰ Akiyama, K.; Yamamoto, S.; Fujimoto, H.; Ishibashi, M., *Tetrahedron*, **2005**, *61*, 1827.

enantiômero, onde k_{cat} é definido como constante de velocidade catalítica e K_M como a constante de Michaelis-Menten (Equação 1).³¹

$$E = \frac{(k_{cat} / K_M) \text{ do enantiômero rápido}}{(k_{cat} / K_M) \text{ do enantiômero lento}} \quad (\text{Equação 1})$$

Considerando a cinética de Michaelis-Menten (Esquema 2), quando a resolução cinética enzimática envolve uma mistura racêmica, os enantiômeros disputam pelo sítio ativo da enzima. Logo, um enantiômero irá reagir mais rapidamente que outro. Sob o ponto de vista cinético, a determinação das constantes de velocidade para cada enantiômero pode ser trabalhosa.



Esquema 2. Resolução cinética enzimática de uma reação irreversível frente a dois enantiômeros.

Em 1982, Sih *et al.*³² propuseram uma metodologia para determinação do valor de E com base nos valores de conversão (c) e excesso enantiomérico (ee), sendo, atualmente, a mais utilizada para esta finalidade (Equações 2 e 3).

³¹ Faber, K. *Biotransformations in Organic chemistry*, 1999, Springer;

³² Chen, C. S.; Fujimoto, Y.; Girdaukas, G.; Sih, C. J., *J. Am. Chem. Soc.*, 1982, 104, 7294.

$$E = \frac{\ln [1 - c (1 + ee \text{ produto})]}{\ln [1 - c (1 - ee \text{ produto})]} \quad (\text{Equação 2})$$

$$E = \frac{\ln [1 - c (1 + ee \text{ substrato})]}{\ln [1 - c (1 - ee \text{ substrato})]} \quad (\text{Equação 3})$$

A conversão expressa quanto do material de partida foi convertido em produto e pode ser obtida por cromatografia em fase gasosa (CG) ou por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Já o excesso enantiomérico, indica a diferença entre as quantidades de cada enantiômero produzido, expresso em porcentagem, sendo obtido com o auxílio de técnicas como a cromatografia (CG ou CLAE) com o uso de colunas quirais, por exemplo. Uma reação com E elevado ($E > 30\%$) terá altos valores de ee e conversões próximas a 50%.

Apesar de eficiente, a metodologia desenvolvida por Sih *et al.*³² torna-se inviável quando se tem uma grande quantidade de culturas de micro-organismos ou de enzimas isoladas. Uma alternativa seria a utilização de métodos espectrofotométricos, com o uso de substratos quirais, para determinação do valor de E considerando as medidas das velocidades iniciais para cada um dos enantiômeros separadamente (Equação 4).³³

$$E = \frac{\text{velocidade inicial do enantiômero mais rápido}}{\text{velocidade inicial do enantiômero mais lento}} \quad (\text{Equação 4})$$

Com base nesse princípio, Kazlauskas *et al.*³³ propuseram uma metodologia bastante simples para obtenção de um valor exato de E para ensaios com enzimas isoladas utilizando o substrato e competidor

³³ Janes, L. E.; Kazlauskas, R. J., *J. Org. Chem.* **1997**, 62, 4560.

cromogênicos. Esta metodologia consiste na inserção de um substrato competidor de modo a simular uma competição entre enantiômeros. Mais tarde, Reymond *et al.*³⁴ propuseram uma metodologia que permite estimar o valor de E para hidrolases (lipases, esterases e epóxido-hidrolases) em ensaios de alto desempenho, utilizando sondas fluorogênicas quirais. Apesar da sua eficiência quanto a uma avaliação qualitativa da enantiosseletividade, o uso deste método pode acarretar desvios de até 70%, acima ou abaixo do valor real de E , pois ignora o efeito de competição dos enantiômeros pelo sítio ativo da enzima. Com base no que foi proposto por Reymond e Kazlauskas,^{33,34} nosso grupo de pesquisas implementou uma nova metodologia para avaliação da razão enantiomérica real de epóxido-hidrolases com células íntegras utilizando sondas fluorogênicas quirais e um competidor não fluorogênico, realizando ensaios com células íntegras.³⁵

³⁴ Badalassi, F.; Wahler, D.; Klein, G.; Crotti, P.; Reymond, J. L., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2000**,39,4067.

³⁵ Mantovani, S. M.; Oliveira, L. G.; Marsaioli, A. J., *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, **2008**, 52–53, 173.

OBJETIVOS

OBJETIVOS

Visando uma ampla caracterização da microbiota existente nas lagoas de sedimentação (Mina do Sossego, Canaã dos Carajás – PA) oriundas do processo de extração de cobre, este trabalho foi dividido em dois capítulos que abordam, de modo amplamente distinto, a diversidade microbiológica e enzimática neste ambiente.

Capítulo I:

O Capítulo I aborda a parte de bioprospecção e tem como objetivo, avaliar a diversidade microbiológica existente na lagoa de sedimentação, fazendo uso de técnicas de isolamento, caracterização morfológica e por espectrometria de massas (MALDI-TOF).

Capítulo II

Este capítulo tem como objetivo avaliar o perfil enzimático das cepas isoladas utilizando a técnica de triagem de alto desempenho para avaliação de esterases, lipases, epóxido-hidrolases e monooxigenases. Ainda, foi proposto avaliar o perfil enantiosseletivo frente a sondas quirais de esterases utilizando *Quick-E*.

*Capítulo I: Isolamento e caracterização de
micro-organismos de rejeitos de mineração
de cobre*

RESULTADOS E DISCUSSÃO

1. Coleta das amostras

As amostras foram coletadas na Mina do Sossego, localizada no município de Canaã dos Carajás, no estado do Pará, aproximadamente 900 km de Belém, pelo engenheiro da VALE Tobias Cabral C. M. de Andrade (Figura 5). Foram coletados dois diferentes rejeitos aquosos (**a** e **b**) e uma amostra de minério moído (**c**):

Amostra (a): 450 mL de rejeito aquoso recém-saído do processo de flotação;

Amostra (b): 200 mL de lodo acumulado na margem da lagoa de sedimentação, onde os rejeitos aquosos do processo de flotação são desaguados;

Amostra (c): 200 g de minério moído, com o qual o processo de flotação é alimentado.



Figura 5. Pontos de coleta das amostras (a), (b) e (c) do processo de mineração de cobre na Mina do Sossego.

As amostras coletadas (a, b e c) foram analisadas por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) acoplada a um detector de Energia Dispersiva (EDS, *Energy Dispersive Spectroscopy*). Esta técnica possibilita, de maneira rápida e eficiente, a obtenção da composição química de modo qualitativo e semi-quantitativo de uma grande variedade de materiais.³⁶ (Tabela 3).

³⁶ Brum, T. M. M.; Chodur, N.; Liccardo, A.; Fisher, A. C.; Acauan, R. B., *Pesquisas em Geociências*, **2003**, 30(2): 3.

Tabela 3. Resultados da análise MEV-EDS para as amostras (a), (b) e (c)

Elemento	Amostra (a)		Amostra (b)		Amostra (c)	
	% m (DP)	% at (DP)	% m (DP)	% at (DP)	% m (DP)	% at (DP)
O	46,65 (1,63)	63,12 (1,45)	44,50 (3,86)	62,44 (3,78)	49,85 (6,56)	66,91 (5,76)
Na	3,61 (1,11)	3,40 (1,03)	3,04 (0,49)	2,98 (0,57)	1,43 (0,45)	1,35 (0,47)
Mg	2,36 (0,09)	2,10 (0,07)	2,40 (0,37)	2,23 (0,40)	3,03 (0,26)	2,69 (0,34)
Al	6,19 (0,81)	4,98 (0,70)	4,93 (0,60)	4,12 (0,60)	5,57 (0,63)	4,46 (0,69)
Si	24,52 (0,60)	18,91 (0,59)	21,97 (1,80)	17,61 (1,91)	19,5 (2,33)	15,05 (2,45)
P	0,14 (0,24)	0,10 (0,17)	0,54 (0,49)	0,39 (0,35)	1,03 (0,25)	0,72 (0,20)
S	n.d	n.d	n.d.	n.d.	0,84 (0,09)	0,57 (0,08)
Cl	0,27 (0,24)	0,17 (0,15)	0,30 (0,27)	0,18 (0,16)	0,11 (0,19)	0,07 (0,12)
K	1,81 (0,14)	1,00 (0,08)	1,14 (0,12)	0,65 (0,07)	1,64 (0,47)	0,91 (0,29)
Ca	3,98 (0,18)	2,15 (0,11)	5,35 (0,58)	3,01 (0,34)	4,64 (0,98)	2,51 (0,64)
Ti	0,32 (0,08)	0,14 (0,04)	0,25 (0,22)	0,12 (0,12)	0,42 (0,36)	0,19 (0,16)
Fe	9,91 (0,86)	3,85 (0,38)	15,34 (1,62)	6,19 (0,83)	10,98 (0,15)	4,24 (0,23)
Cu	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,72 (0,63)	0,25 (0,22)

% m (% em massa média); % at (% atômico média); DP (desvio padrão), nd (não detectado). Todos os experimentos foram realizados em triplicatas.

Com base nos resultados obtidos, foi observado que os elementos Cu e S estão presentes apenas na amostra de minério moído (c). É coerente que, dentre as três amostras analisadas, somente esta apresente tal composição, visto que os dois principais tipos de minérios de cobre encontrados são a calcopirita (CuFeS_2) e a calcosita (Cu_2S), ambos contendo enxofre.

2. Meios de cultura

Com o intuito de isolar uma grande diversidade de micro-organismos, procurou-se otimizar as condições experimentais, atentando para parâmetros como temperatura e composição nutricional. A temperatura utilizada para o crescimento microbiano foi de 28°C devido a estar próxima das condições exigidas para a maioria dos micro-organismos.

Objetivando isolamento de micro-organismos heterotróficos, foram utilizados diferentes meios de cultura com composições nutricionais que favoreçam o crescimento de bactérias (NB e TSB), leveduras (YM) e fungos (ME). Este procedimento foi realizado apenas para as amostras de rejeitos **(a)** e **(b)**.

Inicialmente, foi realizado um pré-cultivo dos micro-organismos das amostras **(a)** e **(b)** nos diferentes meios de cultura líquidos, caracterizando assim as amostras enriquecidas. Outra metodologia utilizada foi transferir alíquotas das amostras de rejeitos **(a)** e **(b)** diretamente para meios de cultura semi-sólidos, caracterizando assim as amostras não enriquecidas (Figura 6).

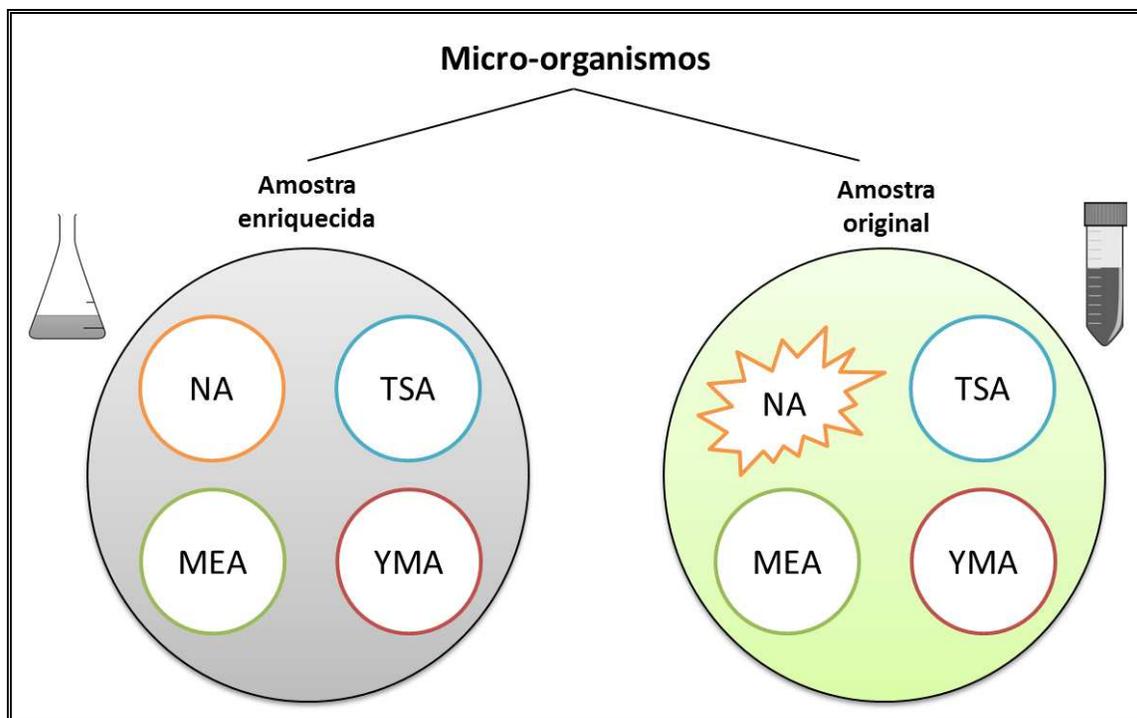


Figura 6. Representação dos consórcios obtidos a partir das amostras enriquecidas e não enriquecidas.

Optou-se por utilizar estas duas metodologias devido à influência que cada uma pode ter sobre o crescimento microbiano. Nas amostras enriquecidas, o crescimento foi realizado em meio líquido (28 °C, 200 rpm) com posterior transferência de alíquotas do inóculo para placas de Petri contendo seu respectivo meio semi-sólido. O uso do meio de cultura líquido acarreta numa maior disponibilidade de nutrientes favorecendo o crescimento microbiano. Consideram-se como amostras não enriquecidas, as que foram inoculadas diretamente em diferentes meios de cultura semi-sólidos, sem o prévio enriquecimento em meio líquido. Apesar de ser recomendado o uso de fungicidas e bactericidas, optou-se por não utilizá-los devido à ausência de informações microbiológicas referente às matrizes que estão sendo avaliadas neste trabalho.

3. Isolamento das culturas puras

A condição fundamental para caracterização e identificação de uma cultura é a mesma encontrar-se pura. Neste trabalho, foram obtidos diferentes consórcios microbianos oriundos das amostras enriquecidas e não enriquecidas em diferentes meio de cultura (Figura 7).

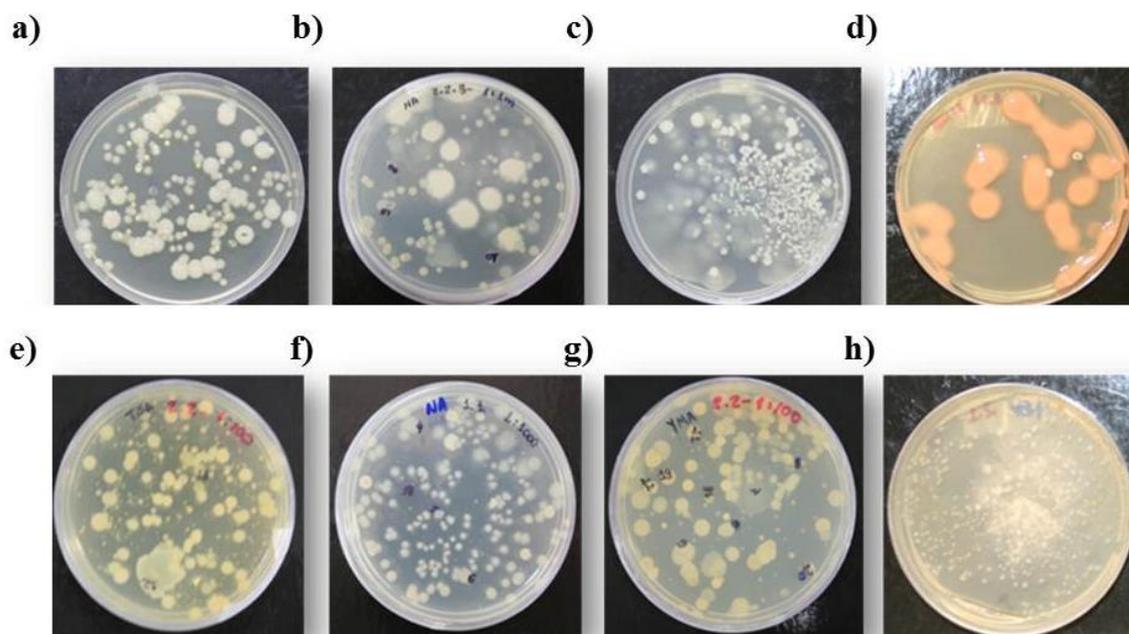


Figura 7. Consórcios microbianos obtidos com enriquecimento a) TSB, b) NB, c) YM e d) ME sem seus respectivos meios semi-sólidos e consórcios oriundos das amostras sem prévio enriquecimento e) TSA, f) NA, g) YMA e h) MEA. (Fotos: amostras VALE, M^a Lair Sabóia de O. Lima e Bruna Zucoloto da Costa).

Os dois métodos utilizados possibilitaram o isolamento de uma grande diversidade de micro-organismos (230 micro-organismos entre bactérias, leveduras e fungos). As colônias foram inicialmente diferenciadas com base nas suas características macroscópicas (cor, borda, elevação, brilho) (Figura 8).

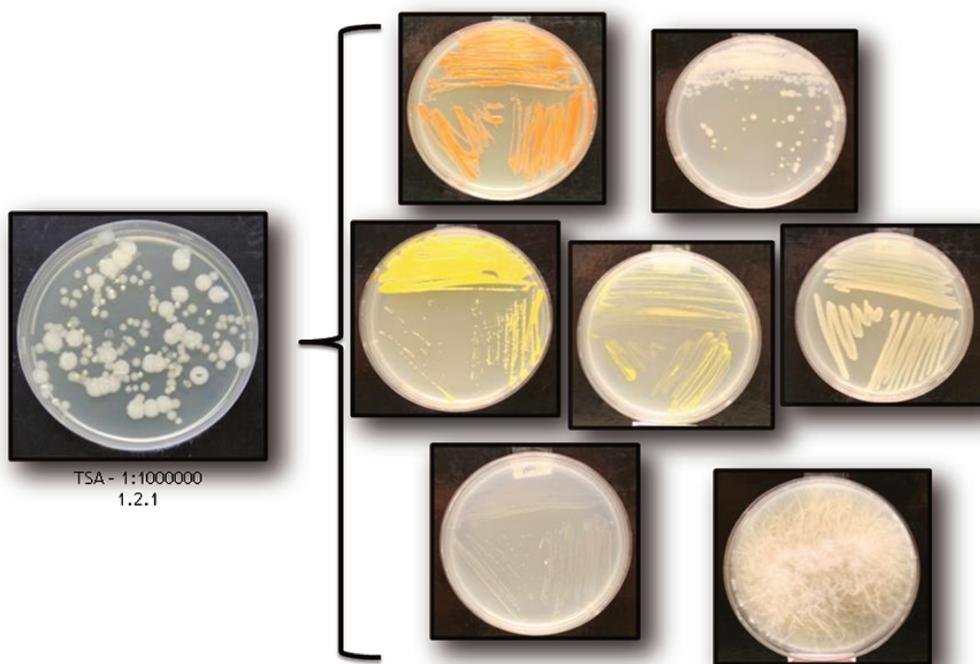


Figura 8. Amostra da diversidade microbiana isolada a partir dos consórcios das amostras enriquecidas. (Fotos: amostras VALE, M^a Lair Sabóia de O. Lima e Bruna Zucoloto da Costa).

Dentre os micro-organismos das amostras enriquecidas, foram obtidas 137 colônias isoladas. A quantidade de bactéria se sobressaiu frente a de leveduras e de fungos (Tabela 4). Tal observação pôde ser constatada devido ao fato de as bactérias se reproduzirem mais rapidamente, o que torna mais escassa a demanda de nutrientes no meio para crescimento de outros micro-organismos.

Tabela 4: Micro-organismos isolados a partir das amostras de rejeitos de mineração de cobre enriquecidas

Micro-organismos isolados	Meios de Cultura			
	NA	TSA	YM	M
Bactérias	23	23	29	11
Leveduras	--	--	1	--
Fungos	--	--	--	1
n.c.	1	1	--	4
TOTAL	24	24	30	16

n.c.= não classificado.

Das amostras não enriquecidas foram obtidas 93 colônias isoladas de micro-organismos entre bactérias, leveduras e fungos (Tabela 5), prevalecendo novamente a quantidade de bactérias com relação a leveduras e fungos.

Tabela 5: Micro-organismos isolados a partir das amostras de rejeitos de mineração de cobre não enriquecidas

Micro-organismos isolados	Meios de Cultura			
	NB	TSB	YM	M
Bactérias	31	30	23	22
Leveduras	0	0	1	10
Fungos	0	0	3	4
n.c.	--	--	8	5
TOTAL	31	30	35	41

n.c.= não classificado.

Ainda, pôde-se constatar que fungos e leveduras cresceram somente em meios de cultura cuja composição nutricional era mais rica (YM – YMA e ME – MEA).

4. Caracterização de culturas puras

Técnicas simples de coloração tornam possível a visualização de micro-organismos ao microscópio óptico, porém, nem sempre as características intrínsecas dos mesmos são perceptíveis sendo necessário utilizar uma coloração diferencial.

Em 1884, Christian Gram desenvolveu uma técnica de coloração diferencial, posteriormente conhecida como “Coloração de Gram”, enquanto pesquisava uma maneira para visualizar a bactéria *Pneumococcus* sp. em tecido pulmonar de pacientes falecidos devido à pneumonia³⁷.

A coloração de Gram baseia-se na diferença da composição das paredes celulares das bactérias e como estas serão distintamente coradas. Bactérias denominadas Gram (-) possuem uma fina camada de glicoproteína (peptideoglicano) recoberta por uma espessa camada formada principalmente por lipoproteínas e substâncias lipídicas. Já as intituladas Gram (+) possuem uma única e espessa camada de glicoproteína (Figura 9).

³⁷ Pelczar Jr., M. J., Chan, E. C. S., Krieg, N. R.; *Microbiologia, Conceitos e Aplicações*, Vol 1, 2ª edição, Makron Books.

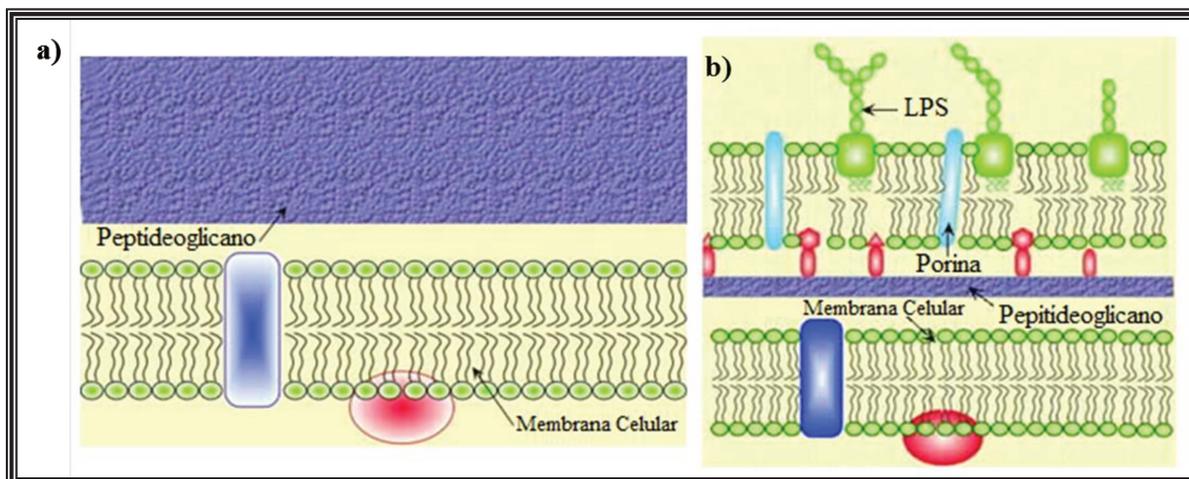


Figura 9. Representação das paredes celulares de bactérias a) Gram (+) e b) Gram (-).

As colônias isoladas foram coradas segundo o método de Gram a fim de diferenciar, ao nível microscópico, bactérias Gram (+), bactérias Gram (-) e leveduras (estas são também coradas, mas não podem ser classificadas quanto a coloração, pois estes eucariotos apresentam parede celular diferenciada) (Figura 10).

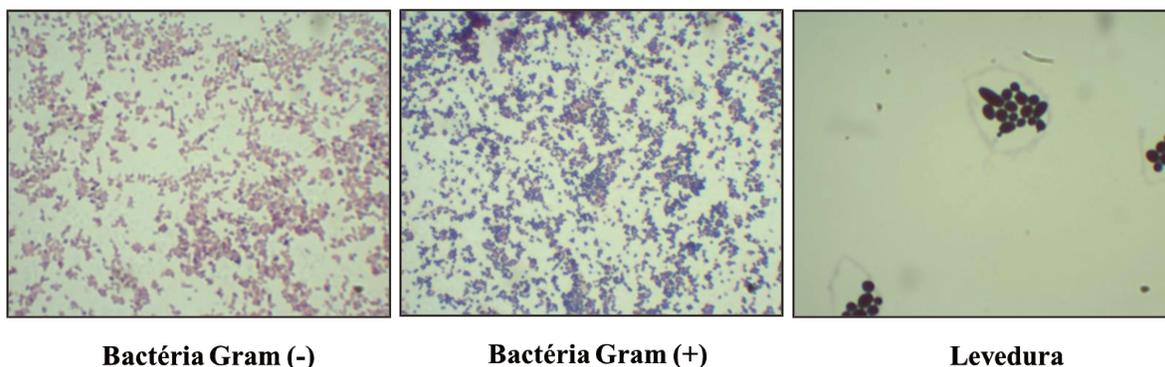


Figura 10. Micro-organismos corados pelo método de Gram.

Até o momento, 192 bactérias isoladas foram analisadas pela coloração diferencial de Gram. Para as bactérias isoladas a partir das amostras não enriquecidas, 17 (20%) foram caracterizadas como Gram (-) e 69 (80%) como

Gram (+). Ressalta-se que das 105 bactérias isoladas a partir das amostras enriquecidas, mais de 50% foram caracterizadas como Gram (-), um valor bem superior ao obtido para as bactérias isoladas a partir das amostras originais de rejeitos.

Além de caracterizar de modo mais geral, que é o que permite a coloração diferencial de Gram, é importante caracterizar os micro-organismos isolados ao nível de gênero e espécie (quando possível). Para tanto, diversas técnicas têm sido utilizadas com esta finalidade.

Uma metodologia bastante promissora e rápida é a caracterização de micro-organismos utilizando a espectrometria de massas com fonte de ionização do tipo MALDI (do inglês, *Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization*) acoplada a um analisador do tipo TOF (do inglês, *Time of Flight*).³⁸

A caracterização por MALDI-TOF encontra-se em andamento e os resultados comparados com o banco de dados da Bruker.³⁹ Até o momento, observou-se a predominância de bactérias dos gêneros *Pseudomonas* sp., *Bacillus* sp., *Acinetobacter* sp., *Delfitia* sp. e *Escherichia* sp..

Um fator muito importante que contribuiu para seleção de alguns gêneros de bactérias é relacionado à forma como estes micro-organismos foram isolados. Cada meio de cultura apresenta uma composição nutricional que favorece o crescimento de uma determinada microbiota. Isto favorece diretamente o crescimento de uma colônia em relação à outra. Outro ponto a ser considerado é a disponibilidade de oxigênio. Neste caso, a forma de isolamento favoreceu o crescimento de micro-organismos aeróbios e aeróbios facultativos.

³⁸ Tang, YW.; Stratton, C. W., *Advanced Techniques in Diagnostic Microbiology*, 2006, New York, NY: Springer-Verlag.

³⁹ Banco de dados utilizado na caracterização por MALDI-TOF: *Bruker Biotyper*

Como a caracterização por MALDI-TOF consiste na comparação com um perfil proteico apresentado em um banco de dados, pode-se não conseguir caracterizar alguns micro-organismos por esta técnica. Ainda, vale ressaltar que é interessante, além de se ter os resultados de caracterização por espectrometria de massas, utilizar outras técnicas que permitam também identificar os micro-organismos em estudo (RNA 16S, por exemplo).

*Capítulo II: Perfil enzimático e
enantiosseletivo de micro-organismos de
rejeitos de mineração de cobre*

RESULTADOS E DISCUSSÃO

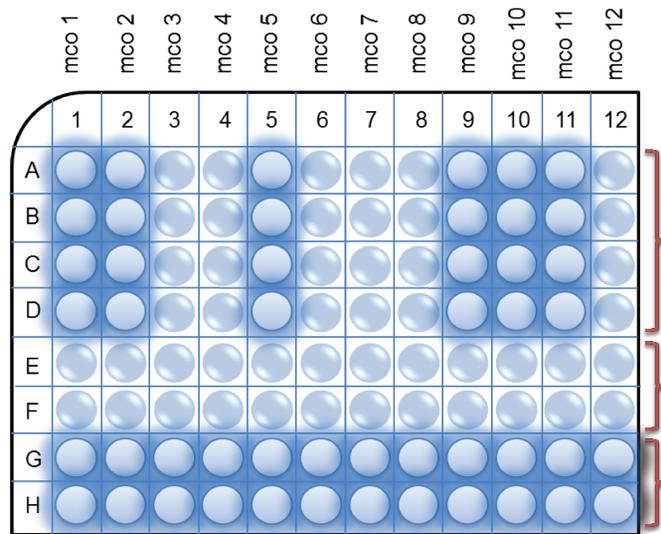
1. Triagem de alto desempenho

Devido ao seu baixo custo, rapidez, miniaturização e sensibilidade, a triagem de alto desempenho é uma técnica eficiente quando se trata da determinação da atividade enzimática frente a substratos fluorogênicos adequados. Neste trabalho, micro-organismos isolados a partir de rejeitos de mineração de cobre (Capítulo 1 desta dissertação) tiveram suas atividades enzimáticas identificadas por HTS. Devido a grande quantidade de micro-organismos isolados, esta técnica foi a mais adequada para tal finalidade.

Os ensaios de HTS são realizados em microplacas de 96 poços (200 μ L) utilizando sondas fluorogênicas não comerciais, sintetizadas em nosso grupo de pesquisas, que apresentam a umbeliferona como sensor fluorogênico.⁴⁰ Nestes ensaios, o micro-organismo transforma o substrato (sonda fluorogênica) via catálise enzimática. Após, este produto da ação enzimática passa por uma reação em cascata, sendo inicialmente oxidado pelo NaIO₄, sofrendo posteriormente uma β -eliminação provocada pelo BSA presente no meio, formando o ânion umbeliferila que é fluorescente no pH de trabalho (7,4).⁴¹ O esquema das reações enzimáticas está representado na figura 11.

⁴⁰ Reymond, J. L., *Enzyme Assays: High-Throughput Screening, Genetic Selection and Fingerprinting*, 2006, 1ª edição, WILEY-VCH.

⁴¹ Para uma revisão ver: a) Sicard, R.; Chen, L. S.; Marsaioli, A. J.; Reymond, J. L., *Adv. Synth. Catal.* **2005**, 347, 1041. b) García, E. G.; Helaine, V.; Klein, G.; Schuermann, M.; Sprenger, G. A.; Fessner, W. D.; Reymond, J. L., *Chem. Eur. J.* , **2003**, 9, 893. c) Wahler, D.; Badalassi, F.; Crotti, P.; Reymond, J. L., *Chem. Eur. J.*, **2002**, 8, 3211.



LEGENDA

-  FLUORESCENTE mco → micro-organismo
-  NÃO FLUORESCENTE

ENSAIO
sonda + micro-organismo + BSA + NaIO₄

CONTROLE NEGATIVO
sonda + tampão + BSA + NaIO₄

CONTROLE POSITIVO
produto da reação enzimática + micro-organismo + BSA + NaIO₄

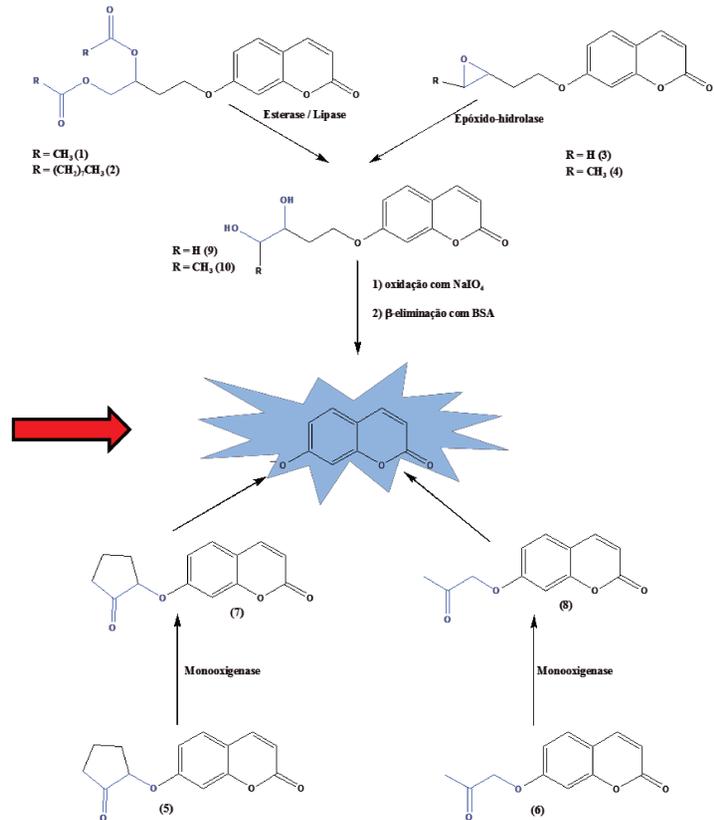


Figura 11: Representação de um ensaio de HTS em microplaca de 96 poços, apresentando o ensaio, controle negativo, controle positivo e mecanismo da reação em cascata que ocorre após a liberação do produto via catálise enzimática.

Os resultados obtidos nos ensaios de HTS com os valores dos percentuais de conversão de cada ensaio, ao final de 72 horas, encontram-se anexos nesta dissertação. Dos micro-organismos isolados dos consórcios de NA, 30 apresentaram atividade para hidrólise de ésteres de cadeia curta (1), 28 para ésteres de cadeia longa (2), 18 para monooxigenase (5 e 6) e apenas 1 apresentou atividade para epóxido-hidrolase (3 e 4), sendo esta atividade identificada para epóxidos não terminais.

Para os micro-organismos isolados dos consórcios de YMA, 24 apresentaram atividade para esterases (1) e 30 para lipases (2). Para epóxido-hidrolases (3 e 4), 2 apresentaram atividade para epóxido terminal (3) e 4 para epóxido não terminal (4). Para as monooxigenases, 25 apresentaram atividade frente às sondas (5) e (6).

Com relação aos isolados dos consórcios microbianos de TSA, observou-se, assim como em NA e YMA, uma predominância em micro-organismos que apresentaram atividade para hidrólise de ésteres de cadeia curta e longa. Isto é esperado devido a grande incidência de esterases e lipases nos organismos vivos. Para estes isolados, foram observadas atividades enzimáticas frente às sondas (1) (35 micro-organismos), (2) (34 micro-organismos), (3) (2 micro-organismos), (4) (8 micro-organismos), (5) e (6) (21 micro-organismos).

Dos resultados obtidos para identificação de epóxido-hidrolases, observou-se que, embora não tenham sido encontrados uma elevada quantidade de micro-organismos com tal atividade, há uma preferência frente a epóxidos não terminais (4), fato este não muito comum, provavelmente devido a fatores estéreos. Por outro lado, o padrão esperado para esterases e lipases foi condizente com o esperado, já que estas hidrolases são mais comumente encontradas. Dos micro-organismos investigados, foram

detectadas atividades enzimáticas para ésteres e atividades enzimáticas de monooxigenases (Figura 12). Foram considerados positivos os ensaios que apresentaram percentual de conversão da sonda fluorogênica no produto maior que 5% ao final de 72 horas (Equação 5).

Equação 5:

$$\% \text{Conversão} = \left[\frac{(\text{média ensaios com micro-organismos}) - (\text{média controles negativos})}{(\text{média controles positivos})} \right] \times 100$$

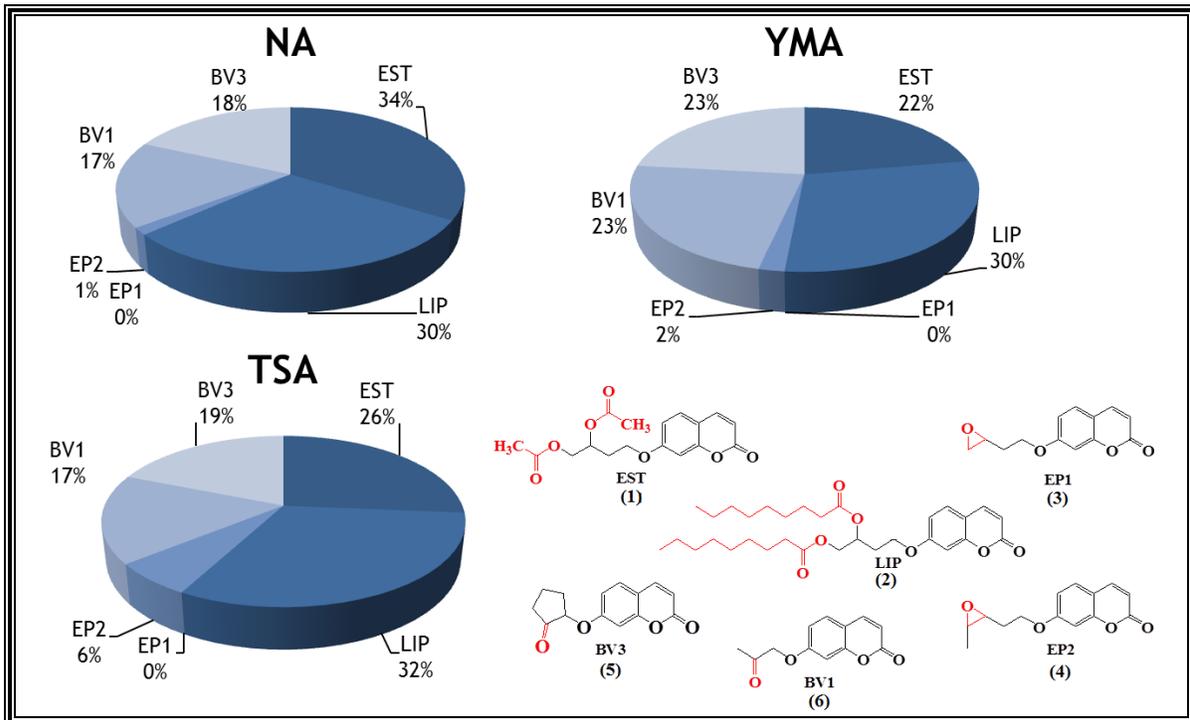
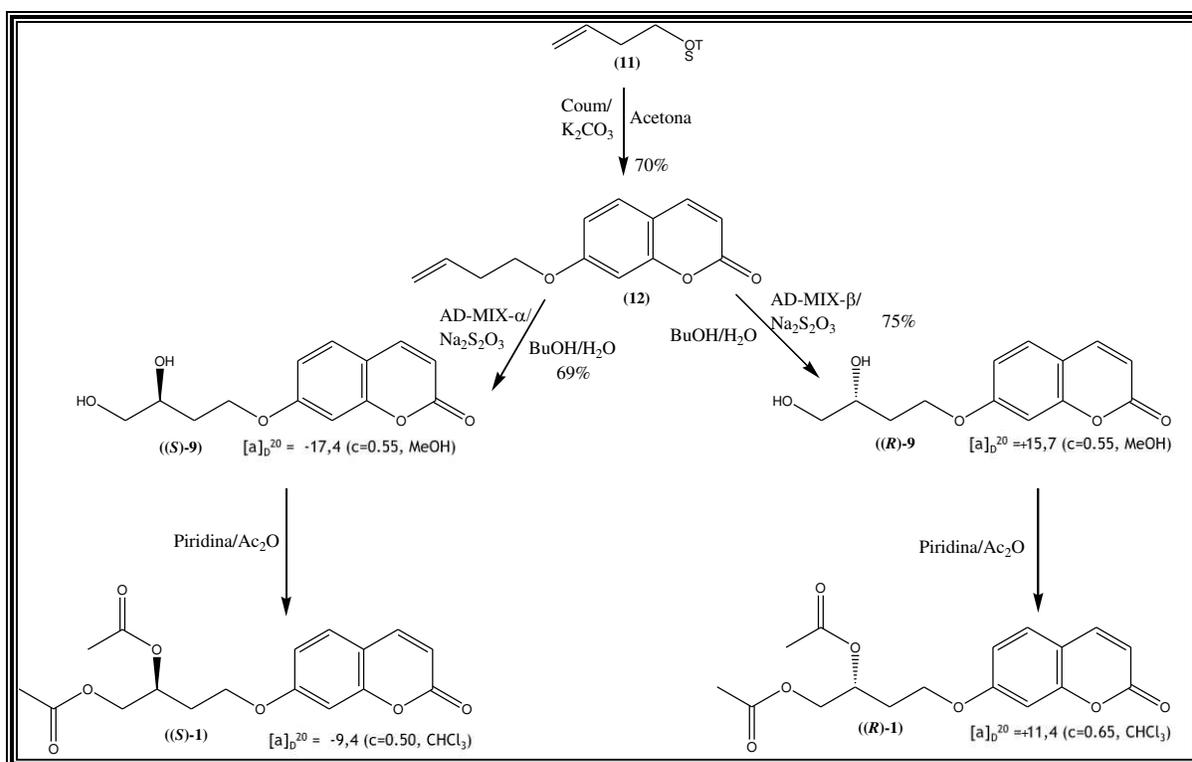


Figura 12: Gráficos representativos das atividades enzimáticas dos micro-organismos isolados dos diferentes consórcios microbianos utilizando as sondas fluorogênicas.

2. Adaptação do *Quick-E* com células íntegras para identificação de esterases enantiosseletivas

Após investigação do potencial enzimático dos isolados, partiu-se para uma avaliação do perfil da enantiosseletividade dos micro-organismos que apresentaram percentual de conversão acima de 5% frente à sonda **1**, ao final de 72 horas. Para tanto, foram sintetizadas sondas fluorogênicas quirais enantiomericamente enriquecidas ((*S*)-**1** e (*R*)-**1**) partindo da 7-hidroxycumarina umbeliferona (Esquema 3).⁴²



Esquema 3. Síntese das sondas fluorogênicas (*S*)-(3,4-diacetoxibutil)umbeliferona, ((*S*)-**1**) e (*R*)-(3,4-diacetoxibutil)umbeliferona, ((*R*)-**1**).

⁴² Wahler, D.; Badalassi, F.; Crotti, P.; Reymond, J-L., *Chem. Eur. J.*, **2002**, 8, No. 14, 3211

Para os ensaios com as sondas quirais ((*S*)-1 e (*R*)-1) foram selecionados 3 micro-organismos, V-NA-7, V-NA-17 e V-NA-21, por apresentarem elevados percentuais de conversão, 42%, 73% e > 99%, respectivamente. Os ensaios foram realizados em formato *HTS* utilizando as sondas fluorogênicas ((*S*)-1 e (*R*)-1) avaliadas individualmente com leituras de intensidade de fluorescência de uma em uma hora durante dezoito horas. Para a otimização da metodologia de triagem com as sondas quirais, os ensaios foram realizados em duas condições diferentes: na ausência de um competidor (**13**), adaptado da metodologia de Reymond *et. al.*³⁴ e na presença de um competidor, como foi proposto por Kazlauskas *et. al.*(com enzimas),³³ e realizado na avaliação enantiosseletiva de epóxido-hidrolases.³⁵ (Figura 13).

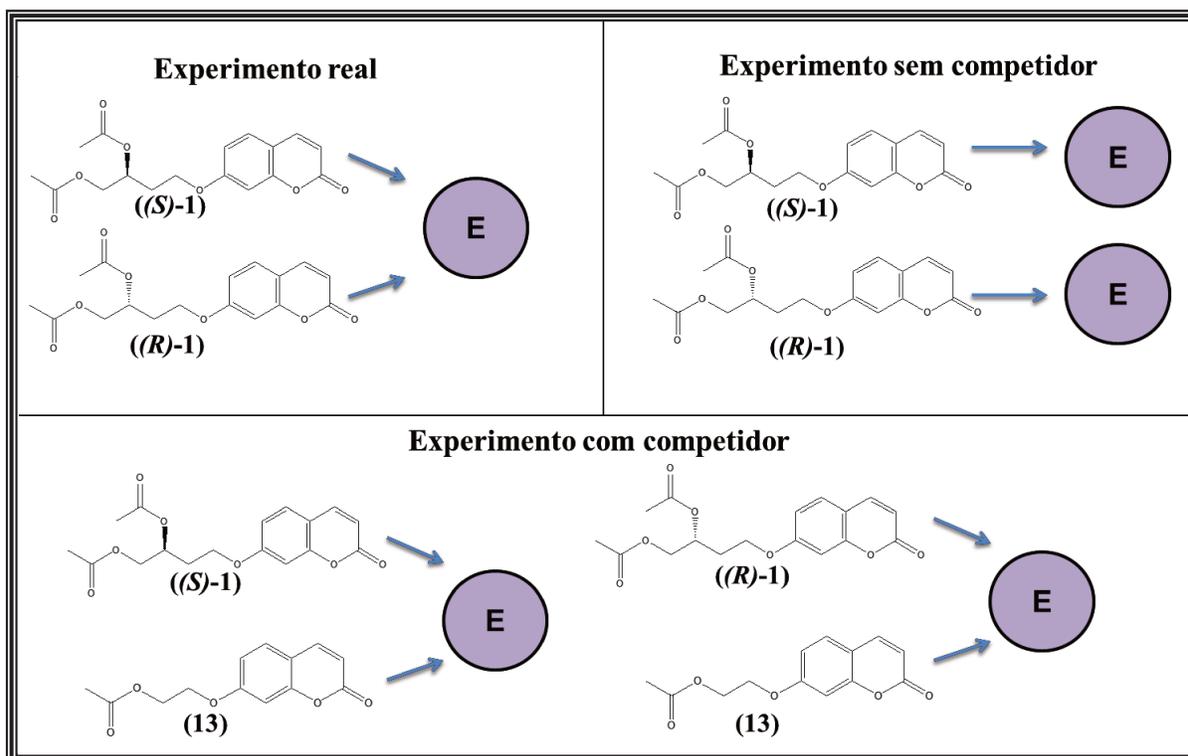


Figura 13. Representação de um ensaio de *HTS*, de um ensaio sem competição e de um ensaio com competição utilizando as sondas fluorogênicas quirais ((*S*)-1 e (*R*)-1) e o competidor (2-acetoxietil)umbeliferona (**13**).

Para determinação de *E*, as intensidades dos sinais de fluorescência das biorreações (com cada micro-organismo) de frente à sonda quirál, foram avaliados nas duas condições experimentais (Figura 14). Quanto à inserção do competidor, este foi utilizado na mesma quantidade da sonda a fim de simular uma competição entre enantiômeros pelo sítio ativo da enzima. As placas foram analisadas em leitor de fluorescência *flash scan*

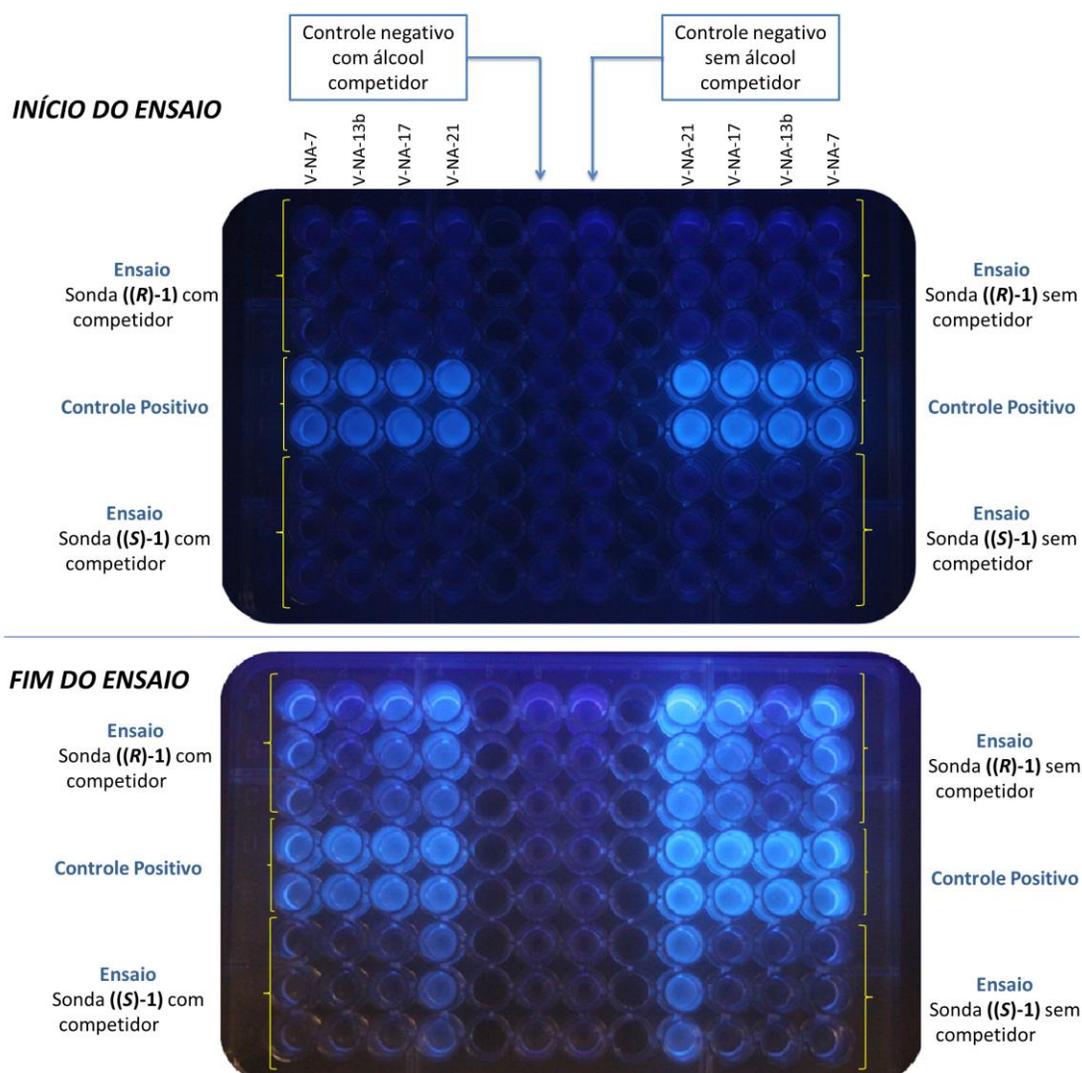


Figura 14. Ensaios de *Quick-E* com as sondas fluorogênicas (S)-1 e (R)-1 mostrando a influência do composto competidor (13) na intensidade de fluorescência produzida ao final do ensaio. (Fotos *Quick-E*: Maria Lair Sabóia de O. Lima)

Para determinação dos valores de E , inicialmente foi construída uma curva de calibração com a intensidade de fluorescência *versus* concentração do ânion umbeliferila, o qual é o produto da biorreação (Figura 15).

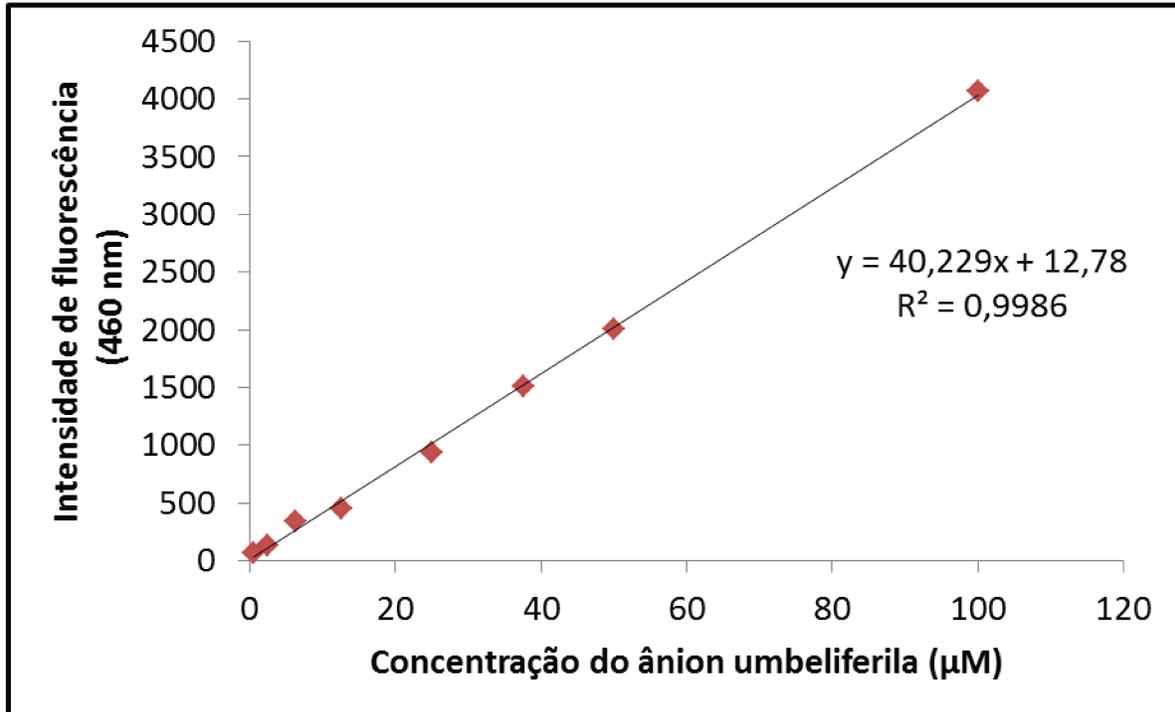


Figura 15. Curva de calibração para o ânion umbeliferila.

A partir da equação da reta, foi possível converter as intensidades de fluorescência, obtidas nos ensaios enzimáticos, em concentração do ânion umbeliferila. Esta informação é necessária para determinar a concentração do produto formado em cada ensaio com os micro-organismos selecionados. Assim, foi possível, obter a velocidade inicial (V_0) da reação enzimática frente a cada enantiômero a partir do coeficiente angular (Figura 16). Os valores de E foram determinados utilizando as velocidades iniciais, de acordo com a **equação 4**, como mostra a Tabela 6.

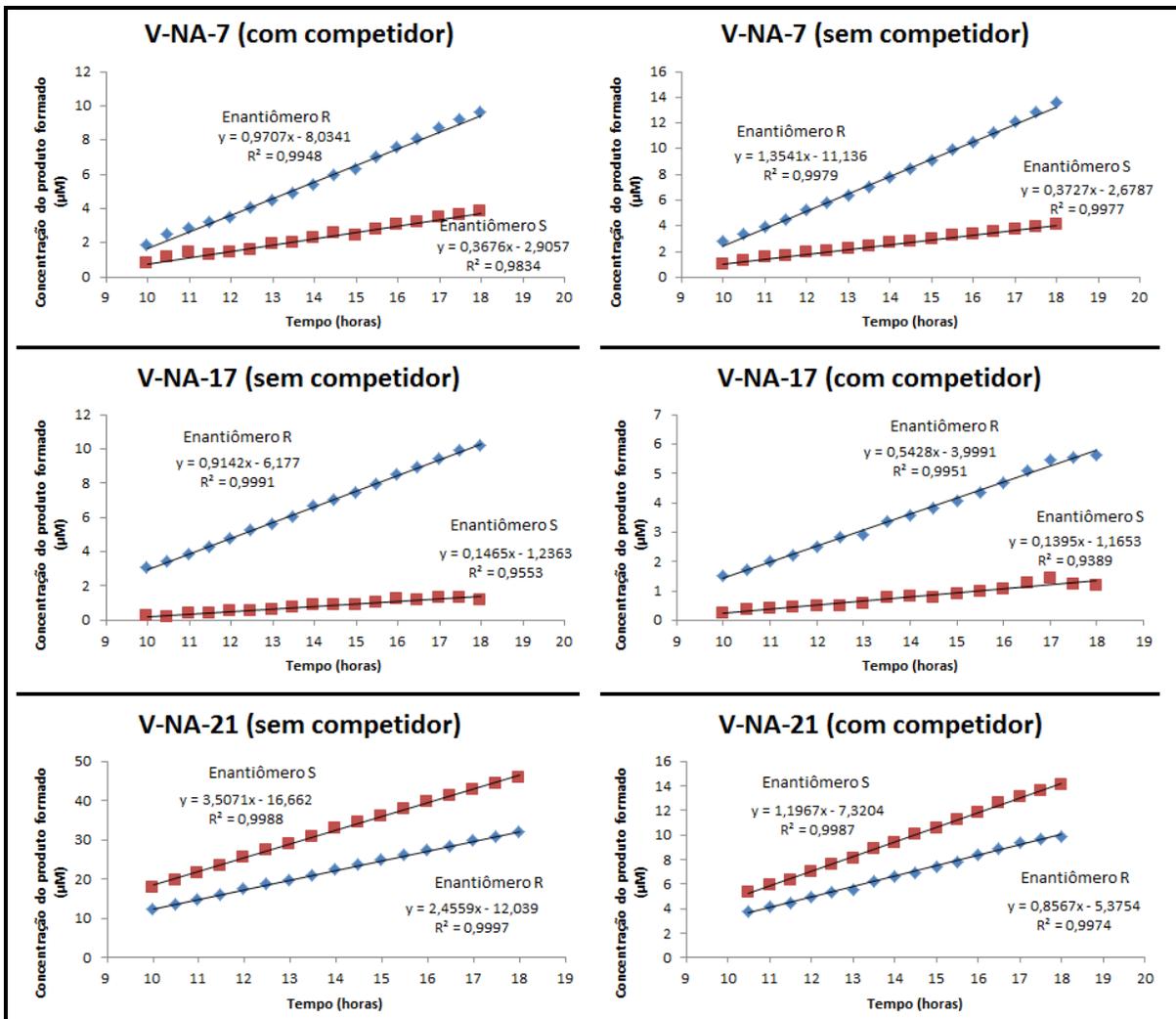


Figura 16. Gráficos do monitoramento das velocidades reacionais dos micro-organismos V-NA-7, V-NA-17 e V-NA-22 utilizando as sondas fluorogênicas (S)-1 (em vermelho) e ((R)-1 (em azul) para detecção enantiosseletiva de esterases com e sem competição.

Tabela 6. Resultados obtidos a partir dos ensaios de *Quick-E* com as sondas fluorogênicas ((*S*)-1) e ((*R*)-1) avaliadas individualmente e na presença do competidor (13)

Ensaio	Micro-organismo	Sonda	Coeficiente		Desvio %*	Enantiosseletiva para
			angular	<i>E</i>		
			(V ₀)			
Sem competidor (13)	V-NA-7	((<i>R</i>)-1)	1,3541	3,63	37,87	<i>R</i>
		((<i>S</i>)-1)	0,3727			
Com competidor (13)	V-NA-7	((<i>R</i>)-1)	0,9707	2,64		<i>R</i>
		((<i>S</i>)-1)	0,3676			
Sem competidor (13)	V-NA-17	((<i>R</i>)-1)	0,9142	6,24	60,41	<i>R</i>
		((<i>S</i>)-1)	0,1465			
Com competidor (13)	V-NA-17	((<i>R</i>)-1)	0,5428	3,89		<i>R</i>
		((<i>S</i>)-1)	0,1395			
Sem competidor (13)	V-NA-21	((<i>R</i>)-1)	3,5071	1,42	2,15	Nd
		((<i>S</i>)-1)	2,4559			
Com competidor (13)	V-NA-21	((<i>R</i>)-1)	1,1967	1,39		Nd
		((<i>S</i>)-1)	0,8567			

Nd = não determinado ; *E* = enantiosseletividade

Desvio % = diferença entre os valores de *E* obtidos nos ensaios com e sem competição.

Os resultados da Tabela 6 demonstram que os experimentos com competição forneceram valores de razão enantiomérica significativamente distintos dos valores obtidos para os experimentos sem competidor. Isto ocorre devido à inserção de um competidor ser um fator limitante na reação entre a enzima e a sonda fluorogênica, levando a condições mais próximas a reações com racematos levando pois ao *E* real. Esta observação é perceptível comparando-se as intensidades de fluorescência dos ensaios com e sem competição para um mesmo micro-organismo.

Observou-se adicionalmente que os micro-organismos com percentuais de conversão de 42% e 73% (**V-NA-7** e **V-NA-17**, respectivamente) foram mais enantiosseletivos que os de percentual de conversão > 99% (**V-NA-21**). Nos ensaios de *HTS*, utiliza-se a sonda **1** racêmica o que acarreta uma competição entre os enantiômeros pelo sítio ativo da enzima. Logo, enzimas mais enantiosseletivas irão diferenciar os enantiômeros de modo mais efetivo chegando a conversões de 50% e *ee* acima de 99%, dependendo do tempo reacional.

Deste modo, os ensaios de *Quick-E* utilizando sondas fluorogênicas quirais e um competidor não fluorogênico na detecção enantiosseletiva de esterases em células íntegras é bastante promissora. Sob o ponto de vista prático, esta metodologia engloba rapidez e eficiência, pois não necessita de valores de *ee*. Além disso, estes ensaios requererem pequenas quantidades de enzima e substrato e possibilitam o monitoramento de várias reações simultaneamente, o que viabiliza a triagem de uma grande quantidade de micro-organismos. Esta metodologia encontra-se em adaptação em nosso grupo de pesquisas e é inédita na literatura, visto que não há menções quanto a uma avaliação enantiosseletiva de esterases em células íntegras com a inserção um competidor utilizando as sondas fluorogênicas quirais (**S**)-**1** e (**R**)-**1**.

CONCLUSÕES

CONCLUSÕES

O estudo englobando os micro-organismos oriundos da lagoa de sedimentação da Mina do Sossego no Pará e pertencente à mineradora VALE apresentou diversidade microbiana que foi preliminarmente avaliada por MALDI-TOF (62 micro-organismos de 228), apresentando bactérias dos gêneros *Pseudomonas* sp., *Bacillus* sp., *Acinetobacter* sp., *Delfitia* sp. e *Escherichia* sp. Entretanto o banco de dados utilizados não é apropriado para amostras ambientais e a caracterização por RNA-16S deverá ser realizada futuramente.

No que se refere às atividades enzimáticas, 156 das 228 cepas foram avaliadas por triagem de alto desempenho, sendo detectadas atividades frente a: esterases (70), lipases (80), epóxido-hidrolases (11) e mono-oxigenases (53)

Para um triagem rápida das enantiosseletividades de esterases foi implementado a metodologia de *Quick-E* utilizando sondas fluorogênicas quirais e um competidor não fluorogênico na investigação de esterases enantiosseletivas utilizando células íntegras. No entanto, devemos ressaltar que esta metodologia encontra-se em fase de validação.

MATERIAIS E MÉTODOS

MATERIAIS E MÉTODOS

1. Métodos cromatográficos

As cromatografias em camada delgada (CCD) foram realizadas em cromatofolhas de alumínio cobertas com sílica gel com indicador de fluorescência (Merck). Os compostos foram revelados por radiação UV_{254nm} e soluções reveladoras adequadas: *p*-anisaldeído (*p*-anisaldeído, H₂SO₄, ácido acético e etanol – 1:2:1:100) ou ácido fosfomolibídico 10% m/v em etanol, sofrendo posterior aquecimento com pistola (300 °C)

As cromatografias *flash* em coluna foram realizadas de acordo com a literatura adequando a quantidade de sílica ao material a ser purificado utilizando solventes previamente destilados como fase móvel. As frações foram coletadas em volumes apropriados ao tamanho da coluna e agrupadas de acordo com o perfil visualizado em CCD.

As análises por cromatografia à gás acoplada com espectrômetro de massas (CG-EM) foram realizadas em cromatógrafo da marca Agilent 6890 com detector de massas HP 5975C e ionização por impacto de elétrons 70 eV, na faixa de *m/z* 50-700. Foi utilizada uma coluna sílica fundida DB-5 (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm). As análises foram realizadas com fluxo constante de He utilizados de 1 mL/min com injetor à 270 °C e temperatura de interface a 280 °C. Foram utilizadas condições padrões de análise nos experimentos (injeção no modo *split*, 1 µL, 10:1; 50-290 °C a 30 °C/min, permanecendo constante por 5 min.).

Todas as análises por espectrometria de massas utilizando MALDI-TOF-TOF foram realizadas em espectrometro *Bruker Autoflex* (Bruker

Daltonics). As análises das colônias de bactérias foram realizadas utilizando SmartBeam-II como laser (355 nm) em modo positivo e linear. O software FlexControl (versão 3.3, Bruker Daltonics) foi utilizado para a aquisição de dados. Todas as análises foram realizadas em triplicata. Um sistema de calibração interna com aquisição automática de dados foi utilizado (padrão de teste bacteriana, Bruker Daltonics), empregando o pacote do software FlexControl 3.3.

2. Métodos espectrométricos de RMN de ^1H e ^{13}C

Os experimentos unidimensionais de RMN de ^1H e ^{13}C foram realizados em espectrômetros *Bruker Avance DPX-250 MHz* ($B_0 = 5,8 \text{ T}$) sonda *QNP*, operando a 250,13 para ^1H e a 62,90 para ^{13}C , *Avance III-400 MHz* ($B_0 = 9,4 \text{ T}$) sonda *TBI*, operando a 400,13 para ^1H e a 100,62 para ^{13}C e *Avance-600 MHz* ($B_0 = 14,1 \text{ T}$) sonda *TBI* operando a 600,17 para ^1H e a 150,92 para ^{13}C . As amostras foram analisadas em tubos de ressonância de 5 mm de diâmetro, diluídas em CDCl_3 ou CD_3OD utilizando tetrametilsilano (TMS, 0,0 ppm) como padrão interno de referência. Os parâmetros de processamento estão apresentados junto a cada espectro.

3. Métodos espectrofotométricos de fluorescência

As medidas de intensidade de fluorescência dos ensaios de *HTS* para detecção das atividades enzimáticas foram realizadas em leitor de microplacas *FlashScan 530, Analytic Jena*. Nos ensaios, foi utilizado comprimento de onda de excitação de 390 nm e comprimento de onda de emissão de 460 nm. Os

ensaios foram realizados em microplacas de polipropileno com 96 poços com leituras em triplicata.

4. MEV-EDS

Os experimentos de microscopia eletrônica acoplado a um detector de energia dispersiva foram realizados em um Microscópio Eletrônico de Varredura JEOL T-300 com detector de energia dispersiva (EDS), com o auxílio do Técnico Daniel Razzo.

Para a realização das análises as amostras dos rejeitos aquosos (*a* e *b*) foram previamente secas em estufa a 50 °C por 1h. Após secagem, as mesmas foram aplicadas sobre uma fita adesiva de carbono, em um porta amostra de carbono (MEV-EDS) ou cobre (imageamento) e metalizadas com carbono (MEV-EDS) ou ouro (imageamento). Todas as análises de MEV-EDS foram realizadas em triplicatas (três diferentes pontos de aquisição).

5. Rotação óptica $[\alpha]_D^{20}$

Os valores de rotação óptica foram determinados em um polarímetro *Perkin Elmer* modelo 341 com lâmpada de Na ($\lambda=589$ nm).

6. Reagentes e solventes

Todos os reagentes utilizados foram de grau analítico. Os solventes utilizados foram previamente tratados segundo procedimentos descritos na literatura⁴³ e todas as reações foram realizadas sob atmosfera de N₂.

7. Procedimentos gerais adotados no laboratório de biocatálise

Todos os materiais, soluções e meios de cultura foram esterilizados em autoclave vertical (121 °C, 1,5 Pa, 15 minutos). Para desinfecção das superfícies, foram utilizadas as soluções de limpeza química etanol 70% e hipoclorito 2%. Quando necessário, também era utilizada lâmpada de radiação UV. Os micro-organismos foram manipulados em câmara de fluxo laminar. Os materiais utilizados nos experimentos foram esterilizados em autoclave vertical (121 °C, 1,5 Pa, 1 hora) antes de serem descartados.

8. Micro-organismos

Os micro-organismos avaliados nos ensaios de triagem enzimática e *Quick-E* foram isolados de amostras de rejeitos de mineração de cobre, coletadas da Mina do Sossego, Canaã dos Carajás, PA, pertencendo a empresa VALE, pelo engenheiro Tobias Cabral Carvalho Machado de Andrade . Para coleta, foram utilizados frascos de vidro previamente esterilizados que foram

⁴³ Perrin, D. D.; Armarego, W. L. F., *Purification of laboratory chemicals*, **1988**, 3ª edição, Pergamon Press.

abertos somente no momento da coleta, sendo rapidamente fechados para evitar contaminações externas.

9. Meios de cultura ⁴⁴

Para favorecimento de uma maior diversidade de micro-organismos, optou-se por utilizar meios de cultura com composições nutricionais variadas que propiciassem o crescimento de procariotos (NB e TSB) e eucariotos (YM e ME).

Tabela 7. Meios de cultura utilizados para o enriquecimento de microbiotas de bactérias, fungos e leveduras das amostras de rejeitos de mineração de cobre.

Micro-organismo	Meio de cultura	Composição ⁴⁵
Bactérias	<i>Nutrient Broth</i>	0,5% de peptona bacteriológica 0,5% de NaCl 0,2% de extrato de levedura 0,1% de extrato de carne
Bactérias	<i>Tryptone Soya Broth</i>	1,7% de caseína digerida ^a 0,3% de farelo de soja digerido ^b 0,5% de NaCl 0,25% de K ₂ HPO ₄ 0,25% de glicose
Fungos	<i>Malt Extract Broth</i>	1,7% de extrato de malte 0,3% de peptona micológica
Leveduras	<i>Yeast Extract Broth</i>	0,3% de extrato de levedura 0,5% de peptona micológica

^a Com enzimas pancreáticas; ^b Com papaína; ^c Com enzimas peptídicas.

Para preparo dos meios semi-sólidos, foi adicionado ágar (5% m/v) aos meios líquidos preparados.

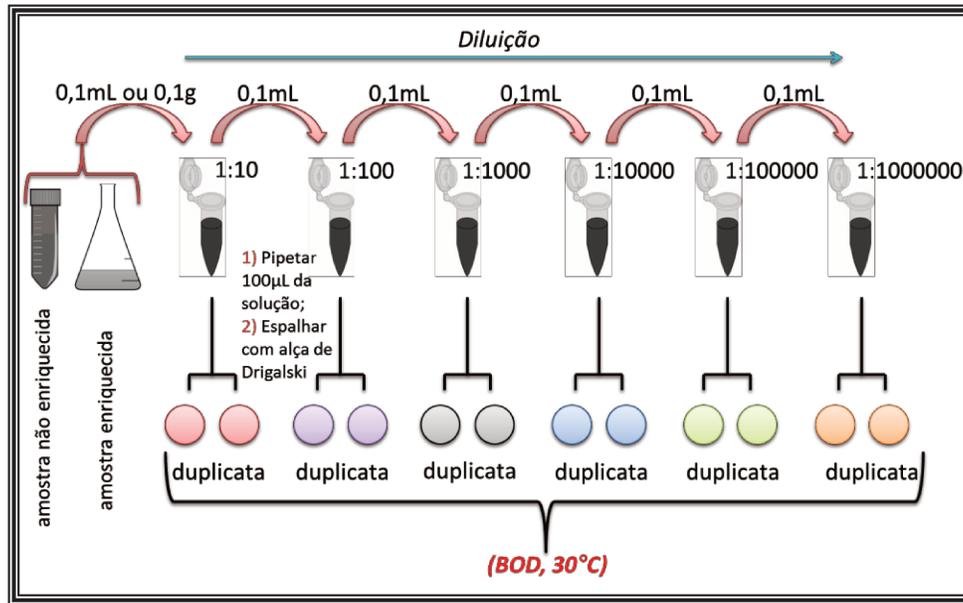
⁴⁴ Procedimento realizado em colaboração com a doutoranda Bruna Zucoloto da Costa.

⁴⁵ Atlas, R.M. *Handbook of Media for Environmental Microbiology*. 2005, 2^a ed.

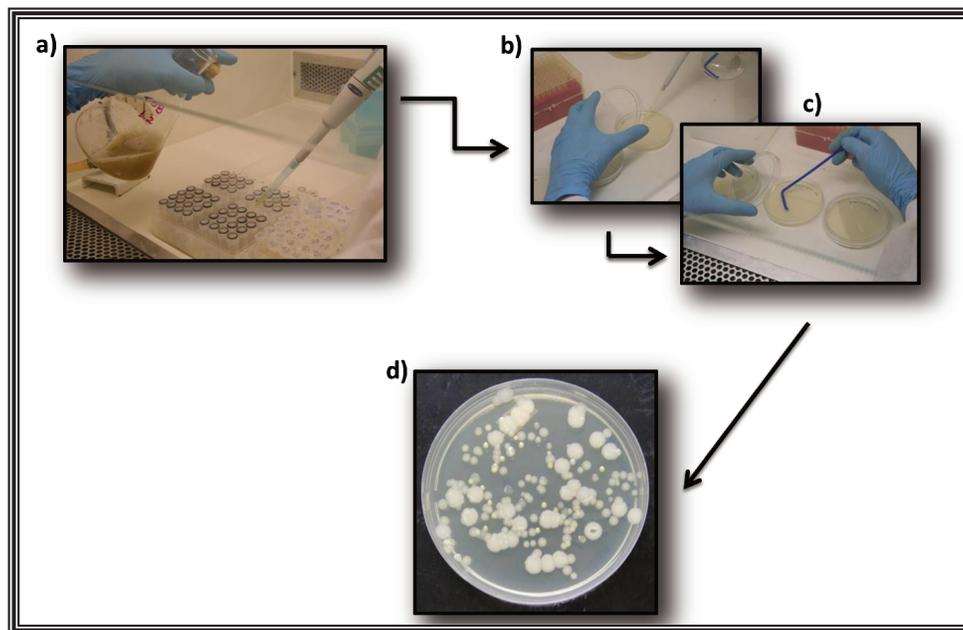
10. Formação dos consórcios microbianos ⁴⁴

Para preparo das amostras enriquecidas, alíquotas de 1,0 g (**b**) ou 1,0 mL (**a**) de amostra foram transferidas para frascos *erlenmeyers* de 1000 mL contendo para 100 mL de meio de cultura líquido (**NB**, **YM**, **TSB** e **ME**), previamente esterilizado. Os meios inoculados foram incubados em estufa orbital (28°C, 200 rpm) por até 3 dias, para o isolamento de bactérias e leveduras, ou 7 dias, para o isolamento de fungos. Posteriormente, as amostras foram diluídas em série a fim de obter os consórcios microbianos. Alíquotas de 100 µL foram transferidas para placas de Petri com diferentes meios de culturas semi-sólidos (**NA**, **YMA**, **TSA** e **MEA**), espalhadas com alça de Drigalski e incubadas em BOD a 30 °C sendo a formação dos consórcios avaliadas a cada 24 horas por até sete dias.

Para as amostras não enriquecidas, alíquotas de 1,0 g (**b**) ou 1,0 mL (**a**) de amostra foram diluídas em 1 mL de diferentes meios de cultura líquido (**NB**, **YM**, **TSB** e **ME**), fazendo, em seguida, uma diluição em série. O procedimento para formação dos consórcios é análogo ao apresentado para as amostras enriquecidas (Esquemas 4 e 5). Todos os experimentos foram realizados em duplicata.



Esquema 4. Formação dos consórcios microbianos a partir das amostras enriquecidas e não enriquecidas para as amostras **a** e **b**.



Esquema 5. a) Diluição seriada das amostras; b) transferência da alíquota diluída para placa de Petri; c) espalhamento com alça de Drigalski; d) formação do consórcio microbiano. (Fotos: amostras VALE, M^a Lair Sabóia de O. Lima e Bruna Zucoloto da Costa).

11. Isolamento das culturas puras ⁴⁴

Nos consórcios microbianos, foram observadas características macroscópicas (cor, borda, elevação, brilho) que permitissem diferenciar as colônias entre si. Para obtenção das culturas puras, foi utilizado o método de esgotamento em placa. Após, as placas foram incubadas (BOD, 30 °C) e acompanhadas por até 48 horas para observação de contaminantes. O procedimento foi realizado até total obtenção de culturas puras.

12. Preservação das culturas puras e das amostras enriquecidas ⁴⁴

A fim de garantir que os consórcios e culturas sejam preservados, diferentes técnicas de preservação foram utilizadas de acordo com o metabolismo de cada micro-organismo.

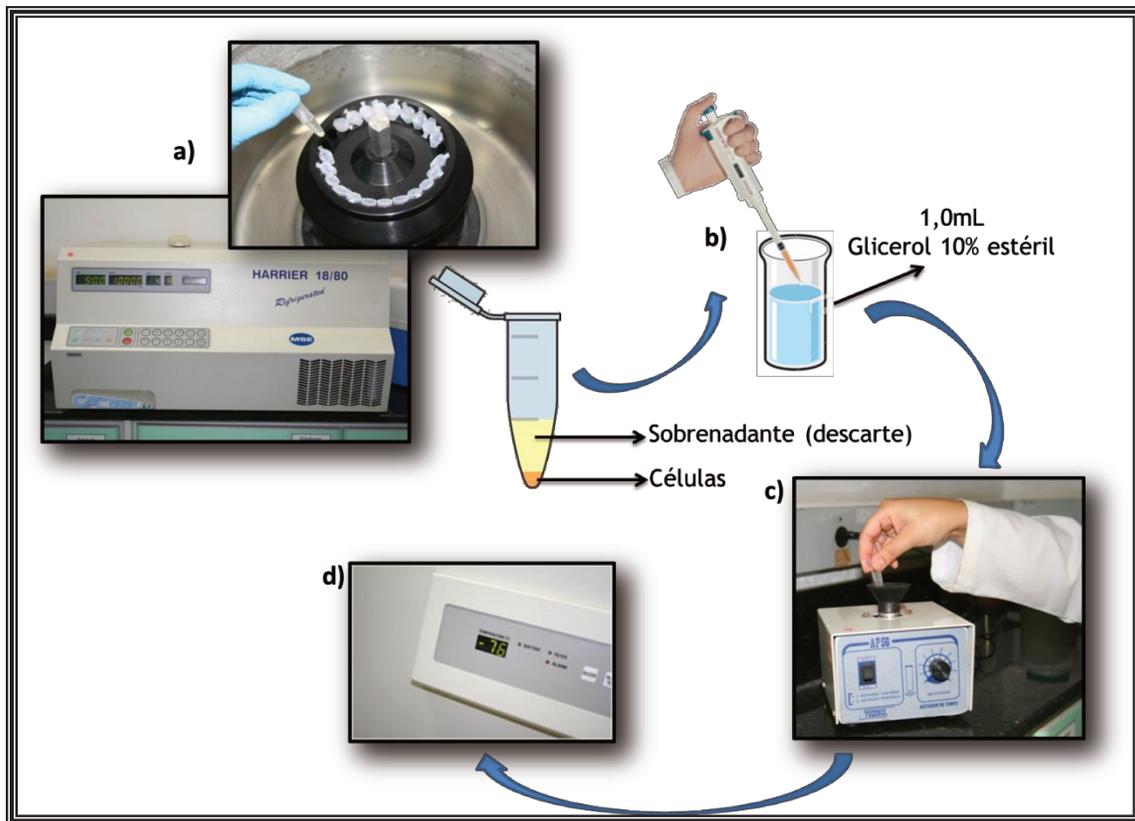
Para as culturas puras, estas foram primeiramente inoculadas e, após crescimento (24 horas para bactérias, 48 horas para leveduras e até 72 horas para fungos) realizou-se o procedimento de preservação. Para os fungos, teve-se o cuidado de utilizar pellets mais jovens afim de viabilizar a preservação dos esporos.

12.1. Preservação em temperatura ultra-baixa ⁴⁶

Este procedimento foi realizado para preservação de culturas de bactérias, leveduras, fungos e das amostras enriquecidas (pré-cutivo).

⁴⁶ Stushnoff, C., Seufferheld, M., *Biotechnology in Agriculture and Forestry*, **1995**, 32, 87

Alíquotas dos meios enriquecidos foram transferidas para criotubos (1,0 mL), centrifugadas (10.000 rpm, 4°C por 5 minutos) e o sobrenadante devidamente descartado. Adicionou-se ao pellet de células, 1,0 mL de solução de glicerol 10% (v/v). As soluções celulares obtidas foram submetidas à agitação em vórtex até completa homogeneização, sendo posteriormente submetidas a congelamento gradual: 20 minutos a 4°C, 20 minutos à 0°C e armazenamento em ultrafreezer à -80°C (Esquema 6).



Esquema 6: a) centrifugação das amostras e descarte do sobrenadante; b) adição da solução de glicerol 10%; c) homogeneização em vórtex; d) armazenamento em ultrafreezer. (Fotos: amostras VALE, M^a Lair Sabóia de O. Lima e Bruna Zucoloto da Costa).

Para as culturas puras, 5 mL de solução de glicerol 10% foram adicionados na placa contendo a cultura crescida, sendo feito posteriormente

um espalhamento com alça de Drigalski a fim de obter as soluções celulares. Em seguida, as soluções celulares foram homogeneizadas com pipeta automática e alíquotas de 1 mL foram transferidas para criotubos previamente esterilizados. Posteriormente, as amostras foram submetidas a congelamento gradual (20 minutos a 4°C, 20 minutos a 0°C e armazenamento em ultrafreezer à -80°C).

12.2. Liofilização⁴⁷

Este procedimento foi realizado para preservação de culturas de bactérias, leveduras e das amostras enriquecidas (pré-cutivo). Alíquotas de 1,0 mL de cada meio enriquecido foram transferidas para tubos *ependorfs* e foram centrifugadas a 10.000 rpm, 4°C por 5 minutos. Descartou-se o sobrenadante e, ao pellet de células, adicionou-se 1,0 mL de solução de leite semi-desnatado 10% previamente esterilizado. As soluções celulares obtidas foram homogeneizadas e transferidas para criotubos com tampão de algodão estéril. As amostras foram congeladas em nitrogênio líquido (-196°C) e liofilizadas por 24 horas (Figura 17). Os liofilizados foram armazenados à temperatura ambiente.

⁴⁷ Costa, C.P.; Ferreira, M.C., *Preservação de microrganismos: revisão. Revista de Microbiologia*, **1991**, 22, n.3, 263.

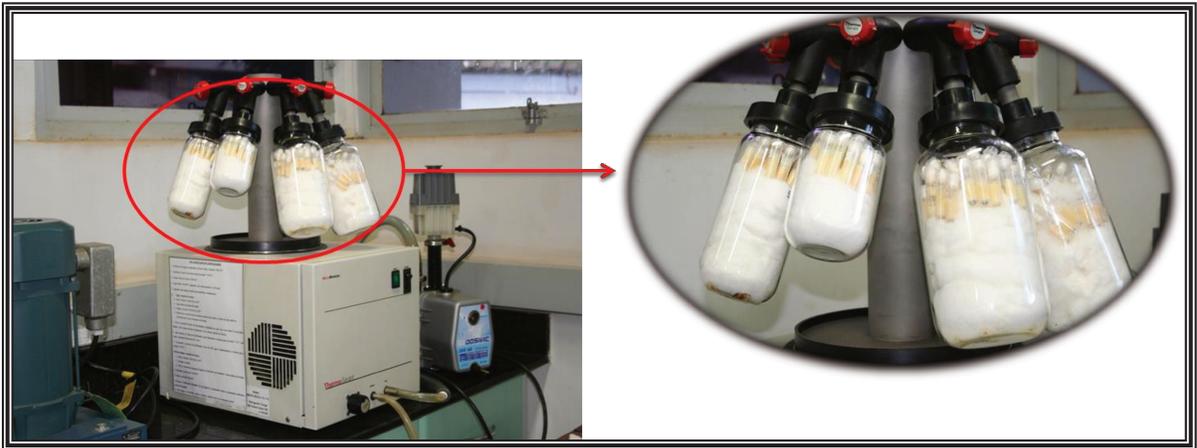


Figura 17: Amostras submetidas ao processo de liofilização. (Fotos: amostras VALE, M^a Lair Sabóia de O. Lima e Bruna Zucoloto da Costa).

Para a preservação das culturas puras, 5 mL da solução de leite semi-desnatado 10% foram adicionados à placa contendo a cultura crescida. Após, espalhamento com alça de Drigalski e alíquotas de 1 mL foram transferidos para criotubos contendo tampão de algodão estéril, sendo posteriormente congeladas com nitrogênio líquido e liofilizadas por 24 horas.

12.3. Preservação em óleo mineral⁴⁸

Esta metodologia foi utilizada apenas para preservação de fungos. Os fungos foram inoculados em ágar inclinado e posteriormente incubados em BOD a 30 °C. Após crescimento, foi adicionado óleo mineral estéril (autoclavado duas vezes seguidas, 121°C, 15 minutos). As preservações foram realizadas em triplicata e armazenadas em geladeira (4°C).

⁴⁸ Lima, D. M. M., *Pesq. Agro, Pec. Bras.*, 1991, 26(6), 853

12.4. Preservação em água destilada estéril – Castellani⁴⁹

Esta metodologia foi também utilizada apenas para preservação de fungos. Os fungos foram inoculados em placas de Petri e incubados (BOD, 30°C, 48 horas). O ágar com o micélio foi recortado com o auxílio de um bisturi estéril e transferido para um tubo Falcon previamente esterilizado, ao qual foi adicionado água destilada estéril. As preservações foram realizadas em triplicata e armazenadas em geladeira (4°C).

13. Soluções de preservação

13.1. Glicerol 10%

Retirar uma alíquota de 10 mL de glicerol puro e completar o volume para 100 mL com água destilada. Esterilizar em autoclave (121°C por 15 minutos).

13.2. Leite semi-desnatado 10%

Pesar 10 g de leite semi-desnatado liofilizado e diluir em 100 mL de água destilada. Esterilizar em autoclave (121 °C por 10 minutos).

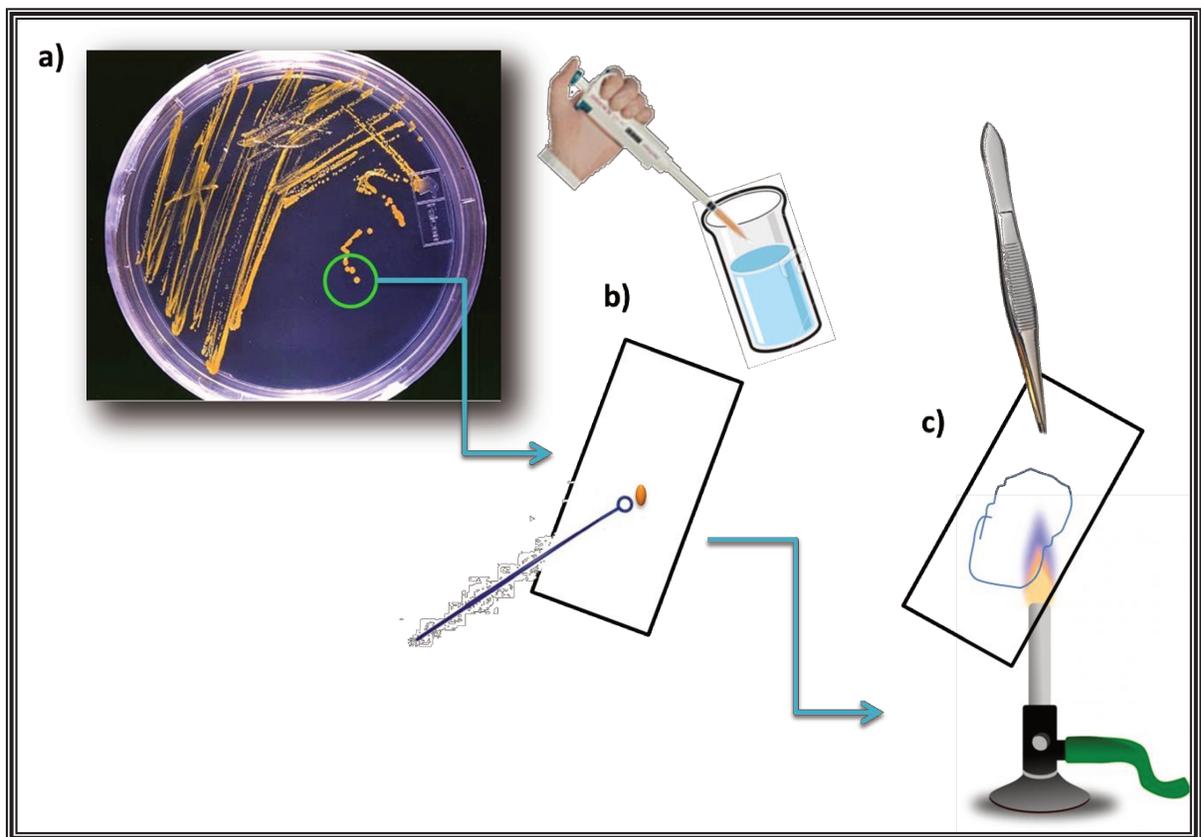
14. Caracterização das culturas puras

⁴⁹ Castellani, A., *Impri. Méd.* (Lisboa), **1960**, 24, 270.

14.1. Coloração diferencial de Gram

14.1.1. Preparação e fixação do esfregaço

Com auxílio de uma alça estéril de Drigalski, uma pequena quantidade de células (micro-organismos isolados com 24 horas de crescimento) foi transferida para uma lâmina de microscópio previamente limpa e seca, contendo 10 μ L de solução salina estéril. Após espalhamento das células, por esfregaço, as mesmas foram fixadas sobre chama, com auxílio de um bico de Busen (Esquema 7).



Esquema 7: a) Colônia isolada; b) transferência da colônia para lâmina de vidro e adição da solução salina estéril; c) fixação em chama.

14.1.2. *Preparo das soluções*⁵⁰

Solução de Cristal Violeta

Solução A) *Solução estoque de cristal violeta:* 20,0g de cristal violeta foram dissolvidas em 100mL de etanol 95% - Tempo de estocagem: até 1 ano;

Solução B) *Solução estoque de Oxalato de amônio:* 1,0g de $(\text{NH}_4)_2\text{C}_2\text{O}_4$ foram dissolvidas em 100mL de água destilada – Tempo de estocagem: até 1 ano.

Solução de trabalho) Misturaram-se as soluções **A** e **B** (na proporção 1:4). A nova solução foi deixada em repouso e filtrada após 24 horas – Tempo máximo de estocagem: 6 meses.

Solução de Lugol (mordente)

A 1,0 g de iodo metálico, adicionaram-se 2,0 g de KI. Os mesmos foram pulverizados em almofariz com pistilo e, posteriormente, foram adicionados 5,0 mL de água destilada. A solução obtida foi diluída em 240 mL de água destilada e 60 mL de solução NaHCO_3 5% (m/v). Após homogeneizada, a solução foi estocada em frasco âmbar. – Tempo de estocagem máximo: 6 meses.

Solução descorante

Foi utilizado etanol 99% como agente descorante.

Solução de Safranina (contra-corante)

⁵⁰ Coico, R., *Current Protocols in Immunology*, 1997.

Solução estoque: Diluíram-se 5,0 g de safranina em 500 mL de etanol 95%. A solução foi armazenada em frasco âmbar. - Tempo máximo de estocagem: 6 meses;

Solução de trabalho: Diluíram-se 10 mL da solução estoque em 90 mL de água destilada. A solução foi armazenada em frasco âmbar. – Tempo máximo de estocagem: 6 meses.

14.2. Caracterização por MALDI-TOF⁵¹

14.2.1. Procedimento padrão de preparo de amostras⁵²

Etapa 1:

- Pipetar 300 µL de água ultra-pura em um *ependorf* estéril. Com uma alça, transferir uma colônia pura com até 24 horas de crescimento e homogeneizar em vórtex por 1 minuto;
- Após, adicionar uma alíquota de 900 µL de etanol à amostra e homogeneizar novamente;
- Em seguida, centrifugar a 13.000 rpm por 2 minutos e o remover o sobrenadante cuidadosamente com uma pipeta;
- Repetir o procedimento.

Etapa 2: Extração das proteínas de membrana

- Aos *pellets* obtido na etapa 1, adicionar 15 µL da solução de ácido fórmico 70% (Pipetar 30 µL de água ultra-pura e 70 µL de ácido

⁵¹ Procedimento realizado em colaboração com o Dr. Eduardo Jorge Pilau (UNICAMP), o doutorando Douglas Ferreira (UFSCAR) e com o Prof. Dr. Edson Rodrigues-Fo (UFSCAR)

⁵² Bruker Daltonic GmbH

fórmico P.A. em um *eppendorf* limpo) e homogeneizar em vórtex por 1 minuto;

- Após, adicionar igual volume de acetonitrila P.A. e homogeneizar cuidadosamente com uma pipeta.
- Centrifugar a amostra a 13.000 rpm por 2 minutos e, se necessário, estocar em geladeira (4°C) por até 5 dias.

15. Preparo das soluções

15.1. Soluções das sondas

Os compostos ((1), (2), (3), (4), (5), (6), (7), (8), (9) (10), (13), (14) ((*R*)-1), ((*S*)-1), ((*R*)-9) e ((*S*)-9)) foram solubilizadas em H₂O : ACN (1:1) numa concentração de 20 mM para posterior diluição. Nos experimentos de HTS, a solução trabalho foi de 2 mmol/L, enquanto que nos experimentos de triagem da enantiosseletividade (*Quick-E*) as sondas foram diluídas para 1 mmol/L. Estas soluções foram conservadas em geladeira.

15.2. Solução de NaIO₄ 20mmol/L

Foram dissolvidos 4,3 mg de NaIO₄ em 1 mL de água ultra-pura resultando em uma concentração de 20 mmol/L. Esta solução foi preparada a cada ensaio realizado.

15.3. Solução de BSA 5,0mg/L

A solução de BSA utilizada nos experimentos de HTS foi preparada diluindo-se 5 mg de BSA em 1 mL da solução tampão borato pH 7,4, seguida de suave agitação para evitar a formação de espuma. Para os ensaios de *Quick-E* com competição, foi preparada uma solução de BSA a 5,7 mg/mL.

15.4. Tampão borato pH 7,4

Preparou-se soluções estoque de H_3BO_3 0,2 mol/L (2,46 g de ácido em 0,2 L e água mili-Q), e bórax 0,05 mol/L (1,91 g em 0,1 L e água mili-Q). Após, o pH do tampão foi ajustado adicionando-se pequenas alíquotas da solução de bórax à solução de ácido bórico preparada (Tabela 8), observando a alteração de pH com pHmetro (pH 300 M *Analyser*).

Tabela 8. Solução Tampão ácido bórico- bórax

Solução de bórax 0,05 mol/L	pH	Solução de bórax 0,05 mol/L	pH
2,0	7,6	22,5	8,7
3,1	7,8	30,0	8,8
4,9	8,0	42,5	8,9
7,3	8,2	59,0	9,0
11,5	8,4	83,0	9,1
17,5	8,6	115,0	9,2.

16. Ensaios de triagem de alto desempenho

Os micro-organismos submetidos aos ensaios de HTS foram cultivados em placas de Petri (24 h para bactérias e 48 h para leveduras, BOD, 30°C) contendo meio de cultura específico para cada micro-organismo.

Para obtenção das suspenções celulares, aproximadamente 2,0 mg de células foram transferidas para um *ependorf* estéril e, posteriormente, suspensas em tampão borato pH 7,4 e homogeneizadas em vórtex.

As suspenções foram diluídas com o mesmo tampão a fim de obterem-se suspensões celulares de 0,2 mg/mL. Os ensaios de triagem enzimática foram realizados em quadruplicata e os controles positivo e negativo em duplicata (Figura 18), como segue:

- **Ensaio:** 10 μ L de NaIO₄ (20 mmol/L), 80 μ L de BSA (5,0 mg/mL), 10 μ L de solução da sonda ((1), (2), (3), (4), (5), (6)) (2 mmol/L), 100 μ L de suspensão celular (0,2 mg/mL);
- **Controle positivo:** 10 μ L de NaIO₄ (20 mmol/L), 80 μ L de BSA (5,0 mg/mL), 10 μ L de solução do produto da sonda ((7), (8), (9) (10)) (2 mmol/L), 100 μ L de suspensão celular (0,2 mg/mL);
- **Controle negativo:** 10 μ L de NaIO₄ (20 mmol/L), 80 μ L de BSA (5,0 mg/mL), 10 μ L de solução da sonda ((1), (2), (3), (4), (5), (6)) (2 mmol/L), 100 μ L de tampão borato pH 7,4.

As leituras foram realizadas a cada 24 horas durante 72 horas em leitor de microplacas *FlashScan 530, Analytic Jena*, sendo utilizados comprimento de onda de excitação de 390 nm e comprimento de onda de emissão de 460 nm.

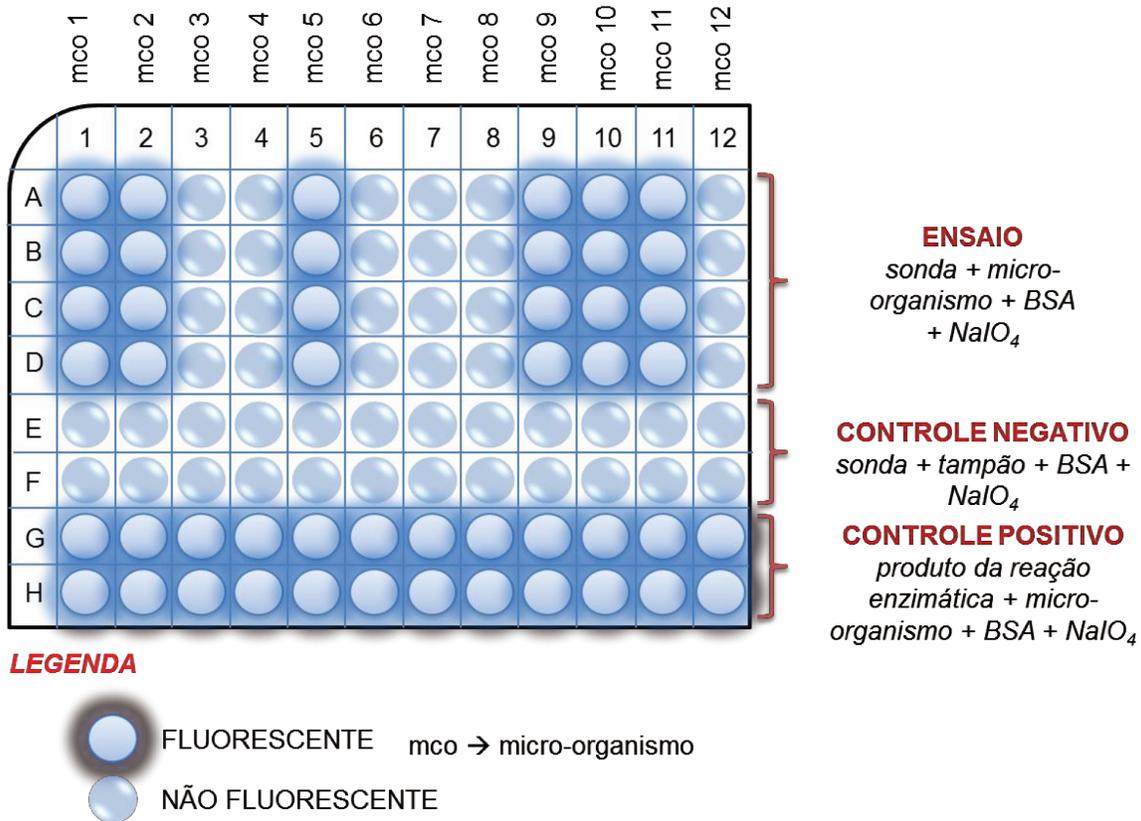


Figura 18. Representação de ensaio de HTS em placas de 96 poços, mostrando os possíveis resultados das reações enzimáticas.

As leituras foram realizadas em leitor de microplacas (*FlashScan 530*, Analytic Jena com comprimento de onda de excitação de 360 nm e comprimento de onda de emissão de 460 nm) a cada 24 horas durante 72 horas. Os dados obtidos foram expostos na forma de percentual de conversão da sonda no respectivo produto (**Equação 5**), sendo considerada 100% a reação monitorada no controle positivo (presença do produto de hidrólise ou de oxidação, no caso das sondas de monooxigenase).

17. Ensaio de *Quick-E*

O procedimento realizado nos ensaios de *Quick-E* com e sem competição foram realizados de forma análoga ao ensaio de *HTS*, diferindo apenas nas concentrações das soluções e na forma de leitura das placas.

Para garantir que as células tivessem o mesmo tempo de crescimento, foram utilizadas as mesmas soluções celulares nos ensaios com e sem competição.

Nos ensaios com competição, as seguintes concentrações de soluções foram empregadas:

- **Ensaio:** 10 μL de NaIO_4 (20 mmol/L), 70 μL de BSA (5,7 mg/mL), 10 μL de solução da sonda ((*R*)-1) e ((*S*)-1)) (1 mmol/L), 10 μL de solução do composto competidor (**13**) (1 mmol/L), 100 μL de suspensão celular (0,2 mg/mL);
- **Controle positivo:** 10 μL de NaIO_4 (20 mmol/L), 70 μL de BSA (5,7 mg/mL), 10 μL de solução do produto da sonda ((*R*)-9) e ((*S*)-9)) (1 mmol/L), 10 μL de solução do produto do composto competidor (**14**) (1 mmol/L) 100 μL de suspensão celular (0,2 mg/mL);
- **Controle negativo:** 10 μL de NaIO_4 (20 mmol/L), 70 μL de BSA (5,7 mg/mL), 10 μL de solução da sonda ((*R*)-1) e ((*S*)-1)) (1 mmol/L), 10 μL de solução do composto competidor (**13**) (1 mmol/L), 100 μL de tampão borato pH 7,4.

Para os ensaios sem competição, utilizaram-se as seguintes soluções:

- **Ensaio:** 10 μL de NaIO_4 (20 mmol/L), 80 μL de BSA (5,0 mg/mL), 10 μL de solução da sonda ((**R**)-1) e ((**S**)-1)) (1 mmol/L), 100 μL de suspensão celular (0,2 mg/mL);
- **Controle positivo:** 10 μL de NaIO_4 (20 mmol/L), 80 μL de BSA (5,0 mg/mL), 10 μL de solução do produto da sonda ((**R**)-9) e ((**S**)-9)) (1 mmol/L), 100 μL de suspensão celular (0,2 mg/mL);
- **Controle negativo:** 10 μL de NaIO_4 (20 mmol/L), 80 μL de BSA (5,0 mg/mL), 10 μL de solução da sonda ((**R**)-1) e ((**S**)-1)) (1 mmol/L), 100 μL de tampão borato pH 7,4.

As leituras foram realizadas de uma em uma hora durante 18 horas em leitor de microplacas *FlashScan 530*, *Analytic Jena*, sendo utilizados comprimento de onda de excitação de 390 nm e comprimento de onda de emissão de 460 nm.

17.1. Curva de calibração

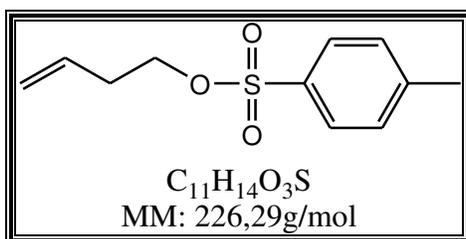
Para construção da curva de calibração (Figura 14, Capítulo II), foram preparadas soluções de 2; 1; 0,75; 0,5; 0,25; 0,125, 0,05 e 0,01 mM de umbeliferona partindo-se de uma solução estoque de umbeliferona a 20 mM em $\text{CH}_3\text{CN}:\text{H}_2\text{O}$ (1:1, v/v).

O experimento foi realizado em microplacas de polipropileno e monitorado por fluorescência em leitor de microplacas *FlashScan 530*,

Analytic Jena com comprimento de onda de excitação de 390 nm e comprimento de onda de emissão de 460 nm.. Para cada concentração de umbeliferona, foram utilizados 80µL de BSA (5 mg/mL), 10 µL de NaIO₄ (20 mM), solução de umbeliferona (10 µL), e 100 µL de tampão borato pH 7,4. O ensaio foi realizado em duplicata.

18. Procedimentos sintéticos⁵³

18.1. Síntese do *p*-toluenossulfonato de 3-butenila (11)

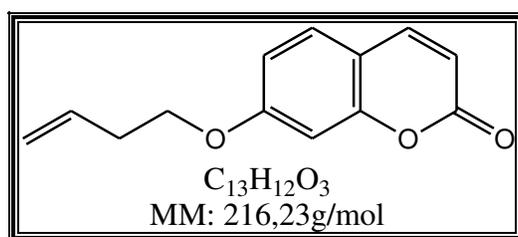


Preparou-se uma solução do 3-buten-1-ol (3,0 g; 3,61 mL; 41 mmol) em CH₂Cl₂ anidro (31,18 mL). A esta, sob agitação e a 0 °C, foram adicionados a trietilamina (9,3 g; 92 mmol), DMAP (4-(dimetilamino)piridina, 0,0012 g) e cloreto de tosilato recristalizado (11,7 g; 61,5 mmol). A reação foi mantida a 0°C por 25 minutos e a 25°C por 1:30h. A reação foi acompanhada por cromatografia em camada delgada (CCD) com solução reveladora de anisaldeído. Após, a reação foi lavada com solução de NH₄Cl 10% m/v (30 mL, 3 vezes de 10 mL). A fase orgânica foi seca sobre MgSO₄, filtrada e o solvente foi evaporado à pressão reduzida fornecendo o produto bruto (7,5g,

⁵³ Procedimento realizado em colaboração com a Dra. Caroline C. S. Gonçalves

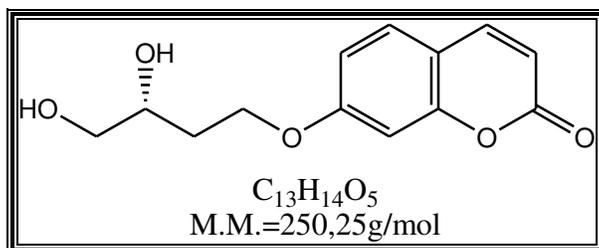
80%). A purificação do produto foi por cromatografia *flash* em coluna utilizando hexano:AcOEt (1:1) como fase móvel. As frações semelhantes foram reunidas e o produto obtido foi um óleo de coloração amarelada. As atribuições dos dados de RMN e IE/EM encontram-se na Tabela 9.

18.2. Síntese de O-(3-butenil)umbeliferona (12)



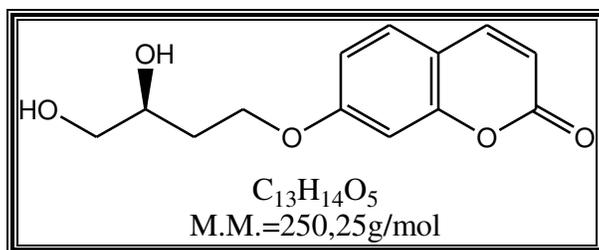
Uma solução do composto **7** (1,0 mmol; 0,226 g) foi preparada em acetona anidra (10 mL). Adicionou-se a umbeliferona (1,2 mmol, 1,195 g) e o K₂CO₃ (2,0 mmol; 0,277 g). A reação foi mantida *overnight* em sistema de refluxo a 60 °C e acompanhada por CCD com solução reveladora de anisaldeído. Após resfriamento, a reação foi filtrada e concentrada sob pressão reduzida. O produto foi purificado por cromatografia *flash* em coluna tendo hexano:AcOEt (7:3) como fase móvel. O produto obtido (0,151 g, 70%) apresentou-se como um sólido cristalino. As atribuições dos dados de RMN e IE/EM encontram-se na Tabela 10.

18.3. Síntese do (R)-(3,4-diidroxibutil)umbeliferona ((R)-9)



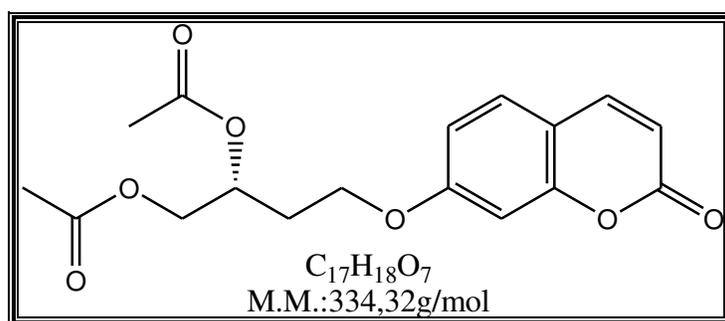
Preparou-se uma solução de AD-MIX- β (4,2 g) em *t*BuOH/H₂O 1:1 (30 mL). A solução foi deixada sob agitação a 25 °C até dissolução total do reagente. Adicionou-se então o composto **12** (0,648 g, 3 mmol) e a reação foi deixada à 0 °C por 18 horas. Após, adicionou-se o Na₂S₂O₃ (4,5 g) e a reação procedeu por mais 1 hora sob agitação. Ocorreu um escurecimento do meio reacional. O tratamento da reação foi feito com acetato de etila (30 mL) e MgSO₄ anidro. Após, a reação foi purificada por cromatografia *flash* em tendo CH₂Cl₂:Acetona (7:3) como fase móvel. A coluna foi acompanhada por CCD e utilizou-se ácido fosfomolibdênico 5% como revelador. O produto obtido (0,562 g, 75%) apresentou-se como um sólido branco. As atribuições dos dados de RMN, IE/EM e $[\alpha]_D^{20}$ encontram-se na Tabela 12.

18.4. Síntese do (S)- (3,4-diidroxibutil)umbeliferona ((S)-9)



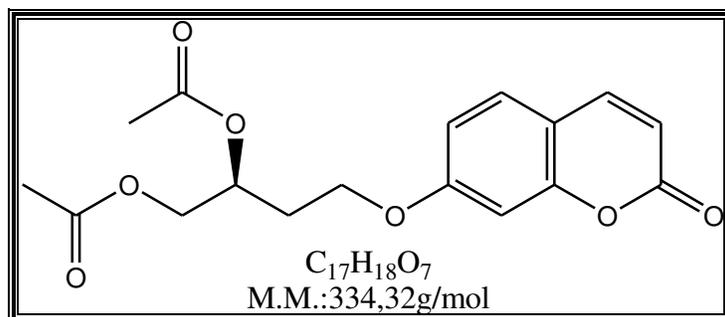
O procedimento é análogo ao descrito no item 18.3 para síntese do composto ((*R*)-9). Porém, utilizou-se o reagente AD-MIX- α (4,2 g) para formação do composto ((*S*)-9) (0,518 g , 69%). As atribuições dos dados de RMN, IE/EM e $[\alpha]_D^{20}$ encontram-se na Tabela 11.

18.5. Síntese do (*R*)-(3,4-diacetoxibutil)umbeliferona ((*R*)-1)



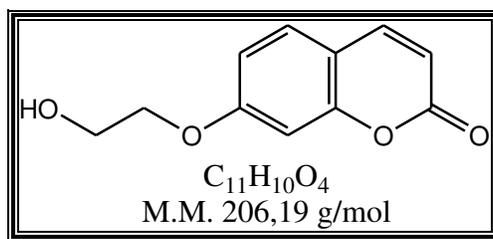
Uma solução do composto ((*R*)-9) (50 mg) foi preparada em piridina anidra (2 mL). Após, 2 mL (1:1) de anidrido acético destilado foram adicionados à solução. A reação foi deixada sob agitação *overnight* a 25 °C e acompanhada por CCD utilizando ácido fosfomolibidênico 5% como revelador. O tratamento da reação foi feito adicionando-se 10 mL de acetato de etila destilado e, posteriormente, adicionaram-se pequenas alíquotas de uma solução saturada de $CuSO_4$ para extração da piridina, até que não se percebesse mais a mudança de coloração da fase aquosa (de azul claro para azul escuro). Ao final, a fase orgânica foi evaporada e o sólido branco formado foi exposto à atmosfera de $N_{2(g)}$ para remoção de ácido acético. As atribuições dos dados de RMN, IE/EM e $[\alpha]_D^{20}$ encontram-se na Tabela 14.

18.6. Síntese do (*S*)-3,4-diacetoxibutilumbeliferona ((*S*)-1)



O procedimento é análogo ao descrito no item 18.5 para síntese do composto ((*R*)-1). Porém, utilizou-se o composto ((*R*)-9) (50 mg) como reagente. As atribuições dos dados de RMN e IE/EM encontram-se na Tabela 13.

18.7. Síntese do 2-(hidroxietil)umbeliferona (14)⁵⁴

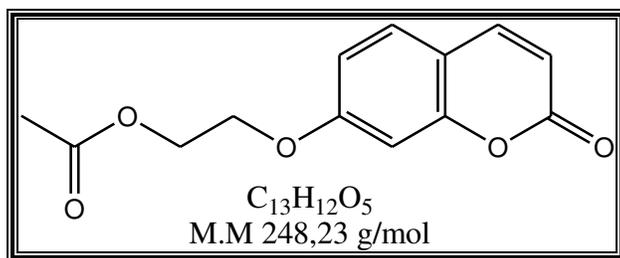


Preparou-se uma solução de 2-bromo-etanol (0,250 g, 2,0 mmol) em acetona anidra (5 mL). Em seguida, adicionou-se a umbeliferona (0,162 g, 1 mmol), o K_2CO_3 (0,210 g, 1,5 mmol) e o NaI (0,075 g, 0,5 mmol) nesta ordem. A reação foi deixada sob refluxo e agitação (60 °C) por 48 horas e foi acompanhada por CCD utilizando hexano:AcOEt (3:7) como eluente e ácido

⁵⁴ Esta síntese foi realizada pela Dra. Caroline C. S. Gonçalves

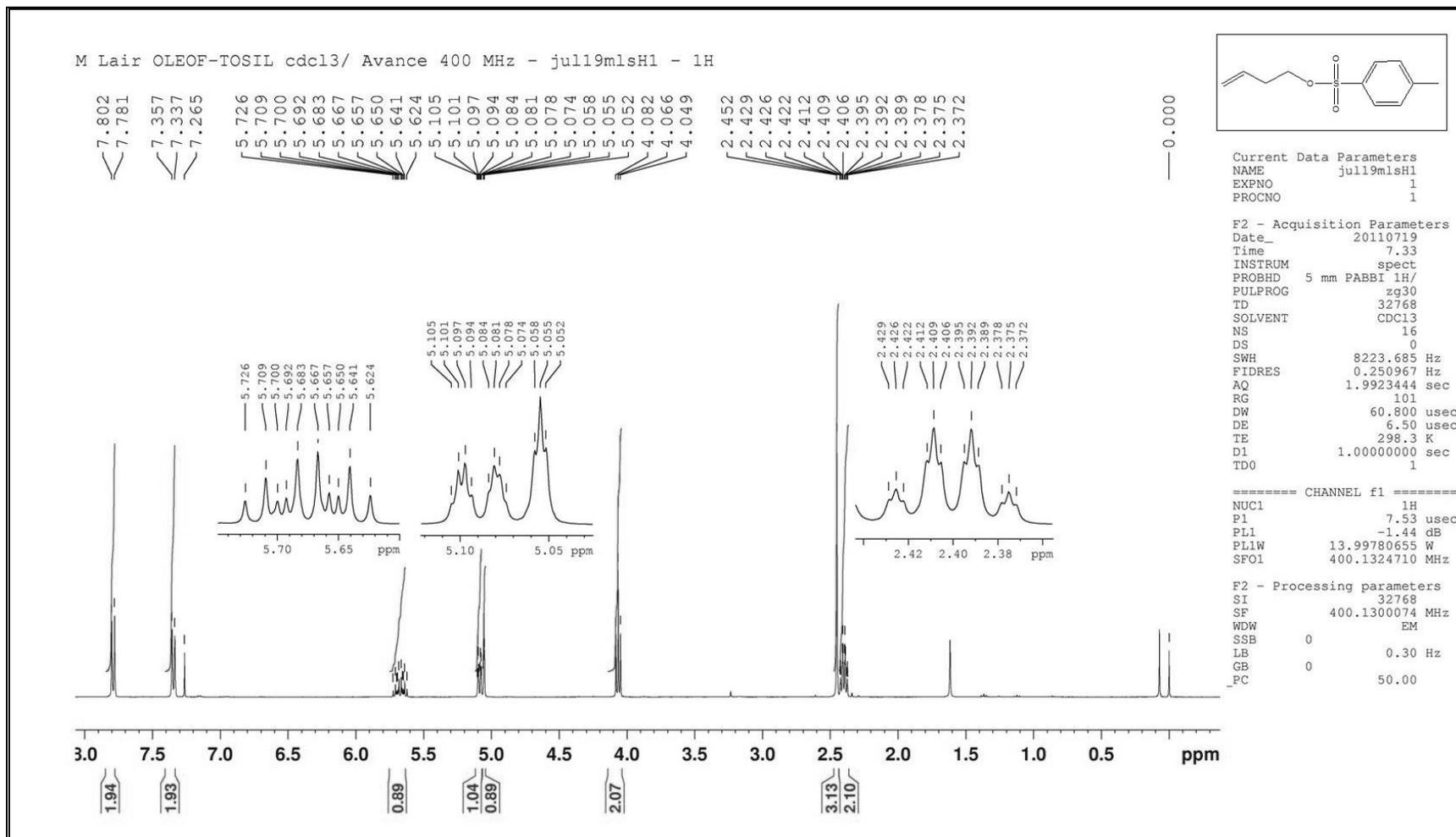
fosfomolibidênico 5% como revelador. A reação filtrada para remoção do K_2CO_3 e purificada por cromatografia *flash* tendo hexano:AcOEt (1:1) como fase móvel. O produto obtido (0,256 g, 62%) apresentou-se como um sólido branco. As atribuições dos dados de RMN e IE/EM encontram-se na Tabela 15.

18.8. Síntese do 2-(acetoxietil)umbeliferona (13)

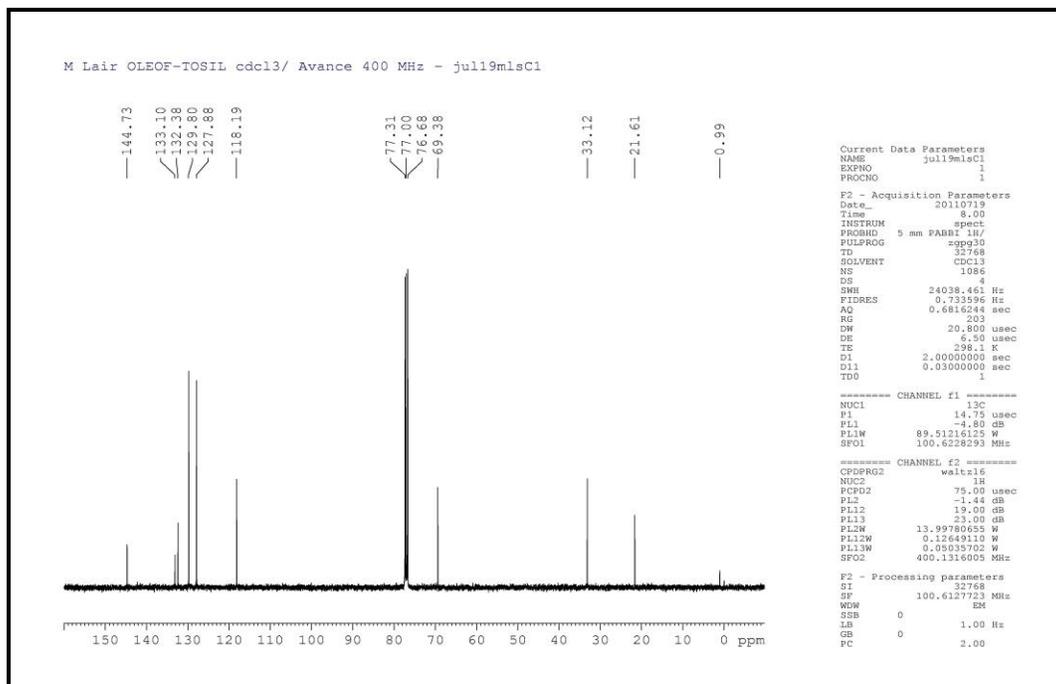


Preparou-se uma solução do composto **14** (0,100 g, 0,5 mmol) em piridina (2 mL). Adicionou-se o anidrido acético (2 mL) e a reação foi deixada sob agitação *overnight* a 25 °C. Uma solução do composto (*R*)-9 (50 mg) foi preparada em piridina anidra (2 mL) e acompanhada por CCD utilizando ácido fosfomolibidênico 5% como revelador. O tratamento da reação foi feito adicionando-se 10 mL de acetato de etila destilado e, posteriormente, adicionando-se pequenas alíquotas de uma solução saturada de $CuSO_4$ até total extração da piridina. Ao final, a fase orgânica foi evaporada e o sólido branco formado foi exposto à atmosfera de $N_{2(g)}$. As atribuições dos dados de RMN e IE/EM encontram-se na Tabela 16.

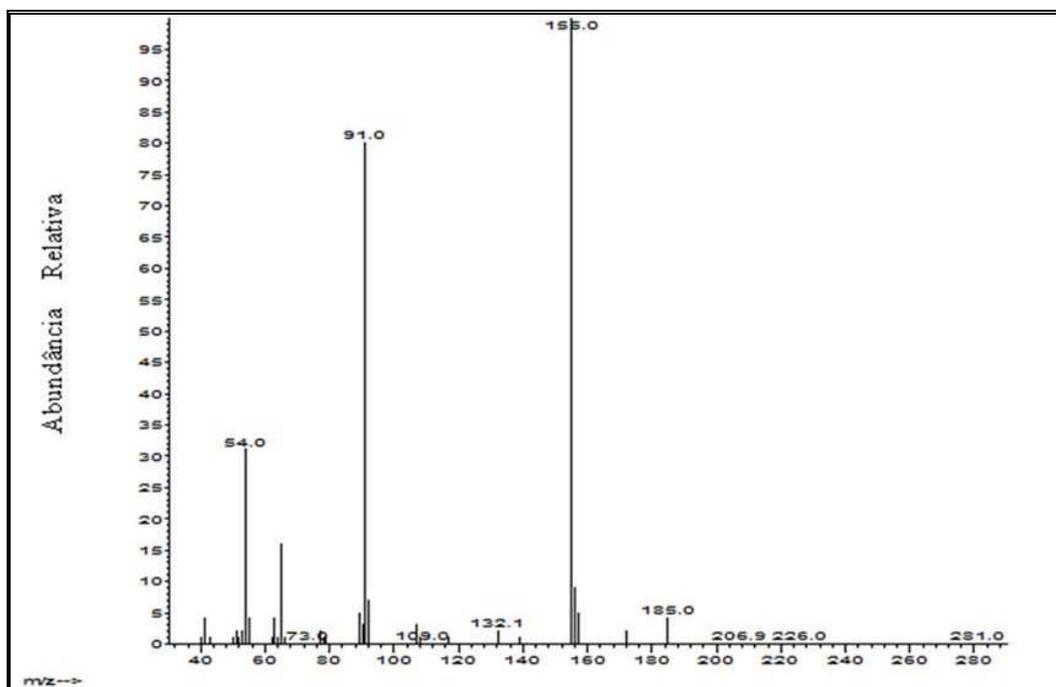
ESPECTROS



Espectro 1. Espectro de RMN de ^1H (400,13 MHz, CDCl_3) do 4-toluenossulfonato de 3-butenila. (11)

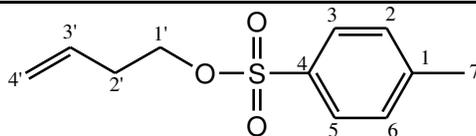


Espectro 2. Espectro de RMN de ^{13}C (100,62 MHz, CDCl_3) do 4-toluenossulfonato de 3-butenila. (11)

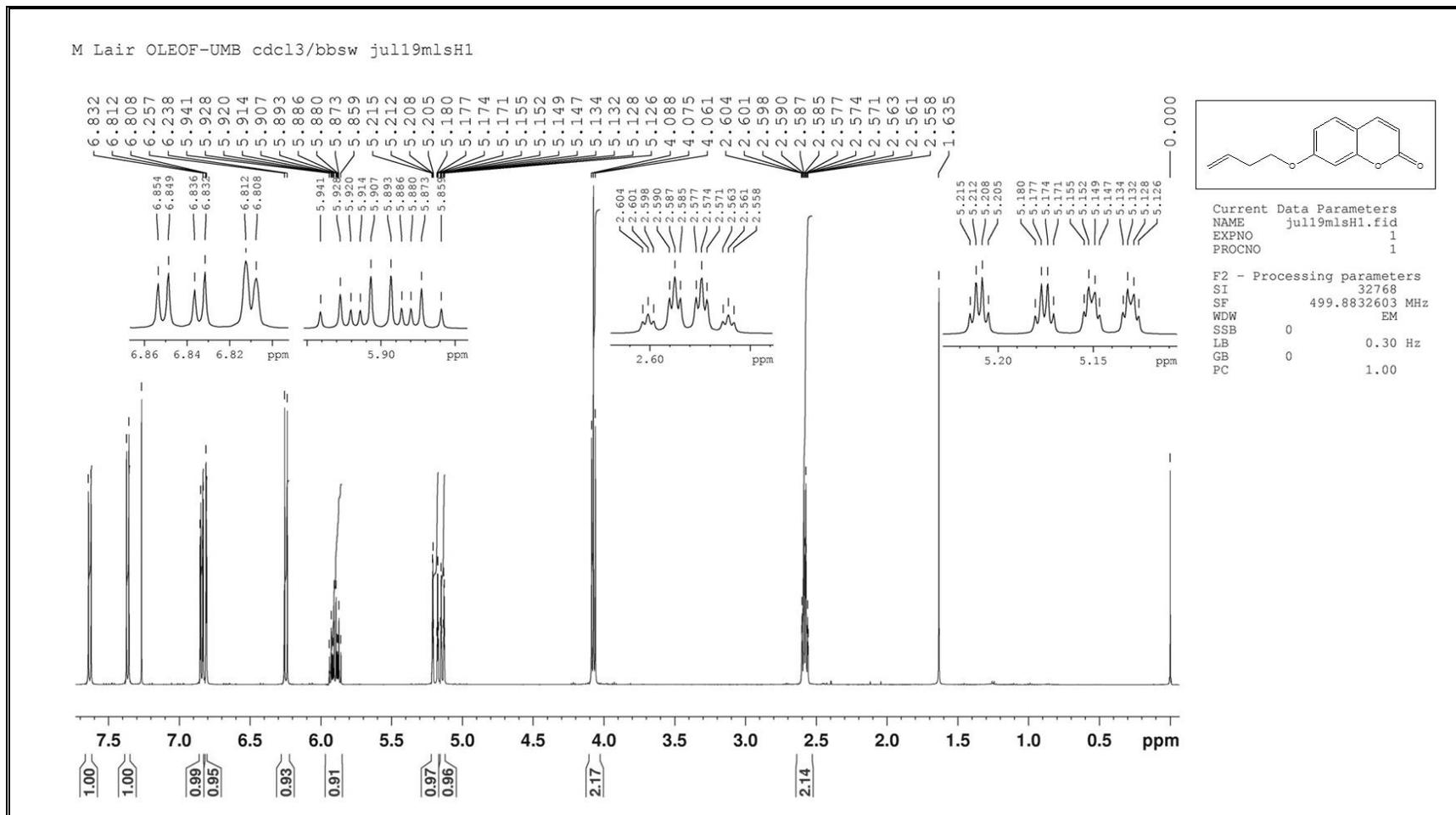


Espectro 3. Espectro de massas obtido por CG/EM do *p*-toluenossulfonato de 3-butenila (11).

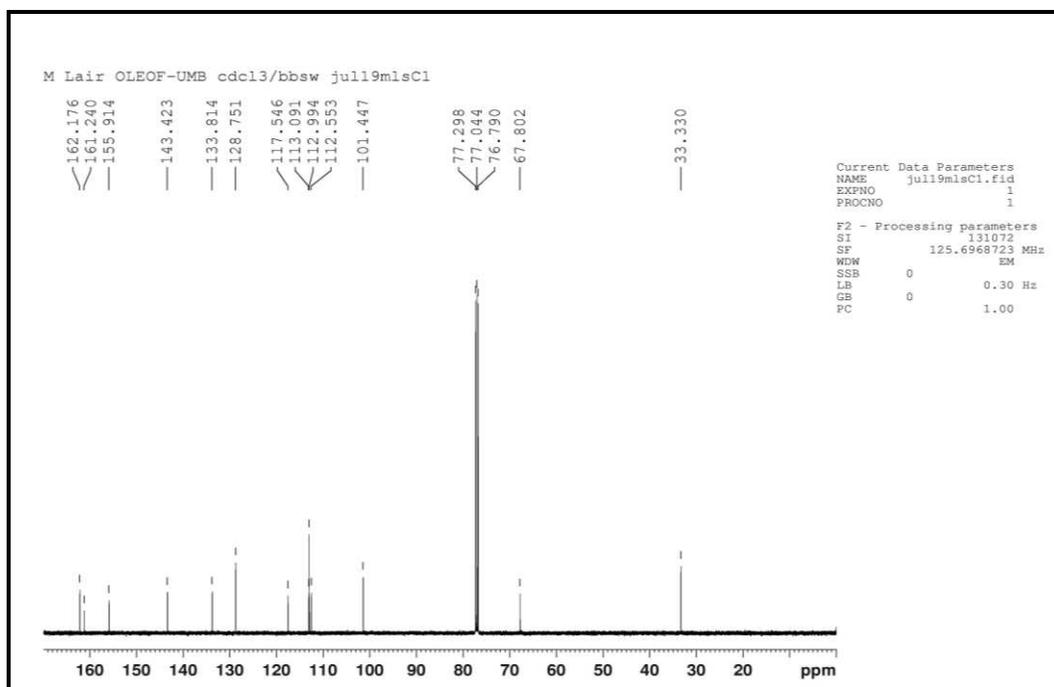
Tabela 9. Atribuição dos dados de RMN de ^{13}C (100,62 MHz, CDCl_3), RMN de ^1H (400,13 MHz, CDCl_3) e IE/EM m/z para o *p*-toluenossulfonato de 3-butenila (**11**).



C#	δ_{C} (ppm)	δ_{H} (ppm), multiplicidade, n° de H, J (Hz)
1	144,4 (C)	-
2 e 6	129,8 (2CH)	7,78, d, 2H, $J=8,4$
3 e 5	127,9 (2CH)	7,33, d, 2H, $J=8,0$
4	132,4 (C)	-
7	21,6 (CH_3)	2,45, s, 3H
1'	69,4 (CH_2)	4,05. t, 2H, $J=6,8$
2'	33,1 (CH_2)	2,37-2,43, ddt, 2H, $J=13,6; 6,8; 1,2$
3'	133,1 (CH)	5,62-5,73, ddt, 1H, $J=10; 6,8; 3,2$
4'	118,2 (CH_2)	5,05-5,11, m, 2H
IE/EM m/z (int. rel.): 226 (M^+, ausente), 155 (100), 91 (82), 54 (32).		

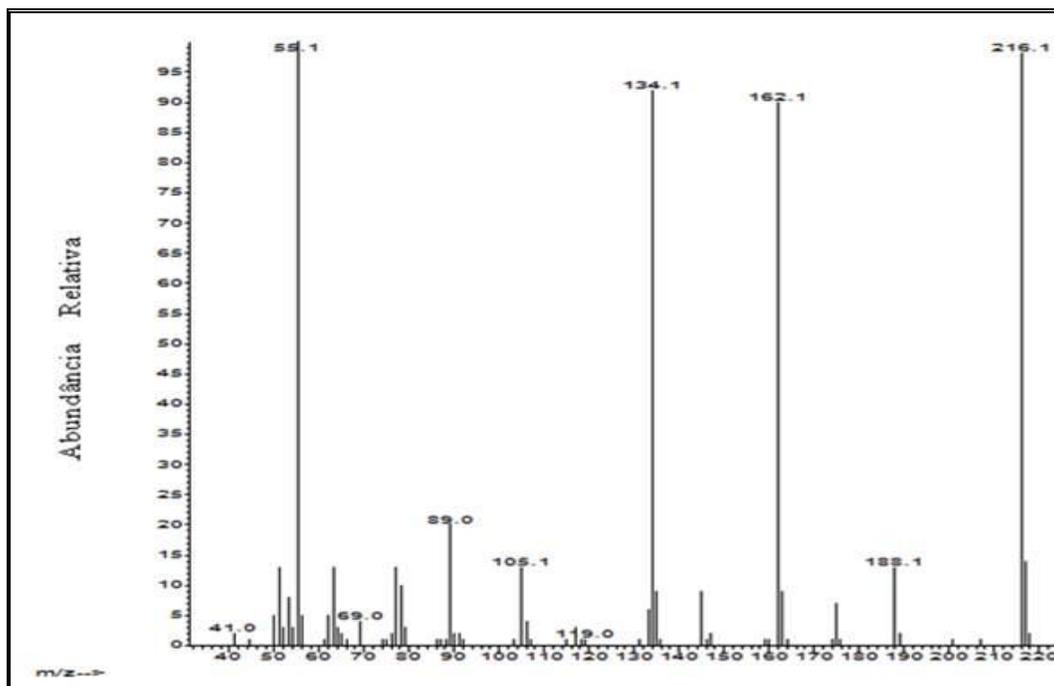


Espectro 4. Espectro de RMN de ^1H (499,88 MHz, CDCl_3) do *O*-(3-butenil)umbeliferona. (12).



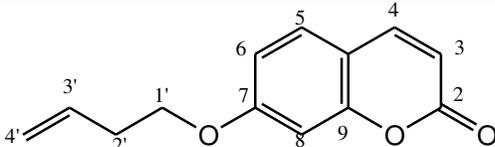
Espectro 5. Espectro de RMN de ^{13}C (125,69 MHz, CDCl_3) do *O*-(3-butenil)umbeliferona.

(12)

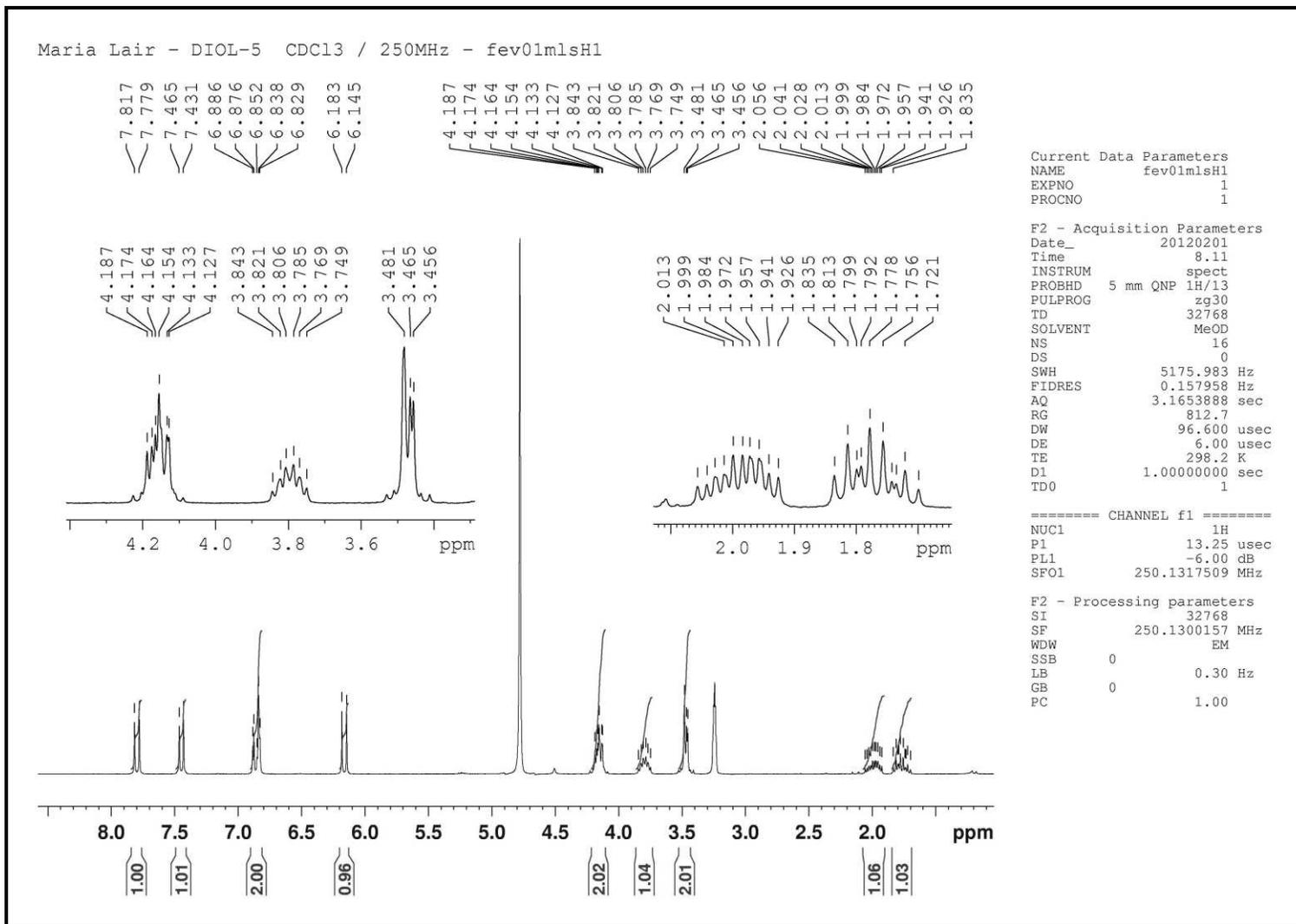


Espectro 6. Espectro de massas obtido por CG/EM da *O*-(3-butenil)umbeliferona. (12)

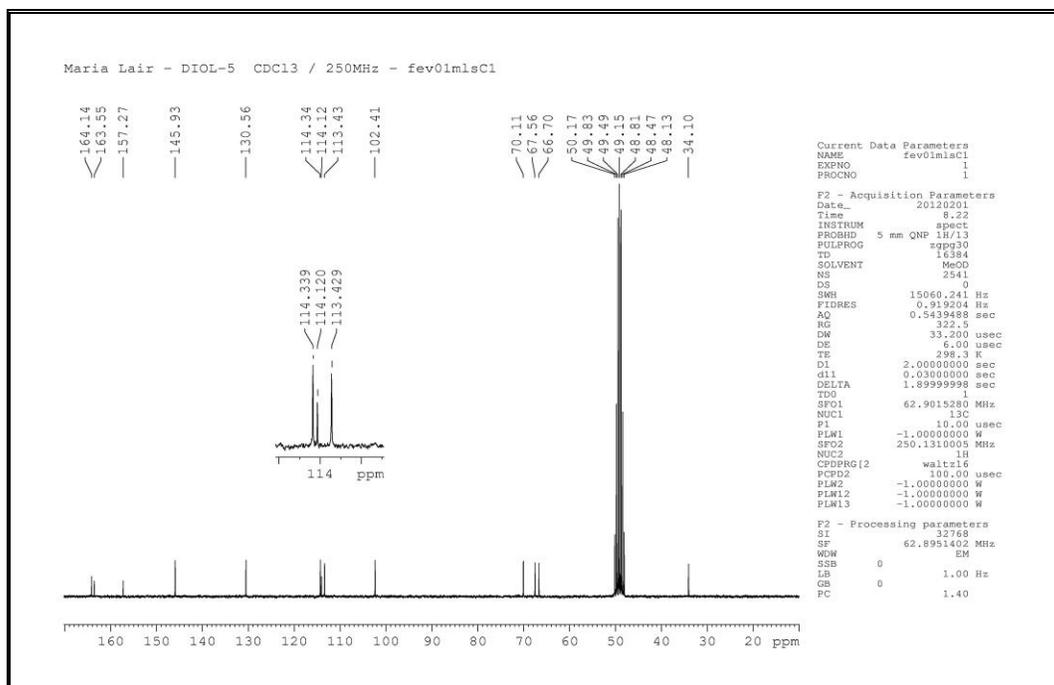
Tabela 10. Atribuição dos dados de RMN de ^{13}C (125,70 MHz, CDCl_3), RMN de ^1H (499,88 MHz, CDCl_3) e IE/EM m/z para o *O*-(3-butenil)umbeliferona (**12**).



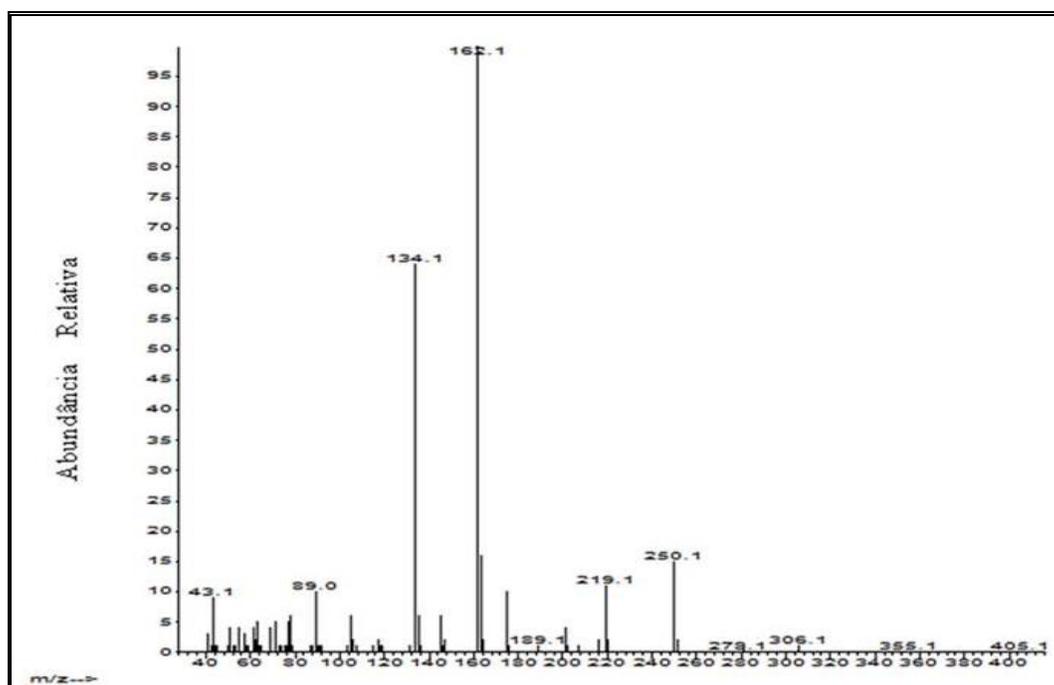
C#	δ_{C} (ppm)	δ_{H} (ppm), multiplicidade, n° de H, J (Hz)
2	162,2 (C)	-
3	112,6 ou 113,0 (CH)	6,24, d, H, $J=9,5$
4	143,4 (CH)	7,62, d, H, $J=9,5$
5	128,8(CH)	7,36, d, H, $J=9,0$
6	112,6 ou 113,0 (CH)	6,83-6,85, dd, H, $J=8,5; 2,0$
7	161,2 (C)	-
8	101,5 (CH)	6,80, d, H, $J=2,0$
9	155,9 (C)	-
10	117,6 (C)	-
1'	67,8 (CH_2)	4,06, t, 2H, $J=7,0$
2'	33,3 (CH_2)	2,56-2,60, ddt, 2H, $J=12,0; 7,0; 1,5$
3'	133,8 (CH)	5,86-5,94, ddt, H, $J=10,5; 6,5; 3,0$
4'	113,1 (CH_2)	5,17-5,21, 2H, m
IE/EM m/z (int. rel.): 216 (M^+ , 99), 188 (14), 162 (90), 134 (92), 105 (15), 89 (23), 69 (5), 55 (100), 41 (3).		



Espectro 7. Espectro de RMN de ^1H (250,13 MHz, MeOD) do (*S*)-(3,4-diidroxibutil)umbeliferona. (*S*)-**9**

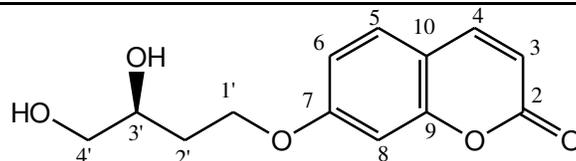


Espectro 8. Espectro de RMN de ^{13}C (62,89 MHz, CDCl_3) do (S)-(3,4-diidroxibutil)umbeliferona. ((S)-9)

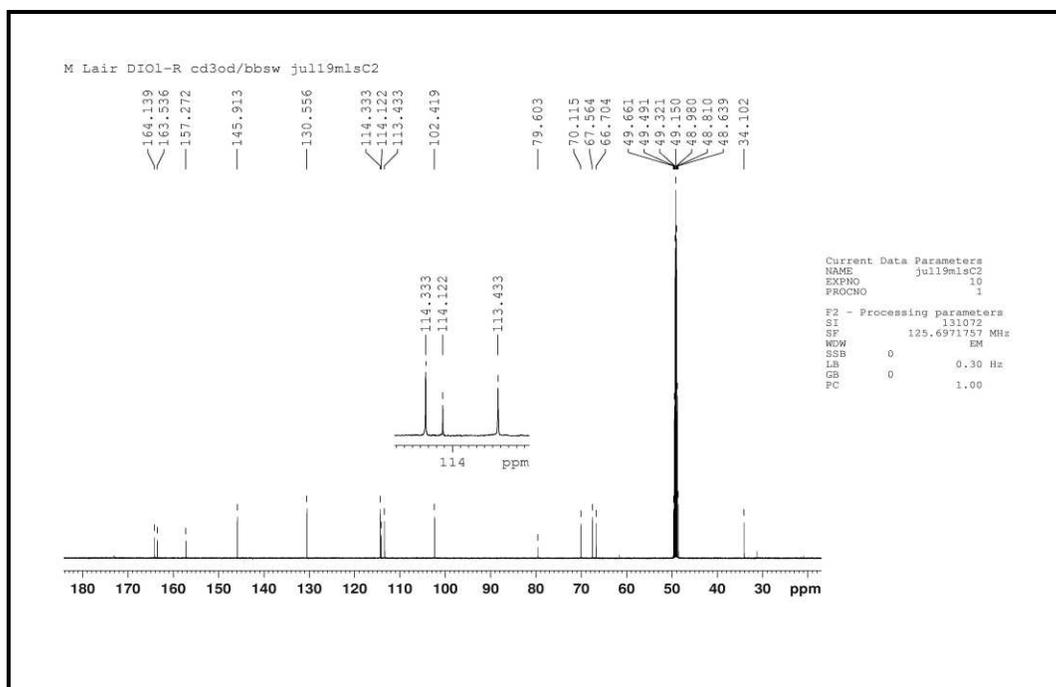


Espectro 9. Espectro de massas obtido por CG/EM do (S)-(3,4-diidroxibutil)umbeliferona. ((S)-9)

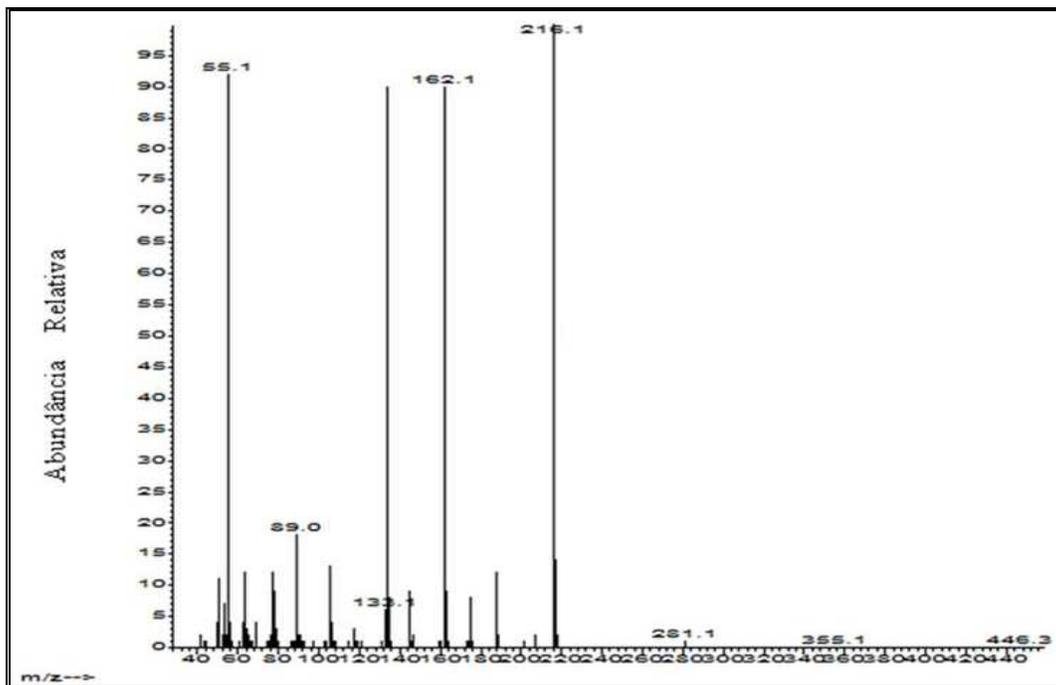
Tabela 11. Atribuição dos dados de RMN de ^{13}C (62,90 MHz, CD_3OD), RMN de ^1H (125,13 MHz, CD_3OD), IE/EM m/z e $[\alpha]_{\text{D}}^{20}$ para o (*S*)-(3,4-diidroxibutil)umbeliferona ((*S*)-**9**).



C#	δ_{C} (ppm)	δ_{H} (ppm), multiplicidade, n° de H, J (Hz)
2	164,1 (C)	-
3	113,4 (CH)	6,15, d, H, $J=9,5$
4	145,9 (CH)	7,78, t, H, $J=9,5$
5	130,6 (CH)	7,43, d, H, $J=8,5$
6	114,1 (CH)	6,85, m, H
7	163,6 (C)	-
8	102,4 (CH)	6,83, m, H
9	157,3 (C)	-
10	114,3 (C)	-
1'	66,7 (CH_2)	4,13-4,19, m, H
2'	34,1 (CH_2)	1,72-2,01, 2m, 2H
3'	70,1 (CH)	3,75-3,84, m, H
4'	67,6 (CH_2)	3,46-3,48, m, 2H
IE/EM m/z (int. rel.): 250 (M^+, 17), 219 (12), 162 (100), 134 (65), 89 (11), 43 (9).		
$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -17,4$ (c=0,55, CH_3OH)		

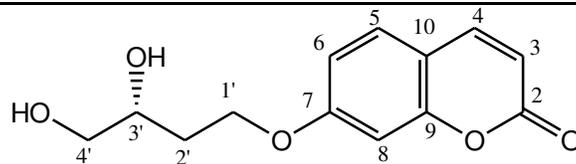


Espectro 11. Espectro de RMN de ^{13}C (125,70 MHz, CDCl_3) do (*R*)-(3,4-diidroxibutil)umbeliferona. (***R***-**9**)

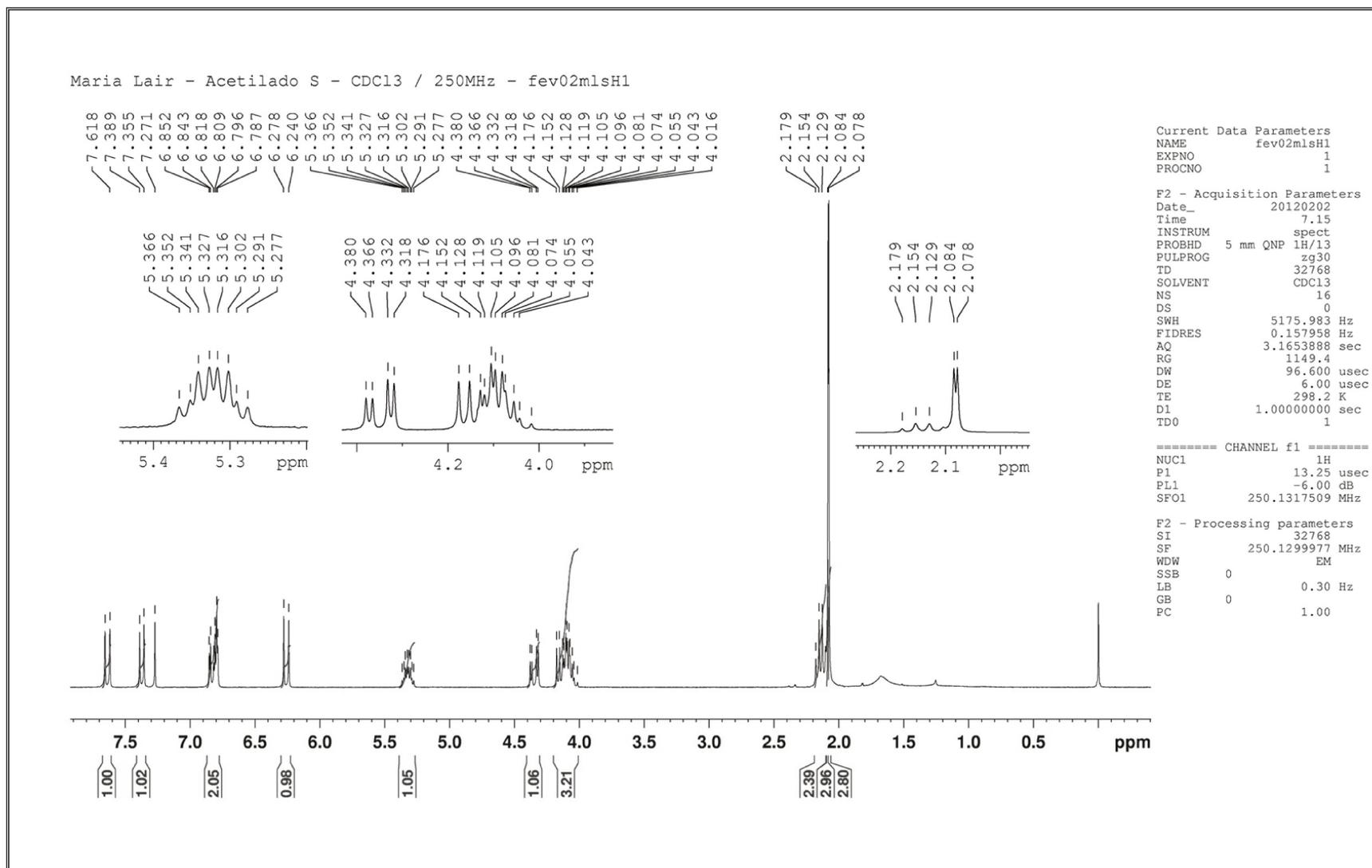


Espectro 12. Espectro de massas obtido por CG/EM do (*R*)-(3,4-diidroxibutil)umbeliferona. (***R***-**9**)

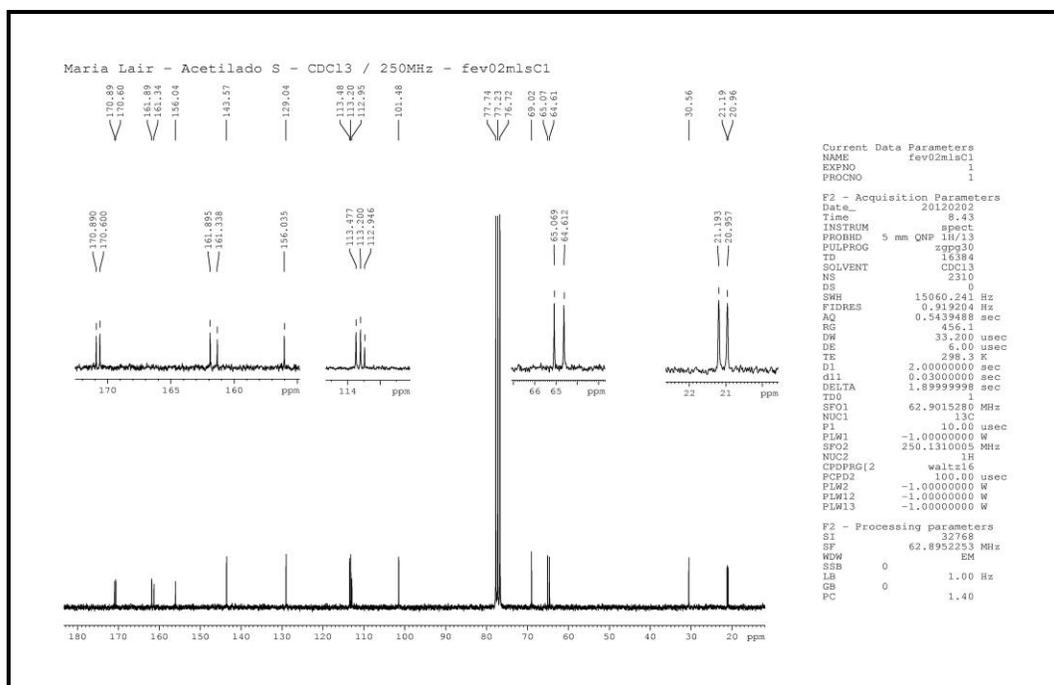
Tabela 12. Atribuição dos dados de RMN de ^{13}C (125,70 MHz, CD_3OD), RMN de ^1H (499,89 MHz, CD_3OD), IE/EM m/z e $[\alpha]_{\text{D}}^{20}$ para o (*R*)-(3,4-diidroxibutil)umbeliferona ((*R*)-**9**).



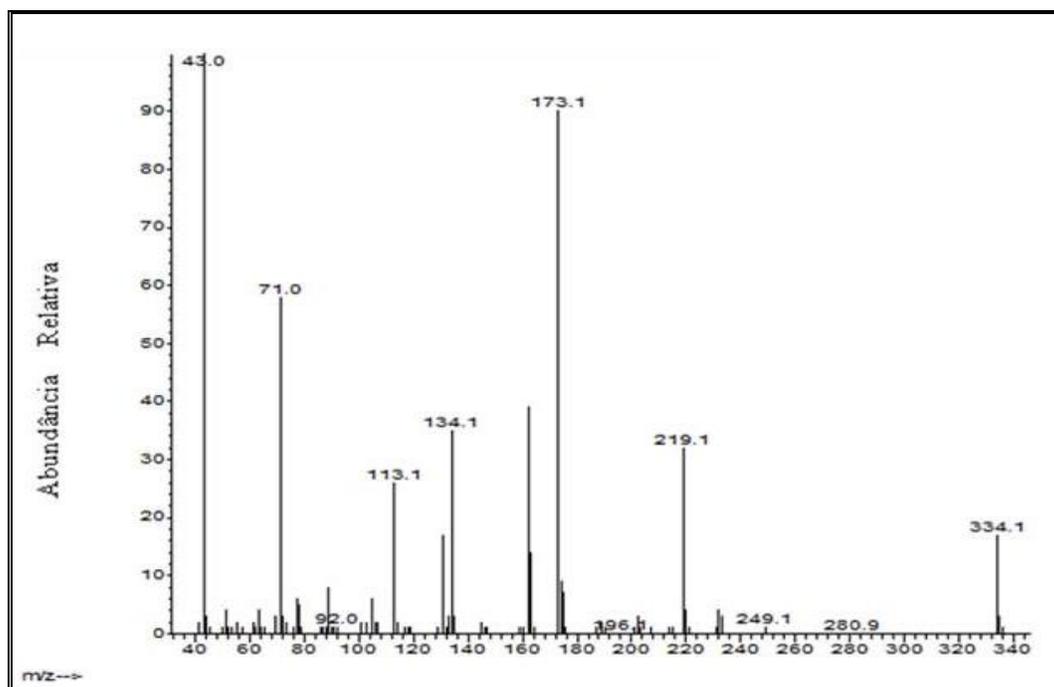
C#	δ_{C} (ppm)	δ_{H} (ppm), multiplicidade, n° de H, J (Hz)
2	164,1 (C)	-
3	113,4 (CH)	6,16, d, H, $J=9,5$
4	145,9 (CH)	7,79, t, H, $J=9,0$
5	130,6 (CH)	7,44, d, H, $J=9,0$
6	114,1 (CH)	6,86, dd, H, $J=8,5; 2,5$
7	163,5 (C)	-
8	102,4 (CH)	6,83, d, H, $J=2$
9	157,3 (C)	-
10	114,3 (C)	-
1'	66,8 (CH_2)	4,12-4,20, m, H
2'	34,1 (CH_2)	1,75-2,01, 2m, 2H
3'	70,1 (CH)	3,77-3,80, m, H
4'	67,6 (CH_2)	3,46-3,51, m, 2H
IE/EM m/z (int. rel.): 250 (M^+, ausente), 216 (100), 162 (90), 133 (7), 89 (18), 55 (92).		
$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +15,7$ (c=0,55, CH_3OH)		



Espectro 13. : Espectro de RMN de ^1H (250,23 MHz, CDCl_3) do (*S*)-(3,4-diacetoxibutil)umbeliferona ((*S*)-*I*).

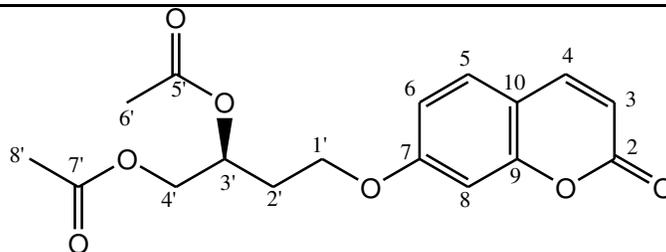


Espectro 14. : Espectro de RMN de ¹³C (62,89 MHz, CDCl₃) do (S)-(3,4-diacetoxibutil)umbeliferona ((S)-1).

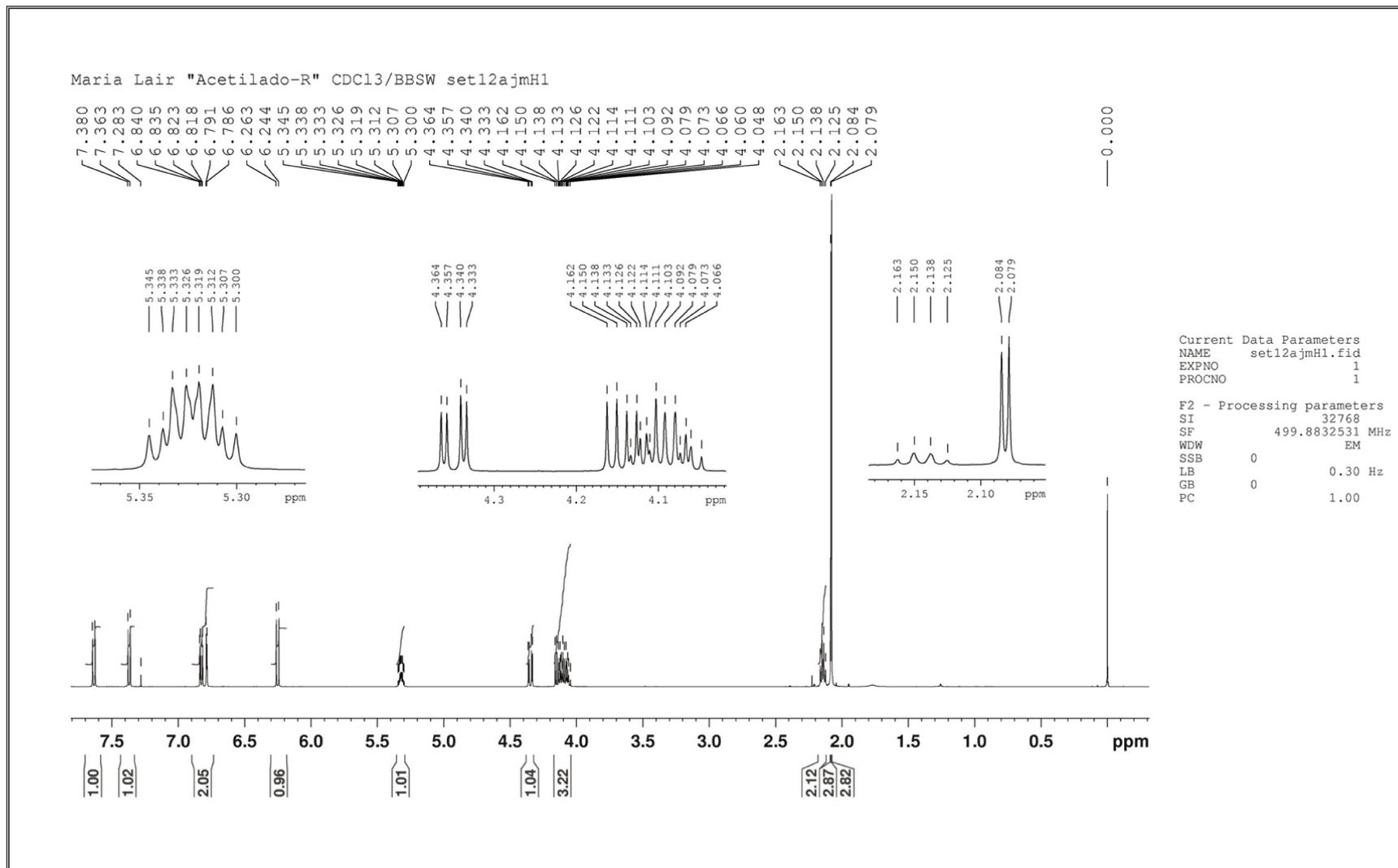


Espectro 15. Espectro de massas obtido por CG/EM do (S)-(3,4-diacetoxibutil)umbeliferona. ((S)-1)

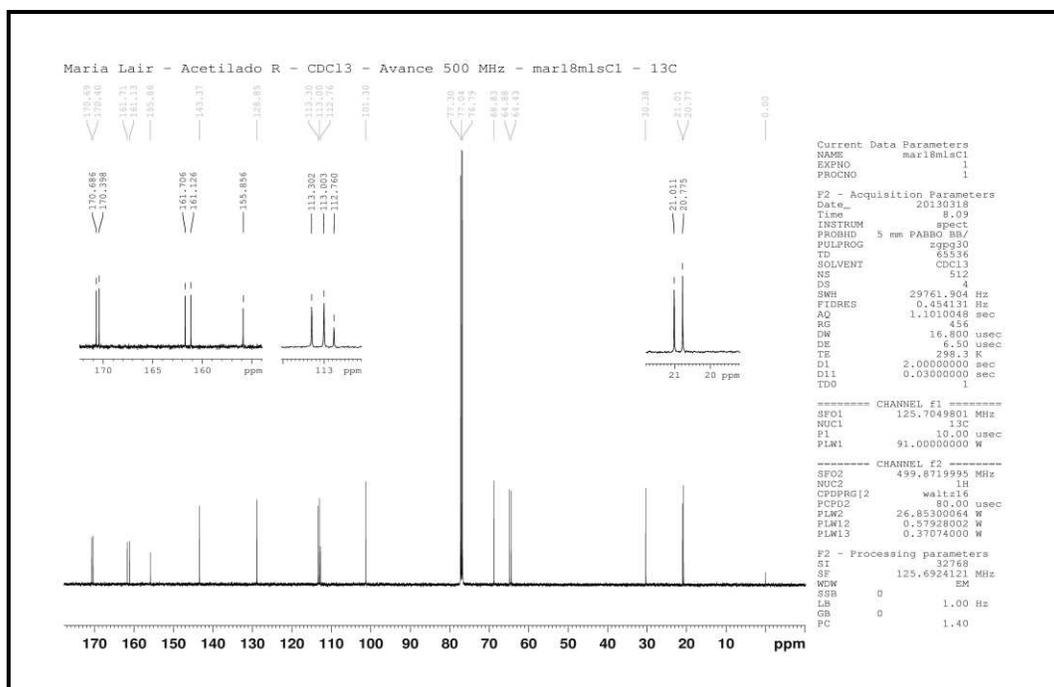
Tabela 13. Atribuição dos dados de RMN de ^{13}C (62,89 MHz, CDCl_3), RMN de ^1H (250,23 MHz, CDCl_3) e IE/EM m/z para o (*S*)-(3,4-diacetoxibutil)umbeliferona ((*S*)-**1**).



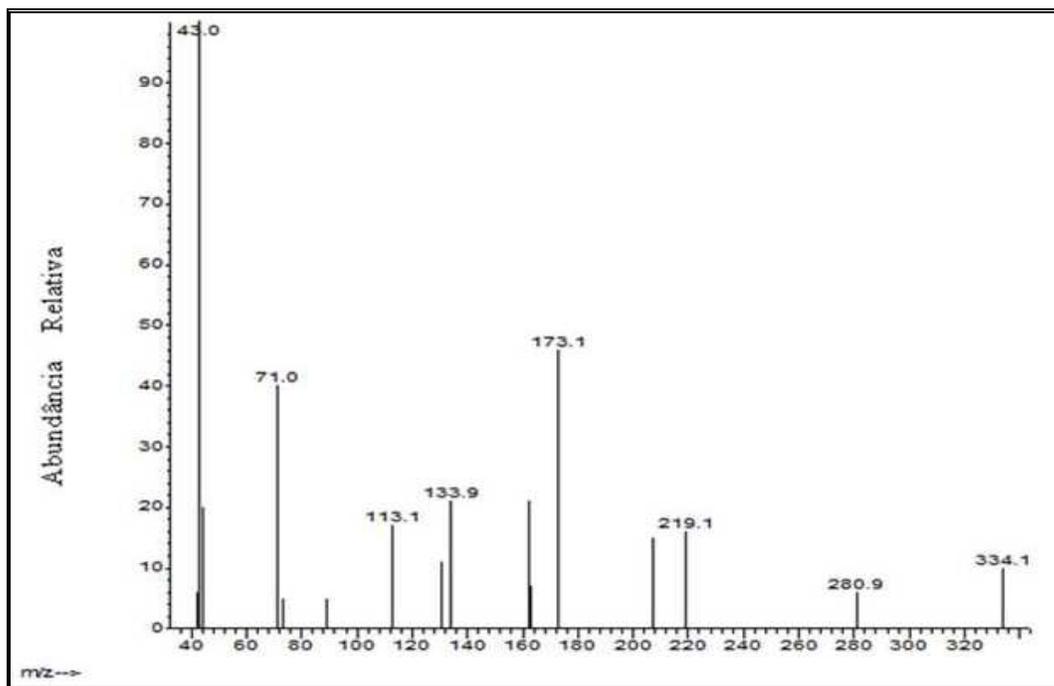
C#	δ_{C} (ppm)	δ_{H} (ppm), multiplicidade, n° de H, J (Hz)
2	161,9 (C)	-
3	113,5 (CH)	6,24, d, H, $J=9,5$
4	143,6 (CH)	7,62, d, H, $J=9,5$
5	129,0 (CH)	7,43, d, H, $J=8,5$
6	113,2 (CH)	6,79-6,85, m, H
7	161,3 (C)	-
8	101,5 (CH)	6,79-6,85, m, H
9	156,0 (C)	-
10	112,9 (C)	-
1'	64,6 ou 65,1 (CH_2)	4,02-4,38, 4H, m
2'	34,10 (CH_2)	2,13, t, 2H, $J=6,2$
3'	69,0 (CH)	3,75-3,84, m, H
4'	64,6 ou 65,1 (CH_2)	4,02-4,38, 4H, m
5'	170,6 ou 170,9 (C)	-
6'	20,9 ou 21,2 (CH_3)	2,07 ou 2,08, s, 3H
7'	170,6 ou 170,9 (C)	-
8'	20,9 ou 21,2 (CH_3)	2,07 ou 2,08, s, 3H
IE/EM m/z (int. rel.): 334 (M^+ , 19), 219 (35), 173 (91), 134 (35), 113 (25), 71 (57), 43 (100).		
$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -9,4$ (c=0,50; CHCl_3)		



Espectro 16. Espectro de RMN de ^1H (499,88 MHz, CDCl_3) do (*R*)-(3,4-diacetoxibutil)umbeliferona (**(*R*)-1**).

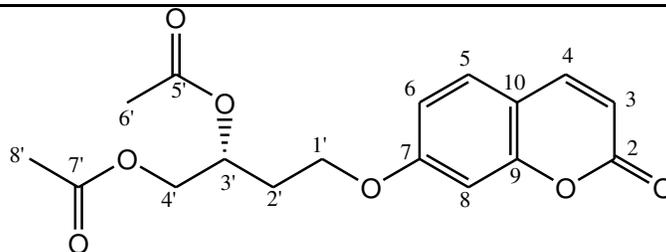


Espectro 17. Espectro de RMN de ^{13}C (125,69 MHz, CDCl_3) do (*R*)-(3,4-diacetoxibutil)umbeliferona (**(R)-1**).

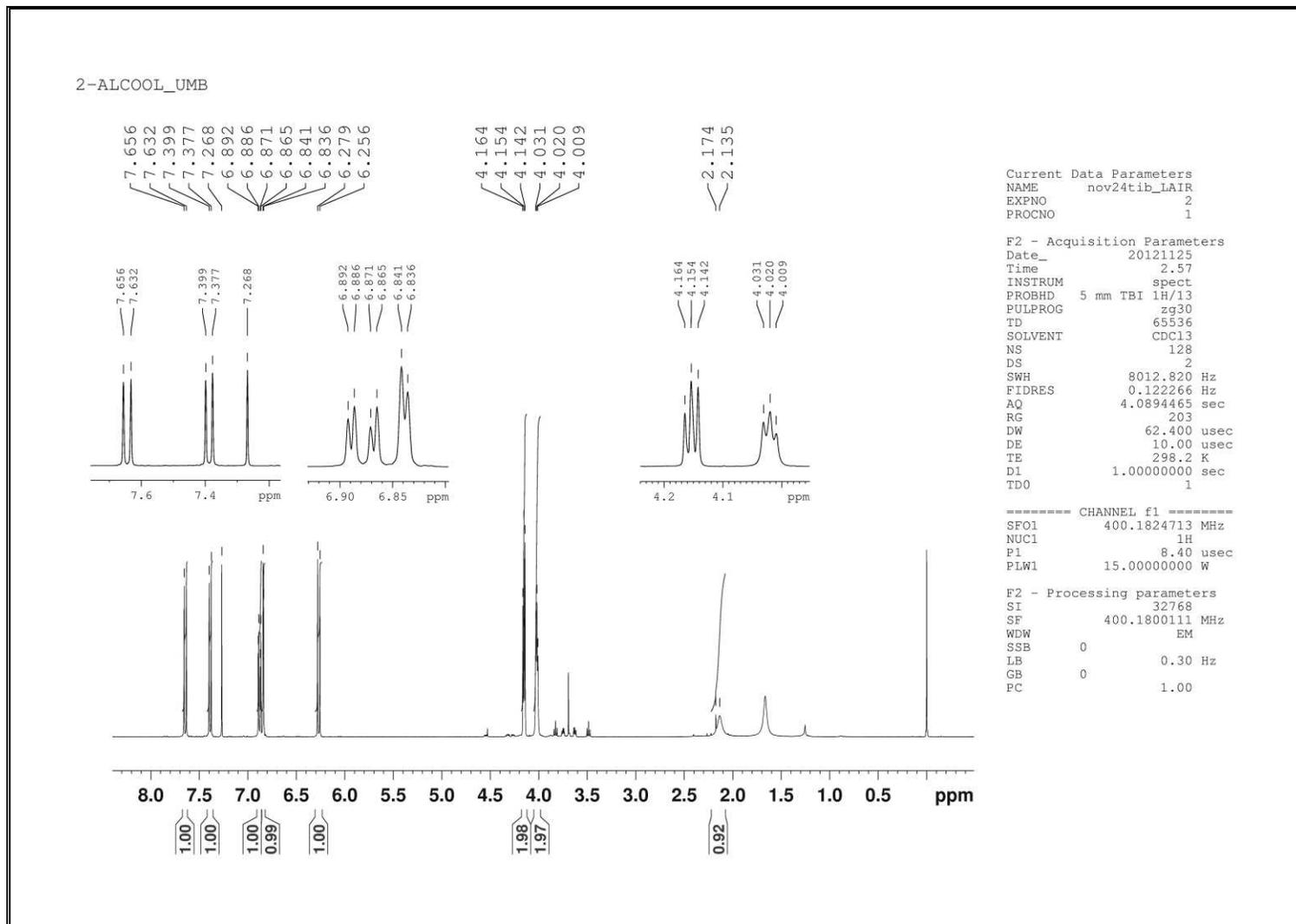


Espectro 18. Espectro de massas obtido por CG/EM do (*R*)-(3,4-diacetoxibutil)umbeliferona. (**(R)-1**)

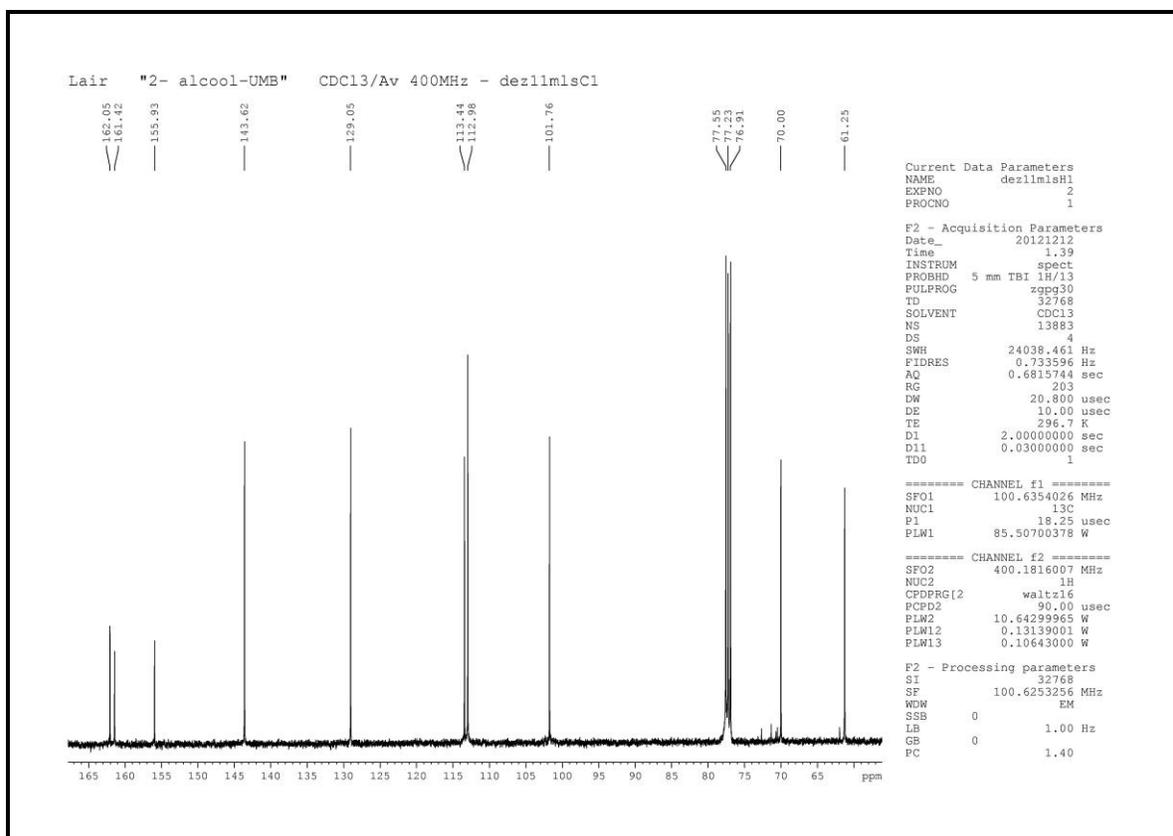
Tabela 14. Atribuição dos dados de RMN de ^{13}C (125,69 MHz, CDCl_3), RMN de ^1H (499,88 MHz, CDCl_3) e IE/EM m/z para o (*R*)-(3,4-diacetoxibutil)umbeliferona ((*R*)-1).



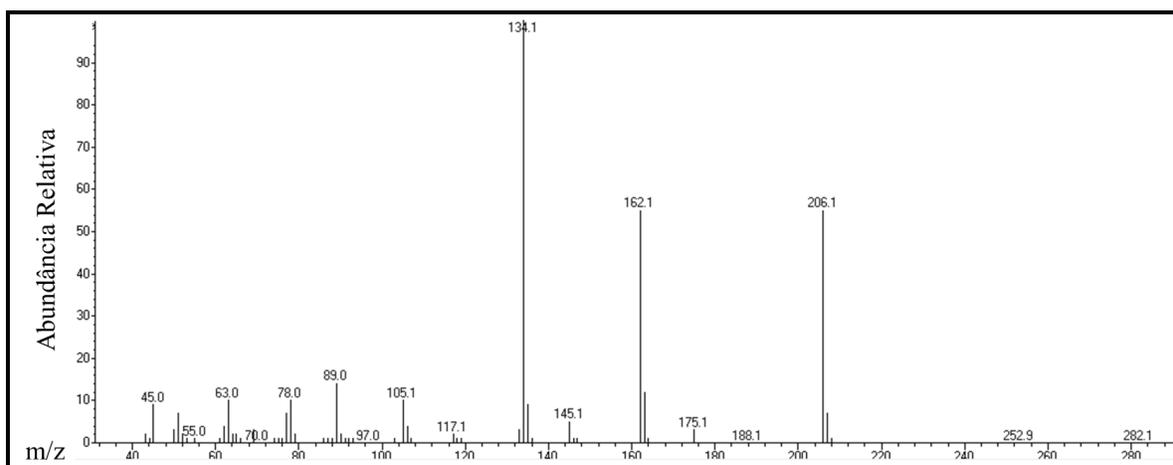
C#	δ_{C} (ppm)	δ_{H} (ppm), multiplicidade, n° de H, J (Hz)
2	161,7 (C)	-
3	113,3 (CH)	6,24, d, H, $J=9,5$
4	143,4 (CH)	7,62, d, H, $J=9,5$
5	128,9 (CH)	7,43, d, H, $J=8,5$
6	113,0 (CH)	6,79-6,82, m, H
7	161,1 (C)	-
8	101,3 (CH)	6,79-6,82, m, H
9	155,9 (C)	-
10	112,8 (C)	-
1'	64,4 ou 64,8 (CH_2)	4,04-4,36, 2H, m
2'	30,4 (CH_2)	2,14, m, 2H
3'	68,8 (CH)	5,30-5,34, m, H
4'	64,4 ou 64,8 (CH_2)	4,04-4,36, 2H, m
5'	170,4 ou 170,7 (C)	-
6'	20,7 ou 21,0 (CH_3)	2,07 ou 2,08, s, 3H
7'	170,4 ou 170,7 (C)	-
8'	20,7 ou 21,0 (CH_3)	2,07 ou 2,08, s, 3H
IE/EM m/z (int. rel.): 334 (M^+ , 10), 281 (7), 219 (17), 173 (49), 134 (21), 113 (19), 71 (41), 43 (100).		
$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +11,5$ (c=0,65; CHCl_3)		



Espectro 19. Espectro de RMN de ^1H (600,17 MHz, CDCl_3) do 2-(hidroxietyl)umbeliferona (**14**).

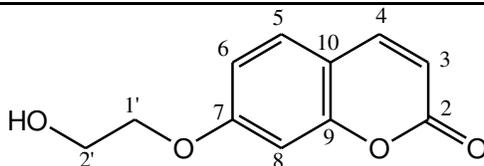


Espectro 20. Espectro de RMN de ^{13}C (100,63 MHz, CDCl_3) do 2-(hidroxietil)umbeliferona (**14**).

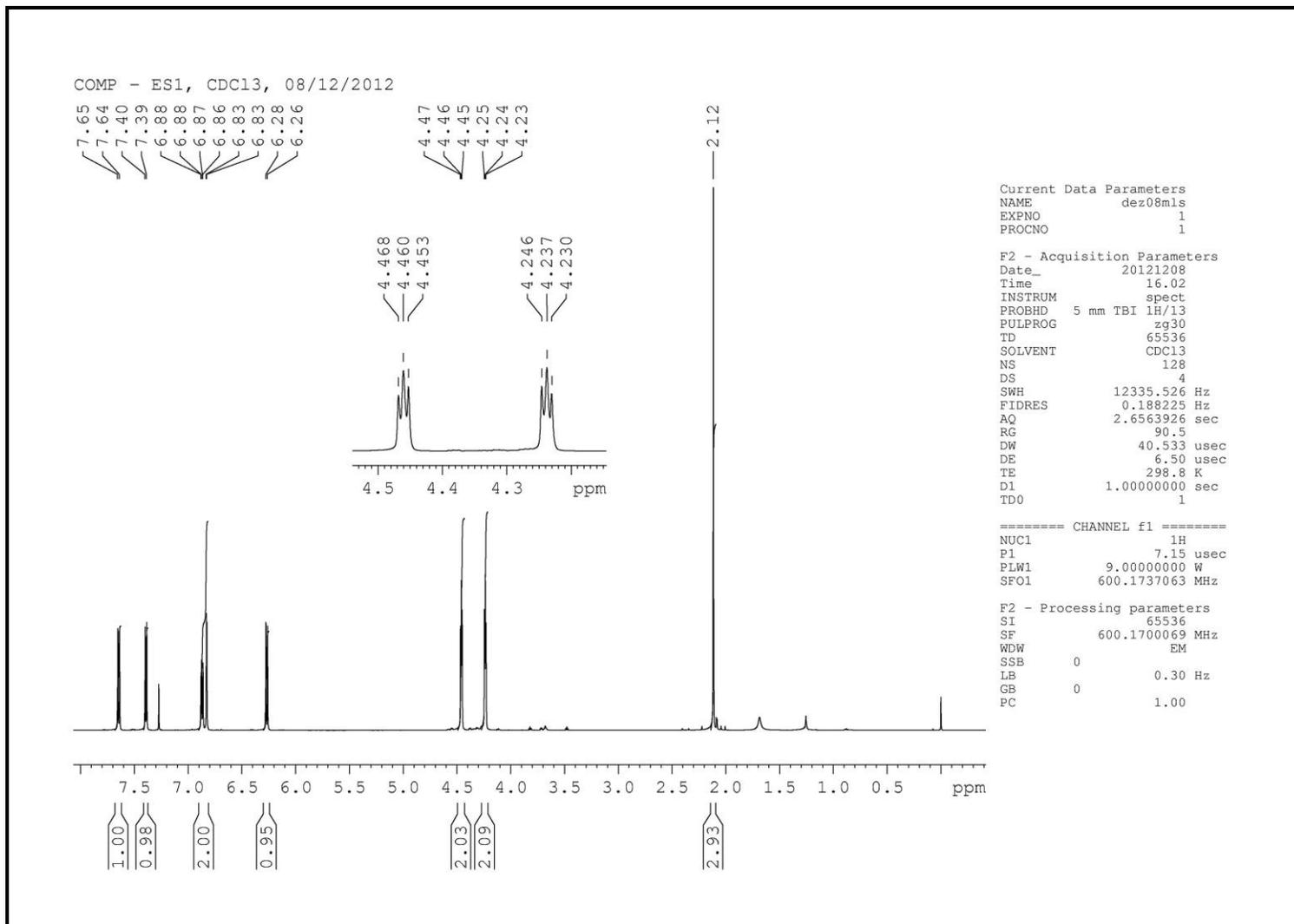


Espectro 21. Espectro de massas obtido por CG/EM do 2-(hidroxietil)umbeliferona (**14**).

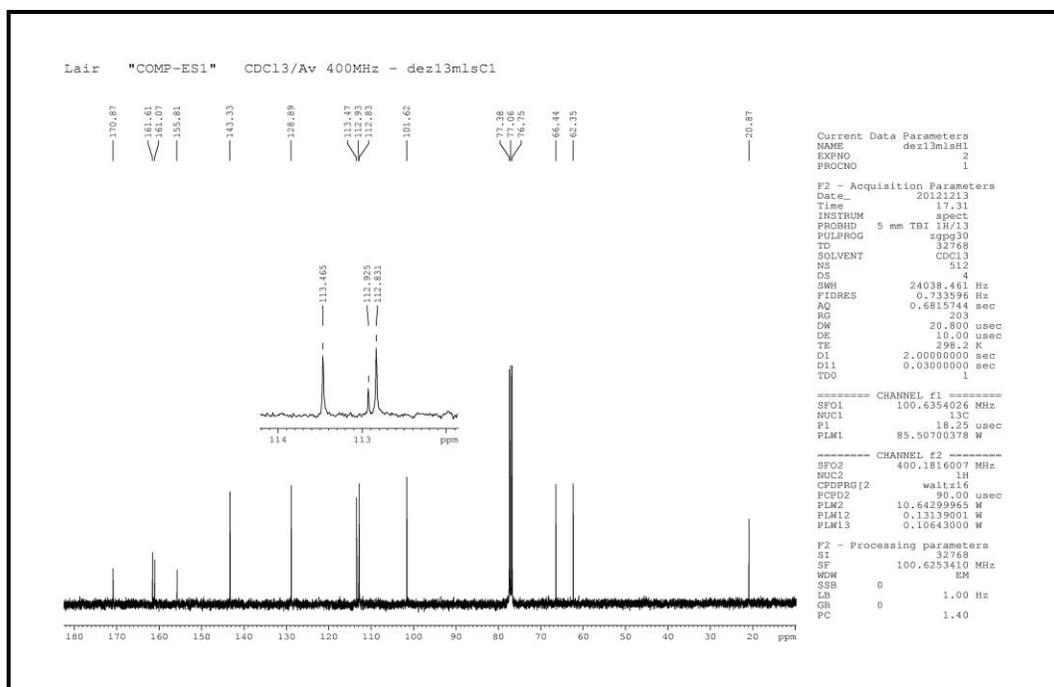
Tabela 15. Atribuição dos dados de RMN de ^{13}C (125,69 MHz, CDCl_3), RMN de ^1H (499,88 MHz, CDCl_3) e IE/EM m/z para o 2-(hidroxietil)umbeliferona (**14**).



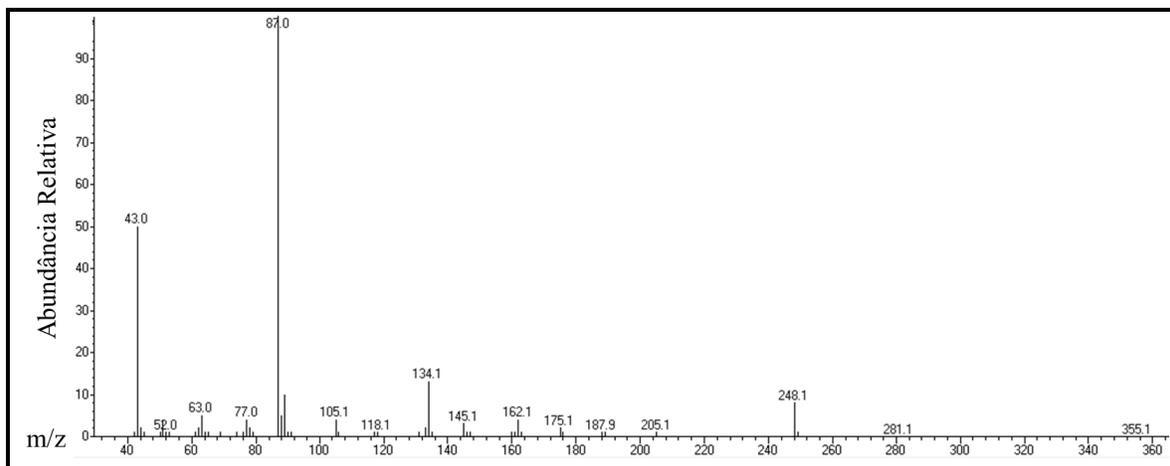
C#	δ_{C} (ppm)	δ_{H} (ppm), multiplicidade, n° de H, J (Hz)
2	161,7 (C)	-
3	113,3 (CH)	6,27, d, H, $J=9,2$
4	143,4 (CH)	7,63, d, H, $J=9,6$
5	128,9 (CH)	7,38, d, H, $J=8,8$
6	113,0 (CH)	6,86-6,89, dd, H, $J=8,4; 2,4$
7	161,1 (C)	-
8	101,3 (CH)	6,84, d, H, $J=2,0$
9	155,9 (C)	-
10	112,8 (C)	-
1'	64,4 ou 64,8 (CH_2)	4,01 ou 4,14, t, 2H, $J=4,5$
2'	30,4 (CH_2)	4,01 ou 4,14, t, 2H, $J=4,5$ e 2,13, s, OH
IE/EM m/z (int. rel.): 206 (M^+, 56), 162 (54), 134 (100), 89 (14), 78 (9), 63 (10), 45 (9).		



Espectro 22. Espectro de RMN de ^1H (600,17 MHz, CDCl_3) do 2-(acetoxietil)umbeliferona (**13**).

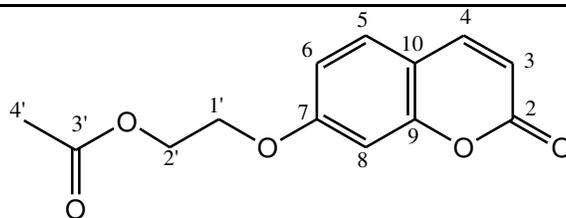


Espectro 23. Espectro de RMN de ^{13}C (100,62 MHz, CDCl_3) do 2-(acetoxietil)umbeliferona (**13**).



Espectro 24. Espectro de massas obtido por CG/EM do 2-(acetoxietil)umbeliferona (**13**)

Tabela 16. Atribuição dos dados de RMN de ^{13}C (100,62 MHz, CDCl_3), RMN de ^1H (600,17 MHz, CDCl_3) e IE/EM m/z para o 2-(acetoxietil)umbeliferona (**13**).



C#	δ_{C} (ppm)	δ_{H} (ppm), multiplicidade, n° de H, J (Hz)
2	161,6 (C)	-
3	113,4-112,8 (CH)	6,26, d, H, $J=12,0$
4	143,3 (CH)	7,64, d, H, $J=6,0$
5	128,9 (CH)	7,39, d, H, $J=6,0$
6	113,4-112,8 (CH)	6,83-6,88, m, H
7	161,1 (C)	-
8	101,6 (CH)	6,26, d, H, $J=12,0$
9	155,8 (C)	-
10	113,4-112,8 (C)	-
1'	66,4 (CH_2)	4,23 ou 4,45, t, 2H, $J=4,8$
2'	62,35 (CH_2)	4,23 ou 4,45, t, 2H, $J=4,8$
3'	170,9 (C)	-
4'	20,9 (CH_3)	2,12, s, 3H
IE/EM m/z (int. rel.): 248 (M^+ , 8), 134 (13), 87 (100), 43 (50)		

ANEXOS

Tabela 17. Percentuais de conversão dos micro-organismos isolados dos consórcios de NA das amostras não enriquecidas ao final de 72 horas.

Micro-organismo	% Conversão																	
	ES1			LIP			EP1			EP2			BV1			BV3		
	24h	48h	72h	24h	48h	72h	24h	48h	72h	24h	48h	72h	24h	48h	72h	24h	48h	72h
V-NA-1	0	0	1	1	3	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
V-NA-2	0	1	1	2	6	9	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
V-NA-3	0	1	1	4	8	10	1	2	2	0	0	0	1	1	1	0	0	0
V-NA-4	0	0	0	1	2	4	1	3	4	0	0	0	2	4	5	10	8	3
V-NA-5	0	0	0	1	2	3	1	2	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0
V-NA-6	0	0	0	2	4	6	1	3	4	0	0	0	1	1	0	0	0	0
V-NA-7	16	34	42	38	47	51	0	0	1	0	0	0	14	25	34	5	16	24
V-NA-8	8	16	20	19	32	41	0	1	1	0	0	0	26	51	69	13	31	42
V-NA-9	32	47	55	22	35	46	1	2	2	0	0	0	24	57	80	8	24	34
V-NA-10	0	0	0	0	1	1	1	2	3	0	0	0	1	1	1	11	10	9
V-NA-11	3	5	6	22	40	55	0	0	0	0	0	0	24	45	62	14	30	40
V-NA-12	0	1	1	3	8	10	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0
V-NA-13a	1	2	2	5	11	15	1	3	9	0	0	0	0	1	1	0	0	0
V-NA-13b	4	9	14	5	11	15	1	4	8	0	0	0	0	0	0	1	1	2
V-NA-14	49	48	50	>99	>99	>99	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1	9	10
V-NA-15	42	56	61	58	77	88	4	5	6	0	0	0	4	7	9	9	15	21
V-NA-16	1	1	1	4	14	20	2	4	5	0	0	0	1	3	3	5	6	7
V-NA-17	35	61	73	38	62	72	4	4	7	2	0	0	40	62	71	24	48	67
V-NA-18b	2	3	3	15	24	30	4	5	6	18	22	24	0	0	0	0	1	3
V-NA-19	8	16	21	67	80	82	0	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1
V-NA-20	1	1	2	9	15	19	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5	6	7
V-NA-21	53	58	58	55	76	83	2	2	3	0	0	0	1	2	2	3	6	9
V-NA-22	>99	>99	>99	1	2	2	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	1	2

Tabela 18. Percentuais de conversão dos micro-organismos isolados dos consórcios de TSA das amostras não enriquecidas ao final de 72 horas.

Micro-organismo	% Conversão																		
	EST			LIP			EP1			EP2			BV1			BV3			
	24	48	72	24	48	72	24	48	72	24	48	72	24	48	72	24	48	72	
V-TSA-1	2	7	17	6	11	15	2	3	3	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1
V-TSA-2	1	0	1	12	28	38	0	0	0	0	0	0	1	3	4	8	7	7	7
V-TSA-3	0	0	0	7	13	16	1	2	3	0	0	1	1	3	3	0	1	2	2
V-TSA-4	9	15	17	18	28	34	3	3	2	21	48	26	0	0	0	1	1	3	3
V-TSA-5	6	12	13	13	19	23	1	0	1	15	18	19	0	0	0	0	0	2	2
V-TSA-6	82	87	88	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	3	3
V-TSA-7	45	71	86	58	72	74	0	0	0	0	0	0	47	67	76	33	41	44	44
V-TSA-8	>99	>99	>99	54	66	67	1	0	1	4	4	4	0	0	0	1	1	2	2
V-TSA-9	0	0	0	14	23	27	0	0	0	0	0	0	1	2	2	8	7	7	7
V-TSA-10	57	76	80	36	57	67	0	0	0	0	0	0	71	97	>99	32	43	51	51
V-TSA-11	17	33	46	38	52	59	1	0	0	0	0	1	0	0	1	1	4	6	6
V-TSA-12	0	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1	2	8	9	9	9
V-TSA-13	9	8	xx	45	52	xx	0		0	0	0	0	2	5	7	14	14	17	17
V-TSA-14	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
V-TSA-15	13	29	43	30	44	50	0	1	1	0	0	1	0	1	1	1	4	9	9
V-TSA-15'	6	10	15	74	81	81	5	5	5	36	48	53	0	0	0	1	2	2	2
V-TSA-16	13	19	25	17	22	25	4	3	3	37	43	45	0	0	0	1	3	3	3
V-TSA-17	4	8	12	2	4	5	0	1	1	1	1	2	0	1	2	1	3	3	3
V-TSA-18a	4	6	8	2	3	4	0	0	0	0	1	1	0	1	1	2	2	2	2
V-TSA-18b	2	4	7	49	65	69	4	4	3	32	41	44	0	0	0	1	1	1	1
V-TSA-18'	1	2	2	43	49	54	0	0	0	0	1	1	1	2	2	3	5	5	5
V-TSA-19	1	2	3	1	1	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1
V-TSA-20	6	11	17	30	39	42	7	6	6	37	44	47	0	0	0	1	1	2	2

Tabela 19. Percentuais de conversão dos micro-organismos isolados dos consórcios de YMA das amostras não enriquecidas ao final de 72 horas.

Micro-organismo	% Conversão																	
	ES1			LIP			EP1			EP2			BV1			BV3		
	24h	48h	72h	24h	48h	72h	24h	48h	72h	24h	48h	72h	24h	48h	72h	24h	48h	72h
V-YMA-1																		
V-YMA-2	1	1	3	3	8	11	1	1	1	0	0	0	1	2	3	8	8	7
V-YMA-3	0	1	1	3	5	7	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0
V-YMA-4																		
V-YMA-5	39	70	79	20	34	46	0	0	0	4	4	4	32	54	62	17	33	39
V-YMA-6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
V-YMA-7	40	69	83	60	72	76	0	1	1	0	0	0	3	4	5	7	9	11
V-YMA-8	56	94	>99	48	57	65	0	0	0	3	3	3	17	26	30	18	29	34
V-YMA-9																		
V-YMA-10A	6	12	16	8	16	23	0	0	0	1	1	1	15	28	37	8	16	22
V-YMA-10B	18	33	39	26	46	62	0	0	0	1	2	2	22	43	53	8	19	27
V-YMA-11	1	1	1	1	2	2	0	0	0	0	0	0	0	1	1	5	6	7
V-YMA-12	80	81	82	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	2
V-YMA-13	1	1	1	1	2	2	0	0	0	0	0	0	1	1	1	5	7	7
V-YMA-14	13	20	21	66	77	85	2	2	3	13	14	14	0	0	0	0	1	2
V-YMA-15	38	56	63	87	>99	>99	0	0	0	3	3	3	43	68	80	22	35	44
V-YMA-16	1	3	4	28	35	40	4	3	3	12	14	14	0	0	0	1	1	2
V-YMA-17	1	2	2	6	12	18	1	1	1	1	1	1	19	37	48	16	30	40
V-YMA-18	>99	>99	>99	1	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1	3	4
V-YMA-19	1	1	2	38	45	47	2	2	4	0	0	0	8	16	22	11	15	19
V-YMA-20A	2	3	4	32	37	38	2	4	6	0	0	0	12	22	29	13	19	24
V-YMA-20B	79	81	85	0	0	0	1	2	4	0	0	0	0	0	0	1	1	2
V-YMA-21A	1	1	2	37	41	44	2	4	6	0	0	0	9	17	24	11	15	20

V-YMA-21B	1	1	1	23	33	37	2	3	4	0	0	0	5	14	21	10	15	20
V-YMA-22A	20	35	43	39	43	45	3	4	6	1	1	2	31	57	76	20	36	49
V-YMA-22B	85	88	89	0	0	0	1	2	4	0	0	0	0	0	1	0	1	1
V-YMA-23	1	3	4	41	46	49	8	8	9	32	36	37	0	0	0	1	1	2
V-YMA-24	1	2	2	6	12	18	1	1	1	1	1	1	19	37	48	16	30	40
V-YMA-25	0	0	0	0	0	0	1	3	3	0	1	1	0	0	0	0	1	1

Tabela 20. Percentuais de conversão dos micro-organismos isolados dos consórcios de NA das amostras enriquecidas ao final de 72 horas.

Micro-organismo	% Conversão																	
	EST			LIP			EP1			EP2			BV1			BV3		
	24	48	72	24	48	72	24	48	72	24	48	72	24	48	72	24	48	72
E1-NA-1	0	1	0	0	0	1	2	4	5	0	0	1	0	0	0	0	3	5
E1-NA-2	46	84	91	52	66	67	1	2	2	0	0	0	23	33	39	17	31	43
E1-NA-3	16	17	Xx	39	47	xx	0	0	0	4	3	2	30	52	66	23	38	52
E1-NA-4	78	78	Xx	1	1	xx	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
E1-NA-5	11	11	xx	50	59	xx	0	0	0	6	7	5	40	68	84	11	23	31
E1-NA-6	38	38	xx	1	1	xx	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	2
E1-NA-7a	12	12	xx	10	16	xx	0	0	0	0	0	0	4	5	7	10	10	13
E1-NA-7b	49	49	xx	0	0	xx	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
E1-NA-8	73	73	xx	1	2	xx	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1
E2-NA-1	68	70	xx	0	0	xx	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1
E2-NA-2	4	4	xx	45	54	xx	0	0	0	2	2	0	19	31	37	14	24	30
E2-NA-3	46	47	xx	2	2	xx	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
E2-NA-4	39	39	xx	1	1	xx	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
E2-NA-5	29	59	72	55	75	80	1	1	2	1	1	1	10	18	23	11	22	28
E2-NA-6	0	0	0	1	1	2	0	0	0	0	0	1	1	1	1	10	9	10
E2-NA-7	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0
E2-NA-8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	2	0	0	0	0	0	1
E2-NA-9	2	6	11	60	70	72	0	1	2	0	1	1	0	0	0	2	3	3
E3-NA-1	45	48	49	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
E3-NA-2	32	53	61	58	67	72	1	2	2	1	1	1	40	70	88	19	35	48
E3-NA-3	41	43	44	2	2	2	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
E3-NA-4	0	0	0	0	1	2	0	1	1	0	0	0	1	2	1	9	9	10

E3-NA-5	98	>99	>99	1	1	1	0	1	2	0	0	0	0	1	0	0	0	0
E3-NA-6	1	2	2	2	2	2	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	3	6
E3-NA-7	1	3	5	62	70	72	0	1	2	0	0	0	0	0	0	0	1	2
E3-NA-8	1	3	6	61	73	77	0	0	1	0	0	0	0	1	1	2	2	2
E3-NA-9	0	0	0	1	2	2	0	0	0	0	0	0	1	1	1	8	9	9
E3-NA-10	0	0	0	1	2	3	0	0	0	0	1	1	1	1	1	9	9	9
E3-NA-11	7	13	16	64	91	96	0	0	0	1	2	2	32	53	67	28	46	55
E3-NA-12	2	7	11	62	73	77	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	2	2

Tabela 21. Percentuais de conversão dos micro-organismos isolados dos consórcios de TSA das amostras enriquecidas ao final de 72 horas.

Micro-organismo	% Conversão																	
	EST			LIP			EP1			EP2			BV1			BV3		
	24h	48h	72h	24h	48h	72h	24h	48h	72h	24h	48h	72h	24h	48h	72h	24h	48h	72h
E1-TSA-1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
E1-TSA-2	5	6	7	14	26	35	0	0	0	4	7	8	13	21	27	16	25	32
E1-TSA-3	78	82	85	0	0	0	2	3	3	0	0	0	0	0	0	2	6	8
E1-TSA-4	6	8	9	6	9	11	3	4	5	0	1	1	4	8	12	12	18	24
E1-TSA-5	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
E1-TSA-6	>99	>99	>99	1	1	1	1	2	3	0	0	0	0	0	0	0	0	1
E1-TSA-7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
E1-TSA-8	6	11	15	1	3	4	2	3	3	1	1	2	27	49	68	9	18	27
E1-TSA-9	56	74	77	84	>99	>99	1	1	2	1	1	1	38	53	61	28	41	50
E1-TSA-10a	48	54	55	50	73	83	1	1	1	4	4	4	62	85	95	44	60	68
E1-TSA-10b	91	93	98	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	4
E1-TSA-11	6	12	17	3	6	8	1	1	1	0	1	1	24	44	59	11	22	32
E1-TSA-12	16	28	33	73	88	93	0	0	0	4	4	3	71	>99	>99	57	72	76
E1-TSA-13a	10	20	25	55	69	73	0	0	0	2	2	2	57	82	92	35	50	57
E1-TSA-13b	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
E2-TSA-1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
E2-TSA-2	6	8	7	14	22	27	2	5	7	0	0	0	5	7	8	11	12	13
E2-TSA-3	29	52	59	64	73	73	2	4	5	3	3	4	40	59	72	31	48	59
E2-TSA-4	93	>99	>99	69	81	83	4	7	11	5	5	7	32	42	50	54	73	85
E2-TSA-5	0	0	0	0	0	0	2	4	5	1	1	2	0	0	0	0	0	0
E2-TSA-6	82	>99	>99	63	73	76	4	7	10	9	9	10	65	68	69	70	82	88
E3-TSA-1	6	7	9	9	13	18	3	7	8	1	2	3	1	1	1	11	11	11
E3-TSA-2	82	>99	>99	54	65	69	2	4	6	7	7	6	73	80	80	72	89	97

E3-TSA-3	96	>99	>99	54	63	65	2	3	5	3	3	3	42	60	72	50	63	73
E3-TSA-4	0	0	0	0	0	0	1	3	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0
E3-TSA-5	0	0	0	1	1	1	0	0	0	4	7	6						
E3-TSA-6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1
E3-TSA-7	56	87	95	74	95	>99	0	0	0	3	3	3	61	82	85	43	60	68
E3-TSA-8	0	0	0	1	1	2	0	0	0	0	0	0	1	1	1	8	8	8
E3-TSA-9	1	4	8	40	56	60	0	0	0	0	0	0						
E3-TSA-10	50	73	82	53	65	70	0	0	0	2	2	1	45	60	68	34	46	51

Tabela 22. Percentuais de conversão dos micro-organismos isolados dos consórcios de YMA das amostras enriquecidas ao final de 72 horas.

Micro-organismo	% Conversão																	
	EST			LIP			EP1			EP2			BV1			BV3		
	24h	48h	72h	24h	48h	72h	24h	48h	72h	24h	48h	72h	24h	48h	72h	24h	48h	72h
E1-YMA-1	80	81	82	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	2
E1-YMA-2																		
E1-YMA-3																		
E1-YMA-4	>99	>99	>99	1	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1	3	4
E1-YMA-5	1	1	2	38	45	47	2	2	4	0	0	0	8	16	22	11	15	19
E1-YMA-6A	2	3	4	32	37	38	2	4	6	0	0	0	12	22	29	13	19	24
E1-YMA-6B	79	81	85	0	0	0	1	2	4	0	0	0	0	0	0	1	1	2
E1-YMA-7																		
E1-YMA-8																		
E2-YMA-1																		
E2-YMA-2	1	1	2	37	41	44	2	4	6	0	0	0	9	17	24	11	15	20
E2-YMA-3	1	1	1	23	33	37	2	3	4	0	0	0	5	14	21	10	15	20
E2-YMA-4	20	35	43	39	43	45	3	4	6	1	1	2	31	57	76	20	36	49
E2-YMA-5																		
E2-YMA-6	85	88	89	0	0	0	1	2	4	0	0	0	0	0	1	0	1	1
E2-YMA-6*																		
E2-YMA-7	1	3	4	41	46	49	8	8	9	32	36	37	0	0	0	1	1	2
E3-YMA-1																		
E3-YMA-2	0	1	2	1	3	4	0	0	0	4	5	6	0	0	0	0	0	0
E3-YMA-3	20	37	46	66	73	78	2	2	2	1	2	2	24	39	48	16	28	34
E3-YMA-4																		
E3-YMA-5	1	1	1	49	59	63	1	2	4	0	0	0	7	13	17	10	15	17
E3-YMA-6	0	1	1	47	63	74	3	5	8	0	0	0	11	21	28	12	18	21

E3-YMA-7	71	74	73	0	0	1	3	4	6	0	0	0	0	0	0	-2	0	2
E3-YMA-8	0	1	1	38	53	61	3	6	8	0	0	0	3	5	9	4	9	13
E3-YMA-9	26	43	51	60	62	64	3	5	6	2	2	2	41	55	62	25	37	43
E3-YMA-10	51	74	82	50	53	57	4	6	8	2	2	3	32	51	62	16	25	29
E3-YMA-11	6	11	14	1	3	6	2	3	3	2	2	2	1	2	3	0	0	0
E3-YMA-12	2	2	3	2	2	2	1	0	2	0	0	0	0	0	1	0	4	7
E3-YMA-13	38	62	73	47	51	55	0	0	0	0	0	0	16	26	33	14	24	30
E3-YMA-14	53	56	55	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
E3-YMA-15																		